

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
**XXIX Dottorato di Ricerca in Biomedicina**  
**Traslazionale**

*Coordinatore: Prof. Lorenzo Malatino*

---

**Dott.ssa Emanuela Cannata**

**CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DELL'HLA E DEL  
PATTERN AMINOACIDICO NEI BAMBINI AFFETTI DA  
LLA E TRATTATI CON L-ASPARAGINASI NEL  
PROTOCOLLO AIEOP-LLA 2009**

---

**Tesi di Dottorato**

---

**Relatore:**

**Chiar. mo Prof. A. Di Cataldo**

---

**Anno Accademico 2015 – 2016**

## **Indice**

<i>Abstract</i> .....	3
<i>Background e rationale</i> .....	6
<i>Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA)</i> .....	8
<i>Predisposizione alla LLA</i> .....	12
<i>Presentazione clinica</i> .....	14
<i>Approccio diagnostico</i> .....	15
<i>Malattia residua minima</i> .....	19
<i>Classificazione fasce di rischio</i> .....	21
<i>Trattamento</i> .....	29
<i>Studi randomizzati</i> .....	35
<i>Asparaginasi</i> .....	36
<i>Tossicità da Asparaginasi</i> .....	44
<i>Asparaginasi e AIEOP LLA2009</i> .....	52
<i>Materiali e Metodi</i> .....	53
<i>Risultati</i> .....	57
<i>Discussione</i> .....	62
<i>Conclusioni</i> .....	68
<i>Tabella e figure</i> .....	70
<i>Bibliografia</i> .....	94

## **Abstract**

La L-Asparaginasi è un farmaco cardine nel trattamento della Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA). Essa esplica la propria attività antileucemica mediante la deplezione dell'asparagina, aminoacido essenziale per i linfoblasti, che sono incapaci di sintetizzarlo. Esistono due forme: una di origine batterica (da Escherichia Coli) e una di origine vegetale (da Erwinia). Tra le complicanze più severe correlate all'utilizzo dell'asparaginasi vi sono le reazioni allergiche, la pancreatite, la trombosi venosa profonda. Di conseguenza diventa di fondamentale importanza identificare preventivamente i soggetti, geneticamente determinati, a più elevato rischio di eventi collaterali gravi.

## **Obiettivi**

1. Identificare i pazienti a più alto rischio d'ipersensibilità alla formulazione di L-Asparaginasi attualmente in uso (Forma Peghilata da E. Coli – PEG-ASP)
2. Caratterizzare il profilo aminoacidico dei bambini con LLA sottoposti a terapia con L-Asp, durante la fase di esposizione al farmaco.
3. Confermare la correlazione tra il locus HLA-DRB1 e l'insorgenza di complicanze post Asparaginasi.

## **Materiali e metodi:**

Da Dicembre 2010 a Maggio 2016 sono stati arruolati nel Protocollo AIEOP LLA2009, 87 pazienti, 44 maschi (51%) e 43 (49%) femmine. Abbiamo raccolto e analizzato il plasma di questi pazienti in specifici time-points, valutato il profilo aminoacidico e studiato l'HLA con particolare riferimento al locus DRB1 mediante sequenziamento.

### **Risultati:**

Nella popolazione esaminata si sono verificati 18 (20.7%) eventi avversi: **13 reazioni allergiche (15%), 3 casi di Trombosi Venosa Profonda (TVP) (3.4%), 2 casi di Pancreatite (2.3%).**

Relativamente al profilo aminoacidico, sono state evidenziate basse concentrazioni di asparagina ai time-points +26 e +33. Su 18 pazienti analizzati, 7 hanno presentato iperfenilalaninemia e 15 pazienti presentano un aumento della treonina al giorno + 26. La tipizzazione HLA a bassa risoluzione dei pazienti che hanno presentato una reazione allergica all'asparaginasi ha mostrato i seguenti risultati, 4 (30%) su 13 pazienti presentavano l'aplotipo DRB1 07.

### **Conclusioni**

I nostri dati confermano la correlazione tra specifiche variabili, età, sesso, immunofenotipo e il verificarsi di eventi avversi. I profili amminoacidici studiati, per quanto il campione sia esiguo, confermano la riduzione dei livelli di asparagina e in parte anche della glutamina

dopo la somministrazione del farmaco ed evidenziano un dato nuovo, cioè che l'asparaginasi potrebbe in qualche modo influenzare il pattern di altri importanti aminoacidi (fenilalanina e treonina). Il nostro studio, in linea con la letteratura più recente, conferma inoltre, la correlazione tra la presenza dell'aplotipo HLADRB1 07 e le reazioni allergiche ASP-correlate.

## **Background e Razionale**

La Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) è il tumore maligno più comune in età pediatrica (0-14 anni). Le leucemie acute costituiscono il 35% di tutte le forme tumorali e di queste, la LLA costituisce l'80%. Nonostante la percentuale di sopravvivenza superi attualmente l'80%, anche nei protocolli dell'Associazione Italiana di Emato-Oncologia Pediatrica (AIEOP), rimane comunque la principale causa di morte per malattia nei bambini e nei giovani adulti (1).

Negli ultimi 20 anni il trattamento della LLA ha ottenuto notevoli progressi grazie alla stratificazione in fasce di rischio, all'ottimizzazione dell'uso in combinazione dei farmaci già esistenti, al miglioramento delle terapie di supporto. Gli obiettivi degli studi clinici attuali sono:

- 1-) identificare i pazienti ad alto rischio per i quali incrementare e/o modificare l'intensità del trattamento;
- 2-) identificare i pazienti ai quali si potrebbe ridurre l'intensità della terapia, riducendo i rischi di tossicità pur mantenendo un'aspettativa di sopravvivenza molto elevata (2).

Per rispondere a quest'ultima esigenza, la farmacogenomica ha fatto passi da gigante. Recentemente sono stati identificati numerosi polimorfismi genetici (Single Nucleotide Polymorphism) che potrebbero avere un ruolo significativo nel modificare la farmacocinetica dei chemioterapici utilizzati nel trattamento della LLA. Questa grande mole di dati, una volta identificata la metodica di applicazione, ci permetterebbe di comprendere le diverse risposte farmacologiche e i meccanismi di resistenza o ipersensibilità ai farmaci (3).

Un farmaco cardine nel trattamento della LLA è rappresentato dalla L-Asparaginasi, che esplica la propria attività antileucemica mediante la deplezione dell'asparagina, aminoacido essenziale per i linfoblasti, inibendo così la sintesi proteica.

4. Identificare i pazienti a più alto rischio d'ipersensibilità alla formulazione di L-Asparaginasi attualmente in uso (Forma Peghilata da E. Coli – PEG-ASP) al fine di prendere in considerazione uno shift ad altro prodotto (forma da Erwinia).
5. Caratterizzare il profilo aminoacidico dei bambini con LLA sottoposti a terapia con L-Asp, durante la fase di esposizione al farmaco, correlandolo con l'insorgenza degli effetti collaterali più temuti (trombosi, pancreatite e reazioni allergiche gravi)

6. Confermare la correlazione tra il locus HLA-DRB1 e l'insorgenza di complicanze post Asparaginasi.

### **Leucemia Linfoblatica Acuta**

Fino alla metà degli anni '60, pur disponendo di tutti gli antiblastici oggi utilizzati nelle terapie *front-line*, era radicato il concetto che nella LLA, l'obiettivo non poteva essere la guarigione, ma solo una terapia palliativa, di contenimento, che si limitava ad un prolungamento della sopravvivenza.

A quel tempo, venivano utilizzati uno steroide ed un antiblastico (Vincristina o 6-Mercaptopurina o Ametopterina), riservando un secondo antiblastico alla comparsa della recidiva ritenuta ineluttabile.

Fra il 1966-67 Donald Pinkel, del St. Jude Children's Research Hospital di Memphis, lanciava un messaggio che rivoluzionava la strategia della terapia: "La LLA si può, si deve guarire con l'uso associato di più antiblastici (polichemioterapia) e di terapia precoce sul sistema nervoso centrale" (4).

Altre due tappe fondamentali vanno attribuite a Hansjörg Riehm. Nei primi anni '70, egli introduceva la terapia d'Induzione con 8 farmaci, tutti quelli allora disponibili ed efficaci nella LLA. Successivamente,



nel 1976, introduceva il “protocollo II” (intensificazione ritardata), che utilizzava gli stessi farmaci, con lievi modifiche, usati nella induzione 5-6 mesi dopo l’inizio della terapia **(5)**. Queste ultime due modalità di intervento sono ancora oggi alla base dei protocolli terapeutici applicati a livello internazionale sia nei paesi occidentali che in quelli con risorse limitate.

Gli sviluppi successivi sono stati caratterizzati da un sempre maggior impegno nella ricerca, sia biologica, che clinica e farmacologica.

Gli studi sulla biologia della LLA hanno consentito di definire sempre meglio la sua eterogeneità, sia sul piano clinico che, soprattutto, sul piano delle caratteristiche immunologiche e molecolari delle cellule leucemiche, di individuare criteri prognostici sempre più accurati e di impostare programmi di terapia con intensità modulata sulle fasce di rischio. Grande merito va attribuito alla realizzazione di studi clinici randomizzati sia a livello nazionale che internazionale **(6)**.

L’incidenza della leucemia è valutata tra il 30-45 per 10<sup>6</sup> bambini per anno, tra 0 e 14 anni di età. Tale incidenza è abbastanza omogenea nei paesi occidentali, mentre è ritenuta inferiore nei paesi con risorse limitate, pur disponendo di dati scarsi per questi paesi **(7)**.

In Italia, sono stati registrati negli ultimi anni, presso il CINECA circa 500 casi/anno di leucemia in età pediatrica; di questi, circa 400 sono LLA.

Negli ultimi anni è stato segnalato, sia in Europa che negli USA, un incremento annuo di incidenza di LLA di circa l'1% **(8)**.

Questo andamento è riferito al ruolo di molteplici fattori ambientali, tra questi, le radiazioni ionizzanti, le radiazioni cosmiche (raggi- $\gamma$ ) e di origine terrestre, i campi elettromagnetici non-ionizzanti; mancano peraltro dati sufficienti per definirne con precisione la causa. Per quanto riguarda la cosiddetta "infant leukemia", diagnosticata entro i 12 mesi di vita, ci sono dati che depongono per una carcinogenesi transplacentare **(9)**

Sebbene le cause esatte della LLA siano ancora tutte da chiarire, l'applicazione delle nuove metodiche di laboratorio a nostra disposizione ha chiaramente dimostrato due importanti concetti:

- a) la leucemia del bambino è il risultato di un processo multistep associato all'acquisizione di alterazioni genetiche nelle cellule leucemiche (mutazioni somatiche);
- b) la LLA del bambino è una malattia eterogenea composta da numerosi sottogruppi biologici, classificati in base alle alterazioni genetiche che li caratterizzano.

E' ormai accertato che la maggior parte dei casi di LLA derivino da mutazioni somatiche che insorgono durante la fase di post-concepimento *in utero* nelle cellule linfoidi in sviluppo **(10)**.

Questa evidenza emerge chiaramente dagli studi sui gemelli monooriali, che mostrano elevata concordanza di eventi leucemici, compresi identici riarrangiamenti genetici **(10)** .

Il backtracking delle alterazioni genetiche diagnostiche utilizzando le Guthrie cards, ha dimostrato la presenza delle stesse traslocazioni già anni prima della diagnosi clinica di LLA **(10)**.

Tra queste traslocazioni, la  $t(12;21)$  che genera il trascritto *TEL/AML1* è stato riscontrato nel sangue cordonale dell'1% di soggetti sani, una frequenza 100 volte superiore rispetto alla prevalenza di questo sottotipo di leucemia, suggerendo che ulteriori mutazioni post-natali si rendono necessarie per la trasformazione maligna **(1)**.

Questo schema dei due *hits* è stato recentemente dimostrato anche nel caso della  $t(9;22)$ . E' stato dimostrato per la prima volta, in una coppia di gemelli monooriali con una LLA concordante per la  $t(9;22)$  che il gene di fusione *BCR-ABL1* può esser considerato un evento prenatale *iniziale* la trasformazione leucemica e che la mutazione (o delezione) di *IKZF1* (gene chiave nello sviluppo dei linfociti B) è un evento

secondario (*driver*) e postnatale incidendo sulla prognosi, in senso negativo **(11)**.

Questo report conferma un altro studio collaborativo sui gemelli con la t(12;21) nel quale, applicando una Genome Wide Copy Number Analysis, si è confermato che mediamente vi sono circa 5 CNV per gemello e che queste alterazioni funzionano da *driver* postnatali **(12)**.

### **Predisposizione alla LLA del bambino**

La LLA del bambino è una malattia sporadica ma una tendenza alla predisposizione esiste in meno del 5% dei casi **(1)**.

I bambini affetti da Sindrome di Down presentano un'incidenza di LLA 20 volte (per la Leucemia Mieloide Acuta LMA M7 500 volte) superiore alla popolazione normale **(1)**.

A conferma di ciò, La LLA nei bambini affetti da Sindrome di Down, è caratterizzata da assenza di forme T-lineage, ridotta associazione con i sottotipi genetici favorevoli (Iperdiploidia e presenza di *TEL/AML1*) ed elevata incidenza (fino al 30%) di mutazioni di Janus Kinase (*JAK2*) ed aumentata espressione del gene recettore per le citochine (*CRLF2*) in più del 55% dei casi, che si esprime mediante una fusione con il gene *P2RY8* o col il gene delle immunoglobuline catene pesanti (IgH) **(13)**.

Inoltre, due recenti studi, che hanno esaminato il background delle variazioni genetiche (differenze nelle cellule normali *variazioni germline*) tra controlli e pazienti con LLA, hanno dimostrato legami con i geni *ARID5B* e *IKZF1*, coinvolti nella differenziazione del linfocita B. I polimorfismi germline di questi geni sembrano essere associati ad un aumentato rischio di LLA, soprattutto il sottotipo iperdiploide **(1)**.

La suscettibilità alla LLA del bambino è stata di recente associata a polimorfismi di geni che hanno un ruolo fondamentale nel sistema immunitario: uno studio canadese ha dimostrato che un elevato numero di geni attivanti *KIR* (killer-cell immunoglobulin-like receptor), soprattutto il *KIR2DS2*, riduce il rischio di sviluppare la LLA nei bambini analizzati **(14)**.

Il ruolo del sistema immunitario nella LLA del bambino è stato oggetto di studio anche in AIEOP: recentemente Cocco C et al hanno dimostrato che il gene del recettore dell'interleuchina IL-23 è up-regolato nella LLA B-lineage e che l'IL-23 induce l'espressione del miR15a e la conseguente down-regulation della proteina antiapoptotica Bcl2, suggerendo che l'IL-23 potrebbe esser utilizzata come potenziale farmaco antileucemico **(15)**.

Le alterazioni di un altro gene relativo ad una interleuchina, *IL7R $\alpha$* , è stato associato in uno studio internazionale (I-BFM) ad una forma di

LLA con over-expression di *CRLF2* a cattiva prognosi, mettendo in evidenza che queste cellule con la mutazione presentano un vantaggio proliferativo indipendente dalla presenza del ligando (16).

### **Presentazione clinica**

La LLA si presenta nella maggior parte dei casi acutamente, più raramente l'esordio può verificarsi subdolamente. La durata dei sintomi può essere molto variabile, da alcuni giorni a settimane, più raramente mesi. I sintomi più frequenti sono la febbre, astenia e dolori ossei o artralgie. Sintomi meno comuni includono cefalea, vomito, dispnea, oliguria ed anuria. L'esame obiettivo evidenzia pallore, petecchie ed ecchimosi mucocutanee. Alla diagnosi la maggior parte dei bambini presenta splenomegalia e/o epatomegalia, solitamente asintomatiche. La linfoadenopatia (solitamente non dolente, localizzata o sistemica) dovuta ad infiltrazione leucemica è ugualmente frequente.

Anemia generalmente normocromica, normocitica associata a conta reticolocitaria bassa o normale, conta e formula leucocitaria alterate (leucocitosi o leucopenia con inversione della formula leucocitaria) e trombocitopenia sono usualmente presenti alla diagnosi. La

coagulopatia è usualmente modesta e raramente associata a sanguinamento severo. Nel 5% dei bambini può essere presente un interessamento del Sistema Nervoso Centrale, caratterizzato da segni e sintomi correlati ad aumentata pressione intracranica (cefalea mattutina, vomito, papilledema, paralisi bilaterale del VI nervo cranico), più raramente sono presenti segni neurologici focali (emiparesi, paralisi dei nervi cranici, convulsioni, coinvolgimento cerebellare con atassia, dismetria, ipotonia, ipereflessia). Inoltre, vi possono essere un interessamento testicolare, un coinvolgimento delle ovaie e del rene. Gli infiltrati leucemici possono essere riscontrati anche come enteropatia necrotizzante, in questi casi la sede più colpita è il cieco.

### **Approccio diagnostico**

Gli innumerevoli progressi terapeutici ottenuti in oncoematologia pediatrica, ed in particolare nelle leucemie acute, sono principalmente dovuti alle conoscenze derivate dal laboratorio che hanno permesso un più approfondito approccio diagnostico, una classificazione del rischio basata anche su variabili biologiche, lo sviluppo di terapie specifiche in rapporto alla risposta, alla terapia e alla comprensione

dell'attivazione di caratteristiche vie di segnale intracellulare. Le metodologie che attualmente costituiscono lo *standard* diagnostico in tutti i migliori gruppi internazionali sono: la morfologia, la citometria a flusso, la citochimica, la citogenetica classica e molecolare, la genetica molecolare (**Tabella 1**).

L'applicazione contemporanea di tali tecnologie è volta ad ottenere il risultato più informativo possibile per coloro che dovranno alla fine applicare un adeguato protocollo terapeutico.

Ogni metodologia ha una definita sensibilità e specificità; è solo il loro uso combinato che contribuisce alla diagnosi finale e permette di valutare accuratamente la risposta alla terapia formulando una possibile prognosi.

In questi ultimi anni, si è passati da una diagnosi della leucemia sostanzialmente morfologica ad una più complessa. L'introduzione negli anni '80-'90 dei marcatori immunologici e di quelli citogenetici ha cambiato profondamente l'approccio diagnostico nelle leucemia acute.

L'esame morfologico costituisce ancora un cardine nella diagnosi di leucemia; ha il grande vantaggio di non essere costoso, di essere rapido, di essere in grado di definire nella maggior parte dei casi se si tratta di una leucemia. Il grande limite di questa tecnica sta



nell'operatore: l'interpretazione è soggettiva, soprattutto nelle forme più immature e dipende in gran parte dall'esperienza dell'esaminatore.

La morfologia, associata alla citochimica è in grado di distinguere tra LLA e la LMA in oltre 80% dei casi. Limite di tale tecnica è il non essere molto sensibile, oltre ad avere una bassa specificità (**Tabella 2**).

La citometria a flusso è attualmente la metodica più accurata per identificare e numerare le cellule leucemiche. E' una metodologia molto versatile e può essere alla portata di qualsiasi laboratorio di analisi. I vantaggi più rilevanti consistono nella rapidità di analisi, con capacità di formulare un referto in breve tempo, senza essere troppo costosa; è in grado di identificare sottogruppi di pazienti con rilevanza prognostica e sottotipi di leucemie geneticamente ben definiti, oltre ad essere in grado di valutare il *follow up* della malattia mediante l'analisi della malattia residua minima. I maggiori limiti sono legati alla capacità dell'operatore, basata anche su un'esperienza adeguata, e ai controlli che il laboratorio è in grado di attivare.

La tipizzazione immunofenotipica è guidata dall'analisi morfologica e permette di distinguere l'appartenenza alla linea B o T, oltre che lo specifico sottogruppo immunologico di ciascuna linea. È indispensabile l'analisi dei seguenti marcatori: cyCD3, mieloperossidasi, cyCD79a, CD19, CD10, cyIg, CD20, smIg, CD7,

CD5, CD1a, sCD3, CD13, CD33, CD34, TdT, CD45, HLA-DR (17, 18).

La ploidia può essere valutata o mediante la metodica classica di conteggio in un preparato di cellule in metafase o con cariotipizzazione molecolare con SNP array o misurando il contenuto di DNA in citofluorimetria. In quest'ultimo caso il contenuto di DNA è espresso come “*DNA index*” (DI), un rapporto tra il contenuto fluorescente dei blasti midollari (in G0/G1) alla diagnosi e la quantità normale di fluorescenza osservata in una cellula diploide.

Tuttavia, l'ipodiploidia non può essere esclusa con sicurezza in presenza di un DI normale. Al contrario, in caso di una “chiara” ipodiploidia al DI, questo dato può essere considerato attendibile, e ha un impatto prognostico negativo (19).

La citogenetica classica offre alcuni vantaggi come quelli di identificare tutte le anomalie eventualmente presenti, il costo relativamente basso, senza la necessità di attrezzature particolarmente sofisticate. Gli svantaggi principali sono: la percentuale di successi non è mai troppo alta, con numerosi falsi negativi; l'analisi è molto operatore dipendente; il tempo impiegato è generalmente non compatibile con scelte terapeutiche tempestive. Questo ha stimolato l'applicazione di tecniche molecolari come la RT-PCR per identificare i prodotti di fusione derivanti dalle più frequenti traslocazioni e la

*Fluorescent in situ hybridization* (FISH). I vantaggi sono principalmente l'identificazione rapida e veloce delle traslocazioni cercate, la possibilità di lavorare su RNA o nuclei interfasicci e una facile interpretazione dei risultati. Lo svantaggio principale è rappresentato dall'incapacità a identificare in genere il gene *partner* o le aberrazioni aggiuntive. La FISH è in genere costosa e necessita di multiple reazioni per uno *screening* adeguato. La RT-PCR è rapida, economica, estremamente specifica ed utilizzabile per la MRD, ma non è in grado di identificare traslocazioni complesse ed è applicabile solo nel 40% di tutte le leucemie. La nuova frontiera si basa sulla possibilità di miniaturizzare l'analisi di espressione dei geni; sull'analisi di alterazioni piccole (mutazioni) e grandi (delezioni e amplificazioni) del genoma; su metodi accurati per identificare in modo selettivo l'espressione di un gene; sull'identificazione di *pathways* metabolici specifici; e infine sullo sviluppo di terapie personalizzate. Con l'utilizzo di nuove metodiche quali gene expression profile (GEP), genome-wide analysis (GWA) e next generation sequencing (NGS) si riesce a caratterizzare virtualmente il 100% dei casi con LLA.

### **Malattia residua minima**

La LLA è il prototipo di malattia in cui si è potuta valutare *in vivo* l'efficacia della risposta alla terapia come fattore prognostico e criterio per la scelta del regime terapeutico più appropriato, in funzione della probabilità di rischio di ricaduta.

Mentre la definizione di remissione ematologica corrisponde alla presenza di un numero di blasti leucemici midollari <5% in un aspirato midollare di controllo, la disponibilità di metodiche molecolari ed immunofenotipiche altamente sensibili ha permesso di modificare la definizione di remissione **(20)**.

Metodiche di polymerase chain reaction (PCR) quantitativa che valutano la presenza di specifici riarrangiamenti clonali dei geni per *T-cell Receptor* (TcR) e per le Immunoglobuline (Ig) o la valutazione citofluorimetrica multiparametrica di fenotipi aberranti, hanno permesso di introdurre il concetto di Malattia Residua Minima (MRD), cioè il riscontro di poche cellule leucemiche nel contesto di decine di migliaia di cellule normali di midollo osseo, quindi in fase di remissione ematologica convenzionale, durante la terapia **(21,22)**.

La valutazione molecolare della MRD richiede l'analisi di clonalità all'esordio di malattia, la sequenza dei riarrangiamenti del gene delle Immunoglobuline (Ig) e/o del T-cell receptor (TcR) ed il monitoraggio di tale sequenza mediante PCR-quantitativa, utilizzando oligonucleotidi *primer* sequenza-specifici e sonde fluorescenti. La

tecnica citofluorimetrica si basa invece, sulla valutazione alla diagnosi dell'espressione di antigeni inusuali, aberranti od ectopici, utilizzando combinazioni multiple di anticorpi monoclonali, che verranno poi impiegati come sonde per individuare la quota di cellule leucemiche residue durante la terapia .

### **Classificazione in fasce di rischio**

Il rischio di LLA è strettamente associato ad alcune caratteristiche biologiche riscontrate all'esordio di malattia e nelle prime fasi di terapia, che vengono pertanto utilizzate per stratificare i pazienti in diversi gruppi di rischio, che contraddistinguono diverse opzioni terapeutiche (23).

Una corretta stratificazione dei pazienti in diverse classi di rischio assume pertanto un ruolo fondamentale nel trattamento, nel tentativo di selezionare una terapia che sia adeguata e non ingiustificatamente troppo tossica.

Sulla base dei due "time points" (TP) utilizzati per la determinazione della malattia residua minima MRD (TP1 al giorno +33 della fase di induzione e TP2 al g+78 dall'inizio del trattamento), è stato possibile

stratificare i pazienti in tre gruppi di rischio “MRD based” : standard (MRD-SR), intermedio (MRD-MR) ed alto (MRD-HR).

Sono associate ad elevato rischio di ricaduta (*high risk*, HR) le seguenti caratteristiche:

- *mancata risposta al Prednisone*: presenza di più di 1000 blasti/ $\mu$ l nel sangue periferico (*Prednisone Poor Response*, PPR) dopo 7 giorni di prefase con Prednisone ed una dose di MTX intratecale al giorno 1;
- *presenza di elevata quota di blasti* all’aspirato midollare del 15° giorno;
- *mancata remissione midollare completa* dopo 33 giorni di terapia di induzione: presenza di più del 5% di blasti al giorno 33 del protocollo chemioterapico di induzione;
- *Positività per MLL/AF4 o t(4;11)*
- *Ipodiploidia*
- *Pazienti HR per malattia residua minima*

Le leucemie acute possono essere classificate in base alle caratteristiche morfologiche (classificazione FAB, vedi **Tabella 2**), immunologiche e molecolari.

In base alle caratteristiche immunofenotipiche le leucemie linfoblastiche acute infantili possono essere suddivise in otto gruppi, cinque appartenenti alla linea B (Common, pre-pre B, pre-B, preB/B,

B) e tre alla linea T linfocitaria (pre-T, T-intermedia, T-matura). Tra le LLA a precursori B la forma più frequente è la “Common” caratterizzata dalla positività per il CD10 (CALL o Common associated lymphoblastic leukemia antigen), il primo antigene scoperto nelle leucemie. Questa forma presenta una prognosi lievemente più favorevole rispetto agli altri sottogruppi di LLA. La presenza di IgM intracitoplasmatiche (cyIgM) caratterizza la LLA pre-B, mentre la positività per le Ig di superficie, indice di maturità dei B linfociti, è tipica della LLA-B matura o di transizione, quando le cellule esprimono solo le catene  $\mu$  di superficie. L’immunofenotipo T presenta una prognosi peggiore rispetto alle LLA della linea B anche perché spesso è associato ad altri fattori prognostici sfavorevoli (iperleucocitosi, interessamento del SNC, sesso maschile, età > 10 anni, massa mediastinica e linfonodale).

Nella **Figura 1** e nella **Tabella 3** sono riassunti gli eventi genetici che caratterizzano i sottogruppi biologici della LLA del bambino, ed il loro impatto sulla prognosi.

I più comuni difetti cromosomici osservati nei blasti leucemici sono *guadagni (gains)* numerici o *perdite (losses)* di interi cromosomi e traslocazioni. L’iperdiploidia è segnalata in quasi un terzo dei casi e l’iperdiploidia con 51-65 cromosomi è associata ad un buona prognosi **(24)**.

La prognosi favorevole nella iperdiploidia sembra esser maggiormente correlata con i gains dei cromosomi 4, 10 e 17 (Tripla Trisomia) o dei cromosomi 4 e 10 (Doppia Trisomia) **(24)**. Di contro, l'ipodiploidia con meno di 44 cromosomi nei blasti leucemici è legata ad una cattiva prognosi **(24)**.

Le traslocazioni nella LLA del bambino comunemente colpiscono fattori di trascrizione ematopoietici o attivano oncogeni e sono eventi chiave nella leucemogenesi: questi comprendono la traslocazione (spesso criptica)  $t(12;21)$  *TELAML1* (o *ETV6-RUNX1*) che è riscontrata nel 25% dei casi; la  $t(1;19)$  *TCF3-PBX1* nel 5%; la  $t(9;22)$  *BCR-ABL1* (generalmente p190) nel 3%; i riarrangiamenti del gene *MLL* (cromosoma 11 banda q23) nell'8% dei casi. Quelli elencati rappresentano i principali sottogruppi biologici per i quali è ben definito l'impatto sulla prognosi. Infatti, se per i casi con iperdiploidia, la  $t(12;21)$  e la  $t(1;19)$  si può pronosticare una sopravvivenza superiore all'85% **(1)** per la  $t(9;22)$  siamo partiti da un modesto 35-40% **(1)** ma attualmente con l'utilizzo degli inibitori delle tirosin-chinasi associati alla chemioterapia siamo oltre il 75% a tre anni **(1)**.

Tutt'altro che confortanti sono invece i dati relativi ai casi con riarrangiamento del gene *MLL*: la  $t(4;11)$  *MLL -AF4*, la traslocazione più frequente (>60%) nei casi di riarrangiamento di *MLL*, è ancor oggi



associata ad una prognosi cattiva soprattutto negli infants (<12 mesi d'età) di età inferiore ai 6 mesi e con un numero di globuli bianchi alla diagnosi superiore o uguale a 300.000/mmc **(1)**.

Nel caso della LLA con t(4;11) non-infant gli attuali presidi terapeutici (chemioterapia ad alte dosi con o senza trapianto allogenico) sembrano garantire un sopravvivenza a due anni non superiore al 55%, come segnalato da una recente analisi dei casi arruolati nei protocolli AIEOP LLA-2000 e R-2006 **(25)**.

A causa di questi non brillanti risultati, questo sottotipo di LLA è oggetto di approfonditi studi biologici anche in ambito AIEOP.

Un'osservazione chiave è che più dei due terzi di casi con LLA B lineage presentano alterazioni genetiche che modificano il normale processo di maturazione linfoide **(13)**

Lo sviluppo dei linfociti B dai precursori staminali midollari è regolato da numerosi fattori di trascrizione che inducono il commitment del lineage linfocitario, la repressione dei lineage alternativi, la maturazione linfocitaria. I geni targets sono *PAX5* (paired box 5), *IKZF1* (IKAROS), *EBF1* (early-B factor 1) e *LEF1* (lymphoid enhancer factor 1). Queste alterazioni genetiche si presentano generalmente in eterozigosi ed includono delezioni focali o ampie, mutazioni e traslocazioni. Quella più comune colpisce il gene *PAX5* (circa il 30% dei casi) anche sottoforma di traslocazioni con

altri geni come *TEL* (13), senza però incidere sulla prognosi. Le alterazioni di *IKZF1* sono meno comuni, si presentano più frequentemente come delezioni che mutazioni e sono associate a sottogruppi di bambini con LLA ad alto rischio, come le LLA *BCR-ABL1* positiva (13)

Alcuni studi hanno però dimostrato che le alterazioni di *IKZF1* sono associate ad una prognosi scadente anche nelle forme di LLA ad alto rischio *BCR-ABL1* negative (13).

L'espressione genica di questi casi è molto simile a quella della LLA *BCR-ABL1* positiva (13).

Questo indica che le alterazioni di *IKZF1* possono direttamente influenzare il *transcriptome* della cellula leucemica o che questi casi possono presentare alterazioni genetiche aggiuntive che inducono l'attivazione di chinasi in maniera simile a quelle indotte dall'espressione di *BCR-ABL1*.

Nel 50% di questi casi, definiti LLA *BCR-ABL1-like*, sono stati riscontrati dei riarrangiamenti che alterano l'espressione del gene *CRLF2* (cytokine receptor like factor 2), il quale è localizzato nella regione pseudoautosomica 1 (PAR1) di Xp/Yp (11). Le alterazioni genetiche di questa banda includono l'inserimento (juxtaposition) nel locus *IgH* (14q32), generando il trascritto *IgH@-CRLF2* o la delezione focale di PAR1 che sovrappone gli elementi regolatori del

gene del recettore purinergico *P2RY8* a *CRLF2*, generando il trascritto chimerico *P2RY8-CRLF2* (13).

I mediatori a valle (downstream) del segnale di *CRLF2* non sono ancora ben caratterizzati ma probabilmente coinvolgono i geni della famiglia delle Janus Kinase; infatti recentemente, numerosi studi, tra cui uno targato I-BFM, hanno dimostrato come fino al 50% dei casi con *CRLF2* riarrangiato presentano concomitanti mutazioni attivanti i geni *JAK1* o *JAK2* (13, 26). Queste forme sono potenzialmente sensibili ai farmaci inibitori di *JAK*, attualmente in studi preclinici. L'impatto sulla prognosi della MRD (minimal residual disease), dell'espressione di *CRLF2*, e delle alterazioni di *IKZF1* e *JAK* è stato oggetto di una recentissima pubblicazione del COG (Children's Oncology Group) che ha dimostrato, in più di 1000 casi, come l'espressione del solo *CRLF2* e l'MRD abbiano un impatto prognostico sfavorevole nelle LLA-HR (27).

Recenti alterazioni genetiche aggiuntive a quanto descritto sono rappresentate da:

a) amplificazione intracromosomica del cromosoma 21 (iAMP21), che è presente in circa il 2% dei casi di LLA B-lineage, è associata ad una età quasi adolescenziale ed a un gene expression profile ben preciso, ed il cui impatto prognostico è controverso (1).

b) delezioni focali del gene ERG che generano una proteina che compete con il gene ERG wild-type **(13)**.

Nel caso della LLA T-lineage mancano delle ben definite traslocazioni nella maggior parte dei casi. Per tale motivo in ambito AIEOP è stato eseguito uno studio relativo all'incidenza ed all'impatto prognostico della presenza del trascritto *CALM-AF10*, derivante dalla t(10;11)(p13;q14) nel protocollo AIEOP LLA-2000 e R-2006: su 187 casi analizzati 14 sono risultati positivi (7,5%) mostrando una sopravvivenza libera da eventi (EFS) superiore al 70% **(28)** e quindi non inferiore alla popolazione negativa, smentendo l'impatto prognostico negativo fino ad ora citato **(29)**.

L'applicazione integrata delle più moderne metodiche diagnostiche ha portato ad identificare un sottogruppo di T-LLA a prognosi severa definito da caratteristiche immunofenotipiche e da espressione genica ben precisa: Early T-Precursor (ETP) **(30)**.

Una ancor più recente analisi di Whole-genome sequencing ha permesso di caratterizzare, su 12 ETP, i geni coinvolti in questo sottotipo, evidenziando analogie sempre più marcate con le forme mieloidi, suggerendo quindi un cambiamento di strategia terapeutica per questa forma di Stem cell leukemia **(30)**.

Nella altre forme di T-LLA più mature vengono riscontrati l'inattivazione di un tumor suppressor gene, il *CDKN2A/2B* fino al 70% dei casi e le mutazioni che attivano il pathway del *NOTCH1* (70% casi) (29).

L'impatto sulla prognosi di queste alterazioni è ancora tutto da dimostrare, poiché sono stati pubblicati dati discordanti. Questa forma di LLA eterogenea da un punto di vista genetico, è stata oggetto di classificazione mediante GEP19 (29) e di studio approfondito dei pathway di cell signaling coinvolti nella malattia, in particolar modo il pathway di PI3K-PTEN-AKT-mTOR (31). Anche in quest'ultimo ambito alcuni dati sono controversi in quanto questo pathway è stato riscontrato iperattivo, proponendosi come potenziale target terapeutico, o completamente *spento* in alcuni casi poi recidivati (32).

## **Trattamento**

Il trattamento della LLA in età pediatrica nei protocolli di chemioterapia adottati dai maggiori gruppi cooperativi internazionali si articola generalmente in 4 fasi: Induzione, Consolidamento/Reinduzione, Mantenimento, terapia per la prevenzione della ricaduta al SNC.

## **Induzione**

Il trattamento previsto nella fase di Induzione ha lo scopo di ottenere la *remissione completa* (RC). L'intensità della chemioterapia di Induzione è aumentata nel corso degli ultimi decenni. I farmaci utilizzati in combinazione sono 8: steroide, vincristina, antracicline, asparaginasi, metotrexate intratecale nella fase IA e 6-mercaptopurina, citosina arabinoside, ciclofosfamide nella fase IB.

Nell'ipotesi di migliorare la clearance precoce dei blasti leucemici, che si delinea in base ad evidenze diverse come uno dei principali fattori prognostici, nel protocollo AIEOP LLA 2000 si è ritenuto opportuno aumentare la dose-intensity della terapia di induzione riducendo la durata del protocollo I, da 43 giorni a 33 giorni; a questo scopo è stato anticipato l'inizio della terapia con asparaginasi a dosi standard, al fine di permettere una più rapida citolisi e quindi una migliore qualità di remissione alla fine della terapia di induzione. Inoltre è stato eseguito uno studio randomizzato sull'efficacia dell'introduzione del desametasone nella fase di Induzione. Per quanto sia nozione comune che gli steroidi rappresentano un caposaldo nella terapia della LLA specie nella fase di induzione, la disponibilità di tipi diversi di steroide ha sollevato il problema del loro

uso differenziale. Le incertezze a questo proposito derivano essenzialmente dalla complessità della farmacocinetica e del meccanismo d'azione dei farmaci steroidei nella LLA.

Nel trattamento della LLA sono stati impiegati in differenti protocolli l'idrocortisone (o il profarmaco cortisone che si trasforma in idrocortisone), il prednisolone (o il profarmaco prednisone che si trasforma in prednisolone), il metilprednisolone, il desametasone.

La farmacocinetica di questi farmaci è assai complessa perché è influenzata da vari fattori come l'assorbimento intestinale, la frazione di farmaco plasmatica libera (non legata alla cortisol binding protein), all'interconversione reversibile di metaboliti, ed al metabolismo epatico che a sua volta può essere condizionato da induttori enzimatici o dagli inibitori dell'ossidasi.

L'attività antileucemica dei farmaci steroidei dipende dalla frazione libera, dai recettori citoplasmatici e dalla conseguente alterazione dell'espressione di geni (linfocine essenziali) o di oncogeni che possono causare la lisi cellulare tramite l'arresto cellulare o l'apoptosi.

Usati da soli i farmaci steroidei possono indurre la RC in circa il 50% delle LLA in età pediatrica; in associazione con la Vincristina, la RC si ottiene nel 90% dei casi (con la sola Vincristina nel 70%).

Il farmaco steroideo più usato nell'Induzione è il Prednisone (profarmaco) che viene convertito nel suo metabolita attivo

Prednisolone. Due recenti studi hanno dimostrato che il desametasone alla dose di 10 mg/mq/die rispetto al trattamento con prednisone somministrato alla dose di 60 mg/mq/die migliora l'outcome in pazienti con T-lineage LLA e nei bambini con LLA a precursori della linea B di età < ai 10 anni. Comunque è noto che l'efficacia dei due steroidi è dose-dipendente, somministrati a dosaggi equivalenti, le EFS stimate sono risultate sovrapponibili, sebbene il desametasone sembra ridurre le recidive al SNC **(33)**.

Il desametasone tuttavia comporta una più severa immunosoppressione e aumenta la tossicità acuta ed a lungo termine, con un incremento di patologie come l'obesità, deficit di statura, diabete e osteonecrosi asettica dell'osso.

Nello studio AIEOP LLA 2009, in fase di Induzione viene utilizzato il prednisone, eccetto che per le forme T-lineage che non presentino criteri di alto rischio definiti al giorno +8, nelle quali viene utilizzato il desametasone. Inoltre, sempre durante la fase di Induzione, il Protocollo AIEOP LLA 2009 introduce uno studio randomizzato (R1) che include i pazienti con pB-LLA non HR che siano: TEL/AML 1 negativi o non noti e FCM-MRD nel midollo osseo al giorno +15 < 0,1 % o TEL/AML 1 positivi. Lo studio valuta se la riduzione del 50% della dose di Daunoblastina nel Protocollo IA possa essere attuata



ottenendo rispetto al braccio controllo una EFS (events free survivals) “non inferiore” ed una riduzione di tossicità.

### ***Consolidamento/Reinduzione***

Il consolidamento consiste in quattro somministrazioni di alte dosi di metotrexate (HD-MTX), associato a Acido Folico, Methotrexate intratecale (IT) e a 6-mercaptopurina.

L'inizio della Reinduzione è previsto dopo 14 giorni dal termine della 6-mercaptopurina della fase di consolidamento oppure, nei pazienti ad HR, alla ripresa dei valori ematologici dopo la terapia a blocchi. Lo schema è composto da due fasi dette fase IIA e fase IIB. I farmaci utilizzati nella fase IIA sono: desametazone (10 mg/mq/die per 21 gg), vincristina (1,5 mg/mq ai giorni 8,15,22,29), adriblastina (30 mg/mq ai giorni 8,15,22,29) e L-Asparaginasi, nella fase IIB: ciclofosfamide (1 g/mq), citosina arabinoside (75 mg/mq i giorni 38-41 e 45-48 due cicli di quattro giorni ciascuno), metotrexate IT (giorni 38 e 45) tioguanina (60 mg/mq dal giorno 36 al giorno 49 (totale 14 giorni). Lo schema del protocollo III invece prevede: desametazone (10 mg/mq/die per 14 giorni), Vincristina (1,5 mg/mq i giorni 1 e 8), adriblastina (30 mg/mq i giorni 1 e 8), ciclofosfamide (500 mg/mq il giorno 15), tioguanina (60 mg/mq dal giorno 15 al giorno 28), aracytin (75 mg/mq i giorni 16-19 e 23-26 (due cicli di quattro giorni

ciascuno), metotrexate intratecale (giorni 16 e 23). Per i pazienti stratificati nell'alto rischio è stata prevista invece una chemioterapia a blocchi. Il 1° blocco prevede la somministrazione di desametazone, vincristina e metotrexate ad alte dosi, metotrexate intratecale, Aracytin ad alte dosi, ciclofosfamide, L-Asparaginasi. Il blocco 2 prevede la somministrazione combinata di desametazone, vindesina, ifosfamide, metotrexate ad alte dosi, metotrexate intratecale, L-Asparaginasi, daunomicina; infine il blocco 3: desametazone, vepeside, aracytin ad alte dosi, L-Asparaginasi, metotrexate intratecale.

Il protocollo AIEOP LLA 2009, prevede nella fase di reinduzione, per i pazienti con pB-LLA (o immunofenotipo non noto) appartenenti alla fascia di rischio intermedia, una randomizzazione , che si basa sulla possibilità di somministrare dosi aggiuntive di PEG-L-Asparaginasi.

### **Terapia preventiva del Sistema Nervoso Centrale**

La prevenzione della localizzazione della malattia al SNC è un concetto acquisito sin dalla fine degli anni '60. L'introduzione della radioterapia craniale (RTC) combinata con chemioterapia intratecale ha consentito di ottenere una riduzione della ricaduta al SNC dal 50% dei casi al 10% circa. Nelle decadi successive tuttavia si è

gradualmente modificata questa strategia per ridurre gli effetti tossici legati al trattamento preventivo. Attualmente si tende a somministrare la RTC solo ai pazienti a più alto rischio di recidiva.

### **Terapia di mantenimento e durata del trattamento**

Nella maggior parte dei regimi terapeutici di Mantenimento vengono somministrati methotrexate settimanalmente e 6- mercaptopurina (6-MP) giornalmente. La durata ottimale della chemioterapia di Mantenimento non è ancora stata definitivamente stabilita. Tuttavia la maggior parte dei gruppi utilizza uno schema che prevede di trattare i pazienti per un totale di 2 anni (inclusa terapia di mantenimento).

### **Studi randomizzati *AIEOP-BFM LLA 2009***

Protocollo Ia: ® 4 dosi di Daunorubicina (DNR) vs 2 dosi

Protocollo IIa: ® somministrazione intensificata di PEG-L-Asparaginasi durante la fase di reinduzione e inizio mantenimento per valutare se migliora la EFS rispetto al braccio controllo.

Studio randomizzato RHR nei pazienti HR (identificati al g +33).

Lo studio valuta se l'esposizione protratta ed intensa a PEG-L-Asparaginasi durante il Protocollo IB è associata ad un miglioramento

della prognosi e della risposta MRD al TP2 rispetto al braccio controllo.

Negli ultimi 20 anni, un contributo importante è venuto dal trapianto di cellule staminali nelle forme di LLA resistenti alla terapia di induzione o dopo recidiva di malattia. I risultati sono in continuo miglioramento ed evidenziano la possibilità di trattare con successo una discreta percentuale di casi a prognosi particolarmente severa.

## **Asparaginasi**

L'asparaginasi rappresenta un farmaco chiave nel trattamento delle Leucemie Linfoblastiche Acute. E' stato dimostrato che la somministrazione intensiva del farmaco ha aumentato l'EFS (event free survival) nei bambini affetti da LLA dal 10% al 15% **(34)**.

Essa esplica la propria attività antileucemica mediante la deplezione dell'asparagina, che è un amminoacido essenziale per gran parte dei linfoblasti maligni. Molti studi hanno dimostrato la sua efficacia **(35)**.

A differenza dei linfoblasti, per le cellule sane l'asparagina non è un amminoacido essenziale, essa può essere di derivazione endogena a partire dall'acido aspartico o esogena tramite la dieta. L'enzima chiave per la sintesi dell'asparagina è l'asparaginasi sintetasi **(figura 2)**. Bassi livelli cellulari di tale enzima portano ad una ridotta sintesi di DNA, RNA e proteine, inibizione della crescita cellulare e in ultima analisi ad un'attivazione dei meccanismi di apoptosi cellulare **(36)**. Le cellule leucemiche tuttavia non esprimono l'enzima asparaginasi sintetasi; pertanto sono incapaci di sintetizzare ex novo l'amminoacido asparagina, che può essere ottenuto solo per via esogena. L'Asparaginasi esplica dunque la sua azione mediante una deplezione della concentrazione di asparagina in circolo. La completa

e persistente deplezione dell'amminoacido sembra essere correlata con un maggior effetto a lungo termine del farmaco.

In condizioni normali, la concentrazione di asparagina in circolo presenta un range tra 40 e 80  $\mu\text{M}$  **(37, 38)**.

Sebbene non esistono criteri standardizzati, diversi studi hanno dimostrato che una completa deplezione dell'asparagina può essere definita da valori inferiori a 0,1-0,2  $\mu\text{M}$ , basandosi sul limite di determinazione della concentrazione dell'amminoacido mediante i metodi di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) utilizzati. Tuttavia, i livelli critici richiesti in vivo per la morte della cellula leucemica sono ancora sconosciuti **(39)**.

Inoltre, la concentrazione di asparagina è di difficile valutazione quando in circolo è presente l'asparaginasi, in quanto, il farmaco continua ad agire ex vivo sulla deplezione di asparagina. Fondamentale dunque è l'accurata raccolta dei campioni e l'immediato congelamento degli stessi **(40)**.

Livelli sierici di asparaginasi  $> 100$  UI/L corrispondono ad una deplezione dell'asparagina in circolo (valori al di sotto del limite quantificabile). Per tale motivo, questo valore è considerato il target di monitoraggio dei livelli enzimatici, meno frequentemente è stata osservata una deplezione dell'amminoacido anche con livelli enzimatici inferiori (50 UI/L) **(40, 41)**.

I livelli dell'attività asparaginasica sono inversamente proporzionali alla concentrazione di asparagina sierica quindi possono essere utilizzati come un marcatore per stimare la deplezione dell'asparagina **(43)**.

Diversi studi hanno dimostrato un'associazione tra l'attività asparaginasica e un outcome favorevole nei pazienti affetti da LLA **(43) e (44,45)**.

Le formulazioni di Asparaginasi attualmente in uso presentano una selettività maggiore per l'asparagina, ma la loro azione, anche se minore, si esplica idrolizzando anche la glutamina.

La deplezione di entrambi gli amminoacidi è necessaria per ottenere un outcome migliore **(39, 46)**.

E' stato constatato che la deaminazione del 90% della glutamina è necessaria per ottenere un'ottimale deplezione dell'asparagina **(46)**.

Attualmente, sono in uso, per il trattamento delle Leucemie Linfoblastiche Acute, diverse formulazioni di Asparaginasi: l'Asparaginasi da E.coli, la forma Peghilata e l'Erwinase. La forma nativa di Asparaginasi da E.coli e la forma Peghilata sono di derivazione batterica. Il prodotto PEG-L-Asparaginasi è costituito dal legame covalente della molecola di sintesi polietilen-glicole (PEG) alla L-Asparaginasi nativa da E.Coli, e rispetto a quest'ultima presenta

una più bassa immunogenicità ed una emivita cinque volte più lunga **(47, 48)**.

Pertanto se il rischio di reazioni allergiche si è ridotto rispetto alla forma nativa, riscontriamo un incremento di effetti collaterali non immunomediati. Recenti esperienze di diversi gruppi collaborativi hanno dimostrato che l'uso della PEG-L-ASP nel trattamento di prima e seconda linea per la LLA in età adulta e pediatrica si è dimostrato efficace, con un profilo di tossicità accettabile, simile a quello osservato con il prodotto nativo **(49, 35)**.

L'asparaginasi da *Erwinia chrysanthemi* è invece di origine vegetale. Le due forme presentano un profilo immunogenico differente, ciò permette l'utilizzo della forma da *Erwinia chrysanthemi* nei casi di ipersensibilità alla formulazione derivata dall'*E.coli* **(50, 51)**.

Le tre formulazioni presentano inoltre emivite diverse. La PEG-ASP mostra l'emivita più lunga tra le tre formulazioni mentre l'Erwinase presenta l'emivita più breve **(43, tabella 4)**.

Tali differenze si traducono nella pratica clinica in dosaggi e modalità di somministrazioni differenti. Per tale motivo le tre forme non sono intercambiabili. Definire l'appropriato dosaggio al fine di ottenere il maggior effetto terapeutico è stato l'obiettivo di numerosi studi **(43, tabella 5)**.



Le reazioni di ipersensibilità sono caratterizzate da una serie di sintomi clinici che variano da reazioni di grado lieve a reazioni gravi, come orticaria, broncospasmo, angioedema e anafilassi sia durante la somministrazione per via i.m. sia e.v.

La valutazione del grado di severità della reazione si basa sulla classificazione del Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.03 (CTCAE) (**tabella 6**).

Le reazioni di grado 1 includono flushing e rash fugaci che non necessitano di un intervento farmacologico, quelle di grado 2 si verificano qualora è necessario l'intervento farmacologico e richiedono l'interruzione del trattamento, le reazioni di grado 3 sono prolungate nel tempo con necessità di ospedalizzazione per le sequele cliniche, le reazioni di grado 4 sono quelle che espongono ad un rischio di vita.

Nel CTCAE, l'anafilassi viene descritta oltre il grado 4 (**tabella 6**).

Nonostante esistano tali criteri, nella pratica clinica non è sempre facile identificare il grado della reazione allergica.

In caso di reazione allergica di grado 1 o reazioni dubbie durante somministrazione per via endovenosa, è consigliabile monitorare i livelli di asparaginasi in real time entro 7 giorni dalla somministrazione, per valutare se vi è stata inattivazione.

Nel caso di reazioni di grado 2-4 verificatesi sia durante la somministrazione endovenosa che intramuscolo è necessario shiftare ad un'altra formulazione senza la necessità di dosare i livelli di attività asparaginasica.

Qualsiasi reazione dubbia durante la somministrazione di asparaginasia via i.m. richiede la valutazione dell'attività asparaginasica **(53)**.

In alcuni studi è stato visto che la formazione di anticorpi anti-asparaginasia può verificarsi nel 30% dei casi **(40)**. Tale fenomeno può sostanzialmente ridurre l'attività asparaginasica e quindi può avere un impatto negativo sull'outcome. La formazione di anticorpi spesso si associa a sintomi clinici di ipersensibilità anche se alcuni pazienti possono sviluppare anticorpi senza evidenti manifestazioni cliniche di reazione allergica. In questo caso parliamo di inattivazione silente o subclinica. Ognuno delle tre formulazioni ha caratteristiche immunogeniche differenti e quindi presentano un rischio differente di reazione di ipersensibilità.

Diverse strategie sono state adottate per ridurre il rischio di reazioni allergiche, ad esempio il pretrattamento con glucocorticoidi, il trattamento dei pazienti con schemi di dosaggio intensivi e continui e lo switching ad una forma alternativa di asparaginasia nei casi opportuni.

L'utilizzo dei corticosteroidi se da un lato, grazie alle caratteristiche immunosoppressive, riduce il rischio di reazioni allergiche dall'altro potrebbe mascherare la presenza di un'ipersensibilità subclinica, la quale è associata ad una significativa riduzione dei livelli dell'attività asparaginasica.

Il trattamento con schemi di dosaggio intensivo e continuo potrebbe favorire la formazione di anticorpi.

Nei casi di reazione allergica il paziente deve essere immediatamente shiftato ad un trattamento con un'altra formulazione **(43)**.

Uno studio condotto da Tong e altri ha mostrato l'efficacia di un trattamento prolungato con Asparaginase da Erwinia e PEG-Asparaginasi da E. coli in pazienti pediatriche affette da LLA.

I pazienti hanno ricevuto 15 somministrazioni di PEGAsparaginasi (2500 UI/mq ogni 2 settimane) in intensificazione dopo aver ricevuto l'asparaginasi nativa da E.coli in induzione. In caso di allergia o inattivazione silente alla PEG Asp, veniva somministrato Erwinase (20000 UI/mq 2-3 volte a settimana).

Sono stati arruolati 89 pazienti nello studio PEG Asparaginasi, 20 (22%) dei pazienti trattati con PEG Asparaginasi hanno presentato allergia; 7 (8%) hanno mostrato inattivazione silente. I livelli dell'enzima erano zero nei pazienti allergici mentre i pazienti che non hanno presentato una reazione allergica presentavano un livello di

asparaginasi di 899 U/L. 59 pazienti sono stati arruolati nello studio Erwinase; 2 (3%) hanno sviluppato allergia mentre nessuno ha presentato un'inattivazione silente. Una percentuale del 96% presentava livelli enzimatici  $\geq 100$  U/L. Tuttavia i livelli sierici di asparagina non erano sempre completamente depleti con l'utilizzo dell'Erwinase in opposizione invece alla deplezione con l'utilizzo dell'Asparaginasi. La presenza di anticorpi anti-asparaginasi era correlata con la presenza di reazioni allergiche o inattivazione silente. Si è visto che l'utilizzo della forma nativa di Asparaginasi da E.coli in induzione porta ad una maggiore ipersensibilità alla PEG-asparaginasi in reinduzione. Per tale motivo, è preferibile utilizzare in induzione la PEG-Asparaginasi **(34)**.

Questo schema di trattamento è attualmente utilizzato in diversi protocolli internazionali, tra i quali anche l'AIEOP LLA2009. In quest'ultimo protocollo, uno stretto monitoraggio dell'attività del farmaco ha come fine il riscontro precoce di inattivazione silente **(54)**.

Lo shift ad Erwinase in caso di reazione allergiche al prodotto di derivazione batterica ha mostrato la presenza di buoni livelli enzimatici in molti pazienti. In particolare, pochi pazienti trattati con Asparaginasi da Erwinia C. hanno presentato una reazione allergica e nessuno un'inattivazione silente, questo conferma che il prodotto da

Erwinia C. presenta una cross-reattività molto bassa con il prodotto da E. coli **(34, 54)**.

Uno studio condotto su una piccola coorte di pazienti (648) ha confrontato l'overall survival (OS) di due gruppi di pazienti che avevano presentato una reazione allergica alla PEG-Asparaginasi. Il primo gruppo era shiftato ad Erwinase (17), nel secondo gruppo i pazienti non erano shiftati ad Erwinase (16). Non è stata evidenziata differenza in termini di OS tra chi aveva eseguito più del 50% della dose di PEG asparaginasi prima della reazione ed era passato ad Erwinase e chi non era shiftato ad altra asparaginasi **(55, 56)**.

Il meccanismo biologico che sta alla base degli effetti terapeutici dell'Asparaginasi è il medesimo per tutte e tre le forme tuttavia la risposta al trattamento varia da paziente a paziente.

### **Tossicità:**

#### **Pancreatite**

La patogenesi della pancreatite durante il trattamento con Asparaginasi è ancora sconosciuta. Tuttavia, la riduzione della sintesi proteica derivante dalla deplezione dell'asparagina può esserne una causa **(57)**.

In alcuni studi, la pancreatite associata a trattamento con asparaginasi si presenta nel 2-18% dei pazienti **(58)**.

Gli adolescenti sembrerebbero più predisposti a questo tipo di complicanza rispetto alla popolazione pediatrica **(59)**.

Nella maggior parte dei casi, la pancreatite si verifica dopo le prime settimane dalla somministrazione del farmaco, questo potrebbe essere correlato ad una predisposizione a tale complicanza piuttosto che secondario ad un accumulo del farmaco **(60)**.

La formulazione di Asparaginasi non sembra influenzare l'insorgenza di pancreatite nei bambini affetti da LLA **(58)**. La diagnosi di pancreatite si basa su criteri clinici, laboratoristici (amilasi e lipasi) e radiologici.

Nel NOPHO ALL2008, per la diagnosi di pancreatite acuta da asparaginasi (AAP) vengono utilizzati i criteri di Atlanta **(61)**.

Devono essere soddisfatti almeno due dei seguenti criteri: a) sintomi clinici di pancreatite acuta; b) valori di amilasi e lipasi tre volte superiori al range di normalità, c) immagini radiografiche suggestive di pancreatite acuta.

Inoltre viene definita lieve una pancreatite caratterizzata da sintomi per una durata inferiore alle 72 ore, livelli di amilasi e lipasi < 3 volte il valore normale, assenza di immagini radiologiche da riferire a pseudocisti, emorragie o necrosi.

La sindrome da risposta infiammatoria sistemica è caratterizzata dalla presenza di almeno due dei seguenti quattro criteri; a) temperatura corporea tra 36-38 °C; b) frequenza cardiaca > 90 bpm; c) tachipnea, con una frequenza respiratoria >20 atti/respiro; d) conta dei globuli bianchi < 4000/mmc o > 12000/mmc, o presenza di più del 10% di neutrofilii (58).

La terapia con asparaginasi può essere continuata anche con valori di amilasi e lipasi lievemente aumentati in assenza di segni clinici, mentre in caso di insorgenza di pancreatite severa il trattamento deve essere interrotto (57).

L'interruzione del trattamento con L-Asparaginasi è stata associata ad una minore EFS (58).

## **Trombosi**

Gli eventi trombotici rappresentano un'altra possibile complicanza del trattamento con Asparaginasi. L'eziologia delle trombosi venose sembra essere multifattoriale. Una meta-analisi di 17 studi che ha previsto l'arruolamento di 1752 pazienti affetti da LLA ha identificato quattro fattori di rischio per l'insorgenza degli eventi trombotici: trattamento con L-Asparaginasi da E. coli, la presenza di un catetere venoso centrale, la trombofilia, l'uso concomitante di steroidi.

Secondo questo studio, l'incidenza della trombosi durante il trattamento con Asparaginasi è del 5.2% **(57, 62)**.

La maggior parte degli eventi avversi si manifesta a carico del sistema nervoso centrale. Tra gli eventi trombotici non SNC correlati, la maggior parte si verifica a carico degli arti superiori e vengono classificate come trombosi venose profonde CVC correlate.

L'asparaginasi è associata ad una riduzione della sintesi proteica e quindi anche una riduzione delle proteine coinvolte nei processi coagulativi e di fibrinolisi. Questo potrebbe essere alla base sia degli eventi trombotici che emorragici. L'uso prolungato di L-Asparaginasi espone ad una riduzione dell'antitrombina III, del fibrinogeno e dei livelli di lectina legante il mannano.

E' preferibile profilassare i pazienti che hanno presentato un evento trombotico con eparina a basso peso molecolare **(63, 57)**.

### **Ipertrigliceridemia e ipercolesterolemia**

L'Asparaginasi è associata anche ad un'alterazione del metabolismo lipidico **(57)**. L'ipercolesterolemia e l'ipertrigliceridemia si riscontrano nel 10-50% di pazienti in trattamento con asparaginasi e sono potenziate anche dall'uso concomitante di steroidi **(64)**.



I corticosteroidi infatti sono agenti adipocinetici e pertanto alterano la sintesi, la clearance e il metabolismo lipidico, contribuendo così all'incremento transitorio dei trigliceridi **(65, 66)**.

Inoltre l'asparaginasi sembra inattivare l'attività delle lipoproteinlipasi **(67)**.

Si è visto sulla base dei risultati di pazienti trattati con il Protocollo DCOG ALL 10 che esiste una stretta correlazione tra i livelli dell'attività asparaginasi e la trigliceridemia. In particolare in questo studio prospettico è stata evidenziata una maggior incidenza di ipertrigliceridemia nei pazienti a cui è stato somministrato il prodotto PEG-Asparaginasi rispetto alla coorte di pazienti che invece hanno ricevuto il prodotto da Erwinia C. (su 89 pazienti pediatrici 89% vs 0%). L'attività asparaginasi, in questo studio, era nettamente più alta nei pazienti trattati con PEG-asparaginasi rispetto ai pazienti trattati con Erwinase **(68)**.

Nella maggior parte dei casi l'ipertrigliceridemia e l'ipercolesterolemia è asintomatica e transitoria. I pazienti che presentano alterazioni del metabolismo lipidico devono essere strettamente monitorati per l'eventuale insorgenza di pancreatite ed episodi tromboembolici. Non c'è un trattamento standardizzato per la dislipidemia. Alcuni casi sono stati trattati con fibrati, omega-3, dieta povera di grassi, plasmaferesi **(67, 69, 70)**.

## **Iperglicemia**

Un'altra possibile complicanza del trattamento con Asparaginasi è l'iperglicemia. La sua patogenesi è correlata al fatto che il farmaco determina una ridotta espressione dei recettori dell'insulina. La somministrazione concomitante di corticosteroidi aumenta l'incidenza di iperglicemia, in quanto gli steroidi causano insulino-resistenza e attivano la gluconeogenesi (57).

In alcuni studi, è stata riscontrata iperglicemia associata ad asparaginasi nel 4-20% dei casi trattati con PEG-Asparaginasi e nel 4-17% dei casi trattati con Erwinase (57, 71)

Altri studi hanno evidenziato un'incidenza del 20-35% nei bambini e del 25% negli adulti. In alcuni casi di iperglicemia severa è consigliabile iniziare terapia insulinica (72).

## **Tossicità epatica**

La tossicità epatica da trattamento con asparaginasi difficilmente è legata a gravi complicanze. Spesso si evidenzia un incremento delle transaminasi, della bilirubina totale e della fosfatasi alcalina. La patogenesi non è ancora chiara, un ruolo predominante sembrerebbe giocare l'inibizione della sintesi proteica. Uno studio condotto su 118

pazienti trattati con asparaginasi ha evidenziato ipertransaminasemia (grado 3/4) e iperbilirubinemia nell'8% dei pazienti trattati con asparaginasi da E. coli e nel 5 % dei pazienti trattati con il prodotto peghilato. Nei pazienti pediatrici e adulti che hanno ricevuto asparaginasi da Erwinia, l'ipertransaminasemia e l'iperbilirubinemia è stata riscontrata nel 5% dei casi. Non esistono linee guida per il trattamento delle disfunzioni epatiche, i trattamenti variano nei diversi protocolli di cura. Per i giovani adulti è preferibile sospendere le somministrazioni del farmaco per valori di transaminasi >5-20 vv il valore norma e riprendere il trattamento alla normalizzazione dopo attento monitoraggio (73).

Se da un lato i pazienti adolescenti e giovani adulti (16-39 anni) presentano un rischio maggiore di eventi avversi, dall'altro si è visto che il trattamento con protocolli pediatrici e quindi dosi intensive di asparaginasi, offre probabilità maggiori di sopravvivenza (74, 75)

## **Encefalopatia**

Sebbene la correlazione non sia ben chiara, l'encefalopatia potrebbe essere un'altra possibile complicanza. Sono stati descritti casi di encefalopatia posteriore reversibile (PRES) soprattutto durante la fase di induzione.

La patogenesi potrebbe essere correlata agli elevati livelli plasmatici di ammonio, conseguenti alla conversione dell'asparagina in acido aspartico e ioni ammonio (76, 77).

L'iperammoniemia da sola tuttavia non è responsabile della sintomatologia, un altro fattore potrebbe essere l'ipoproteinemia.

## **Mielosoppressione**

Sebbene pochi studi abbiano evidenziato una correlazione tra l'uso di asparaginasi e una mielosoppressione (78, 57), l'asparaginasi per le sue caratteristiche non è considerata un agente mielosoppressivo.

Potrebbe determinare una mielosoppressione direttamente o indirettamente alterando l'effetto mielosoppressivo di altri farmaci, ad esempio metotrexate (MTX) e mercaptopurina (6-MP) (79, tabella 7)

## **Asparaginasi e Protocollo AIEOP LLA2009**

Nel protocollo AIEOP-BFM LLA 2009, (protocollo attualmente in uso per il trattamento delle leucemie linfoblastiche acute del bambino), viene utilizzata la forma Peghilata al dosaggio di 2500 UI/mq. In particolare nella fase IA viene somministrata ai giorni +12 e +26, in Reinduzione (Prot.II) al giorno +8 e in Reinduzione (Prot III) al giorno +1. Durante i blocchi per i pazienti ad alto rischio viene somministrato al giorno + 6. Nell'ambito dello studio randomizzato per i pazienti a rischio intermedio, il prodotto PEG-L-ASP viene somministrato, nel braccio sperimentale, ogni 2 settimane al dosaggio di 2500 UI/mq/dose per un totale di 10 dosi (20 settimane) in parallelo durante la reinduzione (Protocollo II) e la terapia di Mantenimento. Il gruppo controllo riceve 1 dose di PEG-L-ASP nel Protocollo II.

Nell'ambito dello studio randomizzato per i pazienti ad alto rischio, la PEG-Asparaginasi viene somministrata nel braccio sperimentale ogni settimana durante la fase IB per un totale di 4 dosi aggiuntive. Dato che e' stato visto in alcuni studi che l'attività terapeutica dell'enzima nella forma peghilata si mantiene per almeno due settimane dalla somministrazione **(80)**, è previsto per tutti i pazienti arruolati un monitoraggio, in determinati "time points", dell'attività asparaginasica

e di anticorpi anti-asparaginasi; si è visto, inoltre, che i livelli sierici di albumina sono un buon marker dell'attività asparaginasi

### **Definizione Materiali e Metodi**

Il nostro progetto di Ricerca include le seguenti analisi:

- 1) Caratterizzazione del profilo aminoacidico nel plasma in specifici time-points pre e post somministrazione di L-Asp (**Fig. 3 e Fig 4**).
- 2) Analisi HLA ad alta e bassa risoluzione dal DNA dei pazienti.

La caratterizzazione del profilo aminoacidico è stata effettuata presso il Laboratorio di Malattie Metaboliche, Azienda Policlinico (Dr C. Meli).

Le analisi per l'HLA Alta Risoluzione sono state eseguite presso il Laboratorio di Immunogenetica Molecolare Azienda Policlinico - OVE (Dr Sortino).

A tal proposito è stato redatto un Consenso Informato secondo le norme vigenti e come previsto dai protocolli di cura attuali (AIEOP-BFM LLA 2009) e un'informativa per i genitori.

Abbiamo raccolto i DNA dei bambini affetti da Leucemia Linfoblastica Acuta diagnosticati e trattati presso il Centro di Riferimento Regionale di Ematologia ed Oncologia Pediatrica in

senso prospettico (25 casi/anno) e retrospettivo (200 casi arruolati e trattati dal 2000).

Nella fase di Induzione Fase IA, per i casi trattati con PEG-Asparaginasi (**fig 3A**) abbiamo conservato a -80°C il plasma da sangue periferico (PB) al giorno +12 (prima della prima dose), al giorno + 26 (prima della seconda dose), +33 (7 giorni dopo la seconda somministrazione) [fase Induzione IB: solo per i bambini ad alto rischio sottoposti a randomizzazione, braccio con 4 PEG aggiuntive), + 40 (pre-1° dose HR), + 47 (pre 2°dose HR), + 54 (pre 3° dose HR), + 61 (pre 4 dose HR), + 68]. Nella fase di Reinduzione (prot. II) con PEG (**fig 3B**): tempo + 8 (pre-Asparaginasi), giorno + 15 e giorno +22.

Nel caso dei pazienti ad alto rischio dopo la fase di Induzione abbiamo raccolto i campioni di plasma nei blocchi HR1, HR2, HR3 come segue: al giorno + 6 (prima di somministrare PEG-Asp), + 13 e + 20.

Nella Reinduzione (Protocollo III): giorno 0 (prima della somministrazione di PEG-Asp), + 8 e +15.

Per quanto riguarda i pazienti trattati con Erwinase, abbiamo raccolto il plasma da sangue periferico (**fig. 4**) in fase di Induzione: + 33 (prima della 1° dose di Erwinase), + 40 (prima della 4° dose), + 47 (prima della 7° dose), +54 (7 giorni dopo la somministrazione della 7°dose).

In Reinduzione (Prot. II), in caso di reazione allergica a PEG-Asp in fase di Induzione (fig. 2B) abbiamo effettuato il campionamento del plasma al giorno 0 (prima della chemioterapia), al giorno + 8 (pre-1 dose Erwinase), giorno +15 (pre 4° dose), giorno + 22 (pre 7 dose) e al giorno + 29 (7 giorno dopo la 7° dose).

In caso di reazione allergica durante la fase di Reinduzione Prot. II (**fig. 4**), sono stati raccolti i campioni di plasma come segue: giorno +15 (pre 1° dose Erwinase), giorno + 22 (pre 4° dose), giorno + 29 (pre 7 dose) e giorno +36 (7 giorni dopo la 7° dose).

Il DNA è stato estratto dai blasti leucemici alla diagnosi e alla remissione al fine di caratterizzare l'HLA ad alta risoluzione (sequenziamento diretto), con particolare attenzione al locus HLA-DRB1.

Tutti i campioni di DNA e siero/plasma sono stati conservati presso il laboratorio di Citogenetica e Biologia Molecolare dell'Ematologia e Oncologia Pediatrica di Catania (Dr Luca Lo Nigro).

Da Dicembre 2010 al Maggio 2016 sono stati arruolati nel Protocollo AIEOP LLA2009, 87 pazienti, 42 maschi e 45 femmine, 1 paziente è risultato non eleggibile al Protocollo AIEOP LLA2009, in quanto è risultato positivo per la traslocazione (8;14) e per tale motivo è stato applicato un programma chemioterapico diverso (Protocollo AIEOP



LNH 97). In base al lineage, nove bambini (10%) hanno presentato una LLA T lineage.

In relazione al dato di biologia molecolare all'esordio, alla risposta al cortisone dopo 7 giorni e alla MRD nella fase di induzione, i bambini con LLA- B lineage (78) sono così suddivisi, 30 (38%) erano rischio standard (SR), 35 (44%) rischio intermedio (MR), 12 (15%) rischio alto (HR); per un paziente non è stato possibile attribuire la fascia di rischio in quanto è deceduto prima del completamento della fase di induzione.

Dei bambini affetti da LLA-T, 7 sono stati assegnati alla fascia di rischio non alto, mentre 2 sono stati trattati secondo la fascia di rischio alto (HR) **(tabella 8, 9)**.

Degli 87 bambini arruolati nel Protocollo, abbiamo raccolto i campioni di plasma di PB previsti ai diversi time points **(figure 3, 4)**.

In totale sono stati raccolti 261 campioni di plasma di PB in fase di induzione.

In fase di Reinduzione, sono stati raccolti 201 campioni di PB per i pazienti assegnati alle fasce di rischio SR e MR e 126 campioni di PB per i pazienti HR.

Durante la terapia a blocchi sono stati raccolti 111 campioni.

## **Risultati**

Le caratteristiche generali degli 87 bambini analizzati e studiati sono elencate nelle **Tabelle 8, 9**.

Nella popolazione analizzata, 87 pazienti affetti dal LLA, 42 maschi (51%) e 45 femmine (49%) abbiamo riscontrato 18 (20.7%) eventi avversi PEG-asparaginasi correlati.

In particolare:

- **13 reazioni allergiche (15%);**
- **3 casi di Trombosi Venosa Profonda (TVP) (3.4%);**
- **2 casi di Pancreatite (2.3%).**

Dei bambini che hanno presentato un evento avverso correlato all'asparaginasi (reazione allergica, pancreatite, trombosi venosa profonda), 7 (8%) erano di sesso femminile, 11(13%) di sesso maschile, 10 (12%) avevano un'età inferiore ai 10 anni, 8 (9%) un'età >10 anni, 14 bambini (16%) erano affetti da LLA lineage B, 4 (4%) da LLA lineage T (**tabelle 10, 11, 12**).

Dunque, su 20 pazienti di età compresa tra i 10 – 17 anni, 8 hanno presentato un evento avverso (40%). Mentre, su 67 bambini di età inferiore a 10 anni, 10 anni (15%) hanno presentato un evento avverso.

Considerando la coorte di pazienti di sesso maschile (44 pazienti), 11 hanno presentato un evento avverso (25%), mentre all'interno della

coorte di pazienti di sesso femminile (43 pazienti), 7 hanno presentato un evento avverso (16%).

Considerando il lineage, su 78 pazienti B lineage, 14 hanno presentato un evento avverso (18%), mentre su 9 pazienti, T lineage 4 hanno presentato un evento avverso (44%).

Inoltre, andando ad analizzare il sottogruppo di pazienti che hanno presentato una reazione allergica (**13 bambini - 15%**), 12 pazienti sono shiftati ad Erwinase. Un paziente non è shiftato ad Erwinase poichè ha intrapreso una chemioterapia a blocchi in quanto t(8;14) positivo, che non prevede la somministrazione del farmaco.

In particolare, in 5 pazienti (38%) l'evento avverso si è verificato durante la seconda somministrazione di ONCASPAR della fase di Induzione IA, 4 reazioni (31 %) si sono verificate al giorno + 6 del blocco 2, 2 reazioni (15%) in fase di Reinduzione (Prot.II), 1 (8%) in fase di Reinduzione (2° Prot. III), 1 (8%) durante la quarta somministrazione in fase di Reinduzione braccio 10 PEG.

Quindi la maggior parte delle reazioni si è verificata durante la seconda e la quarta somministrazione del farmaco, suggerendo che la sensibilizzazione si verifica nella maggior parte dei casi in Induzione.

Dei 13 pazienti che hanno presentato una reazione allergica, 6 (46%) sono stati assegnati alla fascia di rischio alto, 5 (38.4%) pazienti alla fascia di rischio intermedio, 1 (7.8%) alla fascia di rischio basso, 1

non classificabile (7.8%). Questo dato, in linea con i dati della letteratura, dimostra l'importanza dell'utilizzo del farmaco nel trattamento della leucemia linfoblatica acuta, in quanto il verificarsi di una reazione allergica è correlabile ad una peggiore prognosi (43).

La tipizzazione HLA dei pazienti che hanno presentato una reazione allergica all'asparaginasi ha mostrato i seguenti risultati:

1 paziente presentava l'aplotipo DRB1 04 e 13, 1 paziente 07 e 10, 1 paziente 03 e 13, 1 paziente 04 e 12, 1 paziente 07 e 15, 1 paziente 01 e 13, 1 paziente 11, 1 paziente 07 e 16, 1 paziente 01 e 07, 1 paziente 04 e 15, 1 paziente 01 e 03, per 2 pazienti il dato non è disponibile.

Dunque, di questi pazienti, 4 (30%) presentavano l'aplotipo DRB1 07.

Per quanto riguarda i 2 casi di pancreatite si sono verificati entrambi nella fase di Induzione (tabella 13).

Un caso si è verificato 15 giorni dopo la seconda somministrazione del farmaco, l'altro caso, 6 giorni dopo la somministrazione della 2° dose della PEG-Asparaginasi.

**I 3 casi di Trombosi Venosa Profonda (TVP) (3.4%) sono stati:** 1 caso in *v. giugulare esterna destra* riscontrata dopo circa 15 giorni dalla 4° dose di PEG-Asparaginasi della fase di Reinduzione (braccio 10 PEG); 1 caso *in vena omerale dx* in fase di induzione; un caso *in vena omerale dx* associata a trombosi cerebrale localizzata al *seno venoso longitudinale superiore*, evento verificatosi 4 giorni dopo la

prima somministrazione di PEG-Asparaginasi. Quest'ultimo paziente, approfondendo le indagini successivamente all'evento, è risultato essere omozigote mutato per il gene MTHFR.

Dei pazienti che hanno presentato trombosi e pancreatiti durante il trattamento con Asparaginasi, 1 paziente presentava l'aplotipo DRB1 03 e 13, 1 paziente 04 e 13, per 3 pazienti il dato non è disponibile.

Quindi non sembra esserci una correlazione tra HLADRB1 07 e l'insorgenza di trombosi e pancreatite.

Dei pazienti che non hanno presentato un evento avverso, 12 pazienti (16%) presentavano l'aplotipo DRB1 07 (**tabella 13**).

Il nostro studio relativamente al profilo aminoacidico è stato focalizzato alla fase di Induzione. Abbiamo potuto analizzare in atto il profilo aminoacidico di 21 pazienti, ai seguenti time points, prima della somministrazione dell'asparaginasi (giorno +12 fase IA), 15 giorni dopo la somministrazione del farmaco, in corrispondenza della seconda somministrazione (giorno +26 fase IA) e 7 giorni dopo la seconda somministrazione (giorno +33 fase IA). Sono stati analizzati 63 campioni.

I dati dei campioni esaminati hanno messo in evidenza concentrazioni basse di asparagina ai time points +26 e +33 (**vedi tabella 15 e figure 5,6**) mentre le concentrazioni di altri aminoacidi al time point +26 subiscono variazioni e per alcuni si è osservato anche un aumento

delle concentrazioni di fenilalanina al giorno + 26 (15 giorni dopo la somministrazione della PEG- asparaginasi) e un trend in salita con picco al giorno + 26 della treonina. **(Tabelle 15)**. Su 21 pazienti analizzati 8 presentavano iperfenilalaninemia **(vedi figura 7)**. Su 21 pazienti analizzati 15 pazienti presentavano un aumento della treonina al giorno + 26 **(vedi figura 8)**.

Tra i pazienti che hanno presentato una reazione allergica alla PEG-Asparaginasi, un paziente presentava un aumento della fenilalanina al giorno +26 e in contrapposizione agli altri pazienti un aumento dell'asparagina al giorno +26.

Analizzando il profilo aminoacidico dei pazienti che hanno presentato pancreatite, un paziente ha mostrato un aumento della treonina al giorno +26. Assenti significative alterazioni del profilo aminoacidico tra i pazienti che hanno presentato come evento avverso una trombosi venosa profonda.

## Discussione

I progressi ottenuti nell'ambito della farmacogenomica hanno permesso di individuare precocemente le possibili diverse risposte al trattamento chemioterapico e conseguentemente l'outcome dei diversi pazienti. A tal proposito un esempio emblematico è dato dallo studio dei geni che codificano per la tiopurina metiltransferasi (TPMT), enzima coinvolto nella metilazione della 6-mercaptopurina e della 6-tioguanina. L'attività dell'enzima è estremamente variabile a causa di difetti ereditari dei geni che codificano per TPMT. Si stima che circa un paziente ogni 300 abbia attività TPMT completamente assente (difetto in omozigosi) e che circa il 10% della popolazione generale abbia attività ridotta (difetto in eterozigosi). Lo studio di tali difetti genetici permette di modulare nella pratica clinica il dosaggio della 6-mercaptopurina e della 6-tioguanina. Altri geni sono coinvolti nel metabolismo, nell'attività e nel trasporto di diversi chemioterapici ampiamente utilizzati nel trattamento della LLA, come metotrexate, ciclofosfamide, vincristina, etoposide, citarabina, antibiotici citotossici, L-Asparaginasi (L-Asp) (81).

Per spiegare la neurotossicità di un farmaco largamente utilizzato nel trattamento della LLA come la Vincristina, è stata dimostrata la

correlazione tra una bassa espressione di CYP3A5 e un aumentato rischio di neurotossicità **(82)**.

Per quanto riguarda l'asparaginasi, uno studio del St Jude Children's Hospital ha analizzato più di 500000 SNPs in 485 bambini affetti da LLA **(83)**.

E' stato visto che 5 mutazioni (rs495835, rs 10070447, rs 6890057, rs4958676 e rs6889909) nel gene GRIA1 sono associate ad una ipersensibilità al farmaco. Il gene GRIA1 codifica per una subunità del recettore AMPA (alfa-Amino-3-Idrossi-5-Metil-4-isoxazolone propinato), recettore postsinaptico ionotropico, importante per la trasmissione eccitatoria rapida del SNC **(83)**.

Il glutammato non solo ha un ruolo di neurotrasmettitore, ma anche di immunomodulatore, e lo studio condotto da Chen ha permesso per la prima volta di correlare i polimorfismi del gene GRIA1 al fenotipo immunologico, e quindi al verificarsi di reazioni di ipersensibilità all'Asparaginasi **(83)**.

Infine, lo studio dei polimorfismi di altri geni che mediano l'effetto antileucemico dell'asparaginasi, quali l'asparaginase sintetasi gene (ASNS), l'activating transcription factor 5 (ATF5), l'argininosuccinate sintetasi 1 (ASS1), sono stati associati ad una sopravvivenza libera da evento (EFS) più bassa, anche se alcuni autori riportano una mancata associazione con eventi avversi **(81)**.



Altri studi invece hanno dimostrato che in individui omozigoti per la tripla ripetizione (3R) dell'allele dell'asparaginasi sintetasi, presentano un elevato rischio di sviluppare tossicità associata al genotipo 3R3R **(84)**.

E' stato evidenziato che altri geni che caratterizzano la malattia potrebbero giocare un ruolo nella risposta al trattamento con asparaginasi. Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che gli individui i cui blasti presentano il trascritto TEL/AML1 sono più sensibili al trattamento con asparaginasi rispetto ad altri sottogruppi **(84, 85)**.

Uno studio condotto su una coorte di 5185 bambini e giovani adulti affetti da LLA, ha messo in evidenza un'associazione tra varianti a carico del gene CPA2, che codifica per la carbossipeptidasi A2, e l'insorgenza di pancreatite **(86)**.

Una recente pubblicazione del StJude ha identificato una correlazione tra l'allele HLADRB1 07:01 ed un più alto rischio di reazioni alla L-Asparaginasi **(87)**. E' stato dimostrato che pazienti con alleli HLA ad alta affinità per gli epitopi dell'asparaginasi hanno una più alta incidenza di reazioni di ipersensibilità rispetto ai pazienti che hanno alleli HLA a bassa affinità per gli epitopi dell'asparaginasi. L'HLA DRB1\*07:01 sembrerebbe avere un'elevata affinità di legame per gli epitopi asparaginasi **(87)**.

A tale proposito, abbiamo visto, nel nostro studio, che conferma i dati del St Jude, come su 87 pazienti, 13 hanno presentato una reazione allergica e di questi 4 (30%) presentavano l'aplotipo HLADRB1 07.

Questo è di fondamentale importanza, in quanto l'analisi precoce dell'HLA DRB1 può ritenersi utile per prevedere le possibili reazioni allergiche, che sono correlate anche all'inattivazione del farmaco. Un progetto futuro potrebbe essere quello di identificare precocemente questi casi che potrebbero shiftare ad un altro prodotto.

Oltre all'aspetto immunogeno, emerge da studi recenti il ruolo della L-Asparaginasi nel modificare l'equilibrio del metabolismo amminoacidico, il quale a sua volta potrebbe essere alla base dell'insorgenza di complicanze gravi quali la pancreatite. Sono stati infatti correlati i livelli di amminoacidi nel plasma in associazione agli enzimi e co-enzimi pancreatici, dimostrando una correlazione importante **(88)**.

Inoltre, il profilo amminoacidico completo dei pazienti trattati con L-Asparaginasi è scarsamente caratterizzato. E' stato dimostrato che la L-asparagina viene sintetizzata da cellule mesenchimali del midollo osseo, ma mentre secondo alcuni studi non sembra influenzare la risposta alla L-asparaginasi **(89)**, secondo altri studi gli elevati livelli di asparagina sintetasi presenti nelle cellule mesenchimali del

microambiente midollare potrebbero opporsi all'azione dell'asparaginasi (90).

Diversi studi riguardano la concentrazione di amminoacidi durante il trattamento con L-asparaginasi. La glutamina sembrerebbe avere anch'essa un ruolo importante (89)

E riguardo gli altri amminoacidi? Può la loro concentrazione essere correlata in qualche modo con le severe complicanze e/o con la risposta alla terapia?

Il nostro studio che si è focalizzato alla fase di Induzione, per quanto limitato dall'esiguo numero di casi, ha mostrato come il pattern amminoacidico mostri delle alterazioni significative.

I dati a nostra disposizione hanno confermato il dato, ampiamente discusso in letteratura (43) di riduzione dei livelli di asparagina e glutamina dopo la somministrazione del farmaco, eccetto in due pazienti nei quali al giorno + 26 si è assistito ad un aumento delle concentrazioni di asparagina (uno dei pazienti ha presentato una reazione allergica all'asparaginasi e assegnato alla fascia di rischio alto). Abbiamo evidenziato inoltre un dato nuovo: le concentrazioni di fenilalanina e treonina sono risultate molto elevate soprattutto a distanza di 7 giorni dalla PEG-Asparaginasi.

Tuttavia, il profilo aminoacidico dei pazienti che hanno presentato un evento avverso non mostra, nei dati esaminati, differenze significative rispetto ai pazienti che non hanno presentato un evento avverso.

Abbiamo visto come tra le complicanze più severe vi sono la pancreatite e la trombosi venosa profonda, che si presentano maggiormente nei pazienti con età  $\geq 10$  anni rispetto ai pazienti di età inferiore (91).

I casi esaminati hanno messo in evidenza come su 3 casi di trombosi venosa profonda, 2 si sono verificati in pazienti di età  $> 10$  anni, mentre i due casi di pancreatite si sono manifestati, uno in un paziente di età  $> 10$  anni e l'altro in un paziente di età  $< 10$  anni.

Di conseguenza diventa di fondamentale importanza identificare preventivamente i soggetti, geneticamente determinati, a più elevato rischio di eventi collaterali gravi.

In linea con i dati della letteratura (40, 43), abbiamo dimostrato l'importanza dell'utilizzo del farmaco nel trattamento della leucemia, in quanto il verificarsi di una reazione allergica all'asparaginasi, la cui sensibilizzazione avviene come abbiamo visto soprattutto in Induzione, ha un impatto negativo sulla prognosi.

## **Conclusioni**

I dati ottenuti confermano, come descritto nello studio del St Jude, la correlazione tra la presenza dell'aplotipo HLADRB1 07 e gli eventi avversi (reazione allergica) ASP-correlati (30% versus 16%). Considerando specifiche variabili correlate al bambino (età, sesso, immunofenotipo), abbiamo visto come via via sia una significativa correlazione tra età, sesso, immunofenotipo ed eventi avversi (reazione allergica, trombosi venosa, pancreatite).

Non vi sono significative differenze tra i due farmaci PEG-Asparaginasi ed Erwinase in relazione alla tossicità epatica, pancreatica e all'effetto sul metabolismo lipidico.

I profili amminoacidici studiati, confermano la riduzione dei livelli di asparagina e in parte anche della glutamina dopo la somministrazione del farmaco ed evidenziano un dato nuovo, cioè che l'asparaginasi potrebbe in qualche modo influenzare il pattern di altri importanti aminoacidi.

A tal proposito significative le alterazioni riguardanti la fenilalanina e la treonina, il cui significato è ancora da chiarire.

Fondamentale diventa capire sempre di più gli effetti dell'attività asparaginasica e quindi della deplezione dell'asparagina, al fine di poter attuare una tailored therapy per ogni paziente che massimizzi l'effetto terapeutico e riduca al minimo gli effetti collaterali.

**Tabella 1:**

Procedure diagnostiche indispensabili per una corretta caratterizzazione della LLA

Citomorfolgia	Midollo osseo - Valutazione morfologica –mielogramma Sangue periferico: - conta delle cellule – formula leucocitaria Liquido cefalo rachidiano: - conta cellulare (camera di conteggio) – citocentrifugato (cytospin)
MRD – Midollo osseo	- Identificazione di adeguati markers PCR MRD
Citofluorimetria Midollo osseo (e/o sangue periferico)	- Tipizzazione immunofenotipica - DNA index
Genetica molecolare Midollo osseo (3/0 sangue periferico)	- RT-PCR e/o FISH per specifici geni di fusione (BCR/ABL, MLL/AF4, TELM/AML1) - SNP array
Citogenetica –Midollo osseo (e/o sangue periferico)	- Bandeggio G ad alta risoluzione per aberrazioni numeriche e strutturali

**Tabella 2:** Caratteristiche morfologiche della LLA secondo la classificazione FAB

Caratteristiche cellulari	L1	L2	L3
Dimensione cellule	Piccole	Grandi ed eterogenee	Grandi ed eterogenee
Cromatina nucleare	Omogenea	Variabile ed eterogenea	Finemente distribuita ed omogenea
Forma nucleo	Regolare	Irregolare con estroflessioni e dentature	Regolare da rotonda ad ovale
Nucleoli	Non visibili	Uno o più, spesso di grandi dimensioni	Prominenti alcuni di forma vescicolare dimensioni
Quantità del citoplasma	Scarso	Variabile, spesso abbondante	Moderatamente abbondante
Basofilia del citoplasma	Leggera o poco intensa	Variabile; talvolta elevata	Molto elevata
Vacuoli nel citoplasma	Variabili	Variabili	Spesso prominenti

**Tabella 3.** Caratteristiche genetiche e cliniche di specifici sottogruppi di LLA del bambino.

Alterazione genetica	%	Note cliniche – Impatto prognostico
<b>B-lineage</b>		
Iperdiploidia >50 cromosomi	20-30	Prognosi eccellente con terapia antimetabolita
t(12;21)/TEL-AML1	25	Co-espressione di Ag mieloidi (CD13;CD33) prognosi eccellente con L-Asp a dosi intense
Trisomia 4 e 10	20-25	Prognosi eccellente con terapia antimetabolita
t(1;19)/TCF3-PBX1	2-6	Prognosi eccellente con alte dosi di MTX; elevata incidenza di recidiva neurologica in alcuni studi
iAMP21	2-3	Comune nei bimbi più grandi; prognosi scarsa; benefici da più cicli di re-induzione
Riarrangiamenti MLL	8	80% negli Infants; over-espressione di FLT3
t(4;11) MLL-AF4	1-2	Scarsa prognosi soprattutto se età <6 mesi
t(9;22)/BCR-ABL1	2-4	Imatinib + chemioterapia intensa miglioramento della sopravvivenza a tre anni (80%)
t(8;14)/MYC-IgH	2	Prognosi favorevole con terapia a blocchi con alte dosi di MTX, ARA-C e CPM
Ipodiploidia 44 cromos	1-2	Prognosi scadente
CRLF2 iper-espressione	6-7	Prognosi scadente
<b>T-lineage</b>		
Riarrangiamenti TAL/LMO	15-30	Prognosi buona; sensibili a inibitori delle iston-deacetilasi
Riarrangiamenti HOX11	7-8	Buona prognosi
Riarrangiamenti HOX11L2	20-24	In alcuni studi prognosi scadente
Riarrangiamenti HOXA	4-5	Scarsa prognosi: potenzialmente sensibili gli inibitori dell'istone H3K79-metiltransferasi
NUP214-ABL1	6	Sensibili agli inibitori delle tirosin chinasi
CALM-AF10	6-7	Prognosi buona se non ETP
MLL-ENL	2-3	Buona Prognosi
Early T-cell Precursor (ETP)	12	Prognosi scadente; markers mieloidi e staminali; sensibili ad un trattamento AML-like
<b>Mutazioni cooperanti</b>		
<b>B-lineage</b> - Delezioni/Mutazioni IKZF1	15-30	Scarsa prognosi; resistenza ad L-ASP e DNR
Mutazioni geni JAK	2-5	Casi HR; 20% gene JAK2; sensibili agli inibitori specifici
<b>T-lineage</b> - Mutazioni NOTCH	50	Prognosi buona; sensibili agli inibitori specifici
PTEN-AKT-mTOR	50	Scarsa prognosi valutare attivazione pathway
Delezioni CDKN2a/2B	70	Scarsa prognosi e potenzialmente sensibili agli inibitori delle DNA metiltransferasi

Tabella tratta da Lo Nigro L. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (Review). Journal of Pediatric Hematology Oncology, 2013, in press.



**Tabella 4:** Caratteristiche farmacocinetiche delle tre formulazioni di Asparaginasi

	Asparaginasi da Erwinia	Asparaginasi da E.coli	PEG-Asparaginasi
Emivita	0.65 ± 0.13 giorni	1.28 ± 0.35 giorni	5.73± 3.24 giorni
Deplezione asparagina	7-15 giorni	14-23 giorni	26-34 giorni
Picco attività asparaginasica	Entro le 24 ore	24-48 ore	72-96 ore

**Tabella 5 : Studi selezionati di farmacocinetica**

Tipo di Asparaginasi	Paz.	Risultati chiave degli studi di farmacocinetica	Bibliografia
PEG-ASP. ASP, Erwinia chrysantemi	89	PEG-ASP IV (2500 IU/mq ogni 2 settimane) in media ha un'attività asparaginasica di 0.9 IU/mL  Tutti i pazienti con una reazione di ipersensibilità (22%) mostravano livelli enzimatici di 0 IU/ml	Tong 2014 (34)
ASP Erwinia chrysantemi	58	ASP-Eewinia chrysantemi somministrata a 25000 UI/mq IM nei giorni L/M/V , il nadir dell'attività asparaginasica (NSAA) era a 48 e 72 ore dopo la dose	Salzer 2013 (93)
ASP Erwinia chrysantemi	38	Il nadir dell'attività asparaginasica era 0.247 IU/mL dopo 3 giorni e 0.077 IU/mL dopo 4 giorni dalla somministrazione del farmaco al dosaggio di 25000 IU/mq im 2 volte a settimana	Vrooman 2010 (94)
Native E.coli ASP, PEG-ASP	118	PEG-ASP 2500 UI/mq mantiene un'attività aspraginasica > 0.03 IU/mL per 15 -21 giorni  Attività asparaginasica > 0.03 IU/mL per un numero di giorni maggiore per i pazienti a cui è stata somministrata PEG-ASP rispetto ai pazienti che hanno ricevuto native ASP da E. coli al dsaggio di 6000 IU/mq il L/M/V i.m.	Dinndorf 2007 (95)
PEG-ASP	55	Singola dose di PEG-ASP 2000 UI/mq in nuve dignosi di LLA in pazienti adulti ha mostrato una deplezione completa nel 100% dei pazienti dopo 2 ore e nell'81 % dopo 21 giorni  Emivita 7 giorni	Dourer 2007 (96)
PEG-ASP	20	1000 IU/mq ogni 2 settimane durante l'induzione e una volta durante la rinduzione hanno mostrato adeguati livelli di attività asparaginasica e di deplezione di asparagina in circolo	Rizzari 2006 (97)
Native Asparaginase E.coli, PEG-ASP	118	Pazienti randomizzati per ricevere PEG-ASP a 2500 IU/mq o Native E.coli ASP al dosaggio di 6000 IU/mq  Emivita di PEG-ASP 5.5. giorni mentre emivita di Native E.coli ASP 26 ore	Avramis 2002 (98)

		Attività asparaginasica nel siero e livelli di asparagina o glutammina inversamente proporzionali	
ASP Erwinia chrysantemi	40	30000 IU/mq im ogni giorno ha mostrato un NSAA $\geq 0.5$ IU/mL nel 92% dei pazienti 30000 IU/mq i.m. 2 volte a settimana ha mostrato un NSAA $\geq 0.1$ IU/m nel 73% dei pazienti	Abertsen 2001 (36)
ASP Erwinia chrysantemi	21	ASP-ERwinia chrysantemi a 20000 IU/mq IV nei giorni L/M/V I livelli medi di attività asparagiansica dopo 48 ore erano di 0.16 – 0.099 IU/mL	Vieira Pinheiro 1999 (38)
Native E.coli ASP (medac), native E.coli ASP (Crasnitin), ASP Erwinia chrysantemi	56	Singola dose di 10000 IU/mq di medac presenta livelli di attività asparagiansica maggiori dopo 3 giorni rispetto a Crasnitin e all'Erwinase Maggiore è l'attività asparaginasica e maggiore è la deplezione dell'asparagina	Boos 1996 (37)

ASP, asparaginasasi; IM, intramuscolo, IV, endovena; L/M/V, lunedì, mercoledì e venerdì; PEG, peghilata (polietilenglicole); NSAA, nadir attività asparaginasica sierica;

NSAA terapeutico  $\geq 0.1$  IU/mL

## Tabella 6: Classificazione delle reazioni allergiche e anafilassi.

Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.03 (CTCAE).

Definizione reazione allergica: disordine caratterizzato da risposta avversa locale o sistemica dopo esposizione ad un allergene

<b>Grado</b>
<b>1:</b> flushing o rash fugaci: temperatura $<38^{\circ}\text{C}$ , non indicato alcun intervento farmacologico
<b>2:</b> Intervento medico o interruzione della somministrazione del farmaco: risoluzione dopo somministrazione di terapia farmacologica (antistaminici, corticosteroidi, NSAIDS (antinfiammatori non steroidei), narcotici; farmacoprofilassi indicata per un periodo $\leq 48$ h
<b>3:</b> Reazioni prolungate (non rapidamente risolte dopo terapia farmacologica e/o dopo interruzione della somministrazione); ripresa della sintomatologia dopo un iniziale miglioramento clinico; ospedalizzazione indicata per le sequele cliniche (danno renale, infiltrati polmonari)
<b>4:</b> reazioni con sequele a rischio di vita: indicato intervento urgente
<b>DEFINIZIONE ANAFILASSI:</b> Disordine caratterizzato da una reazione infiammatoria acuta dovuta al rilascio di istamina e sostanze istamina-like da parte delle mast cellule, con conseguente risposta immune di ipersensibilità. Clinicamente si presenta con difficoltà respiratoria, vertigini, ipotensione, cianosi e perdita della coscienza, può condurre al decesso.
<b>Grado</b>
<b>3:</b> broncospasmo sintomatico, con assenza orticaria, edema/angioedema, ipotensione
<b>4:</b> conseguenze che espongono ad un pericolo di vita

**Tabella 7: Tossicità correlata al trattamento con asparaginasi**

	Incidenza	Effetti	Managment
Iperglicemia	20-35% bambini 25% adulti	Aumenta percentuale di eventi infettivi, outcome peggiore	Si risolve in 2-4 settimane, insulino terapia nei casi più severi, dieta, esercizio, il monitoraggio della glicemia è fondamentale
Pancreatite	5-10% dei pazienti Sovrapponibile in bambini e adulti	Generalmente lieve, ma può evolvere in gravi complicanze e sequele a lungo termine (pseudocisti, diabete mellito)	Mettere a riposo l'intestino (nutrizione parenterale), correzione degli elettroliti, della glicemia, profilassi antibiotica. E' stato proposto l'uso dell'octreotide e degli inibitori delle proteasi. Nei casi sintomatici il trattamento deve essere interrotto.
Tossicità epatica	20% bambini 33% adulti	Comunemente presente con un aumento degli enzimi epatici (AST, ALT) e della bilirubina, riduzione della sintesi proteica, generalmente lieve e transitoria	E' consigliabile valutazione della funzionalità epatica prima di ogni somministrazione di Asp e quando viene somministrato con altri farmaci a metabolismo epatico (antraciclinici, alcaloidi della vinca). Il trattamento deve essere interrotto per tossicità di grado 3-4 e ripreso non appena possibile con monitoraggio stretto.
Iperamilasemia e Iperlipasemia			Monitoraggio durante il trattamento; sospendere la terapia se valori >2-3 volte il valore normale; sospenderla se valori elevati per più di 2-3 giorni, riprovare appena possibile, ma solo nei casi lievi (casi asintomatici e che si risolvono entro 48 ore)
Ipertrigliceridemia		Può mascherare i segni iniziali di pancreatite, spesso asintomatica	Il trattamento è poco definito e include un'ampia variabilità di possibilità terapeutiche, da nessun trattamento, dieta, idratazione, ad agenti che riducono i lipidi, plasmaferesi.

**Tabella 8:** Caratteristiche popolazione studiata

PAZIENTE	SESSO	ETA'	IF	FASCIA DI RISCHIO FINALE	AE NON CORRELATO A ASP	AE CORRELATO ALL'ASP.	HLA
R. J	M	<10	Common	SR			04,07 b.r.
S. G.	M	<10	Common	HR		REAZIONE	07;10 b.r.
D. A.	F	<10	Common	MR			03,10 b.r.
F. G.	M	>10	T-intermedia	MR		REAZIONE	01:02 e 03:01 a.r.
B. A.	M	<10	T-intermedia	MR		REAZIONE	04;13 b.r.
B. B.	F	<10	pre-B	MR			11 b.r.
P.E	F	<10	Common	MR			04,15 b.r.
A. A.	F	>10	Common	SR			08,11 b.r.
P. G.	M	<10	pre-pre B	HR			04:05 e 11:04 a.r.
B. R.	F	<10	Common	HR		REAZIONE	03,13 b.r.
S. C.	M	<10	Common	SR		REAZIONE	04;12
C. S.	F	<10	Common	SR			13,15 b. r.
B. G.	M	<10	Common	SR			11 b.r.
C. L.	F	<10	Common	MR			13,16 b.r.
R. M.	F	<10	Common	SR			04,11 b.r.
M. D.	F	<10	Common	HR			01,14 b.r.
Z. L	M	<10	pre-preB/Common	SR			07,10 b.r.
G. G	M	<10	Common	SR			11 b.r.
G. A.	F	<10	Common	MR			04,14 b.r.
G.S.P.	M	<10	Common	MR			11,15 b.r.
V. S. A:	F	<10	Common	MR			07,13 b.r.
V. E.	F	<10	Common	MR			01,15 b.r.
R. C.	F	<10	Common	MR			01,13 b.r.
N. F.	F	<10	Common	MR			11,13 b.r.
F. L	M	>10	Common	MR			11 b.r.
P. R.	F	<10	Common	MR	MORTE		01,07 b.r.
T. G.	M	>10	T-intermedia	non alto		TROMBOSI	In corso
D. A.	F	<10	Common	SR			14, 15 b. r.
T. A.	M	<10	Common	SR			11, 13 b.r.
C. G. M.	F	<10	Common	SR			07, 16 b.r.
B. M. M.	F	<10	Common	SR			07, 16 b.r.
M. S. M.	F	<10	Common	MR			10, 11 b.r.
D'A. D.	F	>10	Common	HR			In corso
B. E.	F	>10	Common	HR		REAZIONE	07;15
C. E.	M	<10	T- lineage	HR			In corso
M.F.	F	<10	Common	MR			04, 14 b. r.
D.E.	F	>10	Common	MR			04,13 b.r.
P. A. F.	M	<10	Common	MR			01, 03 b.r.
C. A.	F	<10	Common	HR			07, 15 b.r.
R.C.	F	<10	Common	MR			14, 16 b.r.
L.N.	M	<10	Common	SR			01, 11 b.r.
F.G.	M	>10	Common	MR			03, 11 b.r.
C.E.	M	>10	Common	MR			In corso
D.P.M	M	<10	Common	SR			04, 11 b.r.
D.N.	F	<10	Common	MR			04, 08 b.r.
P.N.	F	<10	Common	MR		TROMBOSI	03, 13 b.r.
T. E.	M	>10	T	non alto		PANCREATITE	04, 13 b.r.
F.A.	M	>10	T	non alto			03, 13 b.r.
D.S.	M	>10	Common	SR			In corso
C.I.	F	<10	Common	SR			04, 07 b.r.
P. G.	F	<10	Common	MR			11 b.r.
L.L.	M	<10	Common	SR			07, 13 b.r.
C.R.	M	<10	Common	MR		REAZIONE	01;13 b.r.
C. A.	M	<10	Common	MR			10, 13 b.r.
P. G.	M	<10	Common	MR		REAZIONE	11, b. r.
C. T.	M	<10	Common	SR <sup>77</sup>			In corso
C. G.	F	<10	Common	HR		REAZIONE	In corso
A. C.S.	M	<10	Common	SR			11, 16 b.r.

I.S.	M	<10	pre-B	SR			04, 07 b. r.
S.C.	M	<10	Common	SR			03, 11 b.r.
C.B.	F	<10	Common	SR			11, 14 b.r.
T.S.	F	<10	Common	SR			07, 15 b.r.
T. C.	F	>10	Common	HR		REAZIONE	07, 16 b.r.
G.M.	F	<10	Common	SR			11, 16 b.r.
M.I.	F	<10	Common	HR		REAZIONE	01:02 e 07:01
T. A.	M	<10	Common	SR			12, 13 b.r.
Q. A.	F	<10	Common	MR			In corso
M. D.	F	>10	Common	HR	MORTE		In corso
N. M.	F	<10	Common	SR			In corso
C. F.	F	<10	Common	MR			In corso
D.M. E.	M	>10	Common	SR			In corso
A.G	M	<10	T	non HR			In corso
P.G.	F	>10	Common	MR			In corso
F.D.	M	<10	Common	SR			In corso
N.C.	M	<10	T	non HR			In corso
D.M.E.	M	<10	Common	Non class	MORTE		In corso
B.S.	M	<10	Common	SR			In corso
G.F.	M	>10	Common	MR			In corso
V.L.	M	>10	Common	HR		TROMBOSI	In corso
S.S.	F	<10	Common	MR		PANCREATITE	In corso
G.S.	M	<10	T	HR			07:01 e 11:04 a. r.
R.P.	M	<10	Common	MR			In corso
S.E.	F	<10	Common	MR			In corso
V. D.	M	<10	Common	MR			In corso
T.G.M.	M	<10	Common	MR			In corso
S.A.	M	>10	Common	MR		REAZIONE	In corso
C.V.	M	>10	B - t(8:14) positiva	Non class		REAZIONE	04:05 e 15:01

**Tabella 9:** Variabili popolazione studiata

<b>VARIABILI</b>	<b>N. PAZ</b>	<b>P.%</b>
<b>SESSO</b>		
Maschi	44	51
Femmine	43	49
<b>ETA'</b>		
1-9 anni	67	77
10-17 anni	20	23
<b>LINEAGE</b>		
B	78	90
T	9	10
<b>FASCIA DI RISCHIO FINALE LINEAGE B (paz. 78 - P. 90%)</b>		
SR	30	38
MR	35	44
HR	12	15
Non attribuibile	1	3
<b>FASCIA DI RISCHIO FINALE LINEAGE T (paz. 9 - P. 10%)</b>		
NON ALTO	7	78
ALTO	2	22

**Tabelle 10:** Eventi avversi e variabili

VARIABILI		No Eventi	P.%	Si Eventi	P.%
Sesso	F	36	41	7	8
	M	33	38	11	13
Età (anni)	1-9	57	65	10	12
	10-17	12	14	8	9
Immunofenotipo	Lineage B	64	74	14	16
	Lineage T	5	6	4	4

**Tabelle 11:** Eventi avversi correlati ad asparaginasi

EVENTO AVVERSO	PAZIENTI	INDUZIONE	REINDUZIONE Prot.II	REINDUZIONE PROT. III	BLOCCHI	HLA DRB1 07
TROMBOSI	3 (3.4%)	2	1			2 no – 1 non noto
PANCREATITE	2 (15%)	2				1 no – 1 non noto
REAZIONE ALLERGICA	13 (2.3%)	5	3	1	4	4 si – 7 no – 2 in fase di caratterizzazione

**Tabella 12: Eventi avversi**

Età (aa)	Sesso	Lineage	Fase della terapia	Evento Avverso	Clinica + lab	Terapia	Complicanze	Risoluzione
>10	M	T	Induzione	Pancreatite	Dolore, iperamilasemia	T.di supporto	Nessuna	Si
<10	F	B	Induzione	Pancreatite	Vomito, iperamilasemia	T.di supporto	Nessuna	Si
>10	M	T	Induzione	Trombosi	Parestesie arto superiore	Eparina	Nessuna	Si
<10	F	B	Reinduzione	Trombosi	CVC non funzionante	Eparina	Nessuna	Si
>10	M	B	Induzione	Trombosi	Convulsioni, parestesie	Eparina+anticonvulsivanti	Ipostenia arto	Non del tutto risolta
<10	M	B	Blocchi	Reazione	Edema, eritema, vomito	Steroidi, antistaminici	Nessuna	Si
>10	M	T	Reinduzione	Reazione	Edema, eritema,	Steroidi, antistaminici	Nessuna	Si
<10	M	T	Reinduzione	Reazione	Edema, eritema	Steroidi,antistaminici	Nessuna	SI
<10	F	B	Reinduzione	Reazione	Edema, tosse	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si
<10	M	B	Induzione	Reazione	Edema, eritema, vomito	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si
>10	F	B	Blocchi	Reazione	Rash cutaneo	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si
<10	M	B	Induzione	Reazione	Dolri addominali, eritema, vomito	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si
<10	M	B	Reinduzione	Reazione	Edema, eritema, difficoltà respiratoria, desaturazione	Steroidi,antistaminici, O2 terapia	Nessuna	Si
<10	F	B	Blocchi	Reazione	Eritema, tosse, vomito	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si
>10	F	B	Induzione	Reazione	Edema, eritema, tosse, difficoltà respiratoria	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si
<10	F	B	Blocchi	Reazione	Edema al volto, ipossia, febbre eritema	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si
>10	M	B	Induzione	Reazione	Dolori addominali, costrizione toracica	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si
>10	M	B	Induzione	Reazione	Edema, eritema	Steroidi,antistaminici	Nessuna	Si



**Tabella 13: HLADRB1**

HLA DRB1	PAZIENTI
01	10
03	8
04	15
07	16
08	2
10	5
11	21
12	2
13	16
14	6
15	9
16	6

**Tabella 14: Classificazione tossicità secondo OMS:**

	0	1	2	3	4
AST/ALT	N	N - 2.5 x N	2.5 - 5 x N	> 5 - 20 x N	>20 x N
Bilirubina	N	N - 1.5 x N	1.5 - 3 x N	> 3 - 10 x N	> 10 x N
Trigliceridi	N	N - 2.5 x N	1.5 - 3 x N	> 3 - 10 x N	> 10 x N
Amilasi	N	N- 1.5 x N	1.5 - 2 x N	> 2 - 5 x N	> 5 x N

**Tabella 15 (a): Concentrazioni aminoacidi**

Aminoacido ( $\mu$ MOL/L)	Paziente 1 RC (3 aa)			Paziente2 V.S 2 (4 aa)			Paziente 3 GSP (5 aa)			Valori normali per età	
	+12	+26	+33	+12	+26	+33	+12	+26	+33	1-12 aa	13-18 aa
Taurina	43	71	67	11	23	39	23	23	23	46 - 172	101 – 225
Acido Aspartico	4	6	4	2	3	2	2	3	3	2 - 10	2 – 14
Treonina	78	147	123	87	136	142	77	142	142	107 - 171	75 – 203
Serina	96	156	140	93	90	112	74	78	78	97 - 151	70 - 170
Asparagina	0	0	0	11	0	0	17	23	27	40 - 55	40 – 55
Acido Glutammico	21	29	20	23	18	17	30	30	30	22 - 50	10 – 45
Glutammina	509	765	605	478	432	430	423	546	546	430 - 562	430 – 620
Sarcosina	21	28	26	13	10	10	12	10	10	10 - 40	10 – 25
Glicina	248	345	245	187	145	255	234	245	245	196 - 268	90 – 400
Alanina	403	576	566	466	521	528	360	478	498	273 - 449	180 – 408
Citrullina	28	34	31	29	11	21	31	33	34	27 - 43	28 – 46
Acido $\alpha$ - aminobutirico	12	21	18	19	10	10	21	28	32	16 - 30	18 – 34
Valina	167	257	248	145	90	160	162	228	198	192 - 254	160 – 280
Cistationina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cistina	43	57	56	32	67	67	21	36	36	74 - 112	31 – 60
Metionina	20	32	30	24	18	18	18	30	30	22 - 32	26 – 38
Isoleucina	50	124	118	32	48	47	40	43	43	54 - 80	45 – 80
Leucina	108	174	120	78	55	123	84	124	108	101 - 148	80 – 148
Tirosina	61	73	67	38	45	51	32	48	46	56 - 78	45 – 109
Fenilalanina	54	184	101	35	43	67	34	45	45	50 - 66	42 – 78
Omocisteina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 12	0 – 12
Ornitina	45	57	53	47	32	117	41	46	50	35 - 63	35 – 83
Lisina	140	160	156	181	108	148	123	167	167	142 - 398	115 – 260
Istidina	77	80	73	63	68	73	81	81	81	75 - 95	70 – 105
1 – metil – Istidina	12	16	13	7	5	5	15	10	10	10 - 23	0 – 29
3 – metil – Istidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 – 7
Arginina	70	82	69	73	69	60	71	75	53	69 - 109	63 – 112
Idrossiprolina	29	25	17	11	23	25	25	16	11	11 - 35	9 – 31
Prolina	209	379	323	135	121	114	135	178	132	129 - 245	129 – 240

**Tabella 15 (b)**

Aminoacido ( $\mu$ MOL/L)	Paziente 4 M D (11 aa)			Paziente N F 5 (10 aa)			Paziente 6 T.C. (17 aa)			Valori normali per età	
	+12	+26	+33	+12	+26	+33	+12	+26	+33	1-12 aa	13-18 aa
Taurina	56	12	60	7	105	28	11	129	10	46 - 172	101 - 225
Acido Aspartico	4	0	5	2	6	3	4	6	3	2 - 10	2 - 14
Treonina	123	45	125	78	139	56	43	123	40	107 - 171	75 - 203
Serina	109	32	110	66	91	78	60	121	56	97 - 151	70 - 170
Asparagina	25	22	22	21	43	5	20	45	18	40 - 55	40 - 55
Acido Glutammico	23	9	27	10	21	10	11	29	7	22 - 50	10 - 45
Glutamina	456	223	467	403	445	273	378	457	234	430 - 562	430 - 620
Sarcosina	23	21	26	12	2	8	10	21	5	10 - 40	10 - 25
Glicina	209	109	226	160	245	211	140	278	120	196 - 268	90 - 400
Alanina	307	121	421	232	511	389	182	459	162	273 - 449	180 - 408
Citrullina	30	17	31	21	22	26	18	29	10	27 - 43	28 - 46
Acido $\alpha$ - aminobutirico	21	11	14	11	11	10	7	18	4	16 - 30	18 - 34
Valina	209	79	198	114	201	162	104	239	98	192 - 254	160 - 280
Cistationina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cistina	76	23	73	21	14	22	31	78	23	74 - 112	31 - 60
Metionina	29	12	27	28	28	28	17	29	25	22 - 32	26 - 38
Isoleucina	56	32	60	56	65	46	50	68	43	54 - 80	45 - 80
Leucina	112	42	120	78	138	83	67	124	60	101 - 148	80 - 148
Tirosina	56	36	55	44	54	48	42	56	34	56 - 78	45 - 109
Fenilalanina	55	35	63	37	61	46	31	256	29	50 - 66	42 - 78
Omocisteina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 12	0 - 12
Ornitina	43	23	51	31	43	34	28	56	21	35 - 63	35 - 83
Lisina	156	106	160	122	135	124	109	307	102	142 - 398	115 - 260
Istidina	78	47	73	67	93	71	61	78	66	75 - 95	70 - 105
1 - metil - Istidina	12	7	11	6	6	3	2	21	4	10 - 23	0 - 29
3 - metil - Istidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 7
Arginina	78	52	70	40	67	48	32	70	50	69 - 109	63 - 112
Idrossiprolina	23	8	21	11	31	13	21	23	17	11 - 35	9 - 31
Prolina	143	102	137	75	257	129	109	235	110	129 - 245	129 - 240

**Tabella 15 (c)**

Aminoacido ( $\mu$ MOL/L)	Paziente D. E. (13 aa)			Paziente G.F. (17 aa)			Paziente V.L.(17 aa)			(valori normali per età)	
	+12	+26	+33	+12	+26	+33	+12	+26	+33	(1-12 aa)	(13-18 aa)
Taurina	31	109	89	56	56	56	28	30		46 - 172	101 - 225
Acido Aspartico	2	5	4	4	4	4	0	0		2 - 10	2 - 14
Treonina	47	139	108	120	267	183	56	58		107 - 171	75 - 203
Serina	60	103	95	101	156	123	78	76		97 - 151	70 - 170
Asparagina	5	2	0	23	0	23	0	0		40 - 55	40 - 55
Acido Glutammico	28	30	18	34	7	34	0	0		22 - 50	10 - 45
Glutammina	435	511	441	256	457	256	427	437		430 - 562	430 - 620
Sarcosina	5	12	10	23	23	23	10	12		10 - 40	10 - 25
Glicina	137	245	186	129	245	131	130	138		196 - 268	90 - 400
Alanina	328	349	349	407	401	398	320	322		273 - 449	180 - 408
Citrullina	15	29	21	30	30	30	18	16		27 - 43	28 - 46
Acido $\alpha$ - aminobutirico	10	17	8	21	21	21	17	18		16 - 30	18 - 34
Valina	160	209	178	209	199	201	165	160		192 - 254	160 - 280
Cistationina	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
Cistina	87	30	21	76	76	76	70	70		74 - 112	31 - 60
Metionina	20	25	20	30	28	28	18	18		22 - 32	26 - 38
Isoleucina	38	48	34	56	56	56	30	43		54 - 80	45 - 80
Leucina	67	121	151	128	123	139	71	95		101 - 148	80 - 148
Tirosina	42	58	50	54	54	50	48	48		56 - 78	45 - 109
Fenilalanina	40	406	58	50	360	45	46	40		50 - 66	42 - 78
Omocisteina	0	0	0	0	0	0	0	0		0 - 12	0 - 12
Ornitina	28	42	39	41	30	32	43	41		35 - 63	35 - 83
Lisina	70	156	150	206	265	205	155	145		142 - 398	115 - 260
Istidina	34	78	71	73	71	73	41	48		75 - 95	70 - 105
1 - metil - Istidina	6	12	8	12	11	12	9	9		10 - 23	0 - 29
3 - metil - Istidina	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0 - 7
Arginina	62	56	43	74	64	60	71	68		69 - 109	63 - 112
Idrossiprolina	10	10	9	22	21	21	12	12		11 - 35	9 - 31
Prolina	120	134	104	123	124	120	174	170		129 - 245	129 - 240

**Tabella 15 (d)**

Aminoacido ( $\mu\text{MOL/L}$ )	Paziente G.S (7 aa)			Paziente S.S. (2 aa)			Paziente C.F. (4 aa)			VALORI NORMALI DI RIFERIMENTO ( $\mu\text{MOL/LITRO}$ )	
	+12	+26	+33	+12	+26	+33	+12	+26	+33	(1-12 aa)	(13-18 aa)
Taurina	53	61	43	41	56	44	21	81	77	46 - 172	101 - 225
Acido Aspartico	4	6	2	3	2	2	2	4	5	2 - 10	2 - 14
Treonina	121	168	105	109	119	98	43	102	112	107 - 171	75 - 203
Serina	103	101	109	78	73	66	49	112	106	97 - 151	70 - 170
Asparagina	22	0	0	9	0	0	7	10	9	40 - 55	40 - 55
Acido Glutammico	31	32	21	24	34	31	19	29	20	22 - 50	10 - 45
Glutamina	356	369	267	434	234	264	288	438	426	430 - 562	430 - 620
Sarcosina	22	21	20	6	5	3	7	10	9	10 - 40	10 - 25
Glicina	130	130	230	237	245	125	125	249	189	196 - 268	90 - 400
Alanina	307	307	309	312	310	210	311	523	340	273 - 449	180 - 408
Citrullina	23	23	22	19	17	18	16	27	21	27 - 43	28 - 46
Acido $\alpha$ - aminobutirico	21	21	12	14	11	10	9	18	11	16 - 30	18 - 34
Valina	190	224	166	180	167	160	89	234	204	192 - 254	160 - 280
Cistationina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cistina	71	71	56	83	81	67	18	56	34	74 - 112	31 - 60
Metionina	28	30	20	22	24	21	16	29	24	22 - 32	26 - 38
Isoleucina	53	65	46	45	56	46	24	65	60	54 - 80	45 - 80
Leucina	158	167	118	84	121	104	85	143	156	101 - 148	80 - 148
Tirosina	45	56	45	51	56	50	32	66	55	56 - 78	45 - 109
Fenilalanina	56	356	63	49	55	45	36	369	104	50 - 66	42 - 78
Omocisteina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 12	0 - 12
Ornitina	41	41	39	30	36	31	53	41	38	35 - 63	35 - 83
Lisina	201	208	189	71	89	80	67	278	128	142 - 398	115 - 260
Istidina	76	79	71	45	78	76	51	74	71	75 - 95	70 - 105
1 - metil - Istidina	10	10	9	9	7	5	3	12	10	10 - 23	0 - 29
3 - metil - Istidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 7
Arginina	67	71	63	70	74	70	72	77	71	69 - 109	63 - 112
Idrossiprolina	21	21	28	14	15	13	19	21	20	11 - 35	9 - 31
Prolina	123	128	117	121	191	145	130	247	235	129 - 245	129 - 240

**Tabella 15 (e)**

Aminoacido ( $\mu$ MOL/L)	Paziente S. E. (9 aa)			Paziente N. M (2 aa)			Paziente R.P. (2 aa)			VALORI NORMALI DI RIFERIMENTO ( $\mu$ MOL/LITRO)	
	+12	+26	+33	+12	+26	+33	+12	+26	+33	(1-12 aa)	(12-18 aa)
Taurina	59	128	68	41	31	30	23	47	23	46 - 172	101 - 225
Acido Aspartico	3	10	2	7	2	3	4	7	2	2 - 10	2 - 14
Treonina	121	291	61	85	129	108	127	141	56	107 - 171	75 - 203
Serina	104	123	93	97	109	98	73	98	32	97 - 151	70 - 170
Asparagina	26	0	0	11	7	3	23	0	0	40 - 55	40 - 55
Acido Glutammico	35	30	12	31	21	10	20	13	7	22 - 50	10 - 45
Glutammina	366	566	346	478	576	566	409	419	267	430 - 562	430 - 620
Sarcosina	23	29	13	11	11	8	17	10	0	10 - 40	10 - 25
Glicina	239	329	229	135	130	125	234	229	139	196 - 268	90 - 400
Alanina	407	507	267	256	254	248	409	523	233	273 - 449	180 - 408
Citrullina	32	30	13	21	25	18	28	29	11	27 - 43	28 - 46
Acido $\alpha$ - aminobutirico	24	20	7	11	11	11	18	11	7	16 - 30	18 - 34
Valina	201	249	120	126	123	190	180	209	109	192 - 254	160 - 280
Cistationina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cistina	79	34	29	21	21	27	34	40	30	74 - 112	31 - 60
Metionina	28	20	18	20	21	13	20	28	14	22 - 32	26 - 38
Isoleucina	60	68	55	58	60	60	52	60	32	54 - 80	45 - 80
Leucina	153	169	98	117	121	126	119	138	108	101 - 148	80 - 148
Tirosina	55	45	40	58	58	58	56	55	43	56 - 78	45 - 109
Fenilalanina	43	49	39	54	284	34	55	60	33	50 - 66	42 - 78
Omocisteina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 12	0 - 12
Ornitina	46	56	56	53	29	29	37	43	28	35 - 63	35 - 83
Lisina	201	206	166	180	85	85	144	177	101	142 - 398	115 - 260
Istidina	80	81	63	66	51	51	63	78	52	75 - 95	70 - 105
1 - metil - Istidina	10	10	7	5	5	5	4	4	0	10 - 23	0 - 29
3 - metil - Istidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 7
Arginina	70	58	43	83	66	34	70	73	45	69 - 109	63 - 112
Idrossiprolina	23	13	19	17	13	8	12	34	14	11 - 35	9 - 31
Prolina	143	200	147	134	131	143	125	145	122	129 - 245	129 - 240

**Tabella 15 (f)**

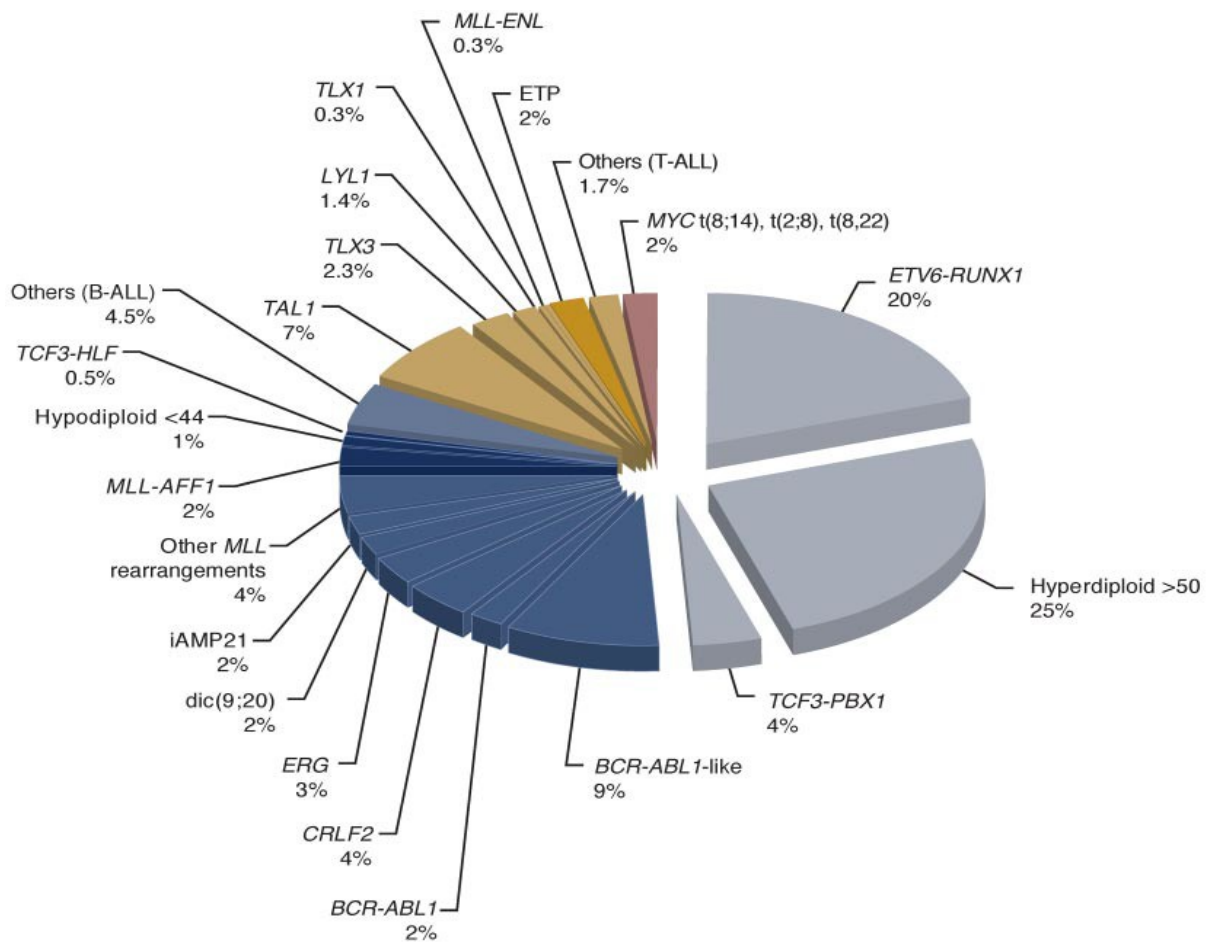
Aminoacido ( $\mu$ MOL/L)	Paziente V.E. (4 aa)			Paziente T.G. (6 aa)			Paziente V.D. (3 aa)			VALORI NORMALI DI RIFERIMENTO ( $\mu$ MOL/LITRO)	
	+12	+26	+33	+12	+26	+33	+12	+26	+33	(1-12 aa)	(12-18 aa)
Taurina	10	33	31	30	57	21	42	56	34	46 - 172	101 - 225
Acido Aspartico	2	4	2	2	2	0	4	6	0	2 - 10	2 - 14
Treonina	121	100	88	40	126	38	106	139	78	107 - 171	75 - 203
Serina	78	66	61	56	67	50	67	109	76	97 - 151	70 - 170
Asparagina	10	12	10	0	0	0	0	0	0	40 - 55	40 - 55
Acido Glutammico	20	13	9	18	12	9	6	10	4	22 - 50	10 - 45
Glutammina	470	410	401	335	405	348	293	378	27	430 - 562	430 - 620
Sarcosina	11	7	11	4	7	3	5	7	3	10 - 40	10 - 25
Glicina	167	189	209	127	327	111	143	243	178	196 - 268	90 - 400
Alanina	471	451	430	558	675	342	289	302	278	273 - 449	180 - 408
Citrullina	27	29	21	12	14	7	8	10	11	27 - 43	28 - 46
Acido $\alpha$ - aminobutirico	16	18	10	6	7	4	3	7	3	16 - 30	18 - 34
Valina	166	156	126	130	148	80	68	86	67	192 - 254	160 - 280
Cistationina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cistina	27	22	16	88	86	44	11	45	32	74 - 112	31 - 60
Metionina	21	24	22	12	10	11	18	23	12	22 - 32	26 - 38
Isoleucina	55	57	44	30	57	28	24	48	48	54 - 80	45 - 80
Leucina	102	110	77	65	69	56	81	95	95	101 - 148	80 - 148
Tirosina	45	44	43	40	47	43	34	40	40	56 - 78	45 - 109
Fenilalanina	43	48	42	34	58	36	38	48	48	50 - 66	42 - 78
Omocisteina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 12	0 - 12
Ornitina	34	36	30	28	34	26	27	36	36	35 - 63	35 - 83
Lisina	151	155	121	65	73	62	57	63	63	142 - 398	115 - 260
Istidina	61	77	70	31	68	37	51	78	78	75 - 95	70 - 105
1 - metil - Istidina	4	9	5	6	6	2	3	11	11	10 - 23	0 - 29
3 - metil - Istidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 7
Arginina	66	65	46	56	67	50	63	79	53	69 - 109	63 - 112
Idrossiprolina	14	21	16	8	26	6	19	27	10	11 - 35	9 - 31
Prolina	115	135	207	127	301	102	136	166	120	129 - 245	129 - 240

**Tabella 15 (g)**

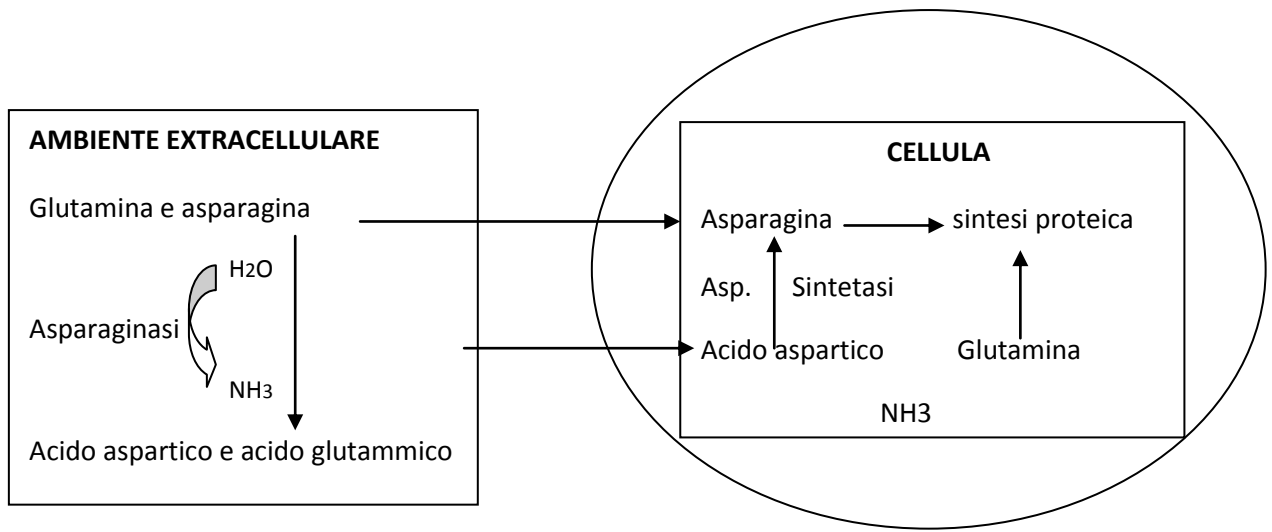
Aminoacido ( $\mu$ MOL/L)	Paziente M. D. (9 aa)			Paziente G.A.. (2 aa)			Paziente F.D. (2 aa)			VALORI NORMALI DI RIFERIMENTO ( $\mu$ MOL/LITRO)	
	+12	+26	+33	+12	+26	+33	+12	+26	+33	(1-12 aa)	(12-18 aa)
Taurina	11	13	17	9	18	11	8	23	17	46 - 172	101 - 225
Acido Aspartico	7	9	5	5	8	2	6	8	2	2 - 10	2 - 14
Treonina	105	124	112	98	123	131	97	127	177	107 - 171	75 - 203
Serina	123	137	106	73	102	98	77	103	92	97 - 151	70 - 170
Asparagina	6	8	0	8	0	0	4	0	0	40 - 55	40 - 55
Acido Glutammico	67	73	70	54	28	11	66	13	7	22 - 50	10 - 45
Glutammina	108	106	416	208	312	310	102	340	242	430 - 562	430 - 620
Sarcosina	12	10	9	8	15	7	6	11	11	10 - 40	10 - 25
Glicina	225	249	189	175	288	275	117	274	246	196 - 268	90 - 400
Alanina	311	452	340	211	378	321	216	571	347	273 - 449	180 - 408
Citrullina	23	21	17	21	19	11	8	21	12	27 - 43	28 - 46
Acido $\alpha$ - aminobutirico	10	11	11	14	12	6	10	18	10	16 - 30	18 - 34
Valina	178	201	204	143	147	77	167	248	195	192 - 254	160 - 280
Cistationina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cistina	20	22	14	20	18	0	32	21	11	74 - 112	31 - 60
Metionina	22	20	18	16	18	10	18	28	16	22 - 32	26 - 38
Isoleucina	55	60	51	42	37	25	67	71	32	54 - 80	45 - 80
Leucina	128	133	156	117	99	63	117	153	53	101 - 148	80 - 148
Tirosina	45	66	55	49	37	24	41	49	32	56 - 78	45 - 109
Fenilalanina	53	52	43	51	42	28	54	280	45	50 - 66	42 - 78
Omocisteina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 12	0 - 12
Ornitina	47	31	38	43	57	31	31	37	33	35 - 63	35 - 83
Lisina	157	178	120	150	111	87	112	123	89	142 - 398	115 - 260
Istidina	81	74	71	77	70	43	77	71	63	75 - 95	70 - 105
1 - metil - Istidina	11	12	10	9	0	0	5	5	0	10 - 23	0 - 29
3 - metil - Istidina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 7
Arginina	75	77	71	71	54	21	43	55	42	69 - 109	63 - 112
Idrossiprolina	23	21	20	29	32	10	16	23	17	11 - 35	9 - 31
Prolina	134	247	235	128	134	78	134	289	165	129 - 245	129 - 240



**Figura 1.** Distribuzione e incidenza dei vari sottotipi fin qui identificati nella Leucemia Linfoblastica Acuta del bambino B-lineage e T-lineage

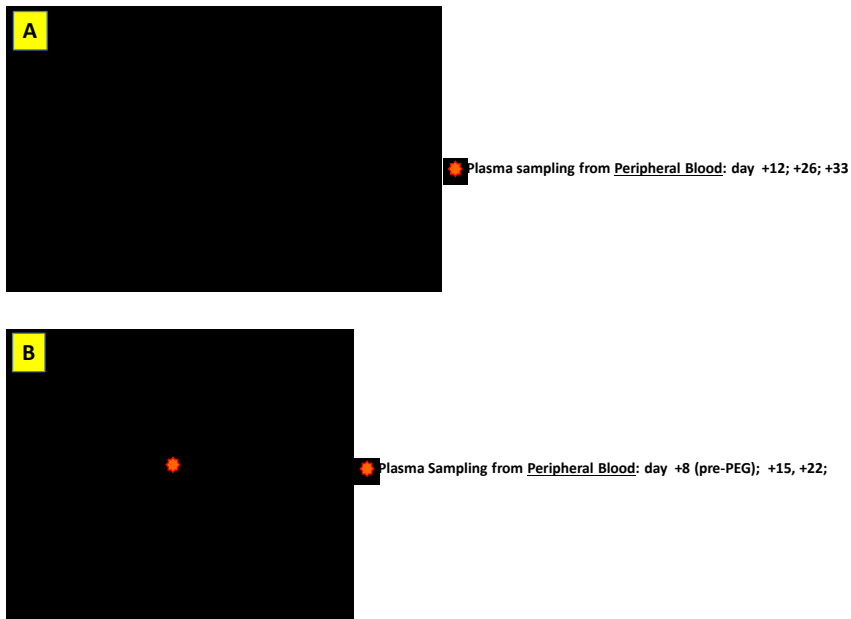


**Figura 2:** Meccanismo di azione dell'Asparaginasi



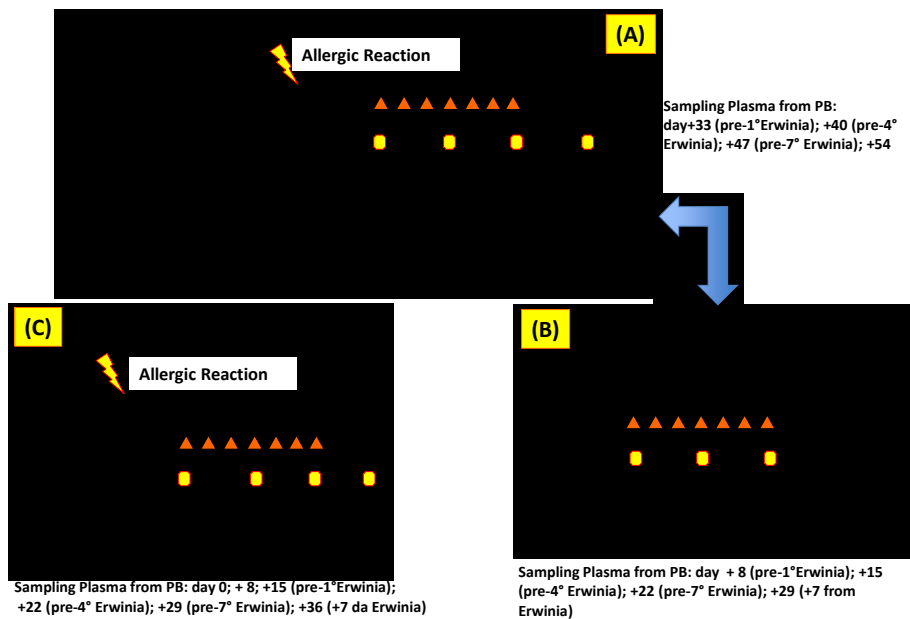
**Figure 3**

**CHARACTERIZATION OF AMINOACID PROFILE IN CHILDREN WITH ALL Bone Marrow + Peripheral Blood during Administration of Oncaspar**

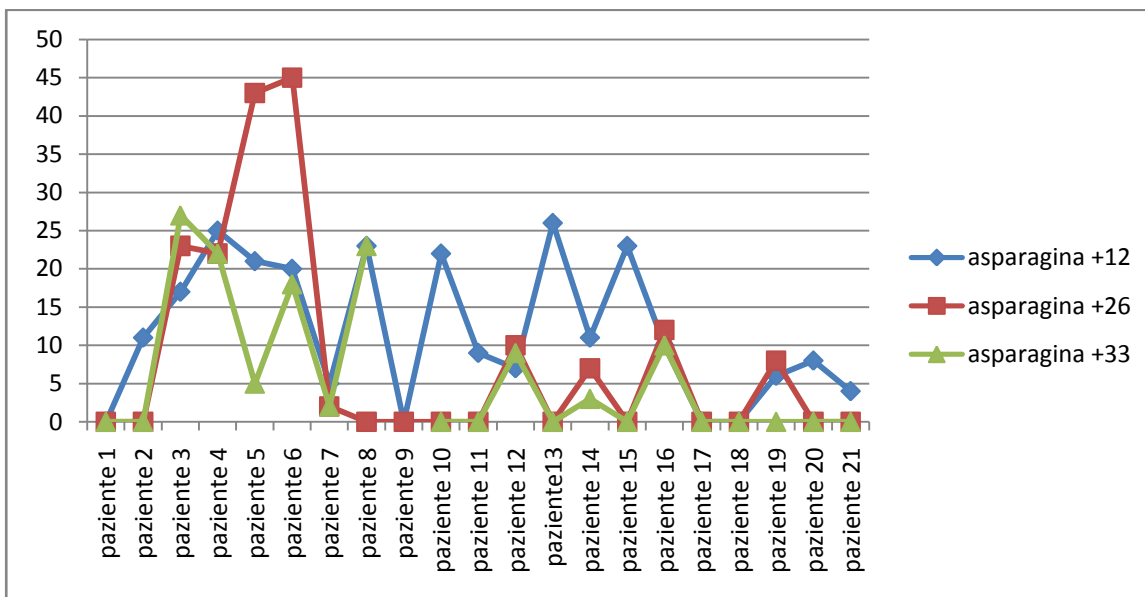


**Figure 4**

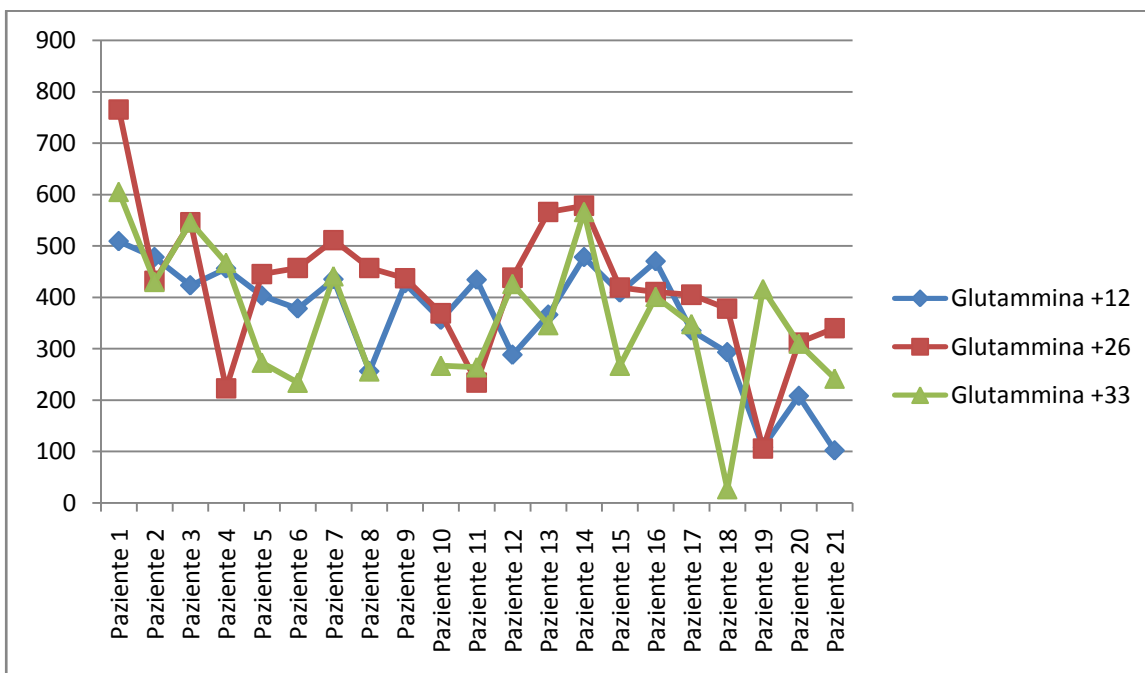
**CHARACTERIZATION OF AMINOACID PROFILE IN CHILDREN WITH ALL Bone Marrow + Peripheral Blood during Administration of ERWINASE In case of Allergic Reaction during Induction (A+B) or Protocol II (C)**



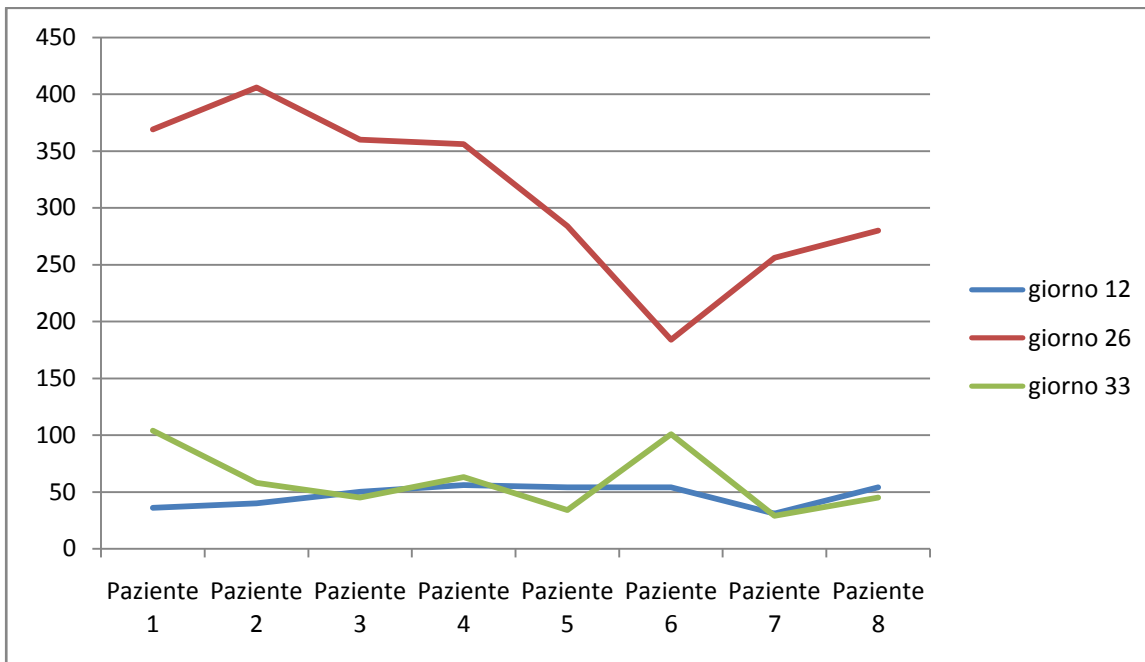
**Figura 5: Concentrazioni di asparagina ai time points +12, +26, +33**



**Figura 6: Concentrazioni di Glutamina ai time points +12, +26 +33**

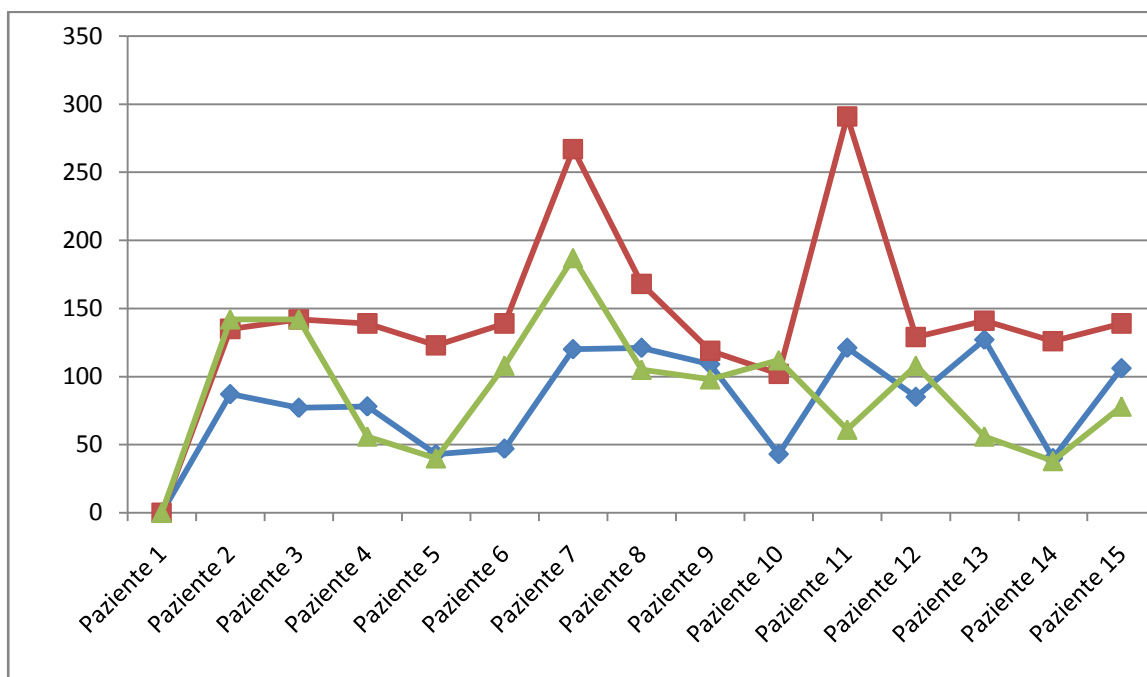


**Figure 7: Concentrazioni di Fenilalanina ai giorni + 12, +26, +33**



	giorno +12 µMOL/L	giorno +26 µMOL/L	Giorno +33 µMOL/L
Paziente 1 C. F.	36	369	104
Paziente 2 D. M. E.	40	406	58
Paziente n. 3 G.F.	50	360	45
Paziente 4 G. S.	56	356	63
Paziente 5 N. M.	54	284	34
Paziente 6 R. C.	54	184	101
Paziente 7 T. C.	31	256	29
Paziente 8 F.D.	54	280	45

**Figura 8 : Concentrazioni di Treonina ai giorni +12, +26, +33**



	giorno +12 µMOL/L	giorno +26 µMOL/L	giorno +33 µMOL/L
Paziente 1 R. C	78	147	123
Paziente 2 V. S.	87	136	142
Paziente 3 G. S.P.	77	142	142
Paziente 4 N. F.	78	139	56
Paziente 5 T. C	43	123	40
Paziente 6 D. M. E.	47	139	108
Paziente 7 G. F.	120	267	187
Paziente 8 G. S.	121	168	105
Paziente 9 S. S.	109	119	98
Paziente 10 C.F.	43	102	112
Paziente 11 S. E.	121	291	61
Paziente 12 N. M	85	129	108
Paziente 13 R. P	127	141	56
Paziente 14 T. G.M	40	126	38
Paziente 15 V. D.	106	139	78

## **Bibliografia**

1. Pui C.H., Carrol W., Meshinchi S., Arceri R., Biology, ***Risk stratification and therapy of Pediatric Leukemia: an update***, Journal of Clinical Oncology 2011, 29:551-65.
2. Inaba H., Greaves M, Mulligan Cg, ***Acute Lymphoblastic Leukemia***. Lancet 2013,381: 1943-55.
3. Stocco G., Franca R, Verzegnassi F. Londero M et al. ***Pharmacogenomic approaches for tailored anti – leukemic therapy in children***. Curr Med Chem 2013,20: 2237-53.
4. Pinkel D. History and development of total therapy for acute lymphocytic leukemia. In: Murphy SB, Gilbert JR (eds). ***Leukemia Research: Advances in Cell Biology and Treatment***. New York: Elsevier Scier Publishing Co., Inc., 1983; 189-20.
5. Riehm H, Gadner H, Henze G, Kornhuber B, Langermann H-J, Muller-Wehrich S, Schellong G. ***Acute lymphoblastic leukemia: treatment result in three BFM studies (1970-1981)***. In: Murphy SB,

Gilbert JR (eds). Leukemia Research: Advances in Cell Biology and Treatment. Elsevier Science: Amsterdam, 1983; 251-263.

6. Conter V., Aricò M, Valsecchi MG, Basso G, Biondi A., Madon R E., Mandelli F., Paolucci G, Pession A., Rizzari C, Rondelli R, Zanesco L, Masera G. *Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) acute lymphoblastic leukemia studies, 1982-1995*. Leukemia 2000; 14 (12): 2196-204.

7. Greaves MF, Coman SM, Beard ME, Brastock K, Cabrera ME, Chen PM, Jacobs P, Lam-Po-Tang PR, MACDougall LG, Williams CK, et al. *Geographical distribution of acute lymphoblastic leukemia subtypes: second report of the collaborative group study*. Leukemia 1993; 7 (1):27-34.

8. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW, Lacour B, Parkin M. *Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study*. Lancet 2004; 364(9451):2097-105.



9. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. *Prenatal origin of acute lymphoblastic leukemia in children*. Lancet 1999; 354 (9189): 1499-1503.
10. Greaves M., Maia A.T., Wiemels J.L., Ford A.M. *Leukemia in twins: lesions in natural history*. Blood 2003, 102: 2321-33.
11. Cazzaniga G., van Deft F.W., Lo Nigro L., et al. *Development origins and impact of BCR-ABL 1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph+ acute lymphoblastic leukemia*. Blood 2011,118 (2): 5559-64.
12. Bateman C., Colman S.M., Chaplin T. et al. *Acquisition of genome –wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia*. Blood 2010, 115 (17): 3553-8.
13. Mullighan C. *Genomic Profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia*. *Best Practise & Research Clinical Haematology* 2011, 24; 489-503.

14. Almalte Z., Samarini S., Iannello A., et al. *Novel associations between activating killer- cell immunoglobuline - -like receptor genes and childhood leukemia*. Blood 2011, 118 (5): 1323 – 8.
15. Cocco C., Canale S., Frasson C., et al. *Interleukine 23 acts as antitumor agent on childhood B-acute lymphoblastic leukemia*. Blood 2010,116 (19): 3887-98.
16. Schochat C., Tal N., Bandapalli O.R., Palmi C., *Gain of function mutations of interleukin 7 receptor (IL7-R) leukemia*. Journal of Experiemntal Medicine 2011, 208 (5): 901-8.
17. Henderson ES, McArthur J. *Diagnosis, classification, and assessment of response to treatment*. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF. Leukemia, 7th Edition. Philadelphia, PA: Saunders; 2002:227-48.
18. van der Does-van den Berg A, Bartram CR, Basso G, Benoit YC, Biondi A, Debatin KM, Haas OA, Harbott J, Kamps WA, Köller U, et al. *Minimal requirements for the diagnosis, classification and*

*evaluation of the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in the "BFM family" Cooperative Group.* Med Pediatr Oncol 1992; 20(6): 497-505.

19. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, Benetello A, Buldini B, Maglia O, Masera G, Conter V, Aricò M, Biondi A, Gaipa G. *Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow.* Journal of Clinical Oncology 2009; 27(31): 5168-5174.

20. Pui CH, Campana D. *New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia 2000; 14(5): 783-5.

21. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schafer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Velsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR. *Minimal residual disease directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP*

***BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia.***

Leukemia 2008.

22. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. ***Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood.*** Lancet 1998; 352(9142):1731- 8.

23. Pui CH, Relling MV, Downing JR. ***Acute lymphoblastic leukemia.*** N Engl J Med 2004; 350(15):1535-48.

24. Harrison C.J. ***Cytogenetics of pediatric and adolescent acute lymphoblastic leukemia.*** British Journal of Haematology, 2009; 144:147-56.

25. Lo Nigro L., Valsecchi M.G., Cazzaniga G., et al. ***Outcome of Children (non-infant) with t(4;11) positive Acute Lymphoblastic Leukemia treated with AIEOP-LLA 2000-R2006 Protocols.*** XXXI

SIOP Meeting, San Paulo, Brazil. *Pediatric Blood and Cancer* 2009, abstract n° PA.060, vol 53(5):pag 778.

26. Hertzberg L., Vendramini E., Ganmore I. et al. ***Down syndrome acute lymphoblastic leukemia: highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report of IBFM Study Group.*** *Blood* 2010,115:1006-17.

27. Chen I.M., Harvey R.C., Mullighan C. et al. ***Outcome modeling CRLF2, IKZF1, JAK and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group Study.*** *Blood* 2012, 12;119(15):3512-22.

28. Lo Nigro L., Mirabile E., Tumino M., et al. ***Detection of CALM/AF10 Fusion Transcript does not predict a poor outcome in children with T-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia treated with AIEOP ALL 2000 Protocol and subsequent Modified 2000 Study (R-2006).*** *Leukemia* 2013 Dec; 27(12):2419-21.

29. Meijerink J.P., den Boer M., Pieters R. ***New genetic abnormalities and treatment response in acute lymphoblastic leukemia.*** *Seminars in Hematology* 2009, 46(1):16-23.

30. Zhang J., Ding L., Holmfeldt L., Wu G. et al. ***The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.*** Nature 2012, 481:157-163.

31. Martelli A.M., Evangelisti C., Chappel W. et al. ***Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway.*** Leukemia 2011, 25:1064-79.

32. Lo Nigro L., Bonaccorso P., Tumino M., et al. ***Downregulation of mTOR and P70S6K $\beta$ 2 in Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (TALL) is correlated with a poor prognosis.*** American Society of Hematology (ASH) 53rd Annual Meeting Blood 2011, 116: abs 2508.

33. Pui C.H., Mullighan C. G., W. E. Evans, M. V. Relling. ***Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?*** Blood 2012 June 22; 120: 1165-1174.

34. Tong W.H., Pieters R., Gertjan J, et al. ***A prospective study on drug monitoring of PEG Asparaginase and Erwinia asparaginase***

**and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia.** Blood 2014, 123,(13), 2026-2033.

35. Abshire TC, Pollock BH, Billett AL et al. *Weekly polyethylene glycol conjugated Lasparaginase compared with biweekly dosing produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study.* Blood 2000, 96(5):1709-15.

36. Muller HJ, Boos J. *Use of L-Asparaginase in childhood ALL.* Crit. Rev Oncol Hematol 1998;28:97-113.

37. Boos J, Weber G, Ahlke E, et al. *Monitoring of asparaginase activity and asparaginase levels in children on different asparagines preparations.* Eur J Cancer 1996; 32A:1544-1550.

38. Vieira Pinheiro JP, Ahlke E, Nowak-Gottl U, et al. *Pharmacokinetics dose adjustment of Erwinia asparaginase in protocol II of the paediatric ALL/NHL –BFM treatment protocols.* Br J Haematol 1999;104;313-320.

39. Avraim VI, Panosasyan EH. *Pharmacokinetics/pharmacodynamic relationship of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future.* Clin Pharmacokinet 2005;44:367-393.
40. Pieters R., Hunger S. et al. *L-Asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase.* Cancer 2011; 117(2): 238-249.
41. Rizzari C, Zucchetti M, Conter V, et al. *L asparagine depletion and L-asparaginase activity in children with acute lymphoblastic leukemia receiving i.m. or i.v. Erwinia C. or E. coli L-asparaginase as first exposure.* Ann Oncol. 2000;11(2):189-193.
42. Vrooman L., Kirov I. et al. *Activity and toxicity of intravenous Erwinia Asparaginase following allergy to E. coli derived asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia.* Pediatric Blood Cancer 2016 February; 63(2): 228-233.



43. Asselin B., Rizzari C., *Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring*. Leukemia and Lymphoma, 2015, 56(8): 2273-2280.
44. Wetzler M, Sanford B L, Kurtzberg J , et al. *Effective asparagines depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 951*. Blood 2007; 109: 4164 – 4167.
45. Amylon MD , Shuster J , Pullen J , et al . *Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study* . Leukemia 1999; 13:335 – 342.
46. Panosyan EH, Grigoryan RS, Avraims IA, et al. *Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagins deamination by asparaginases in vivo (CCG-1961)*. Anticancer Res 2004; 24:1121-1125.
47. Asselin BL , Kreissman S , Coppola DJ , et al . **Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in**

**childhood acute lymphoblastic leukemia.** J Pediatr Hematol Oncol 1999; 21: 6– 12.

48. Panetta JC, Gajjar A et al. **Comparison of native E. coli and PEG Asparaginase pharmacokinetics and pharmacodynamics in pediatric acute lymphoblastic leukemia.** Clin Pharmacol Ther. 2009, 86:651-8.

49. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP et al. *A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study.* Blood 2002 Mar 15;99(6):1986-94.

50. Panosyan EH, Seibel NL, Martin –Aragon S, et al. *Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961.* J Pediatric Hematol Oncol 2004;26:217-226.

51. Fernandez C.A., Stewart E, Panetta C, et al. *Successful challenges using native E. coli asparaginase after*

*hypersensitivity reactions to PEGylated E. coli asparaginase.*

Cancer Chemoter Pharmacol DOI 10.1007/s00280-014-2464-2.

52. Rizzari C, Conter V, Stary J et al. ***Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia.*** Curr Opin Oncol 2013; 25(Suppl. 1): S1-S9:
53. Inge M. van der Sluis, Lynda M. Vrooman et al. ***Consensus expert recommendation for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation.*** Haematologica 2016, Vol 11(3): 279-285.
54. Rizzari. C. **Shedding light on the asparaginase galaxy.** Blood 2014 123: 1976-1978.
55. Pui Ching –Hon. **Is Erwinase Necessary for all children with ALL and Allergic Reactions to E.coli Asparaginase?** Pediatric blood and Cancer 2016 Apr;63(4):587-8.
56. Yen H., Chang W. ***Outcomes following Discontinuation of E. coli L Asparaginase Upon Severe Allergic Reactions in Children With***

*Acute Lymphoblastic Leukemia*. Pediatric Blood Cancer 2016;63:665-679.

57. Nobuko Hijiva, Ingrid M. *Asparaginase associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia & Lymphoma 2016 57(4):748-57.

58. Raheel A. Raja, Kjeld Schmiegelow et al. *Asparaginase associated pancreatitis in children with acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL 2008 protocol*. British journal of Haematology 2014, Apr;165(1):126-33.

59. Barry E, De Angelo DJ et al. *Favorable outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on Dana Faber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocols*. J Clin Oncol. 2007; 25: 813-819.

60. Kearney SL, Dahlberg SE, Levy DE, Voss SD, Sallan SE, Silverman LB. *Clinical course and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia and asparaginase-associated pancreatitis*. Pediatr Blood Cancer 2009; 53:162–167.

61. Bradley, EL II (1993) *A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis*, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Archives of Surgery*, 128, 586-590.
62. Caruso V, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, et al. *Thrombotic complications in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of 17 prospective studies comprising 1752 pediatric patients*. *Blood* 2006; 108: 2216–2222.
63. Merlen C., Bonnefov A. et al. *L-Asparaginase lowers Plasma Antithrombin and Mannan–Binding-Lectin Levels: Impact on Thrombotic and Infectious Events in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatric Blood Cancer* 2015, 62(8), 1381-7.
64. Parsons SK, Skapek SX, Neufeld EJ, et al. *Asparaginase associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Blood* 1997; 89: 1886–1895.
65. Cremer P, Lakomek M, Beck W, et al. *The effect of L-asparaginase on lipid metabolism during induction chemotherapy of childhood lymphoblastic leukaemia*. *Eur J Pediatr* 1988; 147: 64–67.

66. Steinherz PG. ***Transient, severe hyperlipidemia in patients with acute lymphoblastic leukemia treated with prednisone and asparaginase.*** Cancer 1994; 74: 3234–3239.
67. Bhojawani D, Darbandi R, Pei D, et al. **Severe hypertriglyceridaemia during therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia.** Eur J Cancer 2014; 50: 2685–2694.
68. Tong WH, Pieters R, de Groot-Kruseman HA, et al. **Toxicity of very prolonged PEGasparaginase and Erwinia asparaginase courses in relation to asparaginase activity levels with a special focus on dyslipidemia.** Haematologica 2014; 99: 1716–1721.
69. Ridola V, Buonomo PS, Maurizi P, et al. **Severe acute hypertriglyceridemia during acute lymphoblastic leukemia induction successfully treated with plasmapheresis.** Pediatr Blood Cancer 2008; 50: 378–380.

70. Bostrom B. **Successful management of extreme hypertriglyceridemia from pegaspargase with omega-3.** *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59: 350.
71. Pui CH, Burghen GA, Bowman WP, et al. ***Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone.*** *J Pediatr* 1981; 99: 46–50.
72. Howard SC, Pui CH. ***Endocrine complications in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia.*** *Blood Rev* 2002; 16: 225–243.
73. Stock W, Douer D, DeAngelo DJ, et al. ***Prevention and management of asparaginase/pegasparaginase-associated toxicities in adults and older adolescents: recommendations of an expert panel.*** *Leuk Lymphoma* 2011;52: 2237–2253.
74. Boissel N, Auclerc MF, Lhe´ritier V, et al. ***Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 trials.*** *J Clin Oncol* 2003; 21: 774–780.

75. Ramanujachar R, Richards S, Hann I, et al. *Adolescents with acute lymphoblastic leukaemia: outcome on UK national paediatric (ALL97) and adult (UKALLXII/E2993) trials*. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 254–261.
76. Jaing TH, Lin JL, Lin YP, et al. *Hyperammonemic encephalopathy after induction chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia*. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31: 955–956.
77. Frantzeskaki F, Rizos M, Papathanassiou M, et al. *L-asparaginase fatal toxic encephalopathy during consolidation treatment in an adult with acute lymphoblastic leukemia*. *Am J Case Rep* 2013; 14: 311–314.
78. Johnston PG, Hardisty RM et al., *Myelosuppressive effect of colaspase (L-Asparaginase) in initial treatment of acute lymphoblastic leukemia*. *Br Med J* 1974; 3: 81-83.
79. Merryman R., Stevenson KE et al. *Asparaginase-associated myelosuppression and effects on dosing of other chemotherapeutic agents in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatric Blood Cancer* 2012; 59: 925-927.

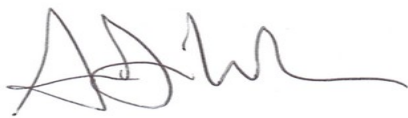


80. Silverman L. B., Supko J.G., Stevenson K. E., Woodward C. et al., *Intravenous PEG-asparaginase during remission induction in children and adolescent with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia.* Blood 2010, 115(7): 1351-1353.
81. Gervasini G., Vagace J. *Impact of Genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Frontiers in Genetics, 3: 1-11; 2012.
82. Egbelakin A., Fergusson MJ, MacGill EA et al. *Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia.* Pediatric Blood & Cancer, 56: 361-7; 2011.
83. Chen SH, Pei D et al. *Genetic variation in GRIA1 on chromosome 5q33 related to asparaginase hypersensitivity.* Clin Pharmacol Ther. 88:191-6; 2010.
84. Tanfous, Kerjci O., Starkova J. et al. *Upregulation of asparaginase synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1 positive leukemic cells.* Leukemia 2004; 18:434-4188:191-6.

85. Kerjci O., Starkova J. et al. *Upregulation of asparaginase synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1 positive leukemic cells*. Leukemia 2004; 18:434-41.
86. Liu C., Yang W. et al. *Clinical and Genetic Risk factor for Acute Pancreatitis in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia*. Journal of Clinical Oncology 2016 Jun 20;34(18):2133-40.
87. Fernandez CA, Smith C et al. *HLA DRB1\*07;01 is associated with high risk of asparaginase allergies*. Blood, 124: 1266-1276; 2014.
88. Minowa k, Suzuki M, Fujimura J et al. *L-asparaginase-induced pancreatic injury is associated with an imbalance in plasma aminoacid levels*. Drugs 2012, 12: 49-55.
89. Tong WH, Pieters R et al. *No evidence of increate asparagine levels in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy*. Pediatric Blood and Cancer, 60:250-261;2013.
90. Iwamoto S, Mihara K. E al. *Mesenchimal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase*. J Clin Invest. 2007; 117: 1049-57.

91. Rizzari C, Putti MC. E al. *Rationale for a pediatric-inspired approach in the adolescent and young adult population with acute lymphoblastic leukemia, with a focus on asparaginasi treatment.*

Hematol Rep 2014, 6(3): 5554.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Rizzari C', with a stylized, cursive script.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Putti MC', with a cursive script.