



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

## DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA  
E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO COMUNE

CICLO 26°

NUOVE STRATEGIE MANIPOLATIVE *EX VIVO* PER IL *PURGING*  
DELLE UNITA' DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE  
PERIFERICHE DESTINATE AL TRAPIANTO AUTOLOGO DI MIDOLLO

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Claudio Grandi

**Dottorando:** Arianna Veronesi





UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

## DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA  
E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO COMUNE

CICLO 26°

NUOVE STRATEGIE MANIPOLATIVE *EX VIVO* PER IL *PURGING*  
DELLE UNITA' DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE  
PERIFERICHE DESTINATE AL TRAPIANTO AUTOLOGO DI MIDOLLO

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Claudio Grandi

**Dottorando:** Arianna Veronesi



## SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 1</b>
1. Il sistema ematopoietico	pag. 1
2. Il fenotipo delle cellule staminali ematopoietiche	pag. 4
3. La leucemia mieloide acuta	pag. 7
4. Trattamento della leucemia mieloide acuta	pag. 9
4.1 Il <i>purging</i>	pag. 13
5. Il Gemtuzumab ozogamicina (GO)	pag. 17
5.1 Struttura e sviluppo	pag. 17
5.2 Meccanismo d'azione	pag. 21
5.3 Meccanismi di resistenza	pag. 22
5.4 Farmacocinetica ed efficacia	pag. 23
5.5 Effetti avversi	pag. 24
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>pag. 27</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 28</b>
1. Prelievo delle unità di sangue cordonale	pag. 28
2. Raccolta delle PBSC ( <i>Peripheral Blood Stem Cells</i> )	pag. 28
3. Separazione delle cellule mononucleate	pag. 29
4. Tecniche di crioconservazione	pag. 29
5. Valutazione della crescita clonogenica in presenza di Gemtuzumab ozogamicina	pag. 30
6. Valutazione del <i>timing</i> di trattamento nella linea HL60	pag. 31
7. Crescita clonogenica dopo incubazione breve con Gemtuzumab ozogamicina	pag. 31
8. Effetti del Gemtuzumab ozogamicina sul subset ematopoietico CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup>	pag. 32

9. Analisi statistica	pag. 33
<b>RISULTATI</b>	<b>pag. 35</b>
1. Valutazione della crescita clonogenica in presenza di Gemtuzumab ozogamicina	pag. 35
2. Valutazione del <i>timing</i> di trattamento nella linea HL60	pag. 37
3. Crescita clonogenica dopo incubazione breve con Gemtuzumab ozogamicina	pag. 39
4. Effetti del Gemtuzumab ozogamicina sul subset ematopoietico CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup>	pag. 42
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 45</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>pag. 49</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 51</b>

# INTRODUZIONE

## 1. Il sistema ematopoietico

Il sistema ematopoietico è costituito da una ristretta popolazione di cellule capostipiti che, attraverso un sistema altamente gerarchizzato di progenitori clonogenici con differenti capacità proliferative ed espansive, origina i precursori e le forme terminali delle filiere differenziative mieloidi, linfoidi, eritroidi e megacariocitiche. Questo processo è definito ematopoiesi e, nell'adulto, ha luogo nel midollo osseo (BM, Bone Marrow) dello sterno, delle vertebre, delle ossa iliache e delle costole.

Il primo ad ipotizzare l'esistenza delle cellule staminali ematopoietiche (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*) fu Alexander Maximov, nel 1909; egli le descrisse come cellule morfologicamente simili a linfociti capaci di migrare attraverso il sangue fino a delle nicchie il cui microambiente consentisse loro di proliferare e differenziarsi lungo specifici *pathways* differenziativi. Per molti anni, comunque, gli studiosi focalizzarono la loro attenzione sul midollo osseo, dove si trova la maggior parte delle HSC, e l'interesse per quelle circolanti rimase secondario fino al momento in cui si svilupparono nuove strategie per il trapianto, nella metà degli anni '80.

L'esistenza delle HSC nel midollo adulto è stata dimostrata su base funzionale. Nel 1961, Till e McCulloch, inoculando nuovo tessuto mieloide in topi irradiati, evidenziarono, a livello della milza, lo sviluppo di noduli ematopoietici definiti con il termine di *Colony Forming Unit-Spleen* (CFU-S) ed identificarono le HSC nelle cellule che costituivano tali strutture. In realtà, successive indagini dimostrarono l'eterogeneità delle popolazioni CFU-S, che comprendevano *subset* cellulari immaturi caratterizzati da differenti patterns fenotipici e funzionali.

Successivamente sono stati proposti test *in vitro* per saggiare le cellule ematopoietiche più immature. Questi includono il saggio LTC-IC (*Long Term Culture-Initiating Cell*), che consente di identificare e quantificare le cellule primitive capaci di sviluppare, dopo cinque settimane di co-cultura su *feeder layer* stromali, le *Colony Forming Cells* (CFC). Con tale tecnica, nel midollo osseo umano, la frequenza delle LTC-IC è risultata di 1 ogni 10-20.000 cellule totali, pari allo 0,5-1% delle cellule CD34<sup>+</sup>. Un saggio analogo è rappresentato dal

*Cobblestone Area-Forming Cells* (CAFC) assay, che ha il vantaggio di poter osservare al microscopio ottico la formazione delle aree ematopoietiche (*Cobblestone areas*) generate dalle cellule primitive senza dover effettuare test clonogenici di rivelazione sacrificando la coltura iniziale (Bonnet, 2002).

Modelli di studio più adeguati sono stati sviluppati *in vivo*, dove è possibile saggiare le potenzialità di ripopolamento a lungo termine delle cellule ematopoietiche (*Long Term Repopulation*, LTR).

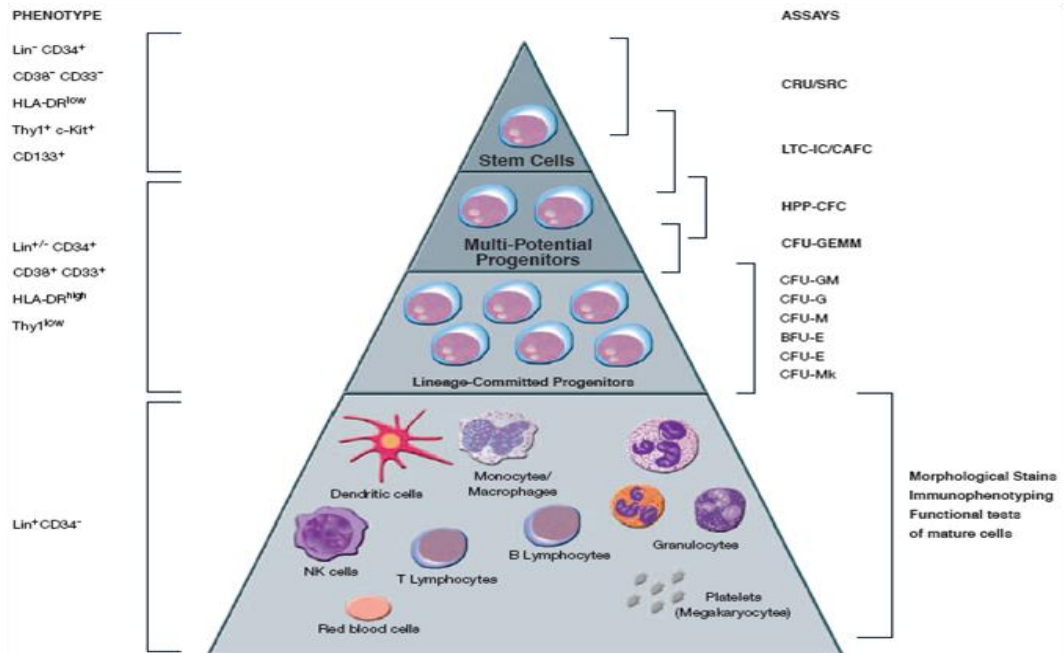
Considerati globalmente, questi studi hanno documentato come le HSC siano caratterizzate funzionalmente dalla capacità di autorinnovamento e dall'elevato potenziale multidifferenziativo e proliferativo. E' stato stimato che le HSC presenti nel midollo umano adulto siano approssimativamente 50 milioni e che ciascuna di esse abbia un potenziale generativo teorico, nell'arco di vita di un individuo, di 1.013 cellule ematiche mature. Comunque, gli esperimenti *in vivo* di ricostituzione a lungo termine del midollo osseo hanno mostrato come il potenziale proliferativo sia disgiunto delle capacità differenziative, essendo funzionale anche all'automantenimento di questa popolazione cellulare. Tale fenomeno, infatti, è critico per le HSC, poiché il *commitment* di queste cellule verso elementi più maturi ha come conseguenza la deplezione del loro *pool* (Bonnet, 2002).

I primi studi sulla cinetica dei fenomeni di automantenimento indicavano come le HSC nel midollo in stato stazionario fossero in gran parte quiescenti. Successivamente, fu ipotizzato che le HSC rimanessero normalmente in fase G0 poiché tale fase assicurava loro la necessaria integrità genetica mantenendole al riparo da danni al DNA. Comunque, più recentemente indagini condotte su modelli murini sembrano indicare che le cellule capostipiti entrino nel ciclo cellulare anche nel midollo in "*steady state*" con un turnover medio di 30 giorni.

I saggi di crescita clonogenica in terreno semisolido sviluppati da McNiece e colleghi (1989) indicano la presenza, immediatamente a valle delle HSC, di *subset* cellulari ad elevato potenziale proliferativo (*High-Proliferative Potential Colony-Forming Units*, HPP-CFU) con caratteristiche fenotipiche e funzionali intermedie tra la cellula staminale pluripotente ed i progenitori ematopoietici.

Nel midollo osseo le HSC e le HPP-CFU possono generare, attraverso il fenomeno del commissionamento, progenitori multipotenti (Figura 1).





**Figura 1.** Organizzazione gerarchica del sistema ematopoietico nel midollo adulto.

I progenitori *committed* sono cellule che crescono bene in mezzi semisolidi (agar/metilcellulosa), dove generano colonie con peculiari caratteristiche morfologiche che le rendono identificabili al microscopio.

La CFU-GEMM (CFU-*Granulocyte/Erythrocyte/Macrophage/Megakaryocyte*), o CFU-Mix, viene considerata la colonia capostipite multipotente mieloide essendo costituita da elementi cellulari con potenzialità maturative non ristrette, capaci di generare a loro volta colonie formate da cellule granulocitarie, eritroidi, macrofagiche e megacariocitiche. Inoltre, tali colonie potrebbero essere capostipiti anche dei progenitori linfoidi. A seconda delle citochine presenti nel *medium*, la cellula CFU-GM (CFU-*Granulocyte-Macrophage*) origina colonie costituite da piccole cellule di tipo granulocitario o colonie monocitarie formate da un minor numero di cellule, ma di grandi dimensioni. I progenitori commissionati in senso eritroide, in presenza di eritropoietina (EPO), presentano rate “esplosivi” di crescita clonogenica e producono le colonie precoci BFU-E (*Burst Forming Unit-Erythroid*) costituite di cellule emoglobinnizzate. In assenza di questo ormone, originano colonie più tardive CFU-E (CFU-*Erythroid*) composte da ammassi di eritroblasti ben differenziati. Le CFU-Meg (CFU-*Megakaryocyte*) sono

progenitori megacartiocitari coltivabili in meticellulosa o su coagulo di plasma in colonie formate da poche e voluminose cellule.

La maggior parte delle cellule del midollo osseo sono costituite da precursori. Queste cellule presentano caratteristiche morfologiche nucleari e citoplasmatiche che consentono una loro classificazione nelle differenti filiere maturative. I precursori presentano scarsa capacità di automantenimento, ma, a causa del loro elevato numero e di una buona attività mitotica, aumentano considerevolmente il loro numero assoluto. Pertanto, le cellule più primitive hanno la capacità di originare una progenie enorme passando da cellule staminali a elementi funzionalmente differenziati.

## **2. Il fenotipo delle cellule staminali ematopoietiche**

Dal punto di vista morfologico e fenotipico, le HSC non sono state ancora ben definite. Si ritiene che tali cellule siano mononucleate, di aspetto simile a piccoli linfociti, con 7-10  $\mu\text{m}$  di diametro, nucleo tondeggiante e prominente, citoplasma ridotto contenente pochi organelli. Col procedere nella differenziazione queste cellule sintetizzano proteine specifiche per ciascuna linea cellulare, le loro dimensioni diminuiscono, in quanto la velocità di divisione supera quella di crescita, aumentano il numero dei ribosomi e la basofilia citoplasmatica a causa dell'aumento della sintesi di RNA. Allo stesso tempo il nucleo diventa eterocromatico e più piccolo per una graduale diminuzione della sintesi di DNA.

Un impulso fondamentale allo studio della biologia della cellula staminale è stato fornito dall'identificazione dell'antigene CD34, il marcatore di una popolazione di cellule morfologicamente e immunologicamente eterogenea il cui elemento unificante, di tipo funzionale, è rappresentato, *in vitro*, dalla capacità di generare aggregati clonali derivati sia da progenitori ontogeneticamente primitivi che orientati e, *in vivo*, dalla capacità di ricostituire la mielo-linfoiesi di un ricevente sottoposto a terapia mielo-linfoablativa (Carlo-Stella *et al.*, 1995).

L'antigene CD34 è una glicoproteina monomerica transmembrana di 90-120kD espressa dall'1-3% delle cellule midollari, dallo 0,01-0,1% delle cellule del sangue periferico in *steady-state* e dallo 0,1-0,45% delle cellule di sangue cordonale. La sua funzione non è stata ancora chiarita, ma sembra che tale

proteina sia coinvolta nella morfogenesi e che medi l'adesione delle HSC alle cellule stromali e alla matrice extracellulare presenti nel microambiente midollare. Originariamente, la scoperta dell'antigene CD34 è stata il risultato più rilevante di una strategia attuata per sviluppare anticorpi monoclonali capaci di riconoscere specificamente i *subset* più immaturi. L'espressione di tale antigene sulla membrana cellulare è divenuto rapidamente il *marker* elettivo per il riconoscimento, il conteggio, l'isolamento e la manipolazione delle cellule staminali ematopoietiche. Tuttavia, il CD34 è espresso anche nei progenitori commissionati, nelle cellule endoteliali ed in alcuni fibroblasti (Bonnet, 2002). Inoltre, vi sono evidenze che dimostrano l'esistenza di una popolazione di HSC CD34<sup>-</sup> molto primitiva; sembra che la cellula HSC CD34<sup>-</sup> possa generare *in vivo* cellule CD34<sup>+</sup> ed abbia anche la capacità di differenziarsi in senso non ematico.

Altri marcatori sono stati proposti per il riconoscimento delle cellule staminali più primitive, quali il Thy-1(CD90), il c-Kit (CD117) e il CD133 (Figura 1). Come per l'antigene CD34, pure la funzione espletata dall'antigene Thy-1 non è nota, anche se numerose evidenze lo indicano come un *marker* precoce delle HSC. Infatti, è stato dimostrato che solo le cellule CD34<sup>+</sup> che esprimono l'antigene Thy-1 sono responsabili della ricostituzione dell'ematopoiesi in topi SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*, immunodeficienza severa combinata). Il proto-oncogene c-kit codifica per un recettore transmembrana ad attività tirosin-chinasica coinvolto intimamente nell'ematopoiesi e risulta co-espresso con il CD133 nelle cellule CD34 più primitive. Il suo ligando è il fattore di Steel o *Stem Cell Factor* (SCF).

Un altro antigene di superficie usato per l'immunofenotipizzazione è il CD38, che sembra essere assente nelle cellule staminali primitive, comparando invece nei progenitori multipotenti. Alcuni studi in topi SCID hanno dimostrato che cellule CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> hanno la capacità di sostenere una ricostituzione stabile dell'ematopoiesi, mentre l'infusione di cellule CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> determina un ripopolamento ematologico veloce ma transiente (Mazurier *et al.*, 2003).

Altri antigeni sono assenti o solo debolmente presenti nelle cellule primitive, ma sono altamente espressi in certi progenitori *lineage-committed*, come il CD33, il CD71, l'HLA-DR e il CD45RA. Le HSC, inoltre, non esprimono i *marker* di superficie associati a filiere di maturazione terminali e sono perciò definite Lin<sup>-</sup>.

Anche i progenitori *committed* sono stati ampiamente studiati mediante citofluorimetria. Allo stadio di CFU-Mix, fa la sua comparsa il marcatore mieloide-specifico CD33. Questo *marker* viene mantenuto sino alle fasi finali del differenziamento, ma si ritrova debolmente espresso anche a livello dei monociti maturi. In ultimo compaiono gli antigeni CD13 e CD15, acquisiti specificamente dalle cellule mieloidi allo stadio CFU-GM e mantenuti per il restante percorso maturativo. Complessivamente, gli studi fino ad oggi condotti hanno permesso di associare alla filiera differenziativa T-linfocitaria i marcatori TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*), CD10, CD7, CD5 e CD2; alla B-linfocitaria i marcatori TdT, CD10, CD19; alla mieloide i marcatori TdT, CD33, CD13, CD14, CD15; alla megacariocitica i marcatori CD61, CD41, CD42b; alla eritrocitaria i marcatori CD36 e CD71 (Carlo-Stella *et al.*, 1995).

É importante sottolineare, che, dall'analisi dei dati di letteratura, appare chiaro che i *pattern* fenotipici caratterizzanti la popolazione CD34<sup>+</sup> più primitiva risultano in parte differenti a seconda che si prendano in esame cellule del sangue cordonale, del midollo osseo e del sangue periferico mobilizzato, che rappresentano le tre possibili fonti di cellule staminali utilizzate a scopo trapiantologico in caso di gravi ematopatie (Bender *et al.*, 1994)

Rispetto alle cellule staminali adulte, infatti, quelle cordonali presentano un fenotipo caratterizzato da un aumento della frequenza del *subset* CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> (Cardoso *et al.*, 1993). Inoltre, le cellule primitive CD34<sup>+</sup> presenti nel midollo sono DR<sup>-</sup>, mentre l'espressione di tale antigene nel sangue cordonale non è chiara: in letteratura è riportata l'espressione sia del fenotipo DR<sup>+</sup> che DR<sup>-</sup>. Invece, il fenotipo predominante delle cellule CD34<sup>+</sup> mobilizzate in circolo è HLA-DR<sup>+</sup>.

L'antigene c-kit è espresso nel 60% delle cellule CD34<sup>+</sup> cordonali. Nelle cellule aferetiche il suo livello di espressione è notevolmente più basso rispetto al midollo osseo in *steady state*. Questa riduzione si manifesta con sei differenti protocolli di mobilizzazione ed è stata confermata anche dagli studi di Sakabe *et al.* (1997), che dimostrano come le cellule primitive siano confinate all'interno della popolazione c-kit<sup>low</sup>. Questa distribuzione di c-kit è in netto contrasto con l'alta espressione osservata nelle cellule primitive del sangue cordonale.

Complessivamente, la caratterizzazione fenotipica ha rivelato che la maggior parte delle cellule ematopoietiche periferiche sono CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> ed

esprimono, inoltre, gli antigeni CD13 e CD33 associati alla linea mieloide (Mayani *et al.*, 2003). L'antigene CD71 (recettore della transferrina), associato alla proliferazione cellulare, viene espresso solo nel 30% di queste cellule.

Dal confronto di questi dati con le caratteristiche immunofenotipiche del sangue cordonale risulta evidente come le cellule ematopoietiche periferiche presentino una maggior maturità differenziativa essendo CD38<sup>+</sup>/Lin<sup>+</sup>. Inoltre, dal punto di vista funzionale i precursori mobilizzati nel sangue periferico sono prevalentemente quiescenti rispetto alla controparte midollare come si deduce anche dalla bassa espressione del CD71.

### **3. La leucemia mieloide acuta**

In base al tipo di cellula affetta ed al decorso clinico le leucemie vengono suddivise in mieloidi o linfoidi, acute o croniche. Negli adulti italiani le leucemie colpiscono ogni anno 5.000 persone, con una lieve preferenza per gli uomini. In particolare, la AML rappresenta il 30% di tutte le leucemie dell'adulto e risulta essere cinque volte più frequente al di sopra dei 50 anni.

Nella maggior parte dei casi i fattori eziopatogenetici responsabili dell'insorgenza della AML non sono noti, anche se fattori ambientali, professionali, stili di vita sono stati di volta in volta chiamati in causa. In altri casi questa patologia è secondaria a disordini genetici, come la sindrome di Down, o ad altre malattie ematologiche, oppure è di tipo iatrogeno a seguito dell'esposizione a radiazioni ionizzanti o alla somministrazione di chemioterapici.

La diagnosi di AML viene effettuata mediante l'identificazione morfologica dei mieloblasti leucemici con la colorazione di Wright-Giemsa (Löwenberg *et al.*, 1999). Queste cellule hanno nuclei tondeggianti-irregolari, nucleoli ben distinti e un citoplasma molto piccolo che spesso contiene granuli azzurrofilo e un numero variabile di corpi di Auer. La presenza di più del 30% di blasti leucemici nel campione di midollo osseo è la condizione necessaria per una diagnosi definitiva di leucemia acuta. Inoltre, allo studio morfologico, si devono aggiungere tutta una serie di indagini, quali l'analisi citogenetica e molecolare, l'immunofenotipo, la citochimica e altri studi particolari, che permettono di distinguere i sottotipi di AML e di calcolare il livello di rischio, cioè la probabilità di andare incontro a recidiva della malattia con la terapia standard (McKenna, 2000).

Circa il 55% degli adulti con la AML presenta blasti leucemici con aberrazioni clonali cromosomiche non-random, quali la traslocazione t(8;21)(q22;q22), l'inversione inv(16)(p13q22), la traslocazione t(15;17)(q22;q11~21), l'anormalità abn(11q23) e la perdita di tutto o parte dei cromosomi 5 e 7 (Fröhling *et al.*, 2005).

Molti studi molecolari di queste anormalità cromosomiche hanno identificato geni specifici implicati nel processo di leucemogenesi. In particolare, gli eventi genetici che sembrano responsabili della comparsa della leucemia si possono dividere in due grandi gruppi. Un gruppo comprende mutazioni che attivano i pathways di trasduzione del segnale, determinando un'aumentata proliferazione e/o sopravvivenza dei progenitori ematopoietici. L'altro gruppo include mutazioni che colpiscono i fattori di trascrizione o componenti del complesso di coattivazione trascrizionale, causando un'errata differenziazione ematopoietica e/o l'acquisizione di un'anormale capacità di autorinnovamento. Mutazioni di entrambi i gruppi spesso concorrono a determinare la leucemia nello stesso paziente (Fröhling *et al.*, 2005). Di particolare importanza sembra essere la mutazione del recettore tirosin-chinasico, FLT3 (*FMS-like tyrosin kinase 3*) che si presenta nel 25-30% dei pazienti con AML ed è la mutazione più comune in questa patologia.

Nonostante i continui miglioramenti delle tecniche citogenetiche, circa il 45% dei pazienti mostra una mappa cromosomica assolutamente normale. Recentemente, uno studio italiano ha dimostrato che circa il 60% dei pazienti con cariotipo normale mostrava una mutazione genetica estremamente specifica, che colpisce il tratto distale del gene della nucleofosmina o NPM. Il gene mutato produce una proteina NPM alterata a livello del c-terminale che, a causa di questa anomalia, si localizza in maniera atipica all'interno delle cellule leucemiche, cioè nel citoplasma, invece che nel nucleo (Falini *et al.*, 2005).

Come si evince da queste osservazioni, la AML è una malattia eterogenea causata da una varietà di meccanismi patogenici. Dal punto di vista morfologico questa eterogeneità si manifesta nella variabilità del grado di commissionamento e di differenziazione della linea cellulare. La classificazione ancora in uso per le AML è quella sviluppata nel 1976 dal gruppo cooperativo Franco-Americo-Britannico (FAB) che identifica 8 sottotipi diversi (da M0 a M7), che differiscono nella

specifica linea mieloide coinvolta e nel grado di differenziazione delle cellule leucemiche (Löwenberg *et al.*, 1999). Come riportato in Tabella 1, la distinzione è basata sulla morfologia dei blasti e sulla loro reattività a diverse colorazioni istochimiche.

FAB SUBTYPE	COMMON NAME (% OF CASES)	RESULTS OF STAINING			ASSOCIATED TRANSLOCATIONS AND REARRANGEMENTS (% OF CASES)	GENES INVOLVED
		MYELOPER- OXIDASE	SUDAN BLACK	NONSPECIFIC ESTERASE		
M0	Acute myeloblastic leukemia with minimal differentiation (3%)	-	-	-*	inv(3q26) and t(3;3) (1%)	<i>EVII</i>
M1	Acute myeloblastic leukemia without maturation (15–20%)	+	+	-		
M2	Acute myeloblastic leukemia with maturation (15–20%)	+	+	-	t(8;21) (40%), t(6;9) (1%)	<i>AML1-ETO, DEK-CAN</i>
M3	Acute promyelocytic leukemia (5–10%)	+	+	-	t(15;17) (98%), t(11;17) (1%), t(5;17) (1%)	<i>PML-RAR<math>\alpha</math>, PLZF-RAR<math>\alpha</math>, NPM RAR<math>\alpha</math></i>
M4	Acute myelomonocytic leukemia (20%)	+	+	+	11q23 (20%), inv(3q26) and t(3;3) (3%), t(6;9) (1%)	<i>MLL, DEK-CAN, EVII</i>
M4Eo	Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils (5–10%)	+	+	+	inv(16), t(16;16) (80%)	<i>CBFB-MYH11</i>
M5	Acute monocytic leukemia (2–9%)	-	-	+	11q23 (20%), t(8;16) (2%)	<i>MLL, MOZ-CBP</i>
M6	Erythroleukemia (3–5%)	+	+	-		
M7	Acute megakaryocytic leukemia (3–12%)	-	-	+†	t(1;22) (5%)	Unknown

\*Cells are positive for myeloid antigen (e.g., CD13 and CD33).

†Cells are positive for  $\alpha$ -naphthylacetate and platelet glycoprotein IIb/IIIa or factor VIII-related antigen and negative for naphthylbutyrate.

**Tabella 1.** Classificazione FAB della leucemia mieloide acuta

#### 4. Trattamento della leucemia acuta mieloide

La terapia dell'AML ha come obiettivi la remissione della sintomatologia acuta che si manifesta all'esordio della malattia e la prevenzione delle ricadute causate dalla malattia minima residua. Conseguentemente, essa si articola, in prima istanza, nel "trattamento induttivo della remissione", a cui fa seguito una fase di consolidamento terapeutico definito "trattamento post-induttivo". In ambito clinico, per remissione completa si intende la scomparsa, dopo trattamento induttivo, di anemia, piastrinopenia, leucocitosi e/o leucopenia ed il ripristino di una ematopoiesi normale associata ad una percentuale dei blasti midollari inferiore al 5% (Fröhling *et al.*, 2005). Più recentemente, per le forme leucemiche caratterizzate da markers molecolari, Raanani et Ben-Bassat (2004) hanno introdotto il concetto di "remissione molecolare": questa si verificherebbe quando

tali marcatori non sono più evidenziabili con metodiche di biologia molecolare in grado di scoprire la presenza di malattia con una soglia minima di 4-10 cellule.

La chemioterapia sistemica è ancora oggi la modalità terapeutica elettiva per indurre la remissione. Usualmente viene impiegata la citosina arabinoside in associazione ad un antraciclino (daunorubicina, aclarubicina, idarubicina) o all'antracenedione mitoxantrone (Tallman *et al.*, 2005). Convenzionalmente, le antracicline (da 45 a 60 mg/m<sup>2</sup>/dose) sono somministrate per i primi tre giorni di trattamento, mentre la citosina arabinoside (100-200 mg/m<sup>2</sup>) viene ugualmente somministrata dal primo giorno di trattamento per un periodo di 7/10 giorni (Löwenberg *et al.*, 1999). Entrambi questi farmaci impediscono, con modalità differente la sintesi del DNA delle cellule leucemiche, bloccando così la loro proliferazione e determinandone la morte. La persistenza dei blasti implica la reiterazione di ulteriori cicli chemioterapeutici. Un'eccezione a questo approccio terapeutico è rappresentato dal protocollo induttivo della Leucemia Acuta Promielocitica (M3) che prevede l'impiego dell'acido trans-retinoico (ATRA), un derivato della vitamina A, capace di indurre la differenziazione dei promielociti leucemici in elementi maturi (Estey, 2001). Nuove opzioni terapeutiche, la maggior parte delle quali ancora in fase di studio, prevedono l'associazione alla citarabina ed alla daunorubicina dell'etoposide o del topotecano, la somministrazione di farmaci innovativi, quali anticorpi monoclonali anti-CD33 coniugati con un chemioterapico, inibitori delle tirosin chinasi o della farnesil transferasi, agenti ipometilanti, inibitori delle multidrug resistance proteins, agenti antiangiogenetici, inibitori di FLT3 o oligonucleoti antisense per inibire la proteina Bcl-2 (Estey, 2001; Tallman *et al.*, 2005).

Secondo dati riportati dalla letteratura, i protocolli induttivi sopra descritti assicurano la remissione completa nel 70-80 % dei pazienti di età inferiore ai 60 anni ed in circa il 50 % dei pazienti più anziani (Löwenberg *et al.*, 1999). Comunque, indipendentemente dall'età, solo una piccola minoranza tra i pazienti con AML in remissione può considerarsi guarita, mentre la maggioranza ha una recidivazione a causa della malattia minima residua, cioè di quelle cellule leucemiche che essendo quiescenti sono sopravvissute alla chemioterapia di induzione. Infatti, la percentuale di pazienti in DFS a cinque anni è inferiore al



20%, con terapia di consolidamento a basso dosaggio, mentre è del 25-35% con trattamenti intensivi (Cassileth *et al.*, 1998).

Pertanto, di cruciale importanza è l'eradicazione della leucemia residua attraverso una terapia di consolidamento efficace. Questa si basa attualmente su tre differenti approcci terapeutici: il primo prevede trattamenti chemioterapici post-remissione intensivi, il secondo il trapianto di midollo allogenico, il terzo la combinazione di regimi di condizionamento mieloablativi con il trapianto autologo (Aglietta *et al.*, 1996).

Comunque, tra gli Autori non c'è un consenso su quale sia il migliore approccio terapeutico, a causa anche di alcuni fattori individuali, quali l'età del paziente, la tollerabilità del trattamento, le alterazioni citogenetiche, il numero di cicli di chemioterapia di induzione necessari alla prima remissione e la disponibilità di un donatore di cellule staminali, che possono influenzare le scelte terapeutiche.

La chemioterapia intensiva post-remissione si basa essenzialmente sull'uso dell'arabinosin-citoside ad alte dosi (3 g/m<sup>2</sup>/dose) da sola (HiDAC) o in combinazione con altri farmaci (Tallmann *et al.*, 2005). I primi studi clinici negli anni '80 dimostrarono che questa terapia consentiva una lunga DFS in circa il 25% dei pazienti in remissione completa. Più recentemente, i risultati di uno studio prospettico condotto dal gruppo CALGB (*Cancer and Leukemia Group B*) hanno dimostrato che la somministrazione di 3 g/m<sup>2</sup> di arabinosin-citoside ogni 12 ore per tre giorni alterni aumentava al 44% la percentuale di soggetti in DFS a quattro anni, nei pazienti di età inferiore a 60 (Aglietta *et al.*, 1996).

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche consiste nell'ablazione della funzione ematopoietica previa somministrazione di chemioterapici a dosaggio sovra-massimale e nella successiva ricostituzione midollare con cellule staminali emopoietiche prelevate dal midollo osseo delle creste iliache posteriori, mediante aspirazioni multiple, o dal sangue periferico, con tecniche aferetiche.

Il trapianto di midollo allogenico da donatore HLA compatibile rappresenta una pratica consolidata da un ventennio di esperienze. Il rischio di ricaduta tra i pazienti sottoposti a trapianto in prima remissione completa da un donatore familiare è generalmente inferiore al 20% (Löwenberg *et al.*, 1999). Il ridotto tasso di recidiva è il risultato non solo della terapia mielo-ablativa, ma anche della risposta citotossica del trapianto contro la malattia minima residua dell'ospite

(*Graft Versus Leukemia-GVL effect*). Tuttavia, tale effetto favorevole è parzialmente mascherato dall'elevata immunosoppressione conseguente al trattamento e dalle complicanze causate dalla GVHD (*Graft Versus Host Disease*). Studi riportati in letteratura evidenziano che a quattro anni dal trapianto la percentuale di pazienti in DFS (*Disease-Free Survival*, sopravvivenza senza malattia) varia dal 45% al 58 % (Aglietta *et al.*, 1996).

Recentemente per il trapianto allogenico è stato proposto l'impiego del sangue cordonale (CB) quale fonte di cellule staminali ematopoietiche alternativa alla donazione di midollo da parte di donatori compatibili. I dati riportati in Letteratura evidenziano i numerosi vantaggi offerti dall'utilizzo del CB, quali la facilità di reperimento, l'assenza di rischi durante la raccolta per la madre e il neonato donatore, il basso rischio di contaminazione virale e la ridotta incidenza e severità della GVHD, conseguente all'imaturità fenotipica dei linfociti T (Laughlin, 2001).

Durante gli anni 1980, il trapianto di midollo osseo autologo (*Autologous Bone Marrow Transplant*, ABMT) è stato sviluppato per consentire questo approccio terapeutico anche nei pazienti privi di donatore HLA-compatibile (Breems e Löwenberg, 2005). Con questa modalità terapeutica all'efficacia antileucemica della terapia mieloablattiva si associa l'assenza di morbilità e mortalità dovuta alla GVHD, che caratterizza il trapianto allogenico. Inoltre, il trapianto autologo è potenzialmente applicabile anche ai pazienti in remissione completa di età superiore ai 60 anni. Comunque, a tali vantaggi si contrappongono la mancanza del *GVL effect* e la possibile contaminazione delle cellule trapiantate con cellule leucemiche residue, che possono contribuire alla ricaduta della malattia.

Nel 2003, Linker ha censito i trials condotti dai gruppi collaborativi EORTC/GIMEMA, GOLEAM, MRC e ECOG, per valutare l'efficacia della combinazione chemioterapia/trapianto autologo di cellule midollari in alternativa a chemioterapia/trapianto allogenico ed alla sola chemioterapia in pazienti in prima remissione. Da tale *review* emerge che solo nel trial del gruppo EORTC/GIMEMA (Zittoun *et al.*, 1995) i risultati conseguiti con l'autotrapianto erano sovrapponibili a quelli del trapianto allogenico ed entrambi superiori alla chemioterapia intensiva di consolidamento. Comunque, in nessun *trial*, compreso quello di EORTC/GIMEMA, la sopravvivenza totale del gruppo autotrapianto è

risultata significativamente migliore, a causa probabilmente della ripresa ematologica lenta e inadeguata imputabile al trattamento stesso (Bruserud *et al.*, 2000).

Per superare la lenta ripresa ematologica che caratterizza i trapianti allogenici ed autologhi, negli ultimi anni è stato proposto l'utilizzo di cellule staminali mobilizzate nel sangue periferico (*Peripheral Blood Stem Cells*, PBSC) in alternativa a quelle espianate dal midollo osseo (Visani *et al.*, 1999). Con questa procedura la mobilizzazione delle cellule staminali viene ottenuta mediante somministrazione di fattori di crescita, mentre il loro recupero viene condotto con tecniche leucoferetiche che richiedono di solito richiede 3 o 4 ore (Jansen *et al.*, 2005). In seguito, le cellule così ottenute vengono crioconservate, fino al momento della reifusione.

La maggior rapidità di ripristino della funzione midollare dipende, soprattutto, dal grande numero di precursori commissionati presenti nelle aferesi, che necessitano di un tempo inferiore per la loro maturazione con conseguente riduzione di gravi complicanze, quali infezioni ed emorragie, e quindi della mortalità peri-trapianto. Inoltre, la riduzione del periodo di aplasia midollare determina il decremento degli eventi febbrili, una minore richiesta trasfusionale ed una più breve segregazione in camera sterile, che si traducono nella contrazione del periodo di ospedalizzazione. Nonostante i vantaggi riportati dalla letteratura nell'impiego delle PBSC, alcuni *trial* clinici condotti nei pazienti affetti da AML non hanno mostrato, in termini di sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da malattia, nessuna differenza nell'uso delle PBSC rispetto a ABMT (Breems e Löwenberg, 2005).

#### **4.1 Il *purging***

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSC) presenta numerosi potenziali vantaggi rispetto al trapianto allogenico quali la sua eseguibilità in mancanza di un donatore HLA compatibile, l'applicabilità in pazienti con più di 65 anni, i ridotti se non nulli livelli di rischio di GVHD ed il rapido recupero della funzionalità ematopoietica ed immunitaria con conseguente bassa frequenza delle complicanze e della mortalità post trapianto.

L'ostacolo maggiore all'uso di HSC autologhe dopo chemioterapia ad alte dosi è rappresentato dalla possibile reinfusione di cellule neoplastiche contaminanti che

possono contribuire alla ripresa della malattia. L'entità di tale contaminazione è determinata da molteplici variabili cliniche. Il coinvolgimento midollare è raro in alcuni tumori solidi (carcinoma dell'ovaio e del testicolo), molto frequente nel linfoma non-Hodgkin, costante nelle leucemie e nel mieloma multiplo (Forman *et al.*, 1999).

Per minimizzare questo rischio, la maggior parte dei Centri Trapianto prelevano le HSC autologhe quando i pazienti sono in remissione completa o quando le indagini istologiche, citogenetiche o di biologia molecolare non evidenziano infiltrazioni neoplastiche del midollo. La somministrazione di fattori di crescita per la mobilizzazione delle HSC dal midollo al periferico ed il loro successivo recupero mediante leucoaferesi rappresentano secondo alcuni Autori un'ulteriore valida modalità per ridurre la contaminazione neoplastica.

Per favorire l'utilizzo clinico delle cellule staminali autologhe ed ampliarne le indicazioni terapeutiche, sono stati proposti differenti metodi per la deplezione selettiva (*purging*) delle cellule neoplastiche con l'obiettivo di eliminare la contaminazione tumorale residua senza inficiare la vitalità e la funzionalità delle HSC, condizioni indispensabili per l'*engraftment* dell'autotrapianto. Tali tecnologie si basano principalmente su a) metodi di separazione fisica (filtrazione selettiva, separazione gravimetrica su gradienti di densità preceduta o meno da agglutinazione con lectine, lisi osmotica, ipotermia); b) trattamenti farmacologici *in vitro* ed *in vivo* (4-idroperoxiciclofosfamide, Asta Z); c) tecniche immunologiche di *cell targeting* (anticorpi monoclonali non coniugati, lisi complemento-mediata, *bead* immunomagnetiche, anticorpi coniugati con chemioterapici, tossine, radionuclidi).

I numerosi studi fino ad oggi condotti per l'ottimizzazione di tali tecniche in pazienti sia con una pregressa storia di infiltrazione del midollo osseo che con una manifesta infiltrazione midollare al momento della raccolta delle HSC, hanno dimostrato come il *purging in vitro* possa essere eseguito senza compromettere la capacità di ricostituzione ematologica a breve e lungo termine.

Comunque, anche se il razionale e la sicurezza trapiantologica del *purging* sono acclarati, la reale efficacia di tale tecnica rimane ancora oggetto di ampio dibattito a causa di numerosi limiti metodologici e clinici.

Perché il *purging* risulti efficace è necessario che le tecnologie adottate siano capaci di discriminare le cellule normali da quelle neoplastiche e di depletare selettivamente queste ultime, ma ciò si scontra con l'eterogeneità clonale della malattia tumorale. Inoltre, la diversa sensibilità dei test utilizzati per valutare i livelli di contaminazione residua è di ostacolo alla corretta analisi in termini di efficienza ed efficacia delle differenti metodologie di *purging* proposte, lasciando aperta l'ipotesi che con le attuali tecniche depletive l'eradicazione delle cellule neoplastiche sia sub-ottimale. I metodi di *purging in vitro* sono, inoltre, caratterizzati da elevata perdita cellulare e da alti costi di esecuzione.

Sul versante clinico, l'aspetto più controverso è il contributo dato dalle cellule tumorali reinfuse alla ripresa della malattia neoplastica. Fino ad oggi, infatti, non è stato condotto alcun *trial* clinico randomizzato che valuti l'efficienza e l'efficacia del *purging* mediante confronto tra gruppi di pazienti reinfusi con o senza HSC autologhe deplete. Inoltre, la scoperta che la maggior parte dei pazienti affetti da linfoma, se sottoposti a trapianto con HSC deplete, recidiva nella sede della lesione primitiva, ha fatto sorgere in alcuni autori la convinzione che il *purging* influenzi solo marginalmente l'outcome del trapianto autologo.

Comunque, uno studio multi-centrico condotto su pazienti affetti da mieloma multiplo avanzato sottoposti a chemioterapia mieloablative, ha dimostrato la presenza di cellule neoplastiche contaminanti nei prodotti leucoferetici ottenuti da otto dei quattordici pazienti considerati con una frequenza variabile tra  $1,13 \times 10^4$  e  $2,14 \times 10^6$  cellule per Kg di peso corporeo, sottolineando l'inconsistenza dell'assunto che le HSC mobilizzate nel periferico sono *tumor free*. Inoltre, una analisi retrospettiva condotta su aspirati midollari di 83 pazienti portatrici di carcinoma mammario ha evidenziato come la frequenza di campioni positivi per trascritti per citocheratina 19 correla con la probabilità di ripresa della malattia neoplastica dopo chemioterapia ad alte dosi e *rescue* midollare autologo. Infine, numerosi studi di *gene marking* condotti su sangue periferico mobilizzato sembrano confermare il forte contributo delle cellule neoplastiche reinfuse alla ricaduta tumorale anche se la bassa efficienza di transfezione di questa tecnologia può dare origine a falsi negativi che non consentono di trarre conclusioni definitive.

A seguito dell'introduzione nella pratica clinica della *Antibody-Targeted Therapy* (AbTT), negli anni 90 è stato proposto l'utilizzo degli anticorpi monoclonali coniugati a chemioterapici anche per il purging farmacologico delle HSC autologhe.

Uckun e colleghi (1992) hanno dimostrato che l'associazione di un anticorpo anti T-cell *antigen* coniugato a ricina con 4-idroperossiciclofosfamide (4-HC) a basso dosaggio, ha una maggior capacità eradicante i progenitori leucemici della filiera T rispetto ai singoli agenti terapeutici ed hanno utilizzato tale combinazione farmacologica anche in *trial* clinici.

Gli studi di De Fabritiis *et al.* (1985) hanno evidenziato che nel linfoma di Burkitt l'impiego di un *cocktail* costituito da 4-HC e dagli anticorpi J5 anti-Calla, J2 anti gp26 ed anti B1 decrementa di venti volte la crescita clonale neoplastica.

Lemoli *et al.* (1991) in uno studio preclinico condotto sulla linea leucemica promielocitica HL60 e su blasti di leucemia mieloide acuta (AML) crioconservati ha ottenuto una deplezione superiore a 4 logaritmi impiegando anticorpi anti antigeni di superficie (CD33 e CD13) associati a 4-HC ed etoposide. Tali *cocktail*, al contrario, non producono alcun effetto citotossico su frazioni altamente purificate di CD34 normali.

Sfortunatamente successivi *trial* clinici non hanno confermato i lusinghieri risultati ottenuti *in vitro* sopra descritti a causa dell'immunogenicità dei monoclonali murini che ne raccorcia l'emivita e della sub-ottimale attivazione della citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC) conseguente alla inadeguata fissazione del complemento.

Comunque, l'introduzione degli anticorpi monoclonali umanizzati, ottenuti sostituendo la regione costante dell'anticorpo murino con la sua controparte umana e mantenendo invariata la regione FAB, ha consentito di superare le limitazioni dei monoclonali naive osservate *in vivo*.

I dati sopra riportati se considerati globalmente indicano come il futuro utilizzo, in ambito clinico, potrebbe essere legato all'impiego di questa nuova generazione di anticorpi monoclonali umanizzati (Campath-1 H e hLL2), o anche a farmaci inibenti i *pathway* molecolari coinvolti nei processi di progressione neoplastica.

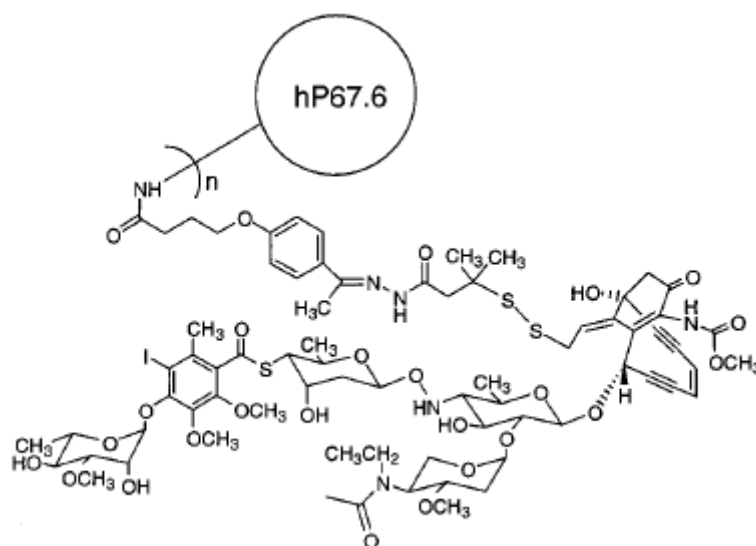
Infatti, nel 2000 è stato introdotto nella pratica clinica il Gemtuzumab Ozogamicina che, essendo costituito da un anticorpo monoclonale umanizzato

anti CD33 coniugato ad un derivato dalla calicheamicina, rappresenta il primo esempio di terapia *antibody-targeted* per l'AML. Poiché il 90% delle AML sovra-esprime l'antigene CD33, è plausibile proporre l'utilizzo di GO nel purging ex vivo delle HSCs autologhe (Linenberger, 2005).

## 5. Il Gemtuzumab Ozogamicina (GO)

### 5.1 Struttura e sviluppo

Il Gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg ®, CMA-676, Wyeth, Philadelphia, PA, USA) è il primo farmaco approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento dei pazienti di età superiore ai 60 anni affetti da leucemia mieloide acuta CD33<sup>+</sup> in prima ricaduta e non candidabili alla chemioterapia (Bross *et al.*, 2001). Tale farmaco è composto da un anticorpo anti CD33 coniugato, mediante un *linker* bifunzionale, ad un potente antibiotico, la calicheamicina (Figura 2).



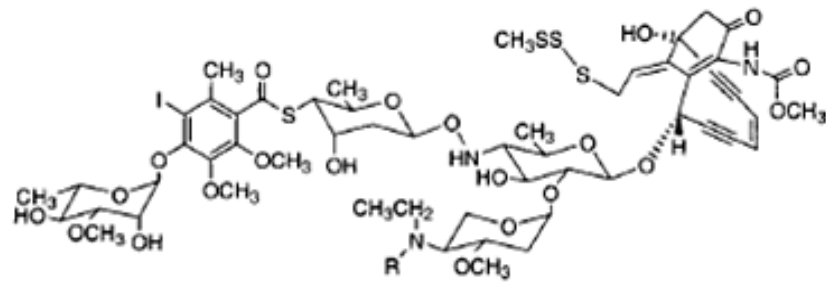
**Figura 2.** Struttura del Gemtuzumab ozogamicina. Il numero (n) di molecole di NAc-calicheamicina è di 2-4 molecole/mole di anticorpo.

La porzione anticorpale del farmaco è composta da un'immunoglobulina ricombinante umanizzata IgG4, con catena leggera di tipo k, che lega

specificatamente l'antigene CD33. Questo anticorpo, chiamato hP67.6, deriva dall'umanizzazione dell'anticorpo monoclonale murino P67.6, legante il CD33. Attraverso la tecnica della mutagenesi sito-diretta, le sequenze nucleotidiche dell'anticorpo murino codificanti per le regioni determinanti la complementarità (CDR) sono state introdotte tra le sequenze codificanti le regioni di framework del dominio variabile della catena pesante e della catena leggera di una IgG4 umana. Successivamente, ciascuna sequenza mutata del dominio variabile è stata subclonata in un plasmide contenente la regione costante, sia per la catena pesante che leggera. I vettori di espressione così ottenuti sono stati cotrasfettati in cellule della linea murina di mieloma NSO, che producono l'anticorpo hP67.6, contenente sequenze amminoacidiche per il 98,3% di origine umana (U.S. patent, 1999).

Nel Gemtuzumab ozogamicina, la porzione anticorpale è coniugata ad un derivato della calicheamicina, la N-acetil- $\gamma$ -calicheamicina dimetil idrazide (DMH). Le calicheamicine sono potenti antibiotici enedienici isolati dalla fermentazione del microrganismo del suolo *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* ed identificati inizialmente per la loro capacità di danneggiare il DNA in test di *screening* (Lee *et al.*, 1987). Il loro sviluppo in terapie come singolo agente non è stato possibile a causa della loro eccessiva citotossicità, che risulta circa mille volte maggiore rispetto agli agenti anticancro clinicamente usati, e, quindi, del loro basso indice terapeutico. Tuttavia, la minor immunogenicità rispetto ad altre tossine, le rende ideali nella chemioterapia *antibody-targeted* (Hamann *et al.*, 2002 [b]). Il capostipite di questa famiglia è la molecola calicheamicina  $\gamma$ 1. Essa è costituita da un gruppo enedienico (un anello carbonioso contenente tripli legami separati da doppi legami), da una coda ariltetrasaccaridica e un gruppo metiltrisolfuro che può reagire con appropriati tioli e formare un disolfuro, permettendo così il *linkage* con proteine (Figura 3).



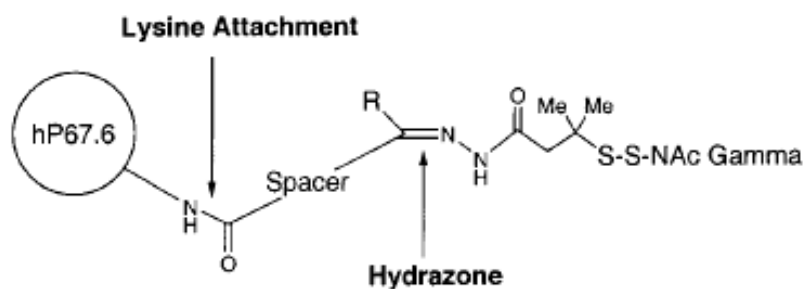


- 1, Calicheamicin  $\gamma_1^I$  (gamma), R = H  
 2, NAc-gamma calicheamicin, R = acetyl

Figura 3. Struttura della calicheamicina  $\gamma_1$ .

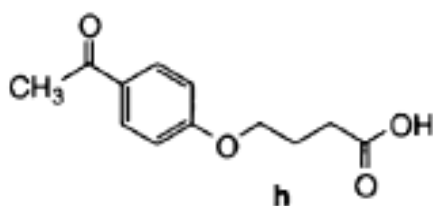
Nell'immunocongiugato la calicheamicina  $\gamma_1$  è presente in forma N-acetilata, in quanto sembra determinare coniugati migliori. Inoltre, il ponte disolfuro interno è stabilizzato da due gruppi metilici adiacenti, al fine di prevenire il rilascio prematuro ad opera di tioli ridotti circolanti, come il glutatione. La presenza di una idrazide permette l'attacco alla porzione anticorpale attraverso un legame idrolizzabile (Hamann *et al.*, 2002 [b]).

I primi studi su coniugati dell'anticorpo anti-CD33 murino P67.6 alla calicheamicina dimostrarono che era necessario un sito di rilascio idrolitico per garantire un'azione citotossica potente e selettiva del composto, perciò fu scelto di utilizzare un "coniugato carboidrato", che contenesse un idrazone, labile a pH lisosomiale. A questo scopo, i carboidrati presenti naturalmente nell'anticorpo venivano opportunamente ossidati, in modo tale che le aldeidi risultanti reagissero con l'idrazide del derivato calicheamicinico, dando vita, così, ad un idrazone, come sito di rilascio idrolitico (Hamann *et al.*, 2002 [a]). Inaspettatamente, nella versione umanizzata dell'anticorpo il processo di ossidazione dei carboidrati determinava un decremento drastico della sua immureattività. Fu deciso così di disegnare un linker bifunzionale.



**Figura 4.** Strategia per formare coniugati ibridi.

Ad una estremità esso doveva possedere un acido carbossilico, al fine di permettere, dopo opportuna attivazione, l'attacco alle lisine dell'anticorpo. All'altra estremità doveva presentare un gruppo carbonilico, per formare una base di Schiff, in particolare un idrazone, con il derivato della calicheamicina (Figura 4). In questo modo si evitava lo step di ossidazione dei carboidrati. Inoltre, uno spaziatore adeguato, come un gruppo arilico, doveva precludere l'interazione dei due gruppi reattivi nel linker bifunzionale. Tra tutti i *linker* testati fu scelto il 4-(4'-acetilfenossi) acido butanoico (Hamann *et al.*, 2002 [b]), rappresentato in Figura 5.



**Figura 5.** Struttura del linker bifunzionale 4-(4'-acetilfenossi) acido butanoico.

Il GO possiede approssimativamente il 50% degli anticorpi legati a 2-4 molecole di calicheamicina per mole di anticorpo. Il restante 50% dell'anticorpo risulta invece nudo. Il farmaco ha un peso molecolare di 151-153 kDa.

## 5.2 Meccanismo d'azione

Il meccanismo d'azione citotossico del GO non è ancora stato completamente chiarito. Studi *in vitro* hanno rilevato che la componente IgG4 del Gemtuzumab ozogamicina, hP67.6, non è citotossica e non induce la citotossicità mediata dal complemento o anticorpo-dipendente (ADCC), perciò essa è stata utilizzata essenzialmente solo come veicolo per il trasporto di farmaci, tossine o radioisotopi verso le cellule leucemiche CD33<sup>+</sup> (Linenberger, 2005).

Numerosi studi hanno dimostrato la necessità dell'espressione dell'antigene CD33 per una risposta clinica al GO (Linenberg, 2005), anche se altre investigazioni hanno recentemente proposto l'utilizzo di questo antineoplastico in tumori CD33 negativi con capacità endocitica (Jedema *et al.*, 2004).

Van der Velden e collaboratori (2001) hanno dimostrato che il Gemtuzumab ozogamicina, dato attraverso infusione di 2 ore, lega rapidamente i siti antigenici CD33 espressi nelle cellule leucemiche e nelle normali cellule mieloidi nel sangue, ma non si lega ai linfociti. La dose di farmaco normalmente somministrata ai pazienti, 9 mg/m<sup>2</sup>, determina la quasi completa saturazione degli antigeni in 3 ore dopo l'inizio dell'infusione. Diverse investigazioni hanno dimostrato che dopo l'adsorbimento dell'anticorpo alla superficie cellulare, il complesso CD33-anticorpo è rapidamente internalizzato e traslocato nei lisosomi. Inoltre è stato evidenziato che il continuo rinnovamento dell'espressione degli antigeni CD33 sulla superficie delle cellule mieloidi aumenta significativamente la quantità di farmaco internalizzata (Van der Velden *et al.*, 2001). Il pH acido dell'ambiente lisosomiale catalizza il clivaggio del *linker* bifunzionale. La calicheamicina DMH liberata si lega al solco minore del DNA. In particolare sembra che l'ancoraggio al DNA avvenga tramite la coda ariltetrasaccaridica a livello delle sequenze TCCT. La porzione enedienica viene successivamente ridotta, presumibilmente dall'azione del glutatione, ad una specie diradicalica 1,4-deidrobenzenica altamente reattiva, che estrae gli atomi di idrogeno dal deossiribosio della molecola, determinando rotture sequenza-specifiche *single* o *double stranded* del DNA (Elmroth *et al.*, 2003).

Questi eventi stimolano una forte risposta al danno del DNA da parte della cellula. Vengono indotti cambiamenti nei livelli di trascritto dei geni coinvolti nel riparo e nella sintesi del DNA, nel riarrangiamento della cromatina e nel controllo del

ciclo cellulare. Sebbene in alcuni esperimenti con linee cellulari leucemiche siano stati rilevati alcuni meccanismi di morte necrotica attivati dal GO, il *pathway* mitocondriale di apoptosi sembra essere il predominante meccanismo di morte cellulare indotto dal farmaco. È stato dimostrato che esposizioni continue di Gemtuzumab ozogamicina in vitro comportano l'arresto in fase G2/M in linee cellulari di leucemia mieloide, come HL60 e NB-4 (Naito *et al.*, 2000). Inoltre l'effetto citotossico del farmaco sembra essere dipendente dalla quantità di antigeni CD33 espressi sulla superficie cellulare e dalla velocità proliferativa delle cellule (Naito *et al.*, 2000). Amico e colleghi (2003) hanno dimostrato che l'arresto del ciclo cellulare è correlato all'attivazione della ciclica B1 e alla fosforilazione delle ChK1 e ChK2 (*Checkpoint Kinase*), mentre l'apoptosi è associata all'attivazione della caspasi 3. Numerosi studi hanno comunque riportato risposte cellulari variabili al Gemtuzumab ozogamicina, tra cui l'arresto del ciclo cellulare seguito da morte cellulare (sia apoptotica che necrotica), l'arresto del ciclo cellulare senza morte cellulare, o nessun effetto (Linenberger, 2005). Da questi risultati, *pathway* multipli sembrano interagire dopo il danno del DNA indotto dal farmaco, determinando la morte o la sopravvivenza cellulare.

### **5.3 Meccanismi di resistenza**

Similmente a quanto evidenziato con altri farmaci, nelle AML sono stati osservati fenomeni di resistenza anche per il Gemtuzumab ozogamicina.

In tali fenomeni sono implicati alcuni trasportatori di membrana, in particolare i membri della superfamiglia delle *ATP-binding cassette* (ABC).

La calicheamicina è simile in grandezza e struttura a substrati conosciuti della Pgp (*Multidrug Resistance gp170 Permeability Glycoprotein*). Alcune ricerche hanno riportato che la sovraespressione di Pgp determina la resistenza al GO e che inibitori di questo trasportatore di membrana, come la ciclosporina A, possono restaurare la sensibilità al farmaco (Naito *et al.*, 2000; Linenberger, 2005). Inoltre uno studio di Matsui e colleghi (2002) ha rilevato che tale farmaco è meno efficace in cellule AML CD33<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>, rispetto alle cellule leucemiche CD33<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>, perché le prime esprimono una maggior quantità di molecole Pgp. Altri studi hanno dimostrato che anche la MRP1 (*Multidrug Resistance Protein 1*), sovraespressa nel 7-30% dei casi di AML primaria, può attenuare la tossicità del

Gemtuzumab ozogamicina (Walter *et al.*, 2003). Evidenze recenti suggeriscono che anche i membri della famiglia di Bcl-2 delle proteine antiapoptotiche sono rilevanti nella resistenza al GO. È stato dimostrato, infatti, che la molecola PK11195, un ligando di un recettore periferico delle benzodiazepine promuovente l'apoptosi mitocondriale, aumenta la suscettibilità al farmaco (Walter *et al.*, 2004).

#### **5.4 Farmacocinetica ed efficacia**

In uno studio di fase I, condotto per valutare la sicurezza di dosi scalari di Gemtuzumab ozogamicina, da 0,25 a 9 mg/m<sup>2</sup>, in 40 pazienti con leucemia acuta mielodie CD33 positiva refrattaria o in ricaduta, si è osservato che la dose di 9 mg/m<sup>2</sup> determinava una saturazione superiore al 75% dei siti CD33 e l'eliminazione dei blasti in un'elevata percentuale di pazienti. Lo stesso studio ha permesso di stimare che l'emivita dell'anticorpo hP67.6 era di 2-3 giorni e, conseguentemente, di stabilire come la seconda dose dovesse essere somministrata a distanza di circa 14 giorni dalla prima per evitare il suo indesiderato accumulo nel plasma (Sievers *et al.*, 1999).

In considerazione di tali risultati, in un successivo studio di fase II condotto da Dowell e collaboratori (2001) che si proponeva di studiare la farmacocinetica del Gemtuzumab ozogamicina, i pazienti arruolati ricevevano una dose di 9 mg/m<sup>2</sup> e, se necessaria, una seconda dose uguale dopo 14 giorni. Dopo la somministrazione della prima dose, il picco di concentrazione plasmatica si osservava subito dopo la fine dell'infusione e risultava essere  $2,86 \pm 1,35$  mg/L, l'AUC (*Area Under the Curve*) era di  $123 \pm 105$  mg x h/L, il tempo di dimezzamento di  $72,4 \pm 42,0$  ore e la *clearance* di  $0,265 \pm 0,229$  L/h. Dopo la seconda somministrazione sono stati osservati aumenti di concentrazione, probabilmente dovuti alla diminuzione della clearance operata dalle cellule CD33<sup>+</sup>. Ciò comproverebbe l'azione citotossica della prima somministrazione e supporterebbe l'ipotesi che il principale meccanismo di eliminazione dell'anticorpo dal plasma sia l'internalizzazione da parte delle cellule leucemiche. Inoltre, i profili di concentrazione della calicheamicina seguono quelli dell'anticorpo hP67.6, evidenziando che nel plasma la calicheamicina rimane coniugata all'anticorpo.

L'efficacia di GO è stata confermata da uno studio che arruolava 277 pazienti con AML in prima ricaduta, con età media di 61 anni. I pazienti ricevevano due infusioni da 9 mg/m<sup>2</sup> di Gemtuzumab ozogamicina a distanza di 14 giorni. Il tasso di remissione è stato del 26% (il 13% ha conseguito la remissione completa e il 13% la remissione con incompleto recupero piastrinico). La DFS è stata di 6,4 mesi per i pazienti in remissione completa (Larson *et al.*, 2005).

I dati di letteratura riportano che i pazienti trattati con Gemtuzumab ozogamicina incontrano una tossicità molto minore rispetto ai pazienti che ricevono la chemioterapia standard. Infatti, la terapia con GO non determina perdita di capelli, mucosità orali severe o danno alla mucosa intestinale.

### **5.5 Effetti avversi**

Il maggiore effetto tossico associato al farmaco è una severa, ma aspettata, immunosoppressione. Il 98% dei pazienti va incontro a neutropenia e il 99% ad una severa trombocitopenia (Larson *et al.*, 2005). Sintomi acuti associati all'infusione, quali febbre, ipotensione e dispnea, possono manifestarsi nelle 24 ore dopo la somministrazione del farmaco. Alcuni studi hanno, inoltre, riportato casi di epatotossicità, inclusa la malattia epatica veno-occlusiva (Giles *et al.*, 2001).

Nel giugno 2010, l'azienda farmaceutica Pfizer ha volontariamente ritirato dal mercato statunitense Gemtuzumab ozogamicina. La società ha preso questa decisione dopo che uno studio clinico condotto da Petersdorf e colleghi (2009), e noto come *Southwest Oncology Group (SWOG) Study (S0106)*, aveva destato preoccupazioni sulla sicurezza del farmaco senza dimostrare benefici clinici rilevanti. Infatti, il farmaco era stato approvato dall'FDA (*Food and Drug Administration*) nel 2000 con procedura accelerata, che richiedeva ulteriori studi a conferma dell'efficacia e della *safety*. Tra questi, nel 2004 è iniziato il *trial* clinico post-registrativo SWOG S0106, il cui obiettivo era determinare se l'antileucemico, aggiunto alla chemioterapia standard, determinasse un beneficio in termini di sopravvivenza. Il *trial*, che aveva coinvolto 627 pazienti, ha evidenziato che nel gruppo trattato con Gemtuzumab ozogamicina non si osservavano significativi miglioramenti clinici e si registrava un aumento del tasso di mortalità.

Dopo il ritiro di GO, i risultati di una serie di studi clinici relativi all'impiego del farmaco nella AML sono stati resi noti, e molti ricercatori ne hanno chiesto la reintroduzione nel mercato, sottolineando che la dose approvata, 9 mg/m<sup>2</sup> al giorno, era troppo alta, se aggiunta alla chemioterapia, in particolare per quanto riguarda la tossicità epatica. (Estey, 2012; Ravandi e Kantarjian, 2012; Ravandi *et al.*, 2012; Rowe e Lowenberg, 2013).

Nel frattempo, uno studio pubblicato da Burnett e collaboratori nel 2006 ha mostrato che una dose più bassa (3 mg/m<sup>2</sup> al giorno) era compatibile con il trattamento chemioterapico, fornendo alcune prove preliminari di un beneficio di sopravvivenza senza una tossicità aggiuntiva, in contrasto con i risultati dello studio S0106. Lo stesso gruppo di ricerca ha successivamente condotto un'indagine più ampia (Burnett *et al.*, 2011; Burnett *et al.*, 2012) che ha coinvolto 1.015 pazienti anziani (età media 67 anni; range 51-84 anni) affetti da LMA o ad alto rischio di sindrome mielodisplastica. Tali pazienti sono stati sottoposti ad una chemioterapia di induzione con daunorubicina/citosina arabinoside o daunorubicina/clofarabina, con o senza Gemtuzumab ozogamicina (3 mg/m<sup>2</sup>) aggiunto il primo giorno del ciclo di chemioterapia. I risultati di sopravvivenza globale a 3 anni sono risultati significativamente migliori nel gruppo trattato anche con GO (25% contro 20%; *Hazard Ratio*-HR=0,87; p=0,05), così come quelli relativi all'incidenza cumulativa di recidive a 3 anni (68% contro 75%; HR=0,78 p=0,007). Il beneficio è apparso evidente in tutti i sottogruppi e non si sono osservate interazioni con gli altri interventi terapeutici. Inoltre, gli autori hanno eseguito una metanalisi di due studi del *United Kingdom National Cancer Research Institute*, che hanno coinvolto in totale 2.228 pazienti, da cui sono emersi anche una riduzione significativa del rischio di recidiva (HR=0,82; p=0,002) e un miglioramento significativo della sopravvivenza globale (HR=0,88; p=0,02). Questi risultati sperimentali hanno dimostrato che Gemtuzumab ozogamicina, alla dose di 3 mg/m<sup>2</sup> e somministrato in contemporanea con daunorubicina (50 mg/m<sup>2</sup>) come parte della terapia di induzione, è sicuro, riduce in modo significativo il rischio di ricaduta e migliora la sopravvivenza globale.

Alla luce di quanto detto, il presente lavoro si colloca come un'ulteriore indagine degli effetti positivi di Gemtuzumab ozogamicina nell'ambito della terapia della leucemia mieloide acuta.





## **SCOPO DELLA TESI**

Questo lavoro di tesi si propone di valutare la possibilità di utilizzare il Gemtuzumab ozogamicina nel purging *ex vivo* delle PBSC autologhe, al fine di eliminare le possibili cellule leucemiche contaminanti.

L'impiego di tale farmaco è subordinato alla verifica che la deplezione delle cellule maligne non provochi effetti citotossici sulle cellule staminali pluri/multi potenti normali, alle quali è deputato il ripopolamento stabile e duraturo del midollo osseo.

Pertanto, tale verifica è stata condotta esponendo al Gemtuzumab ozogamicina cellule ematopoietiche mobilizzate nel periferico, cellule ematopoietiche del sangue cordonale e cellule promielocitiche della linea leucemica HL60 e determinando il loro "rate di crescita" mediante test clonogenici su terreno semisolido.

## MATERIALI E METODI

### **1. Prelievo delle unità di sangue cordonale**

Le unità di sangue cordonale (*Cord Blood*, CB) impiegate in questa sperimentazione sono state prelevate presso le Divisioni di Ostetricia di Adria, Montebelluna, Noventa Vicentina, Rovigo, Conegliano, Vittorio Veneto e Treviso, afferenti alla Treviso Cord Blood Bank.

Il prelievo del sangue placentare è stato eseguito, previa sottoscrizione di uno specifico consenso informato ed in accordo con i protocolli della Foundation for the Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy (FAHCT), nei parti naturali che hanno superato la trentacinquesima settimana di gestazione.

Dopo espulsione del neonato, clampaggio e recisione del cordone ombelicale, le vene funicolari sono state incannulate per mezzo del catetere di una sacca da emodonazione contenente 21 ml di soluzione anticoagulante CPD (sodio citrato, acido citrico monoidrato, sodio fosfato monobasico diidrato, destrosio monoidrato). Le unità sono state inviate al Laboratorio della Banca Cordonale dove, se non risultanti idonee per la crioconservazione, sono state utilizzate per questa sperimentazione entro 48 ore dal parto.

### **2. Raccolta delle PBSC (*Peripheral Blood Stem Cells*)**

Le aliquote di PBSC impiegate in questo studio sono state messe a disposizione dal settore aferetico del Servizio Immuno-Trasfusionale dell'Ospedale di Treviso. Le PBSC provenivano da pazienti affetti da mieloma o linfoma sottoposti a mobilitazione in previsione di un autotrapianto di midollo. La mobilitazione è stata attuata mediante somministrazione di fattori di crescita quali l'rhG-CSF da solo o in associazione a ciclofosamide secondo protocolli e schedule somministrative differenziate in relazione alla stadiazione e alle caratteristiche biologiche dei singoli pazienti. Nei giorni successivi al trattamento, i livelli periferici di cellule CD34<sup>+</sup> sono stati monitorati e, attraverso un algoritmo, si è determinato il giorno di massima mobilitazione, in cui eseguire le procedure aferetiche. Queste sono state attuate per mezzo di un separatore cellulare COM.TEC Fresenius in grado di stratificare tramite centrifugazione le cellule del

sangue in base a dimensione e densità. Le componenti di sangue rimosse vengono sostituite da soluzione fisiologica, albumina o plasma. La procedura dura 3-4 ore (h).

### **3. Separazione delle cellule mononucleate**

La separazione delle cellule mononucleate cordonali e del sangue periferico è stata condotta mediante la tecnica di separazione su gradiente di densità di Boyum. In breve, il CB raccolto è stato diluito nel rapporto 1:1 con EDTA 2 mM in soluzione fisiologica tamponata (PBS), mentre le aliquote di PBSC (0,5 ml) sono state diluite 1:10 con di *Stemline Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium* (Sigma-Aldrich) supplementato con glutamina 4 mM, penicillina 200 U/ml, streptomina 200 µg/ml, kanamicina 200 µg/ml ed anfotericina B 2,5 µg/ml (*Stemline Expansion Medium* completo).

I campioni diluiti sono stati successivamente stratificati su una soluzione gradiente di Ficoll sodio diatrizzato (BAG-Biologische Analysen System GmbH,) con densità di 1,077 g/ml e centrifugato a 2500 rpm per 20 minuti (min) a 20 °C. Al termine della centrifugazione, le cellule mononucleate, stratificatesi all'interfaccia fra gradiente e plasma, sono state recuperate, lavate con PBS/EDTA 2 mM per centrifugazione a 1800 rpm per 10 min a 4 °C e infine risospese in 5 ml *Stemline Expansion Medium* completo.

### **4. Tecniche di crioconservazione**

Le cellule mononucleate del CB, dopo incubazione di almeno 1 h a 4 °C, sono state risospese alla concentrazione di  $1 \times 10^7$  cell/ml in terreno di congelamento costituito da FCS e dimetil solfossido (DMSO) nel rapporto 9:1, aliquote in vials da criogenia e congelate overnight a -30 °C in un apposito device da congelamento contenente isopropanolo. Al termine del congelamento le vials sono state trasferite in azoto liquido.

Le aliquote di PBSC prelevate dalle singole aferesi sono state diluite in rapporto 1:1 con una soluzione crioprotettiva costituita dal 86% di soluzione fisiologica, 10% di DMSO e 4% di albumina umana, congelate a -150 °C mediante il dispositivo computerizzato (IceCube 1810 Taylor-Warthon) e trasferite in azoto liquido.

Al momento dell'uso, le cellule sono state scongelate rapidamente in bagnomaria a 56 °C, lavate con una soluzione di citrato di sodio 22 g/1000 ml, glucosio monoidrato 24,5 g/1000 ml, acido citrico monoidrato 8 g/1000 ml (ACD-A) contenente inoltre 20 U/ml di DNasi (Pulmozyme R05CB13-dornase alfa-Roche) e risospese in *Stemline Expansion Medium* completo, additivato con 40 U/ml di Dnasi.

### **5. Valutazione della crescita clonogenica in presenza di Gemtuzumab ozogamicina**

Questa valutazione è stata condotta su sei unità di sangue cordonale e su cinque leucoaferesi mediante test clonogenici eseguiti in accordo con il metodo proposto da Miller e Lai (2005). In breve, aliquote di cellule mononucleate di CB e PB (*Peripheral Blood*) fresche e scongelate (Tabella 2) sono state seminate in provette contenenti 3 ml di terreno semisolido in assenza ed in presenza di Gemtuzumab ozogamicina alla concentrazione finale di 5 µl/ml.

Come medium di coltura è stato utilizzato il *MethoCult* GF H4434, costituito da *Iscove Medium* contenente l'1% di metilcellulosa, il 30% di *fetal bovine serum* (FBS), l'1% di albumina sierica bovina, 10 ng/ml di GM-CSF,  $10^{-4}$  M di mercaptoetanolo, 2 mM di L-glutamina, 50 ng/ml di rhSCF, 10 ng/ml di rhIL-3, 3U/ml di rhEPO (StemCell Technologies Inc). Dopo la risospensione delle cellule, da ciascuna provetta sono state prelevate due frazioni di 1,1 ml di terreno, distribuite in altrettante capsule Petri da 35 mm di diametro. Queste sono state poste ad incubare per 14 giorni in camera umida a 37 °C ed in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>. Al termine dell'incubazione, le capsule Petri sono state osservate al microscopio a contrasto di fase per la determinazione del numero delle CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix e del numero complessivo di CFU, eseguita in accordo con Nissen-Druey *et al* (2005).

GRUPPO SPERIMENTAL E		Trattamento di 14		Trattamento di 2h		Trattamento di 24h	
		in 3 ml	in 1.1 ml	in 3 ml	in 1.1 ml	in 3 ml	in 1.1 ml
CBSC	pre	45000	45000	45000	16500		
	post	45000	45000	45000	16500		
PBSC	pre	12000	12000	12000	4400		
	post	45000	12000	12000	4400	12000	4400

**Tabella 2.** Numero di cellule mononucleate seminate nei vari gruppi sperimentali nei test clonogenici in 3 ml e 1.1 ml di *MethoCult* GF H4434. pre: precongelo; post: postcongelo.

## 6. Valutazione del *timing* di trattamento nella linea HL60

Le cellule della linea leucemica promielocitica HL60 sono state coltivate in sospensione impiegando come medium nutritivo lo *Stemline Expansion Medium* completo. Per questa valutazione sono stati condotti dieci esperimenti esponendo le cellule al farmaco per tempi differenti.

In breve, aliquote di HL60, alla concentrazione di  $2 \times 10^6$  cellule/ml, sono state incubate in agitazione a bagnomaria a 37 °C per 2 h, 4 h, 6 h e 24 h con Gemtuzumab ozogamicina alla concentrazione finale di 5 µg/ml. Al termine di ogni *end point* il farmaco in eccesso è stato allontanato mediante lavaggi con PBS additivata con il 2% di albumina e le cellule risospese in 2 ml di *Stemline Expansion Medium* completo. Parallelamente sono stati eseguiti trattamenti di controllo in presenza di sola PBS e di Mitomicina C, alla concentrazione di 2 µg/ml. Le cellule risospese dopo trattamento sono state seminate, con le modalità sopra descritte, in terreno semisolido *MethoCult* H4230, privo di fattori di crescita. Il numero totale di cellule seminate in ciascuna capsula Petri era 500.

## 7. Crescita clonogenica dopo incubazione breve con Gemtuzumab ozogamicina

Questa valutazione è stata condotta esponendo al GO cellule mononucleate, sia fresche che scongelate, di cinque unità di CB e sette unità di PB per 2 h e quattro unità scongelate di PB per 24 h.

Le cellule sono state coltivate in terreno semisolido *MethoCult* GF H4434. Il numero di cellule seminate nei saggi clonogenici è riportato in Tabella II.

Per questa valutazione sono stati condotti dieci esperimenti esponendo le cellule al farmaco per tempi differenti.

In breve, aliquote di cellule da CB e da PB alla concentrazione di  $2 \times 10^6$  cellule/ml, sono state incubate in agitazione a bagnomaria a  $37^\circ\text{C}$  per 2 h, 4 h, 6 h e 24 h con Gemtuzumab ozogamicina alla concentrazione finale di  $5\ \mu\text{g/ml}$ . Al termine di ogni *end-point* il farmaco in eccesso è stato allontanato mediante lavaggi con PBS additivata con il 2 % di albumina e le cellule risospese in 2 ml di *Stemline Expansion Medium* completo. Parallelamente sono stati eseguiti trattamenti di controllo in presenza di solo PBS e di Mitomicina C, alla concentrazione di  $2\ \mu\text{g/ml}$ . Le cellule risospese dopo trattamento sono state seminate, con le modalità sopra descritte, in terreno semisolido *MethoCult* H4230, privo di fattori di crescita. Il numero totale di cellule seminate in ciascuna capsula Petri era 500.

## **8. Effetti del Gemtuzumab ozogamicina sul *subset* ematopoietico CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>**

Per la purificazione di questi *subset* è stato utilizzato il *kit* di selezione negativa *StemSep Human Primitive Hematopoietic Progenitor Enrichment* (StemCell Technologies) basato sulla separazione magnetica delle cellule bianche indesiderate mediante sistemi anticorpali tetramerici linkati a sferule di ferro colloidale rivestite di destrano (TAC). In breve, dalla sospensione cellulare di partenza, i progenitori ematopoietici più primitivi sono purificati mediante incubazione con TAC ed eluizione attraverso un'apposita colonna di separazione inserita in un magnete. Il TAC è un complesso anticorpale tetramerico di selezione costituito da due anticorpi monoclonali IgG murini mantenuti in una disposizione tetramericata da due anticorpi monoclonali di ratto IgG-anti topo. Una molecola di anticorpo murino riconosce gli antigeni di superficie CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD36, CD38, CD45RA, CD56, CD66b e glicoforina A, mentre l'altro riconosce il destrano che riveste le sferule colloidali.

In questa sperimentazione è stata impiegata una colonna di 0,5" di diametro, montata su un magnete da 0,6 Tesla (*Green Magnet*, StemCell Technologies). La colonna è stata inizializzata con 5 ml di PBS e in seguito lavata con una soluzione di lavaggio composta da PBS addizionato al 2% di albumina.

Contemporaneamente, le aliquote di cellule mononucleate scongelate, risospese alla concentrazione di  $5 \times 10^7$  cell/ml in *Stemline Expansion Medium* completo con DNasi, sono state incubate a temperatura ambiente per 15 min con aliquote del *cocktail* anticorpale (100  $\mu$ l per ogni ml di sospensione cellulare). Al termine, 60  $\mu$ l di sospensione colloidale sono stati aggiunti ad ogni ml di sospensione cellulare attivata. Dopo ulteriore incubazione per 15 min, la sospensione cellulare è stata caricata in colonna ed eluita con 25 ml di soluzione di lavaggio. Le sospensioni cellulari ottenute sono state risospese in 1 ml di *Stemline Expansion Medium* completo, contate alla camera di Bürker e sottoposte a determinazione citofluorimetrica per valutarne il grado di purezza CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>.

In seguito, i *subset* ematopoietici CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, incubati in presenza e in assenza di Gemtuzumab ozogamicina per 2 h, sono stati sottoposti a saggio clonogenico.

## 9. Analisi Statistica

Per rendere confrontabili fra loro i risultati dei test clonogenici condotti per valutare gli effetti citotossici di GO con concentrazioni di semina differenti sono state calcolate le efficienze clonali (EC) delle CFU mediante la formula:

$$EC = \text{numero CFU} / \text{numero cellule seminate}$$

Le efficienze clonali sono state sottoposte ad analisi statistica formale (calcolo della media e deviazione standard, mediana e percentili, range minimo/massimo, coefficiente di variazione) ed ai test statistici di Curtosi, Sweknees e Barlett per valutarne la distribuzione normale. Poiché tali test hanno evidenziato la non gaussianità delle frequenze, ai differenti gruppi sperimentali sono stati applicati metodi di confronto non parametrici (Mann-Whitney e Wilcoxon), utilizzando come livello di significatività  $p < 0,05$ .

Nello studio degli induttori, i risultati dei test citotossici in terreno liquido sono stati espressi come efficienza di piastramento (EP), cioè come rapporto tra il numero di cellule seminate e quello rilevato all'*end point* dopo 7 giorni di coltura. I test di recupero sono stati espressi come numero medio di CFU/pozzetto. Successivamente, i differenti gruppi di dati sperimentali sono stati confrontati mediante Analisi della Varianza (One Way Anova) e t Test per dati appaiati parametrici e non parametrici, utilizzando come livello di significatività  $p < 0,05$ .

Per l'elaborazione di tali calcoli e per la preparazione dei grafici si è ricorsi al software *GraphPad Prism Version 4.0*.



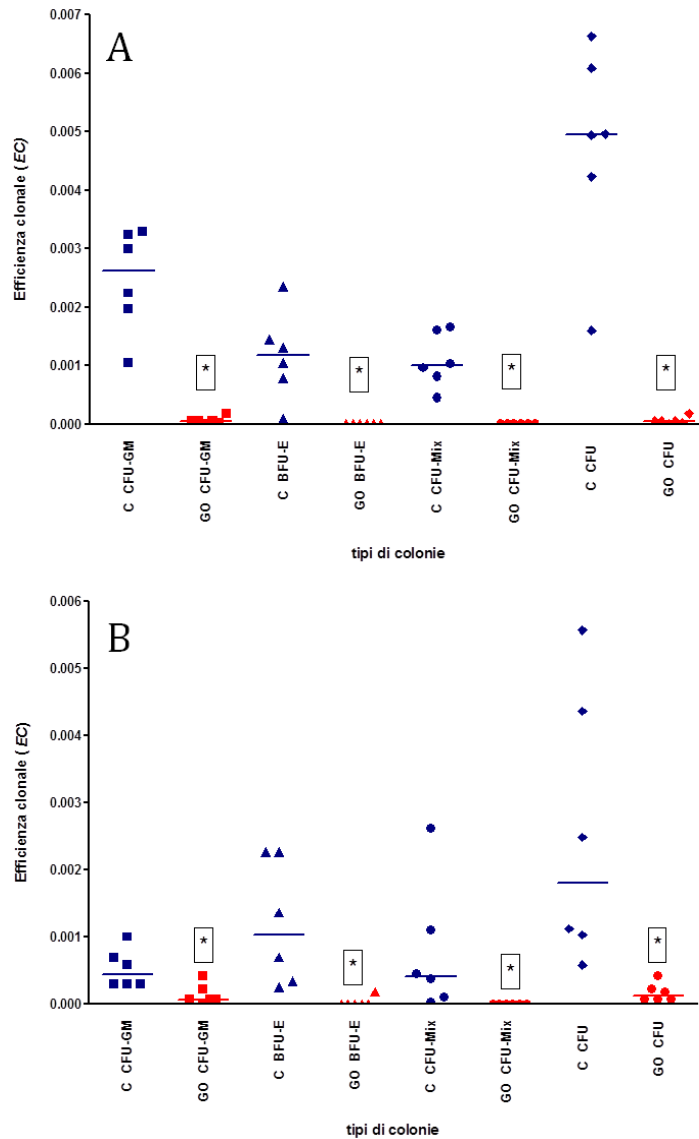
## RISULTATI

### **1.Valutazione della crescita clonogenica in presenza di Gemtuzumab ozogamicina**

I risultati dei test clonogenici condotti per valutare gli effetti del trattamento di 14 giorni con GO sulla crescita clonale dei quattro gruppi sperimentali considerati (CBSC-pre, CBSC-post, PBSC-pre, e PBSC-post), sono riportati rispettivamente nelle Figure 6 e 7 come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale.

Nelle colture di controllo delle CBSC-pre, le EC mediane sono rispettivamente di 0,002621 per le CFU-GM, 0,001182 per le BFU-E, 0,001 per le CFU-Mix e 0,004955 per le CFU. Nelle colture esposte a GO, questo parametro decrementa di due logaritmi per le colonie CFU-GM e CFU, mentre si azzerava per le BFU-E e CFU-Mix (Figura 6 A).

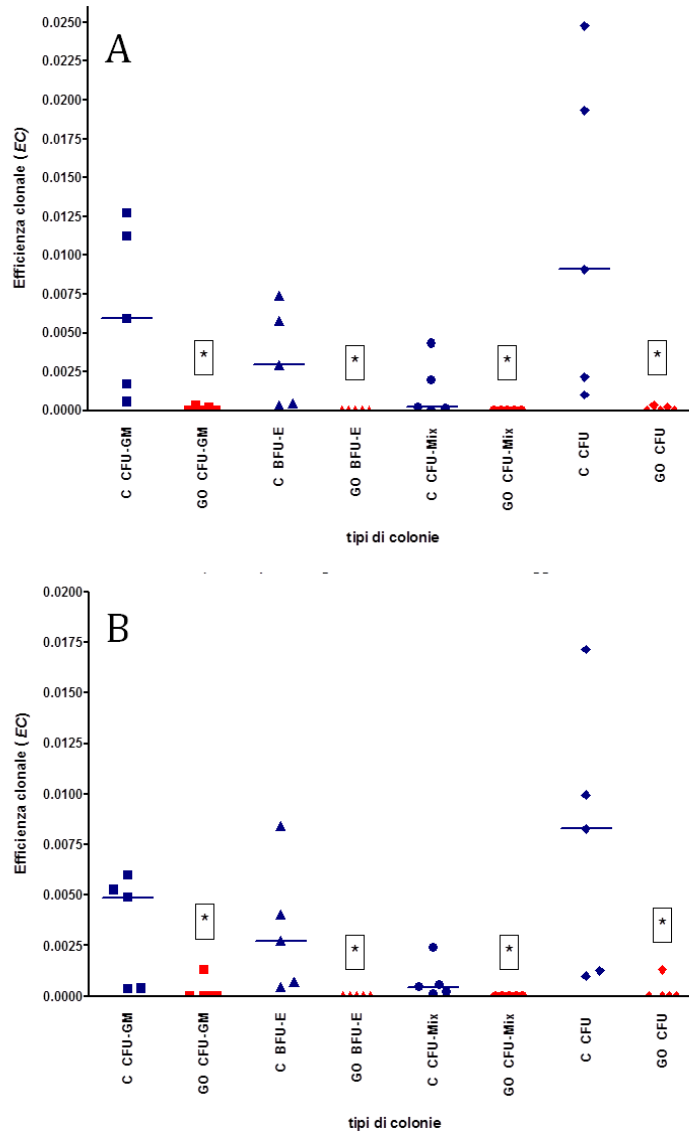
Nelle CBSC-post, le EC mediane dei controllo sono rispettivamente di 0,0004394 per le CFU-GM, 0,001030 per le BFU-E, 0,000409 per le CFU-Mix e 0,001803 per le CFU totali. L'esposizione al farmaco impedisce anche in questo gruppo la crescita delle CFU-Mix, azzerava l'EC mediana delle BFU-E, e decrementa di un solo logaritmo l'EC delle CFU-GM e delle CFU (Figura 6 B).



**Figura 6.** Sperimentazione condotta per valutare gli effetti dell'esposizione di 14 giorni al GO su cellule mononucleate cordonali pre- (A) e post-congelamento (B). I risultati sono espressi come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale. (\* livello di significatività  $p < 0,05$ ).

Nelle PBSC (pre e post) il farmaco impedisce la crescita della BFU-E e CFU-Mix ed azzerava l'EC mediana di CFU-GM e delle CFU (Figura 7).

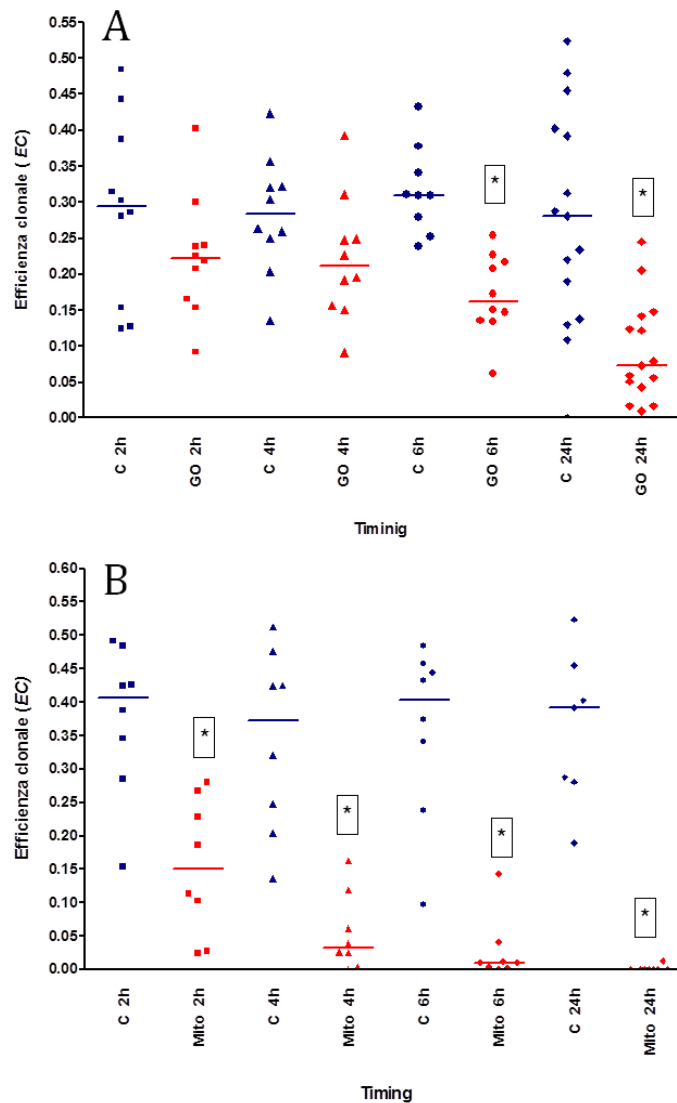
I confronti statistici eseguiti nei quattro gruppi considerati evidenziano come il GO induca una significativa riduzione della EC totale e quelle di tutti i tipi di colonie.



**Figura 7.** Sperimentazione condotta per valutare gli effetti dell'esposizione di 14 giorni al GO su cellule mononucleate da sangue periferico pre- (A) e post-congelamento (B). I risultati sono espressi come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale. (\*livello di significatività  $p < 0,05$ ).

## 2.Valutazione del *timing* di trattamento nella linea HL60

I risultati dello studio del *timing* di somministrazione del farmaco condotto sulla linea cellulare promielocitica umana HL60 sono riassunti in Figura 8 come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun *end point*.



**Figura 8.** Sperimentazione condotta per valutare il timing di esposizione al GO sulla linea HL60 (A) e prove di controllo con la Mitomicina C (B). I risultati sono espressi come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun *end point*. (\* livello di significatività  $p < 0,05$ ).

Nelle prove condotte esponendo le cellule al GO (Figura 8 A) le EC mediane delle colture di controllo sono comprese tra 0,2810 e 0,3090. Nelle colture trattate le EC mediane a 2 h, 4 h, 6 h e 24 h sono rispettivamente di 0,2220, 0,2115, 0,1620 e 0,0730. I confronti statistici condotti su tali dati evidenziano che i decrementi osservati alle 6 h e 24 h sono statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ).

Nelle prove con Mitomicina C (Figura 8 B) le EC mediane delle colture di controllo sono comprese, ai differenti end-point, nel range di 0,3400-0,4065. Nelle colture trattate col progredire del tempo di esposizione al farmaco è

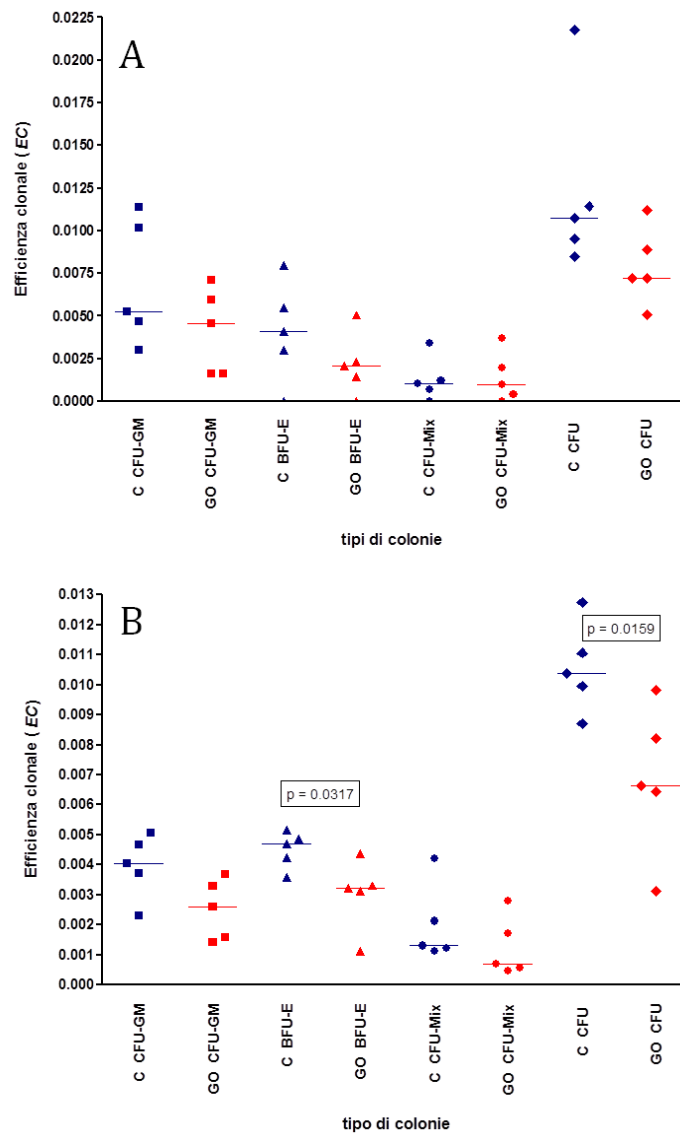
osservabile il progressivo decremento delle EC mediane. I confronti statistici indicano, a tutti gli *end point*, la significatività di tale fenomeno ( $p < 0,05$ ).

### **3. Crescita clonogenica dopo incubazione breve con Gemtuzumab ozogamicina**

I risultati della sperimentazione condotta per valutare gli effetti del GO sulla crescita clonale delle CBSC-pre, CBSC-post, PBSC-pre, e PBSC-post dopo 2 h di trattamento sono riportati rispettivamente nelle Figure 9 e 10 come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale.

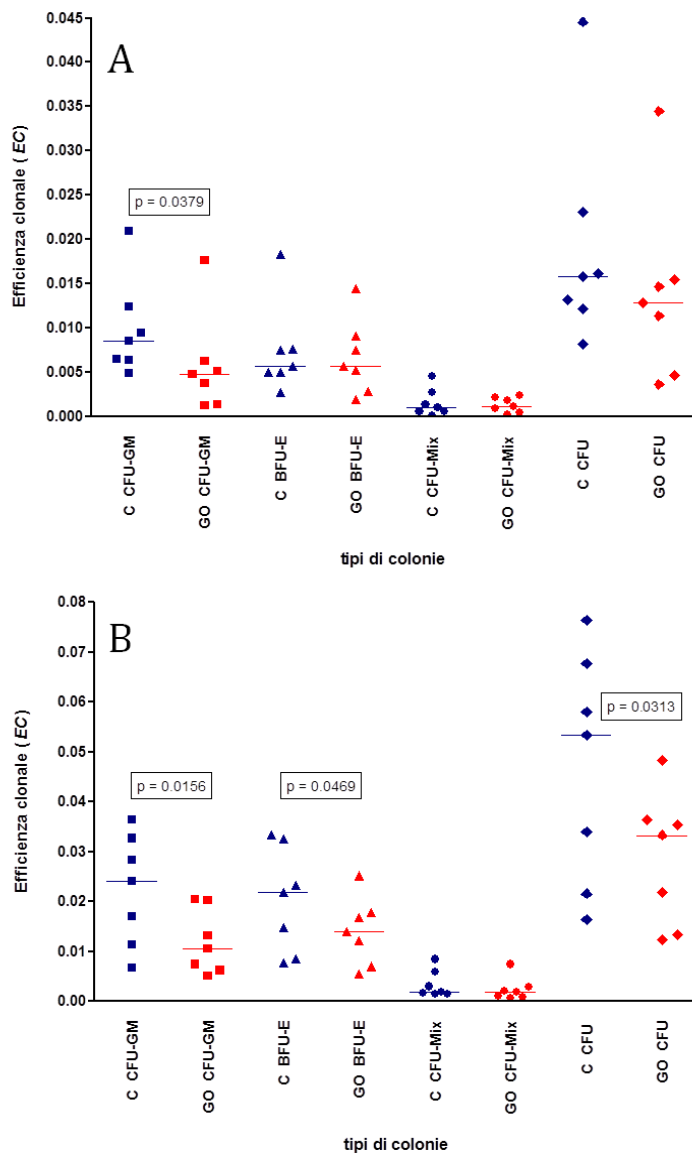
Nelle prove con CBSC-pre le EC mediane rilevate nelle colture di controllo sono rispettivamente di 0,005273 per le CFU-GM, di 0,004121 per le BFU-E, di 0,001030 per le CFU-Mix e di 0,01073 per le CFU. Nelle colture trattate i valori delle EC mediane sono invece di 0,004576 per le CFU-GM, di 0,002091 per le BFU-E, di 0,0002121 per le CFU-Mix e di 0,006167 per le CFU. L'analisi statistica ha rivelato che i decrementi delle EC mediane osservati in queste colture non risultano significativi (Figura 9 A).

Nel gruppo delle CBSC-post, a fronte di EC mediane nelle colture di controllo di 0,004071 per le CFU-GM, di 0,004697 per le BFU-E, di 0,001303 per le CFU-Mix e di 0,01037 per le CFU, nelle colture trattate i corrispondenti parametri scendono a 0,002606 per le CFU-GM, di 0,003213 per le BFU-E, di 0,000697 per le CFU-Mix e di 0,006636 per le CFU. I confronti statistici evidenziano valori  $p$  di 0,0317 e di 0,0159 per i decrementi post trattamento delle BFU-E e CFU, rispettivamente (Figura 9 B).



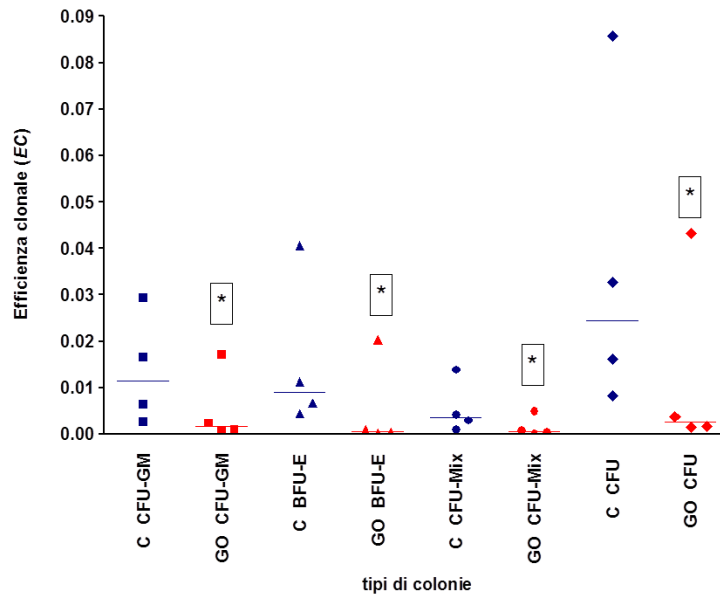
**Figura 9.** Sperimentazione condotta per valutare gli effetti dell'esposizione di 2 h al GO su cellule mononucleate cordonali pre- (A) e post-congelamento (B). I risultati sono espressi come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale. È specificato il livello di significatività quando  $p < 0,05$ .

Analoghi decrementi delle EC mediane sono osservabili nelle prove con PBSC, sia pre che post congelamento. I confronti statistici hanno determinato un valore  $p$  pari a 0,0379 per la riduzione post trattamento delle CFU-GM nelle prove con cellule fresche (Figura 10 A), e valori  $p$  di 0,0156, di 0,0469 e di 0,0313 per il decremento dopo esposizione al GO delle CFU-GM, delle BFU-E e delle CFU nelle prove con cellule scongelate (Figura 10 B).



**Figura 10.** Sperimentazione condotta per valutare gli effetti dell'esposizione di 2 h al GO su cellule mononucleate da sangue periferico pre- (A) e post-congelamento (B). I risultati sono espressi come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale. È specificato il livello di significatività quando  $p < 0,05$ .

I risultati della sperimentazione condotta per valutare gli effetti del GO sulla crescita clonale delle PBSC postcongelamento dopo 24h di trattamento sono riportati nella Figura 11 come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale. I confronti statistici eseguiti su queste prove evidenziano riduzioni significative post trattamento ( $p < 0,05$ ) delle EC mediane di tutte le tipologie di colonie considerate.

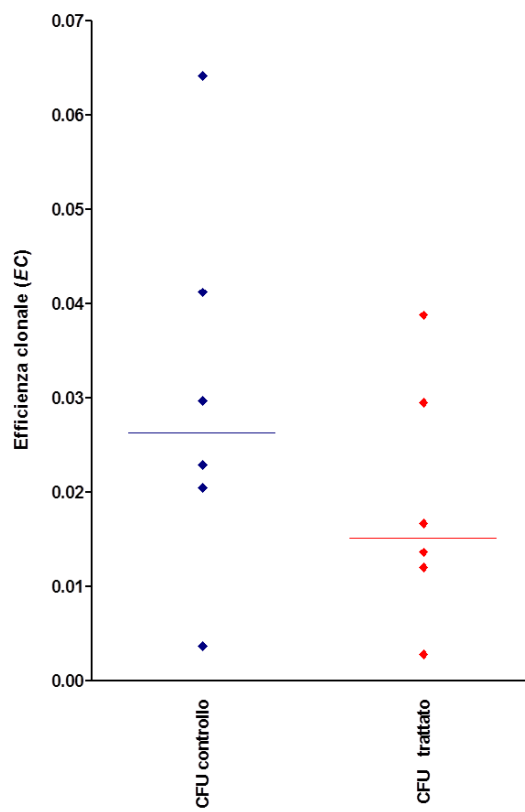


**Figura 11.** Sperimentazione condotta per valutare gli effetti dell'esposizione di 24 h al GO su cellule mononucleate da sangue periferico post-congelamento. I risultati sono riportati come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale. (\* livello di significatività  $p < 0,05$ )

#### 4. Effetti del GO sul *subset* ematopoietico CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>

In Figura 12 sono descritti gli effetti del trattamento di 2 h con GO sulla crescita clonale del *subset* cordonale CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>. Tali dati sono riportati come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale. A fronte di una EC mediana di 0,02631 nelle colture di controllo, questa sperimentazione ha evidenziato che l'esposizione al GO riduce l'EC mediana a 0,01518. Tale decremento tuttavia non è significativo.





**Figura 12.** Sperimentazione condotta per valutare gli effetti dell'esposizione al GO (2 h) sul *subset* ematopoietico CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>. I risultati sono espressi come distribuzione *scatter* delle EC dei singoli saggi e come EC mediana di ciascun gruppo sperimentale.



## DISCUSSIONE

Dal punto di vista teorico, la realizzazione di un *purging* ottimale delle leucoaferesi destinate al trapianto autologo dei portatori di AML implica l'utilizzo di metodologie che consentano l'allontanamento e/o la distruzione delle cellule leucemiche senza alterare in termini numerici e funzionali i subset ematopoietici normali capaci di garantire l'attecchimento e la ricostituzione midollare a lungo termine.

In quest'ottica il Gemtuzumab ozogamicina potrebbe rappresentare una soluzione a queste problematiche. Infatti, tale farmaco è costituito da un anticorpo monoclonale umanizzato linkato ad un potente antiblastico e diretto specificatamente contro l'antigene CD33, notoriamente sovraespresso, rispetto alle cellule ematopoietiche normali, nei blasti neoplastici del 90% delle AML (Linenberger, 2005)

La pianificazione del progetto di ricerca per la verifica delle potenzialità applicative del GO al *purging* prevede che la sperimentazione sia articolata nelle fasi di a) verifica della citotossicità del GO su cellule ematopoietiche normali e leucemiche; b) ottimizzazione della schedula di *purging* (dosaggio e *timing*); c) sviluppo di protocolli di espansione post *purging*; d) verifica *in vivo* in modelli animali della DFS e della sopravvivenza del trapianto; e) traslazione dei dati sperimentali a livello clinico con *trial* di fase I, II e III.

Nell'ambito di questo progetto, le prove condotte su cellule ematopoietiche normali di differente origine (cellule cordonali e cellule aferetiche da sangue periferico), descritte in questa tesi, ne rappresentano l'indispensabile approccio preliminare.

Il risultato più rilevante che emerge da queste sperimentazioni è la dimostrazione della scarsa citotossicità esercitata dal GO sul subset CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, isolato per selezione negativa con tecniche immunomagnetiche da *pool* di cellule mononucleate di origine cordonale. Infatti, il decremento non statisticamente significativo della crescita clonogenica registrato sembra verosimilmente imputabile all'incompleta purificazione del *subset* (purezza=67,02±27,56) che risulterebbe inquinato da cellule fenotipicamente più mature e, pertanto, esposte all'azione di *targeting* da parte del farmaco. Comunque, alla luce delle

conoscenze acquisite sui suoi meccanismi d'azione, non si può escludere che la riduzione dell'EC nelle colture di cellule CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> trattate sia riferibile ad un leggera azione citotossica sul subset in seguito a fenomeni di endocitosi (Jedema *et al.*, 2004), ma ciò dovrà essere ulteriormente approfondito in futuro.

In letteratura è stato ampiamente dimostrato come il subset CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, con fenotipo Lin<sup>-</sup> e con potenzialità LTR nei topi nudi, sia costituito da un gruppo eterogeneo di cellule con caratteristiche funzionali pluri/multipotenti, posizionabile al vertice della piramide differenziativa del sistema ematopoietico. Pertanto, le considerazioni sopra esposte sulle prove con il *subset* CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> sembrano avallare l'ipotesi di un utilizzo del GO nelle procedure di *purging*.

I risultati dei test clonogenici condotti sulle cellule mononucleate cordonali dopo esposizione di 2 h al farmaco confermano la ridotta tossicità del GO su tali cellule.

Al contrario, con le cellule staminali da sangue periferico il farmaco decrementa significativamente la crescita clonale dei progenitori della filiera granulocitico-macrofagica, senza tuttavia comprometterla definitivamente. Come evidenziato nell'introduzione, le attuali conoscenze dell'ematopoiesi consentono una puntuale ricostruzione delle filiere differenziative su base funzionale e fenotipica solo a partire dalle CFU-Mix. Al contrario, tra la cellula capostipite pluri/multipotente e la CFU-Mix esiste tuttora un *gap* parzialmente colmato solo su base funzionale *in vivo* e *in vitro*, da test che permettono il riconoscimento di popolazioni LTRC, CFU-S, LTC-IC, CAFC, CFU-BL, HPP-CFU non ancora definite su base fenotipica e di cui sfugge il livello maturativo (Bonnet, 2002). È possibile, pertanto, che il CD33 compaia in popolazioni capostipite della filiera maturativa granulocitica-macrofagica, poste immediatamente a monte o a valle della CFU-Mix, ritenuta dalla letteratura esprimere per la prima volta questo antigene. La recente identificazione, presso il nostro Laboratorio di Citofluorimetria, di un subset CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup>, sembrerebbe confermare questa ipotesi (dati non mostrati). A livello applicativo di *purging*, la riduzione, ma non l'abrogazione della crescita clonale granulocitica-macrofagica comporterebbe un ritardo nella comparsa in circolo di elementi granulocitari e monocitari maturi, che potrebbe essere, tuttavia, ovviato con il prolungamento della permanenza del paziente in camera sterile e con un'adeguata terapia trasfusionale di supporto. In alternativa,

potrebbe essere eseguita l'espansione *in vitro* post *purging* di queste cellule con fattori di crescita, come previsto dalla pianificazione di questo progetto.

La criopreservazione sia delle cellule cordonali che periferiche sembra aumentare la sensibilità al farmaco delle cellule capostipiti che dovrebbero ricostituire le filiere ematopoietiche granulocitico-macrofagiche ed eritroidi. Probabilmente, il congelamento, ma soprattutto la fase di scongelamento, potrebbe compromettere l'integrità della membrana cellulare e la presenza di DMSO residuo, anche in tracce, potrebbe fungere da veicolante. Questo dato, se confermato, suggerirebbe la necessità di eseguire il *purging* con il GO prima della crioconservazione. Infine, la sperimentazione riguardante l'esposizione al farmaco per 24 h e per 14 giorni dimostrano che in fase di ottimizzazione della schedula di somministrazione dovranno essere privilegiati tempi di trattamento brevi.



## CONCLUSIONI

In base ai dati sopra descritti è possibile concludere che:

- il Gemtuzumab ozogamicina non inibisce significativamente l'efficienza clonale del subset primitivo CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> e delle cellule mononucleate normali.
- Il GO riduce significativamente la crescita clonogenica delle cellule capostipiti granulocitiche-macrofagiche del sangue periferico.
- La criopreservazione incrementa significativamente gli effetti tossici del GO a causa probabilmente di danni a carico della membrana cellulare, che incentivano l'endocitosi.
- In previsione di un impiego clinico nel purging del GO, dovranno essere evitati trattamenti superiori alle 24 h.

Questi dati offrono lo spunto per ulteriori future sperimentazioni atte a chiarire i fenomeni di tossicità rilevati e motivano la pianificazione di trials clinici finalizzati all'impiego del Gemtuzumab ozogamicina nel *purging* delle cellule staminali emopoietiche raccolte con procedure aferetiche di pazienti affetti da AML eleggibili al trapianto di midollo osseo autologo.





## BIBLIOGRAFIA

Aglietta M, De Vincentiis A, Lanata L, Lanza F, Lemoli RM, Menichella G, Tafuri A, Zanon P, Tura S (1996). Peripheral blood stem cells in acute myeloid leukemia: biology and clinical application. *Haematologica*, 81:77-92

Amico D, Barbui AM, Erba E, Rambaldi A, Introna M, Golay J (2003). Differential response of human acute myeloid leukemia cells to gemtuzumab ozogamicin in vitro: role of Chk1 and Chk2 phosphorylation and caspase 3. *Blood*, 101: 4589-4597

Bender GJ, Unverzagt K, Walker DE, Lee Wanda, Smith S, Williams S, Van Epps D (1994). Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol*, 70: 10-18.

Bonnet D (2002). Haematopoietic stem cells. *J Pathol*, 197: 430-440.

Breems DA, Lowenberg B (2005). Autologous stem cell transplantation in the treatment of adults with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 130(6): 825-833.

Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R (2001). Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*. June, 7: 1490-1496

Bruserud O, Tjonnfjord G, Gjertsen BT, Foss B, Ernst P (2000). New strategies in the treatment of acute myelogenous leukemia: mobilization and transplantation of autologous peripheral blood stem cells in adult patients. *Stem Cells*, 18(5): 343-351.

Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, Yin JA, Hunter A, Goldstone AH, Wheatley K (2011). Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29: 369-377.

Burnett AK, Kell WJ, Goldstone AH, Milligan D, Hunter A, Prentice AG, Russell NH, Gibson B, Wheatley K, Hills RK (2006). The Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction Chemotherapy for AML Improves Disease Free Survival without Extra Toxicity: Preliminary Analysis of 1115 Patients in the MRC AML15 Trial. *Blood*, 108.

Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Freeman S, Kjeldsen L, Hunter AE, Yin J, Craddock CF, Dufva IH, Wheatley K, Milligan D (2012). Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30: 3924-3931.

Cardoso A, Li M-L, Batard P, Hatzfeld A, Brown EL, Levesque J, Sookdeo H, Panterne B, Sansilvestri P, Clark SC, Hatzfeld J (1993). Release from quiescence of CD34+CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8707-8711.

Carlo-Stella C, Mangoni L, Almici C, Garau D, Cravioito L, Piovani G, Caramatti C, Rizzoli V (1992). Differential sensitivity of adherent CFU-Blast, CFU-Mix, BFU-E, and CFU-GM to mafosfamide: implications for adjusted dose purging in autologous bone marrow transplantation. *Exp. Hematol*, 20: 328-333.

Carlo-Stella C, Cazzola M, De Fabritiis P, De Vincentiis A, Gianni AM, Lanza F, Lauria F, Lemoli RM, Tarella C, Zanon P, Tura S (1995). CD34-positive cells: biology and clinical relevance. *Haematologica*, 80: 367-387

Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, et al. (1998). Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med*, 339(23): 1649-1656.

Castaigne S, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie JN, Legrand O, Thomas X, Turlure P, Reman O, de Revel T, Gastaud L, de Gunzburg N, Contentin N, Henry E, Marolleau JP, Aljijakli A, Rousselot P, Fenaux P, Preudhomme C, Chevret S, Dombret H; Acute Leukemia French Association (2012). Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*, 379(9825): 1508-1516.

Chantepie SP, Reboursiere E, Mear JB, Gac AC, Salaun V, Benabed K, Cheze S, Johnsonansah H, Macro M, Vilque JP, Reman O (2014). Gemtuzumab ozogamicin in combination with intensive chemotherapy in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia (AML). *Leuk Lymphoma*, 13: 1-11.

De Fabritiis P, Bregni M, Lipton J, Greenberger J, Nadler L, Rothstein L, Korbling M, Ritz J, Bast RC Jr (1985). Elimination of clonogenic Burkitt's lymphoma cells from human bone marrow using 4-hydroperoxycyclophosphamide in combination with monoclonal antibodies and complement. *Blood*, 65(5): 1064-1070.

Dowell JA, Korth-Bradley J, Liu H, King P, Berger MS (2001). Pharmacokinetics of Gemtuzumab Ozogamicin, an antibody-targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukaemia in first relapse. *J Clin Pharmacol*, 41: 1206-1214.

Elmroth K, Nygren J, Ma<sup>o</sup>rtensson S, Ismail HI, Hammarsten O (2003). Cleavage of cellular DNA by calicheamicin gamma1. *DNA Repair*, 2: 363-374.

Estey E (2012). Treatment of AML: resurrection for gemtuzumab ozogamicin? *Lancet*, 379: 1468-1469

Estey EH (2001). Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer*, 92(5): 1059-1073.

Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, 352(3): 254-266.

Forman SJ, Blume KG, Thomas ED (1999). *Hematopoietic Cell Transplantation*. Blackwell Science Boston (MA).

Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL (2005). Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*, 23(26): 6285-6295.

Giles FJ, Kantarjian HM, Kornblau SM, Thomas DA, Garcia-Manero G, Waddelow TA, David CL, Phan AT, Colburn DE, Rashid A, Estey EH (2001). Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin) therapy is associated with hepatic venoocclusive disease in patients who have not received stem cell transplantation. *Cancer*, 92: 406-413.

Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, Lindh D, Upešlaciš J, Flowers DA (2002). An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem*, 13: 40-46. [a]

Hamann PR, Hinman LM, Hollander I, Beyer CF, Lindh D, Holcomb R (2002). Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconjug Chem*, 13: 47-58. [b].

Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP (2005). Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med*, 9(1): 37-50.

Jedema I, Barge RM, van der Velden VH, Nijmeijer BA, van Dongen JJ, Willemze R (2004). Internalization and cell cycle dependent killing of leukemic cells by Gemtuzumab Ozogamicin: rationale for efficacy in CD33-negative malignancies with endocytic capacity. *Leukemia*, 18: 316-325.

Kharfan-Dabaja MA, Hamadani M, Reljic T, Pyngolil R, Komrokji RS, Lancet JE, Fernandez HF, Djulbegovic B, Kumar A (2013). Gemtuzumab ozogamicin for treatment of newly diagnosed acute myeloid leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol*, 163(3): 315-325.

Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, Löwenberg B, Estey EH, Dombret H, Theobal M, Voliotis D, Bennet GM, Richie M, Leopold LH, Berger MS, Sherman ML, Loken MR, van Dogen JJM, Bernstein ID, Appelbaum FR (2005). Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukaemia in first recurrence. *Cancer*, 104(7): 1442-1452. *Abstract*.

Laughlin MJ (2001). Umbilical cord blood for allogenic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplant*, 27: 1-6.

Lee MD, Dunne TS, Siegel MM, Chang CC, Morton GO, Borders DB (1987). Calicheimicins, a novel family of antitumor antibiotics. 1. Chemistry and partial structure of calicheimicin-gamma-1. *J Am Chem Soc*, 109: 3464-3466.

Lemoli RM, Gasparetto C, Scheinberg DA, Moore MA, Clarkson BD, Gulati SC (1991). Autologous bone marrow transplantation in acute myelogenous leukemia: in vitro treatment with myeloid-specific monoclonal antibodies and drugs in combination. *Blood*, 77(8): 1829-1836.

Linenberger ML (2005). CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia*, 19: 176-182.

Linker CA (2003). Autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplantation*, 31:731-738

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999). Acute myeloid leukaemia. *Medical Progress*, 341: 1051-1062

Matsui H, Takeshita A, Naito K, Shinjo K, Shigeno K, Maekawa M (2002). Reduced effect of gemtuzumab ozogamicin (CMA-676) on Pglycoprotein and/or CD34-positive leukemia cells and its restoration by multidrug resistance modifiers. *Leukemia*, 16: 813-819.

Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P (2003). Biology of human hematopoietic stem and progenitor cell present in circulation. *Arch Med Res*, 34: 476-488.

Maximow A (1909). The lymphocyte as a stem cell, common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals. Lecture with a demonstration, held at a special meeting of the Berlin Hematological Society on 1 June 1909 (Tradotto dal tedesco). *Folia Haematologica* 8.1909, 125-134 (L'originale in tedesco).

Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE (2003). Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med*, 9: 959-963.

McKenna RW (2000). Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clin Chem*, 46(8 Pt 2):1252-1259.

McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ (1989). Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood*, 74: 609-615.

Naito K, Takeshita A, Shigeno K, Nakamura S, Fujisawa S, Shinjo K, Yoshida H, Ohnishi K, Mori M, Terakawa S, Ohno R (2000). Calicheamicin-conjugated humanized anti-CD33 monoclonal antibody (gemtuzumab ozogamicin, CMA-676) shows cytotoxic effect on CD33-positive leukemia cell lines, but is inactive on P-glycoprotein-expressing sublines. *Leukemia*, 14: 1436-1443.

O'Hear C, Inaba H, Pounds S, Shi L, Dahl G, Bowman WP, Taub JW, Pui CH, Ribeiro RC, Coustan-Smith E, Campana D, Rubnitz JE (2013). Gemtuzumab ozogamicin can reduce minimal residual disease in patients with childhood acute myeloid leukemia. *Cancer*, 119(22): 4036-4043.

Petersdorf S, Kopecky K, Stuart R, Larson R, Nevill T, Stenke L, Slovak M, Tallman M, Willman C, Erba H, Appelbaum F (2009). Preliminary Results of Southwest Oncology Group Study S0106: an international intergroup phase 3 randomized trial comparing the addition of Gemtuzumab Ozogamicin to standard induction therapy versus standard induction therapy followed by a second randomization to post-consolidation Gemtuzumab Ozogamicin versus no additional therapy for previously untreated acute myeloid leukemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 114: 790.

Raanani P, Ben-Bassat I (2004). Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myelogenous Leukemia. *Acta Haematol*, 112: 40-54.

Ravandi F, Estey EH, Appelbaum FR, Lo-Coco F, Schiffer CA, Larson RA, Burnett AK, Kantarjian HM (2012). Gemtuzumab ozogamicin: time to resurrect? *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30: 3921-3923.

Ravandi F, Kantarjian H (2012). Haematological cancer: Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukaemia. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9: 310-311.

Rowe JM, Löwenberg B (2013). Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: a remarkable saga about an active drug. *Blood*, 121(24): 4838-4841.

Sakabe H, Ohmizono Y, Tanimukai S et al. (1997). Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived. CD34+ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit antigens. *Stem Cells*, 15: 73-81.

Sayar D, Burstein Y, Bielora B, Toren A, Dvir R (2010). Upfront use of gemtuzumab ozogamicin in young children with CD33-positive AML. *Pediatr Blood Cancer*, 55(1): 183-185.

Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT, Forman SJ, Flowers D, Smith FO, Shannon-Dorcy K, Berger MS, Bernstein ID (1999). Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood*, 93: 3678-3684.

Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, 106(4): 1154-1163.

Till JE, McCulloch EA (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14: 213.

Tsunemine H, Akasaka H, Sakane EI, Ito K, Kodaka T, Takahashi T (2014). Successful repeated treatment of acute myeloid leukemia in early relapse with gemtuzumab ozogamicin alone. *Int J Hematol*, 99(2): 193-197.

Uckun FM, Kersey JH, Haake R, Weisdorf D, Ramsay NK. Autologous bone marrow transplantation in high-risk remission B-lineage acute lymphoblastic leukemia using a cocktail of three monoclonal antibodies (BA-1/CD24, BA-2/CD9, and BA-3/CD10) plus complement and 4-hydroperoxycyclophosphamide for ex vivo bone marrow purging. *Blood*; 79(4): 1094-1104.

U.S. patent 5,877,296 (1999). Hamann RP, Hinman L, Hollander I, Holcomb R, Hallet W. Process for preparing conjugates of methyltrithio antitumor agent.

Van der Velden VH, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS, van Dongen JM (2001). Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood*, 97: 3167-3204

Visani G, Lemoli RM, Tosi P, Martinelli G, Testoni N, Ricci P, Motta M, Gherlinzoni F, Leopardi G, Pastano R, Rizzi S, Piccaluga P, Isidori A, Tura S (1999). Use of peripheral blood stem cells for autologous transplantation in acute myeloid leukaemia allows faster engraftment and equivalent disease-free survival compared with bone marrow. *Bone Marrow Transplant*, 24: 467-472.

Walter RB, Raden BW, Hong TC, Flowers DA, Bernstein ID, Linenberger ML (2003). Multidrug resistance protein attenuates gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity in acute myeloid leukaemia cells. *Blood*, 102: 1466-1473.

Walter RB, Raden BW, Cronk MR, Bernstein ID, Appelbaum FR, Banker DE (2004). The peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 overcomes different resistance mechanisms to sensitize AML cells to gemtuzumab ozogamicin. *Blood*, 103: 4276-4284.

Yamauchi T, Uzui K, Nishi R, Shigemi H, Ueda T (2014). Gemtuzumab ozogamicin and olaparib exert synergistic cytotoxicity in CD33-positive HL60 myeloid leukaemia cells. *Anticancer Res.* 34(10): 5487-5494.

Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L (1995). Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med*, 332(4): 217-223.