

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI "FEDERICO II"  
NAPOLI**



***DOTTORATO DI RICERCA  
IN TERAPIE AVANZATE MEDICO-CHIRURGICHE  
(29° CICLO)***

*Coordinatore: Prof. Giovanni Di Minno*

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**RILEVANZA CLINICO-BIOLOGICA DELLE REAZIONI AVVERSE  
INFUSIONALI AI FARMACI:  
IL CASO DELL'ANTICORPO MONOCLONALE RITUXIMAB**

Candidato: Dott. Giovanni D'Arena

Handwritten signature of Giovanni D'Arena.

ANNO ACCADEMICO 2016-2017



## INDICE

|  |         |
|--|---------|
| Introduzione   | pag. 4  |
| <i>Anticorpi monoclonali</i>                               | pag. 4  |
| <i>L'anticorpo monoclonale rituximab</i>                   | pag. 6  |
| <i>La tolleranza immunologica e le malattie autoimmuni</i> | pag. 8  |
| <i>Rituximab e terapia delle malattie autoimmuni</i>       | pag. 10 |
| <i>Reazioni avverse infusionali al rituximab</i>           | pag. 11 |
| <i>La terapia di desensibilizzazione</i>                   | pag. 12 |
| Obiettivo dello studio                                     | pag. 14 |
| Pazienti e Metodi  | pag. 15 |
| Statistica   | pag. 18 |
| Risultati  | pag. 19 |
| Discussione  | pag. 23 |
| Conclusione  | pag. 27 |
| Tabelle  | pag. 30 |
| Figure   | pag. 42 |
| Bibliografia   | pag. 56 |

## **Introduzione**

### ***Gli anticorpi monoclonali***

Gli anticorpi monoclonali sono il prodotto di un singolo clone, cioè di una popolazione cellulare geneticamente identica, in quanto derivata da una singola cellula madre, e quindi caratterizzati dal possedere una identica struttura antigenica <sup>(1)</sup>.

La possibilità di poter produrre tali anticorpi si deve alla messa a punto, da parte di Georges Köhler e Cesar Milstein, nel 1975, e che per questo nel 1984 furono insigniti del premio Nobel, della tecnologia dell'ibridoma (Figura 1) <sup>(2,3)</sup>. Tale metodica consiste nella fusione cellulare (o ibridizzazione cellulare somatica) fra un linfocita B normale, in grado quindi di produrre anticorpi, e una linea di mieloma, con formazione dell'ibridoma, e successivamente nella selezione delle cellule fuse, ottenute con l'obiettivo di isolare linee produttrici anticorpi della specificità desiderata.

In breve, dei topi vengono esposti all'antigene di interesse. Successivamente vengono isolati i linfociti della milza dell'animale e vengono fusi con cellule di mieloma difettive dell'enzima hypoxantine-guanine phosphoribosyl-transferase (HGFT). Il prodotto di questa fusione viene quindi coltivato *in vitro* per 10-14 giorni in un mezzo di selezione contenente ipoxantina, aminopterina e timidina e perciò detto terreno HAT. In tal modo le cellule di mieloma non fuse muoiono perché incapaci di sintetizzare nucleotidi mentre i linfociti muoiono perché hanno una vita breve se privi di stimoli adeguati. Le cellule fuse (ibridate), invece, sopravvivono perché sono in grado di produrre nucleotidi (il gene per questo viene fornito dai linfociti immunizzati) e sono immortalizzate (grazie ai geni provenienti dal mieloma). Dalla miscela di cellule ibridate

vengono selezionate quelle producenti anticorpi contro l'antigene desiderato e attraverso diluizioni al limite si giunge ad ottenere singoli cloni producenti anticorpi generati da cellule derivate da un unico ibrido detto appunto ibridoma. Infine, l'ibridoma viene amplificato *in vitro* e utilizzato per la produzione di anticorpi monoclonali specifici.

Gli anticorpi monoclonali identificano specifici epitopi antigenici presenti sulla superficie cellulare, quali recettori transmembrana o fattori di crescita extracellulari. In alcuni casi sono coniugati a radioisotopi o tossine per permettere il rilascio specifico di questi agenti citotossici alla cellula target, una volta che essa sia stata riconosciuta e che l'anticorpo vi si sia legato.

I primi anticorpi monoclonali utilizzati in clinica erano di derivazione murina. La loro efficacia, tuttavia, era limitata innanzitutto da una scarsa funzione di riconoscimento reciproco tra l'anticorpo murino e il corrispondente antigene umano, ma anche da una ridotta emivita e dallo sviluppo di anticorpi umani rivolti contro l'anticorpo monoclonale murino stesso, riconosciuto come estraneo dal sistema immunitario. In seguito, la tecnologia del DNA ricombinante ha consentito di generare anticorpi monoclonali costituiti da una regione variabile murina e da una regione costante umana (anticorpi chimerici). Ulteriori modificazioni hanno portato alla produzione di anticorpi in cui la proteina murina è costituita solo da quelle parti dell'anticorpo che interagiscono con l'antigene (regioni ipervariabili), mentre il resto delle immunoglobuline è umano (anticorpi umanizzati). Infine, grazie all'utilizzazione di topi transgenici, l'informazione genetica per la sintesi delle immunoglobuline umane è stata trasferita in un topo creando un animale capace di produrre (dopo che è stato esposto ad uno specifico antigene) degli anticorpi interamente umanizzati. Una

schematizzazione dei vari tipi di anticorpi monoclonali, la loro immunogenicità e i principi relativi alla loro nomenclatura sono riportati nella Figura 2.

Il primo anticorpo monoclonale approvato per l'uso clinico è stato un anticorpo murino impiegato come immunosoppressore per il controllo del rigetto del rene trapiantato, noto come OKT3 (muromomab CD3), che identifica una molecola di membrana dei linfociti T (CD3)<sup>(4)</sup>. Il blocco di tale recettore antigenico impedisce l'attivazione della risposta immunitaria essendo tale recettore fondamentale nella genesi della risposta immune. In seguito, numerosi altri anticorpi monoclonali sono stati prodotti grazie anche alla tecnologia del DNA ricombinante. La Tabella 1 riporta una selezione dei più importanti anticorpi monoclonali approvati da FDA e EMA per l'utilizzazione in clinica.

### ***L'anticorpo monoclonale Rituximab***

Il primo anticorpo monoclonale approvato per la terapia del cancro è stato il rituximab, un anticorpo chimerico che identifica il CD20, antigene presente sulla superficie dei linfociti B normali e sulla maggior parte dei linfociti neoplastici dei linfomi non-Hodgkin (LNH) a cellule B e della leucemia linfatica cronica (LLC) <sup>(5-7)</sup>. Inizialmente utilizzato nel trattamento del linfoma follicolare e degli altri LNH a basso grado di malignità è stato poi ampiamente usato nel trattamento dei LNH aggressivi, in combinazione con la chemioterapia, dimostrandone la superiorità, in associazione, rispetto alla sola chemioterapia <sup>(8-10)</sup>. Più recentemente, l'utilizzazione del rituximab ha dimostrato la sua efficacia nel trattamento di varie tipologie di malattie autoimmuni

(Tabella 2) ricevendo, tra l'altro, l'approvazione al trattamento dell'artrite reumatoide (AR) nel 2006 <sup>(11-34)</sup>.

Attualmente il rituximab è quindi approvato per il trattamento di:

1) LNH: in associazione alla chemioterapia di I linea e in recidiva e in monoterapia in terapia di mantenimento del LNH follicolare;

2) LLC: precedentemente non trattata e in recidiva o refrattaria, in associazione alla chemioterapia;

3) AR: in associazione al methotrexate, nella forma di malattia attiva di grado grave con inadeguata risposta o intolleranza ad altri farmaci antireumatici modificanti la malattia, comprendenti uno o più inibitori del fattore di necrosi tumorale (TNF);

4) Granulomatosi con poliangite (di Wegener) e poliangite microscopica attiva di grado lieve, in associazione con glucocorticoidi.

L'anticorpo monoclonale chimerico rituximab ha come target l'antigene identificato dal CD20 il quale è presente sulla superficie dei linfociti maturi B normali e su quella delle cellule B neoplastiche della maggior parte dei linfomi (Figura 3 e Figura 4) <sup>(6,35,36)</sup>. Facendo seguito al legame del dominio Fab del rituximab con l'antigene target, l'azione sulle cellule B avviene attraverso vari meccanismi, i principali dei quali sono la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC), la citotossicità complemento-dipendente (CDC) e effetti direttamente indotti dal legame dell'anticorpo al CD20, inclusa l'apoptosi (Figura 5) <sup>(1)</sup>.

Il farmaco deve essere somministrato per via endovenosa, in ambiente ospedaliero, con disponibilità di apparecchiature per la rianimazione. E' prassi comune effettuare una premedicazione con un farmaco antipiretico ed un antistaminico (ad es. paracetamolo e difenidramina) prima di ogni somministrazione. Spesso, soprattutto nei

pazienti affetti da LNH o da LLC, si somministrano, in associazione, glucocorticoidi che fanno per lo più parte dello schema di chemioterapia associato all'infusione dell'anticorpo <sup>(37)</sup>.

L'anticorpo, se infuso la prima volta, va somministrato alla velocità di 50 mg/ora con un incremento della velocità di 50 mg/ora ogni 30 minuti, se non vi è tossicità, fino ad una velocità massima di 400 mg/ora; nelle infusioni successive si inizia con una velocità di 100 mg/ora con un incremento della velocità di 100 mg/ora ogni 30 minuti fino ad un massimo di 400 mg/ora <sup>(38)</sup>.

### ***La tolleranza immunologica e le malattie autoimmuni***

La tolleranza immunologica è la mancata responsività a un antigene indotta dalla precedente esposizione a quello stesso antigene <sup>(1,39,40)</sup>. In un assetto immunitario normale la tolleranza agli antigeni self è di fondamentale importanza dal momento che la perdita di essa da luogo a risposte immunitarie contro antigeni autologhi, definite risposte autoimmuni, con il conseguente manifestarsi di malattie autoimmuni.

I meccanismi che sono utilizzati dal nostro sistema immunitario per prevenire l'emergere di cellule B autoimmuni sono schematizzati nelle Figure 6 e 7 e sono alla base della cosiddetta tolleranza immunologica verso gli antigeni self che può essere indotta allorquando i linfociti in via di maturazione incontrano tali antigeni all'interno degli organi linfoidei primari, cioè midollo osseo e timo (tolleranza centrale), o quando i linfociti maturi li incontrano a livello dei tessuti periferici (tolleranza periferica) <sup>(1,39,40)</sup>.



La tolleranza centrale dei linfociti T avviene nel timo, laddove i linfociti T immaturi che riconoscono con elevata affinità gli antigeni autologhi che sono lì presenti ad alta concentrazione, muoiono per apoptosi. Questo processo viene definito selezione negativa.

La tolleranza periferica dei linfociti T avviene per anergia, cioè inattivazione funzionale dei linfociti T, ed essa si verifica quando tali linfociti riconoscono gli antigeni senza un livello adeguato dei secondi segnali (costimolazione) che sono necessari perché si abbia una piena attivazione, per delezione, attraverso un meccanismo di apoptosi, per soppressione, attraverso la generazione di linfociti T soppressori (cellule T regolatorie) che hanno azione inibitrice, per lo più attraverso il rilascio di citochine ad azione immunosoppressiva, quali l'IL-10 e il TGF- $\beta$  <sup>(41)</sup>.

Sebbene siano meglio conosciuti i meccanismi di genesi della tolleranza dei linfociti T, è noto che esistono anche meccanismi di induzione della tolleranza dei linfociti B <sup>(41)</sup>. Nel midollo osseo avviene una tolleranza centrale per apoptosi (selezione negativa) o per induzione alla modificazione della loro specificità recettoriale (editing del recettore). Nei tessuti periferici, invece, avviene una tolleranza periferica per anergia, ossia i linfociti vengono resi incapaci di rispondere agli antigeni self se manca una adeguata cooperazione dei linfociti T helper in quanto assenti o tolleranti.

La possibilità che vi sia un deragliamento della normale organizzazione del sistema immunitario, per cui antigeni self sono riconosciuti come estranei con conseguente reazione immunitaria e danno tissutale, è fenomeno noto fin dall'inizio del secolo scorso allorché Paul Ehrlich per definirlo coniò l'espressione di *horror autotoxicus* <sup>(42)</sup>. Si stima che dal 2 al 5% della popolazione nel mondo occidentale presenti una malattia autoimmune. Oggetto di studio, poiché i dati non sono ancora

conclusivi, sono i motivi per cui emergano linfociti autoreattivi con mancato funzionamento del fenomeno della tolleranza immunologica.

Quello che è ormai chiaro è che l'autoimmunità è sostanzialmente frutto di una rottura della tolleranza verso il self causata per lo più da alterazioni intrinseche dei linfociti oppure da alterazioni nella natura o nella presentazione degli antigeni da essi riconosciuti. Fattori genetici ed infezioni probabilmente svolgono un ruolo predisponente alla rottura della tolleranza immunologica ed allo sviluppo di una malattia autoimmune <sup>(1)</sup>.

### ***Rituximab e terapia delle malattie autoimmuni***

L'anticorpo monoclonale rituximab avendo come target specifico il CD20 e quindi le cellule B che lo esprimono sulla loro superficie, ha trovato utilizzazione anche nel trattamento delle malattie autoimmuni <sup>(29)</sup>.

E' intuitivo pensare, nel considerare il possibile meccanismo d'azione dell'anticorpo, che esso possa agire semplicemente eliminando le cellule che normalmente producono e secernono gli anticorpi. Tuttavia noi sappiamo oggi che non solo le cellule B normali, ma anche quelle patologiche, come i linfociti B della LLC, costituiscono delle efficienti cellule presentanti l'antigene (APC) <sup>(1,17,43)</sup>. Nel complesso quindi l'anticorpo agirebbe determinando un killing non solo delle cellule B produttrici l'anticorpo ma anche di quelle che in parte presenterebbero l'antigene alla cellula T helper, funzione che normalmente viene svolta dai macrofagi, innescando la reazione immune (Figura 8).

### ***Reazioni avverse infusionali al rituximab***

Nonostante il farmaco sia generalmente molto ben tollerato, sia quando viene infuso in monoterapia che quando è infuso in associazione ad altri chemioterapici, possono aversi delle reazioni avverse al farmaco (ADRs) che, in alcuni casi, sono responsabili di una interruzione definitiva dell'anticorpo privando tali pazienti dell'indubbio beneficio della sua somministrazione <sup>(44)</sup>.

Nella letteratura oncologica circa un terzo dei pazienti sviluppa una reazione infusione al rituximab nonostante la premedicazione con glucocorticoidi <sup>(44)</sup>. Le reazioni infusionali si riducono di frequenza nelle infusioni successive. Queste reazioni sono generalmente di tipo lieve-moderato e possono richiedere interventi aggiuntivi quali paracetamolo, antistaminici broncodilatatori e somministrazioni ulteriori di glucocorticoidi. Meno comuni sono le reazioni più gravi che possono portare anche all'interruzione definitiva della somministrazione del farmaco (<1%) <sup>(45)</sup>. Valutando nel complesso i dati del trattamento della AR con rituximab è possibile vedere che le reazioni infusionali dopo la prima infusione si verificano nel 25% dei pazienti e sono per lo più lievi-moderate; nelle infusioni successive si verificano rispettivamente nel 13%, 9%, 9% e 3% dei pazienti <sup>(46,47)</sup>.

Le ADRs costituiscono un importante problema clinico non solo per la morbilità e la mortalità ad esse correlate ma anche per la non sostituibilità di alcuni farmaci il che conduce alla impossibilità di somministrare una determinata terapia con impatto sulla risposta al trattamento e sulla sopravvivenza globale stessa.

## ***La terapia di desensibilizzazione***

La terapia di desensibilizzazione è una tecnica per il trattamento delle malattie da ipersensibilità immediata, le cosiddette malattie allergiche, che comporta la somministrazione ripetuta di basse dosi dell'antigene a cui l'individuo è allergico.

Tale approccio terapeutico, in uso ormai da più di un secolo, e che prevede la somministrazione ripetuta di dosi diluite e progressivamente crescenti dell'allergene, attraverso un protocollo multistep fino a raggiungere la dose in poche ore, per indurre uno stato di tolleranza. Il suo esatto meccanismo d'azione che non è ancora precisamente ben compreso, ma spesso impedisce l'insorgenza di gravi reazioni allergiche a una successiva esposizione all'antigene.

I farmaci biologici, quali gli anticorpi monoclonali e gli inibitori delle tirosin chinasi, sono agenti di ultima generazione che rappresentano una nuova frontiera nella terapia dei tumori. Tuttavia, anche gli anticorpi monoclonali non sono scevri dal causare reazioni di ipersensibilità (Tabella 3) <sup>(48,49)</sup>. Si stima che gli anticorpi monoclonali umanizzati causino reazione da ipersensibilità gravi in meno del 3% dei casi <sup>(50-53)</sup>. L'immunogenicità dell'anticorpo monoclonale è strettamente dipendente dal suo "contenuto umano" che varia da forma chimerica a umanizzata a completamente umanizzata (Figura 2).

La prima casistica pubblicata di terapia desensibilizzante rapida al rituximab è stata quella di Castells e collaboratori, nell'ambito di una più ampia casistica di pazienti trattati con desensibilizzanti ad agenti chemioterapici <sup>(54)</sup>.

Successivamente, Brennan e collaboratori hanno riportato altri 14 casi di pazienti sottoposti a desensibilizzazione per precedenti eventi allergici al rituximab

somministrato per il trattamento della loro patologia ematologica di base (LNH, LLC, malattia di Waldenstrom) ed anche patologie autoimmuni (PTI, LES, polimiosite) <sup>(55)</sup>. Tali autori descrivono un metodo di desensibilizzazione rapida, che si articola in 12 step standardizzati della durata di 6 ore, che è risultato essere molto efficace per vari anticorpi monoclonali, incluso il rituximab <sup>(56,57)</sup>.

L'obiettivo di questo protocollo di desensibilizzazione, messo a punto nel Dipartimento di Reumatologia, Immunologia e Allergologia del Brigham and Women's Hospital dell'Università di Harvard (Boston, USA), è quello di incrementare gradualmente la dose del farmaco senza tuttavia raggiungere una soglia di concentrazione che potrebbe scatenare la reazione anafilattica. Come dimostrato da studi *in vitro* IgE/antigene di desensibilizzazione delle mastcellule, ciascuna dose somministrata induce una maggiore inibizione raggiungendo la soglia dei sintomi clinici <sup>(58)</sup>.

Sono tuttora disponibili protocolli efficaci di desensibilizzazione a vari anticorpi monoclonali, quali il rituximab, ofatumumab, obinutuzumab, trastuzumab, cetuximab, infliximab, etanercept, brenutuximab, bevacizumab <sup>(57)</sup>.

## **Obiettivo dello studio**

In questo lavoro sono riportati i dati di uno studio retrospettivo, osservazionale, multicentrico, di farmacovigilanza condotto con l'obiettivo di valutare l'incidenza "real life" e la tipologia di ADRs al rituximab, la sicurezza della sua somministrazione in pazienti con malattie neoplastiche linfoproliferative delle cellule B e con malattie autoimmuni. In una seconda fase si è cercato di identificare parametri clinici e laboratoristici che fossero in grado di predire l'occorrere di una ADRs. Infine si riportano i dati di un gruppo di pazienti con ADRs al rituximab che sono stati sottoposti a terapia desensibilizzante rapida.

## **Pazienti e Metodi**

Sono stati analizzati retrospettivamente i dati di 374 pazienti (età mediana 64 anni; range 20 – 87 anni) a cui è stato infuso rituximab in 8 Istituzioni Italiane (in Tabella 4 è riportato l'elenco dei centri partecipanti allo studio) tra giugno 2005 e giugno 2015.

Le caratteristiche dei pazienti, suddivisi per età, sesso, patologia di base e lunghezza del follow-up, in rapporto all'incidenza di ADRs sono riassunte in Tabella 5.

Il rituximab è stato somministrato per via endovenosa, dopo aver ottenuto la firma del consenso informato al trattamento, utilizzando i diversi protocolli adottati per la cura delle differenti patologie nelle nostre Istituzioni. In particolare, sono stati infusi: 1) 375 mg/mq ogni 21 o 28 giorni nei LNH aggressivi e indolenti; 2) 500 mg/mq ogni 28 giorni nei pazienti con LLC; 3) 375 mg/mq settimanalmente nei pazienti con patologie autoimmuni per 4-8 somministrazioni; 4) 1000 mg il giorno +1 e il giorno +14, e successivamente, ogni 6 mesi nei pazienti con AR.

I pazienti affetti da LNH e LLC hanno ricevuto contemporaneamente differenti schemi di chemioterapia in accordo alle linee guida al tempo del trattamento (Tabella 6).

Per prevenire le ADRs, tutti i pazienti hanno ricevuto metilprednisolone (100-1000 mg e.v.) 30 minuti prima di ciascuna infusione e, nella maggior parte dei casi, anche 1000 mg di acetaminofene per via orale e 10 mg di clorfenamina per via endovenosa.

Il rituximab è stato somministrato con una iniziale velocità di infusione di 50 mg/ora per la prima ora e, successivamente, con un incremento, ogni 30 minuti, di 50 mg/ora fino a raggiungere la velocità massima di infusione di 400 mg/ora.

Le ADRs sono state registrate sulle cartelle cliniche dei pazienti nel corso del trattamento e l'intensità di tali reazioni è stata valutata utilizzando i criteri riportati nella versione 4.2 del National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) con una gradazione da 1 a 5 della severità della reazione <sup>(59)</sup>.

Mediante citofluorimetria (FACSCalibur/FACSCanto, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Josè, CA, USA) è stata studiata l'intensità media di fluorescenza (MFI) del CD20 sulle cellule B, nel sangue periferico o nel midollo osseo, di 37 pazienti con LLC, con bassa-intermedia MFI, 17 LNH follicolari con bassa-alta MFI, e 3 LNH mantellari con alta MFI, con l'obiettivo di valutare una possibile relazione tra ADRs e livello di espressione del CD20 sulla superficie delle cellule B neoplastiche <sup>(60)</sup>. Gli istogrammi dell'intensità del CD20 di 3 pazienti con malattie linfoproliferative con alta, intermedia e bassa intensità di espressione dell'antigene sono rappresentati nella Figura 9.

Infine, 4 pazienti (3 maschi e 1 femmina) affetti da LNH a basso grado di malignità (1 paziente) e LNH ad alto grado di malignità (3 pazienti), età media 61 anni (range: 56 - 65 anni), che avevano presentato una reazione di ipersensibilità al rituximab nel corso di un trattamento chemioterapico per il loro linfoma (schema R-CVP in un caso e R-CHOP nei rimanenti 3 casi), sono stati sottoposti a terapia desensibilizzante all'anticorpo secondo il protocollo disegnato da Castells e collaboratori e il cui schema è riportato in Tabella 7 <sup>(54,56)</sup>.



I test cutanei per valutare la sensibilizzazione al farmaco sono stati effettuati in tutti e 4 i casi e sono risultati essere negativi.

## **Statistica**

Le variabili continue sono riportate come medie, deviazioni standard, mediane e range. Per confrontare i dati sono stati usati il t-test, per i dati parametrici, e il Mann-Whitney U-test, per quelli non parametrici. Le variabili di categoriche sono riportate come numero e percentuale e sono state confrontate attraverso l'uso del test  $\chi^2$  o del test esatto di Fisher. La significatività statistica è stata definita  $<0.05$ . Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il programma di analisi STATA, versione 11.0 (Stata Corp., College Station, YX, USA).

La selezione delle variabili e il modello di predizione sono stati valutati in accordo al metodo descritto in maggior dettaglio nella sezione dei Risultati. Infine, il follow-up è stato valutato dall'inizio della terapia all'ultima valutazione clinico-laboratoristica effettuata.

## Risultati

Il rituximab è stato somministrato a 374 pazienti per un totale di 2.846 infusioni. Di tali pazienti, 272 (72,7%) hanno ricevuto >4 infusioni, 73 (19,5%) 4 infusioni; 10 (2,7%) 3 infusioni, 9 (2,4%) 2 infusioni e 10 (2,7%) una singola infusione. Nel complesso, ADRs associate all'infusione si sono verificate in 88 pazienti, che costituiscono il 23,5% della popolazione totale studiata.

Rispetto all'intera coorte di pazienti, ADRs si sono verificate più frequentemente in quelli affetti da LNH indolente (9%), rispetto a quelli affetti da LLC (6%) e LNH ad alto grado di malignità (4,6%). Inoltre, 7 pazienti (1,8%) con malattie autoimmuni primitive e altri 7 pazienti (1,8%) con patologie linfoproliferative complicate da patologie autoimmuni hanno sviluppato ADRs.

Le ADRs osservate sono state generalmente di grado lieve (grado 1: 56 pazienti; 63,7%) o moderato (grado 2: 24 pazienti; 27,2%) (Tabella 8) e sono state più frequentemente osservate durante la prima infusione (78 pazienti; 88,6%). L'incidenza delle ADRs si è poi ridotta nelle successive infusioni (Figura 10).

All'insorgenza di una ADR, l'infusione del rituximab è stata immediatamente interrotta ed infusa lentamente una soluzione di NaCl allo 0,9%. Se richiesto dalla gravità della situazione clinica, sono stati anche somministrati steroidi (metilprednisolone 200-500 mg o desametasone 40 mg endovena) e antistaminici. Al risoluzione della sintomatologia del paziente, l'infusione del rituximab è stata ripresa a una più bassa velocità di infusione che è stata poi aumentata successivamente se tollerata bene dal paziente stesso.

Degli 88 pazienti che hanno manifestato una ADR, 84 sono stati in grado di completare l'infusione dopo la somministrazione dell'appropriato trattamento; 95% di essi hanno ricevuto successivamente altre dosi di rituximab senza manifestare altre reazioni avverse. Solo in 8 casi (9,1%) le ADR sono state di grado severo (grado 3-4) per cui si è reso necessario un trattamento più intensivo (1 g di metilprednisolone e 25-50 mg di difenidramina per via endovenosa). Soltanto la metà di tali pazienti, corrispondenti all'1% del totale della casistica presa in esame, hanno interrotto definitivamente il trattamento (Tabella 8).

Infine, un solo paziente, affetto da anemia emolitica autoimmune primitiva, che peraltro non aveva avuto nessuna reazione avversa all'infusione dell'anticorpo, ha rifiutato di continuare la terapia dopo la seconda dose.

A un follow-up mediano di 20.6 mesi (range: 3 - 125 mesi) non si sono osservati decessi o infezioni severe.

Le correlazioni tra ADRs e le caratteristiche clinico-laboratoristiche dei pazienti partecipanti allo studio sono riassunte nella Tabella 9. Come si può vedere, il verificarsi delle ADRs è correlato significativamente con livelli più elevati di emoglobina, una più alta conta leucocitaria, ma più bassi livelli assoluti di neutrofili, presenza di splenomegalia, una anamnesi positiva per episodi allergici e, nei pazienti con patologie linfoproliferative, una infiltrazione midollare da parte delle cellule linfoidi neoplastiche. Nel complesso, il verificarsi di una ADR non è correlato alla tempistica della infusione del rituximab rispetto ai farmaci chemioterapici dello schema terapeutico, cioè se in concomitanza, lo stesso giorno, o in ritardo (generalmente dopo una settimana dal 1° ciclo di chemioterapia) rispetto ad essi. Inoltre, il verificarsi di una ADR non è risultato influire sulla qualità della risposta alla terapia (p 0.16).

Le ADRs non sono chiaramente associate alla densità di espressione del CD20 sulla superficie delle cellule neoplastiche sebbene il limitato numero di pazienti studiati (soprattutto quelli con più alta MFI) non consente di giungere a conclusioni definitive riguardo a questo aspetto.

Abbiamo condotto una selezione *"a-priori"* di tutte le variabili statisticamente significative per lo sviluppo di ADRs nella precedente analisi, escludendo l'infiltrazione midollare, a causa del piccolo numero di pazienti "positivi" (abbiamo anche escluso le LLC). Le variabili continue sono state suddivise in terzili, comparando successivamente il terzo terzile (il valore più elevato) con il primo e il secondo terzile per ottenere una variabile dicotomica. E' stato usato un modello logistico multivariato con un approccio stepwise reverse per scegliere, con un metodo non supervisionato, le variabili rilevanti capaci indipendentemente di predire le ADRs dopo trattamento con rituximab.

Un valore di  $p < 0.05$  è stato definito come statisticamente significativo per rimanere nel modello finale.

Le variabili selezionate per questo tipo di approccio sono risultate essere la splenomegalia, una anamnesi positiva per allergie, i livelli terzili di emoglobina (<11 g/dl; 11-12,9 g/dl;  $\geq 13$  g/dl), i livelli terzili di leucociti circolanti (<5.800/uL; 5.800-11.100/uL;  $>11.000$ /uL), e i livelli terzili dei neutrofili circolanti (<3.100/uL; 3.100-5.500/uL;  $>5.500$ /uL). I livelli terzili dei leucociti ( $p = 0.6167$ ) e dei neutrofili ( $P = 0.254$ ) sono stati rimossi successivamente dall'analisi.

Il modello finale è stato quindi composto da splenomegalia (OR 1.88; 95% CI 1.06 – 3.35,  $p = 0.03$ ), storia di allergie (OR 2.34; 95% CI 1.21-4.52,  $p=0.011$ ), e livello terzile di emoglobina (<11-12.9 g/dl vs  $\geq 13$  g/dl; OR 2-13, 95% CI 1.19 – 3.8,  $p=0,001$ ). A causa del piccolo campione abbiamo effettuato un ricampionamento di tipo bootstrap

di questo modello finale per testare la robustezza dei risultati ottenuti. Questo modello è stato rivalutato 1.000 volte e in seguito corretto per la variabile sesso. I risultati ottenuti alla fine sono stati: splenomegalia (OR 1.76, 95% CI 1.02-3.03, p=0.042), storia di allergie (=R 2.2, 95% CI 1.15-4.2, p=0.0017), livello terzile di emoglobina (OR 2.5, 95% CI 1.4-4.47, p=0.0002), sesso femminile (=R 2.02, 95%CI 1.13-3.5, p =0.017).

L'area sotto la curva ROC di questo modello è 0.662, con 22% di sensibilità, 96% di specificità, e 76% di pazienti correttamente classificati (Figura 11).

Abbiamo, quindi, calcolato una probabilità predetta di ADR suddividendo il rischio in 3 differenti gruppi:

- 1) basso rischio: probabilità <20%;
- 2) rischio intermedio: da 20 a 39%;
- 3) alto rischio: >40%.

E' stata, infine, realizzata una tabella/heatmap con differenti combinazioni delle variabili selezionate per visualizzare i risultati in termini di probabilità di sviluppare ADR in singoli pazienti (Figura 12).

La terapia desensibilizzante utilizzata nei nostri 4 pazienti che avevano avuto ADRs in precedenti infuzioni di rituximab è stata effettuata in sicurezza senza complicanze ed ha permesso di far riprendere a tutti la terapia con l'anticorpo ai dosaggi previsti.

## Discussione

Il rituximab costituisce una parte fondamentale della terapia per varie patologie che comprendono sia le neoplasie linfoproliferative sia le malattie autoimmuni <sup>(8,9,12,61)</sup>. Sebbene il rituximab sia generalmente ben tollerato, la sua infusione può essere complicata da effetti collaterali, la maggior parte dei quali si verificano generalmente nel corso della prima somministrazione <sup>(44)</sup>. In particolare, la cosiddetta sindrome da rilascio citochinico è stata descritta ed è generalmente ritenuta essere correlata al burden tumorale (ad es. il numero di linfociti circolanti nei pazienti con LLC o la massa tumorale nei LNH in stadio avanzato di malattia) <sup>(62-64)</sup>.

L'incidenza delle ADRs correlate all'infusione è riportata essere nell'ordine del 25-78% dei casi <sup>(44,62-70)</sup>. In particolare, è stata descritta una maggiore incidenza nei pazienti con LNH (72-87%) rispetto alle patologie autoimmuni (25.7-78.3% nella sclerosi multipla, 5.9-29% nel LES e nella AR). La maggior parte di queste ADR sono di grado 1-2, secondo la classificazione CTCAE, mentre quelle di grado 3-4 sono rare con una mortalità direttamente o indirettamente correlata alla somministrazione del rituximab estremamente rara (circa 0.04-0.07%) <sup>(44)</sup>.

La maggior parte di queste caratteristiche sono state confermate dal nostro studio multicentrico retrospettivo nel quale il rituximab è stato somministrato come parte della terapia di vari tipi di neoplasie a cellule B oltre che patologie autoimmuni sia primitive che complicanti patologie linfoproliferative di basso grado <sup>(71)</sup>.

Un dato di estremo interesse, a nostro giudizio, è che le ADRs siano state più frequentemente osservate nei disordini autoimmuni intesi globalmente (primitivi e

secondari, cioè associati a patologie linfoproliferative a basso grado di malignità) rispetto alle malattie linfoproliferative a cellule B (LNH e LLC).

Tutti i pazienti della nostra casistica sono stati trattati con steroidi e, in alcuni casi, azatioprina e metotrexate prima di iniziare la terapia con rituximab. Questa immunosoppressione potrebbe spiegare, almeno in parte, la più bassa incidenza di ADRs in questi pazienti rispetto a quelli con malattie linfoproliferative. Inoltre, nella nostra casistica, le ADRs di grado 1-2 sono state sensibilmente più comuni di quelle di grado 3-4. E' interessante notare che solo l'1% dei pazienti ha dovuto interrompere in maniera definitiva la terapia con il rituximab.

Sia la densità antigenica del CD20 sulla superficie delle cellule B che la massa di malattia (valutata in termini di stadio clinico) nei LNH e nella LLC non sono stati predittori del verificarsi di ADR. In particolare, come precedentemente riportato dal nostro stesso gruppo di lavoro in una coorte di soli pazienti con LLC non inclusi nel presente studio <sup>(72)</sup>, un più basso numero di linfociti circolanti era predittivo di sviluppo di ADR. In questo stesso ambito, Norin e collaboratori hanno riportato che ADRs severe non sono comuni nei pazienti con LLC trattati con rituximab e che non vi è correlazione tra conta leucocitaria e incidenza e grado di ADRs <sup>(73)</sup>.

Da notare, inoltre, che non si sono osservati né decessi né infezioni di alcun tipo. In particolare, nessuna riattivazione di epatite B e ciò è stato probabilmente dovuto al fatto che i portatori di HBsAg e/o antigeni anti-core hanno ricevuto profilassi con lamivudina (100 mg/die per via orale) durante e per almeno 6 mesi dopo la fine della terapia infusione con rituximab.

Si conferma, inoltre, da questo studio che l'incidenza di ADRs si verifica più frequentemente nel corso della prima infusione <sup>(71)</sup> e che l'incidenza si riduce



progressivamente nelle infusioni successive (Figura 10). La ragione esatta di ciò per lo più non è nota sebbene si ritenga che probabilmente intervengano una vera reazione di ipersensibilità IgE-mediata e un rilascio di citochine <sup>(74)</sup>.

Nel complesso il verificarsi di una ADR non ha influenzato la risposta alla terapia e non sono state osservate differenze nella incidenza e severità di ADR in rapporto alla prima somministrazione di rituximab nello stesso giorno della chemioterapia o differita di una settimana o al ciclo successivo come è prassi talvolta fare soprattutto nei pazienti con rilevante massa tumorale all'esordio per evitare una sindrome da lisi tumorale <sup>(75)</sup>.

Il più rilevante contributo di questo studio, secondo il nostro parere, è la dimostrazione che combinando pochi e semplici parametri clinici e di laboratorio (splenomegalia, una anamnesi positiva per reazioni allergiche, livelli basali di emoglobina e il sesso) sia possibile identificare quei pazienti a più elevato rischio di sviluppare una ADR dopo la somministrazione di rituximab. Infatti, utilizzando la proposta table/heatmap (Figura 12), si è in grado di identificare 3 differenti gruppi di pazienti nei quali il rischio di sviluppare una ADR dopo infusione di rituximab aumenta progressivamente dal 10 a oltre il 69%.

Mentre è pienamente comprensibile che una precedente storia di reazioni allergiche possa svolgere un ruolo nello sviluppo di una ADR dopo infusione di rituximab, non lo è perfettamente l'influenza dei livelli di emoglobina, la splenomegalia e il sesso femminile predispongano a ciò. Si potrebbe speculare che un più alto ematocrito, il microambiente splenico e differenze farmacocinetiche dell'anticorpo legate al sesso (ad es. una ridotta clearance nelle donne più anziane) <sup>(76,77)</sup> possano favorire meccanismi capaci di indurre ADR. Queste, tuttavia, rimangono delle semplici speculazioni che richiedono, perché siano meglio elucidate, appropriati studi.

Nonostante oramai sia stato introdotto in clinica l'uso del rituximab sottocute, che è una combinazione di anticorpo monoclonale più concentrato (120 mg/ml invece che 10 mg/ml) e di ialuronidasi umana ricombinante, la prima somministrazione rimane ancora da effettuare per via endovenosa. Per questa ragione, poiché l'ADR si verifica più frequentemente durante la prima infusione, il problema non viene risolto dalla differente modalità di somministrazione introdotta più recentemente. E' da notare, inoltre, che valutando la sicurezza dell'infusione della molecola per via sottocutanea non è stata osservata nessuna differenza in termini di incidenza e severità dell'ADR <sup>(78,79)</sup>. Nella formulazione sottocute sono state osservate per lo più reazioni cutanee di grado 1-2, poche di grado 3 e nessuna di grado 4 o 5.

## Conclusioni

Il rituximab si è imposto ormai da tempo come uno degli elementi cardine della terapia delle malattie neoplastiche dei linfociti B e la sua utilizzazione si sta ampiamente diffondendo anche nel campo delle patologie autoimmuni. La sua capacità di identificare l'antigene target CD20 sulla superficie delle cellule B sia normali che patologiche avviando la catena di eventi che porta alla loro distruzione lo rende una molecola di straordinaria importanza. Se nei linfomi la sua efficacia è legata soprattutto alla capacità di eliminare selettivamente le cellule B neoplastiche, nelle patologie autoimmuni essa è legata alla capacità di raggiungere un obiettivo dal duplice aspetto: eliminare quelle cellule, cioè i linfociti B maturi, capaci non solo di produrre l'autoanticorpo responsabile delle manifestazioni della malattia ma anche le cellule che presentano l'antigene al linfocita T dal momento che è ormai noto che anche i linfociti B sono delle efficienti cellule presentanti l'antigene. Nella Figura 13 è presentato schematicamente il caso paradigmatico della anemia emolitica autoimmune che complica il decorso clinico della LLC. In questo caso il rituximab ha come target la cellula B normale, che produce l'autoanticorpo che dà origine e sostiene l'anemia emolitica autoimmune, e quella patologica che si è dimostrata essere una aberrante ed efficiente cellula che presenta l'antigene al linfocita T attivando la risposta autoanticorpale <sup>(43,80)</sup>.

Il nostro studio conferma che il rituximab rimane un anticorpo sicuro nella pratica clinica, nonostante le ADRs siano abbastanza frequenti. Fortunatamente, ADRs severe sono rare e in pochissimi casi è necessario interrompere definitivamente il farmaco.

I dati qui presentati sono il risultato di una analisi *“real-life”*, comprendente, quindi, anche pazienti che normalmente non vengono arruolati in trials clinici, fornendo un panorama più realistico della sicurezza dell’anticorpo.

E’ chiaro che una volta validato in studi prospettici, il modello predittivo da noi proposto, basato su semplici parametri clinici e laboratoristici, potrebbe essere estensivamente impiegato nel predire lo sviluppo di effetti collaterali legati all’infusione del rituximab, consentendoci di identificare singoli pazienti a più alto rischio di ADR, i quali potrebbero essere sottoposti ad appropriate terapie desensibilizzanti al farmaco consentendo la sua somministrazione sicura anche ad essi. Questo anche perché non vi sono, per molti farmaci, tra cui il rituximab, alternative terapeutiche con farmaci di sostituzione.

In conclusione, la flow chart disegnata in Figura 14, mostra quello che crediamo possa essere un ideale percorso da seguire fin dalla prima valutazione del paziente candidato a ricevere rituximab. Dopo una attenta valutazione clinico-laboratoristica del paziente, utilizzando la heat/map disegnata nel presente studio, il candidato a rituximab viene stratificato in alto o basso rischio di ADR. I pazienti ad alto rischio potrebbero essere quindi avviati alla terapia di desensibilizzazione al rituximab in modo da ridurre al minimo la possibilità di ADR e consentire di somministrare un farmaco fondamentale nello schema terapeutico della malattia e con un discreto margine di sicurezza.

Castells e collaboratori hanno dimostrato che i protocolli di desensibilizzazione utilizzati per i farmaci in generale, inclusi i classici chemioterapici, possono essere estesi anche ai farmaci biologici <sup>(58)</sup>. La procedura in mani esperte rimane sicura ed i

risultati ne dimostrano una grande efficacia come dimostrato anche dal piccolo campione di pazienti da noi trattati.

Il meccanismo della desensibilizzazione non è ben noto così come, a volte, il meccanismo patogenetico che scatena l'ADR. Tuttavia, a seguito della desensibilizzazione, l'efficacia terapeutica è comparabile a quella che si osserva in pazienti non sottoposti alla desensibilizzazione <sup>(81)</sup>.

**TABELLA 1****LISTA PARZIALE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI APPROVATI PER USO CLINICO**

| <b>Anticorpo</b>     | <b>Nome commerciale</b> | <b>Data di approvazione (EMA)</b> | <b>Tipo di anticorpo</b> | <b>Target</b>                             | <b>Indicazione approvata</b>   |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---|--|
| Abciximab            | ReoPro                  | 1994                              | Chimerico                | Inibizione della glicoproteina IIb/IIIa   | Malattie cardiovascolari   |
| Adalimumab           | Humira                  | 2002                              | Umano                    | Inibizione del segnale di TNF-alfa        | Patologie autoimmuni   |
| Alemtuzumab          | Campath                 | 2001                              | Umanizzato               | CD52                                      | LLC  |
| Basiliximab          | Simulcet                | 1998                              | Chimerico                | Recettore dell'IL2-Ralfa (CD25)           | Rigetto da trapianto   |
| Belimumab            | Benlysta                | 2011                              | Umano                    | Linfociti B                               | LES  |
| Bevacizumab          | Avastin                 | 2004                              | Umanizzato               | Vascular endothelial growth factor (VEGF) | Carcinoma del colon retto e degenerazione maculare senile                                  |
| Brentuximab vedotin  | Adcetris                | anno                              | Umanizzato               | CD30                                      | Linfoma di Hodgkin e LNH anaplastico a grandi cellule                                      |
| Cetuximab            | Cimzia                  | 2008                              | Umanizzato               | Inibizione del segnale del TNF $\alpha$   | Morbo di Chron e Artrite reumatoide  |
| Daclizumab           | Zenapax                 | 1997                              | Umano                    | Recettore della IL-2Ra                    | Rigetto da trapianto   |
| Denosumab            | Xgeva                   | 2010                              | Umano                    | Ligando RANK                              | Neoplasia con metastasi ossee  |
| Eculizumab           | Soliris                 | 2007                              | Umanizzato               | Proteina C5 del complemento               | EPN  |
| Efalizumab           | Raptiva                 | 2002                              | Umanizzato               | CD11a                                     | Psoriasi   |
| Gemtuzumab           | Mylotarg                | 2000                              | Umanizzato               | CD33                                      | LAM  |
| Golimumab            | Simponi                 | 2008                              | Umanizzato               | TNF $\alpha$                              | AR, artrite psoriasica, spondilite anchilosante  |
| Ibritumomab tiuxetan | Zevalin                 | 2002                              | Ratto                    | CD20                                      | LNH  |
| Infliximab           | Remicade                | 1998                              | Chimerico                | Inibizione del segnale del TNF-a          | AR, spondilite anchilosante, colite ulcerosa, artrite psoriasica, morbo di Chron, psoriasi |

continua nella pagina successiva

**TABELLA 1****Lista parziale degli anticorpi monoclonali approvati per uso clinico**

| <b>Anticorpo</b> | <b>Nome commerciale</b> | <b>Data di approvazione (EMA)</b> | <b>Tipo di anticorpo</b> | <b>Target</b>                           | <b>Indicazione approvata</b>       |
|------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---|------------------------------------|
| Ipilimumab       | Vervoy                  | 2011                              | Umano                    | CTLA-4 (Linfociti T)                    | Melanoma                           |
| Muromomab-CD3    | Orthoclone OKT3         | 1986                              | Ratto                    | CD3                                     | Rigetto da trapianto               |
| Natalizumab      | Tysabri                 | 2006                              | Umanizzato               | Integrina alfa-4                        | Sclerosi multipla e morbo di Chron |
| Ofatumumab       | Arzerra                 | 2009                              | Umano                    | CD20                                    | LLC                                |
| Omalizumab       | Xolair                  | 2004                              | Umanizzato               | IgE                                     | Asma                               |
| Palivizumab      | Synagis                 | 1998                              | Umanizzato               | Proteina RSV F                          | Virus respiratorio sinciziale      |
| Panitumumab      | Vectibix                | 2006                              | Umano                    | Epidermal growth factor receptor (EGFR) | Carcinoma del colon                |
| Ranibizumab      | Lucentis                | 2006                              | Umanizzato               | VEGF-A                                  | Degenerazione maculare             |
| Rituximab        | Mabthera<br>Rituxan     | 1997                              | Chimerico                | CD20                                    | LNH, LLC                           |
| Tositumumab      | Bexxar                  | 2003                              | Ratto                    | CD20                                    | LNH                                |
| Trastuzumab      | Herceptin               | 1998                              | Umanizzato               | ErbB2                                   | Carcinoma della mammella           |

**TABELLA 2**

**RITUXIMAB E MALATTIE AUTOIMMUNI**

| <b>Principali patologie autoimmuni<br/>in cui è stato utilizzato il Rituximab</b> |
|---|
| Anemia emolitica autoimmune   |
| Piastrinopenia immune   |
| Pure red cell aplasia   |
| Artrite reumatoide  |
| Lupus eritematoso sistemico   |
| Malattia di Graves  |
| Sclerosi multipla   |
| Pemfigo volgare   |
| Crioglobulinemia  |
| Dermatomiosite  |
| Sclerosi multipla   |
| Neuropatia IgM-mediata  |
| Malattia da agglutinine fredde  |
| Vasculite ANCA-associata  |
| Miastenia grave   |
| Spondilite anchilosante   |
| Pemfigo bolloide  |
| Emofilia A da inibitori acquisiti   |
| Graft versus Host Disease   |
| Sindrome di Sjogren   |
| Neuromielite ottica   |
| Sindrome da anticorpi antifosfolipidi   |
| Angioedema acquisito  |
| Orticaria cronica   |



**TABELLA 3**

**INCIDENZA DI REAZIONI DA IPERSENSIBILITA' AGLI ANTICORPI MONOCLONALI**

| <b>Anticorpo</b>         | <b>Target</b>       | <b>Incidenza globale delle reazioni avverse</b>        | <b>Incidenza delle reazioni da ipersensibilità</b> |
|--------------------------|---------------------|--|--|
| Rituximab (Mabthera®)    | CD20                | 77%<br>(prima infusione)                               | 5-10%  |
| Ofatumumab (Arzerra®)    | CD20                | 44% (prima infusione) 67% (in terapia di combinazione) | 2%   |
| Obinutuzumab (Gazyva®)   | CD20                | 66%  | Case reports di anafilassi                         |
| Trastuzumab (Herceptin®) | HER-2               | 40% (lieve; prima infusione)                           | 0,6-5%   |
| Cetuximab (Erbix®)       | EGFR                | 15-21%   | 1,1-5%   |
| Tocilizumab (Actemra®)   | Recettore dell'IL-6 | 7-8%   | 0,1-0,7%   |
| Infliximab (Remicade®)   | TNF- $\alpha$       | 5-18%  | 1%   |
| Etanercept (Enbrel®)     | TNF- $\alpha$       | 15-37%   | <2%  |
| Adalimumab (Humira®)     | TNF- $\alpha$       | 20%  | 1%   |
| Brentuximab (Adcetris®)  | CD30                | 12%  | Case reports di anafilassi                         |
| Bevacizumab (Avastin®)   | VEGF-A              | <3%  | Nessun caso descritto                              |
| Omalizumab (Xolair®)     | IgE                 | 45%  | 0,09-0,2%  |

Modificato da Bonamichi-Santos & Castells M. Curr Pharmac Des 2016; 22: 6870-6880.

**TABELLA 4****CENTRI PARTECIPANTI ALLO STUDIO**

| Centro                  |   | Referente  |
|-------------------------|---|--|
| Rionero in Vulture (PZ) | U.O. Ematologia<br>IRCCS - Centro di<br>Riferimento Oncologico<br>della Basilicata  | Dott. Giovanni D'Arena   |
| Roma                    | Cattedra di Ematologia<br>Università Cattolica del<br>Sacro Cuore   | Dott. Luca Laurenti  |
| Potenza                 | U.O. di Ematologia<br>Ospedale "S. Carlo"   | Dott. Michele Cimminiello  |
| Potenza                 | U.O. di Reumatologia<br>Ospedale "S. Carlo"   | Dott. Michele Gilio  |
| Caserta                 | U.O. di Ematologia<br>Ospedale "S. Sebastiano"  | Dott.ssa Maria Luigia<br>Vigliotti                               |
| Pagani (SA)             | U.O. di Ematologia<br>Ospedale "A. Tortora"   | Dott.ssa Sonya De Lorenzo  |
| Bari                    | U.O. di Ematologia<br>IRCCS Istituto Nazionale<br>Tumori "Giovanni Paolo II"  | Dott. Giacomo Loseto   |
| Bari                    | Dipartimento di Scienze<br>Biomediche e Oncologia,<br>Università "Aldo Moro"  | Dott.ssa Anna Passarelli   |
| Napoli                  | Departmento di Clinica<br>Medica e Chirurgia, Centro<br>Regionale delle Malattie<br>della Coagulazione,<br>Università "Federico II"<br>University | Prof. Giovanni Di Minno<br>Dott. Dario Nicola Matteo<br>Di Minno |
| Salerno                 | Dipartimento di Farmacia,<br>Università di Salerno  | Prof. Vincenzo De Feo  |
| Battipaglia             | U.O. di Allergologia e<br>Immunologia, Ospedale<br>Civile   | Dott. Vincenzo Patella   |

**TABELLA 5**

**CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO**

| <b>PAZIENTI</b>  | Tutti<br>(n. 374) | ADRs: si<br>(n. 88; 23.5%) | ADRs: no<br>(n. 286; 76.5%) | p       |
|--|-------------------|----------------------------|-----------------------------|---------|
| <b>Età</b>   |                   |                            |                             |         |
| Media ± SD   | 62 ± 13.2         | 63.4 ± 14.8                | 61.6 ± 12.7                 | 0.4     |
| Mediana (range)  | 64 (20-87)        | 66 (20-87)                 | 63 (21-86)                  |         |
| <b>Sesso (n, %)</b>  |                   |                            |                             |         |
| Maschi   | 177 (47.2)        | 37 (42)                    | 139 (49)                    | 0.2     |
| Femmine  | 197 (52.8)        | 51 (58)                    | 147 (51)                    |         |
| <b>Patologia (n, %) *</b>                                    |                   |                            |                             |         |
| LNH Indolente **   | 136 (36.3)        | 34 (25)                    | 102 (75)                    | <0.0001 |
| LLC  | 64 (17.1)         | 23 (35.9)                  | 41 (64.1)                   |         |
| LNH Aggressivi ***   | 60 (16)           | 17 (28.3)                  | 43 (71.7)                   |         |
| Malattia autoimmune primitiva °                              | 74 (20)           | 7 (9.4)                    | 67 (89.6)                   |         |
| Patologie autoimmune ematologiche complicanti LNH indolenti§ | 40 (10.6)         | 7 (17.5)                   | 33 (82.5)                   |         |
| <b>Follow-up (mesi)</b>                                      |                   |                            |                             |         |
| Media ± SD   | 20.6 ± 20.4       | 20.8 ± 17.9                | 20.6 ± 21.1                 | 0.3     |
| Mediana (range)  | 12 (8-135)        | 12.7 (9-90)                | 12 (8-135)                  |         |

ADRs: Adverse drug reactions; LNH: linfoma non-Hodgkin; LLC: leukemia linfatica cronica

\* La percentuali cella Colonna “Tutti” si riferiscono al totale della coorte di pazienti, mentre le percentuali dei pazienti con o senza ADR sono calcolate per ciascuna specifica patologia.

\*\* LNH follicolare (n. 78), LNH linfocitico (n. 6), LNH della zona marginale (n. 40) e variant non aggressive del LNH mantellare (n. 12).

\*\*\* LNH diffuso a grandi cellule (n. 51) e LNH mantellare aggressivo (n. 9).

° Artite reumatoide (AR): n. 28; RA più syndrome di Sjogren: n. 9; anemia emolitica autoimmune (AEA): n. 21; piastrinopenia idiopatica autoimmune (ITP): n. 15; emofilia acquisita: n. 1.

§ AEA: n. 22; ITP: n. 16; Pure red cell aplasia (PRCA): n. 2.

**TABELLA 6****TERAPIE DI ASSOCIAZIONE CON RITUXIMAB SOMMINISTRATE  
AI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO.**

| Patologie (n.)  | Schedule                                 | Pazienti (n.) |
|---|--|---------------|
| LNH indolenti (159)   | R-CHOP                                   | 72            |
|   | R-Benda                                  | 38            |
|   | R solo                                   | 10            |
|   | R-Chl                                    | 6             |
|   | R-COP                                    | 33            |
| LLC (64)  | FCR                                      | 26            |
|   | R-Chl                                    | 8             |
|   | R-COP                                    | 3             |
|   | R-Benda                                  | 26            |
|   | R-F                                      | 1             |
| LNH aggressivi (94)   | R-CHOP                                   | 69            |
|   | R-COMP                                   | 18            |
|   | R-Benda                                  | 7             |
| Malattie autoimmune primitive (74)                              | R solo                                   | 37            |
|   | R solo (dopo steroidi e alte dosi di Ig) | 37            |
| Malattie autoimmune ematologiche complicanti LNH indolenti (46) | R solo                                   | 40            |
|   | FCR                                      | 2             |
|   | RCD                                      | 1             |
|   | R-MP                                     | 1             |
|   | R-COP                                    | 1             |

Alcuni pazienti hanno ricevuto più linee di terapia includenti il rituximab.

LNH: linfoma non-Hodgkin; R: rituximab; CHOP: ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone; Benda: bendamustina; Chl: clorambucile; COP: ciclofosfamide, vincristina, prednisone; LLC: leucemia linfatica cronica; FCR: fludarabina, ciclofosfamide, rituximab; F: fludarabina; COMP: ciclofosfamide, vincristina, doxorubicina liposomiale, prednisone; RCD: rituximab, ciclofosfamide, desametasone, metilprednisolone.

**TABELLA 7****PROTOCOLLO DI DESENSIBILIZZAZIONE PER RITUXIMAB**

| STADIO | SOLUZIONE    | RAPPORTO<br>(ml/h) | TEMPO<br>(min) | VOLUME<br>INFUSO<br>AD OGNI<br>STADIO<br>(ml) | DOSE<br>SOMMINISTRATA<br>(mg) | DOSE<br>CUMULATIVA<br>(mg) |
|--------|--------------|--------------------|----------------|---|-------------------------------|----------------------------|
| 1      | 1            | 2                  | 15             | 0,50  | 0,0170                        | 0,0170                     |
| 2      | 1            | 5                  | 15             | 1,25  | 0,0426                        | 0,0596                     |
| 3      | 1            | 10                 | 15             | 2,50  | 0,0851                        | 0,1447                     |
| 4      | 1            | 20                 | 15             | 5,00  | 0,1702                        | 0,3149                     |
| 5      | 2            | 5                  | 15             | 1,25  | 0,4255                        | 0,7404                     |
| 6      | 2            | 10                 | 15             | 2,50  | 0,8510                        | 1,5914                     |
| 7      | 2            | 20                 | 15             | 5,00  | 1,7020                        | 3,2934                     |
| 8      | 2            | 40                 | 15             | 10,00   | 3,4040                        | 6,6974                     |
| 9      | 3            | 10                 | 15             | 2,50  | 8,4430                        | 15,1404                    |
| 10     | 3            | 20                 | 15             | 5,00  | 16,8861                       | 31,0264                    |
| 11     | 3            | 40                 | 15             | 10,00   | 33,7721                       | 65,7986                    |
| 12     | 3            | 75                 | 186            | 232,50  | 785,2014                      | 851,0000                   |
| Tempo  | = 351 minuti |                    |                |   |                               |                            |
| totale | (5,85 ore)   |                    |                |   |                               |                            |

Modificato da Castells MC et al. J Allergy Clin Immunol 2008 <sup>(54)</sup>; 122: 574-580 e Patella V et al. It J Allergy Clin Immunol 2009; 19: 22-28 <sup>(56)</sup>

**TABELLA 8****TIPOLOGIA E GRADO DI ADR OSSERVATA DOPO INFUSIONE DI RITUXIMAB**

| Descrizione ADR                     | Grado 1-2 (n. 80)) | Grado 3-4 (n. 8) |
|-------------------------------------|--------------------|------------------|
| Flu-like symptoms (febbre, brividi) | 31                 |                  |
| Orticaria                           | 10                 |                  |
| Ipotensione                         | 6                  | 1*               |
| Cefalea                             | 6                  |                  |
| Dolore lombare                      | 4                  |                  |
| Rash                                | 4                  |                  |
| Prurito                             | 3                  |                  |
| Vomito                              | 4                  |                  |
| Artralgie                           | 2                  |                  |
| Mialgie                             | 2                  |                  |
| Nausea                              | 2                  |                  |
| Dispnea                             | 2                  |                  |
| Diarrea                             | 2                  |                  |
| Tosse                               | 2                  |                  |
| Broncospasmo, ipotensione, dispnea  |                    | 7**              |

ADR: reazioni avverse la farmaco

\* Terapia interrotta (paziente con LLC)

\*\* Tre di 7 pazienti hanno interrotto la terapia (1 LLC e 2 LNH indolenti), mentre 3 pazienti con LNH aggressive e 1 paziente con LNH indolente hanno poi ripreso l'infusione del rituximab dopo appropriata terapia (steroidi, broncodilatatori, clorferaniman e ossigeno).

**TABELLA 9 (a)****CORRELAZIONI TRA ADRs E CARATTERISTICHE CLINICO-LABORATORISTICHE DEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO**

| <b>Caratteristiche clinico-laboratoristiche</b>   | <b>ADR Si</b>                           | <b>ADR No</b>                           | <b>p</b> |
|---|---|---|----------|
| Hb (g/dL)<br>Media ± SD<br>Median (range)         | 12.2 ± 1.9<br>12.6 (7.3-16.5)           | 11.4 ± 2.6<br>11.8 (3.5-17)             | 0.019    |
| Hb<br>< 13 g/l<br>≥ 13 g/dl                       | 49 (22.48)<br>39 (35.78)                | 169 (77.52)<br>70 (64.22)               | 0.036    |
| Leucociti (/μL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range)  | 23,951 ± 34,131<br>10,220 (980-177,000) | 18,539 ± 31,309<br>7,540 (223-214,000)  | 0.033    |
| Leucociti, n. (%)<br>Normale<br>Bassa<br>Alta     | 27 (25.96)<br>17 (22.67)<br>38 (35.51)  | 77 (74.04)<br>58 (77.33)<br>69 (64.49)  | 0.126    |
| Neutrofili (/μL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range) | 4,276 ± 2,595<br>3,815 (410-17,130)     | 6,269 ± 14,809<br>4,405 (470-2,019)     | 0.1      |
| Neutrofili, n. (%)<br>Normale<br>Basso<br>Alto    | 63 (32.64)<br>14 (38.89)<br>3 (7.69)    | 130 (67.36)<br>22 (61.11)<br>36 (92.31) | 0.004    |
| Linfociti (/μL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range)  | 16,361 ± 28,092<br>3,240 (100-136,400)  | 13,548 ± 25,170<br>2,000 (170-122,000)  | 0.19     |
| Linfociti, n. (%)<br>Normale<br>Basso<br>Alto     | 40 (25.00)<br>11 (25.00)<br>35 (34.65)  | 120 (75.00)<br>33 (75.00)<br>66 (65.35) | 0.21     |
| Monociti (/μL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range)   | 433 ± 272<br>380 (10-1,140)             | 639,4 ± 995,5<br>490 (30-10,000)        | 0.06     |
| Monociti, n. (%)<br>Normale<br>Basso<br>Alto      | 51 (26.02)<br>11 (36.67)<br>3 (15.00)   | 145 (73.98)<br>19 (63.33)<br>17 (85.00) | 0.23     |

I numeri assoluti e percentuali si riferiscono ai pazienti con dati disponibili per ciascuna variabile.  
Le definizioni di alto e basso indicano le anomalie rispetto ai range normali utilizzati nei laboratory di riferimento dei singoli Centri.

Hb: emoglobina

**TABELLA 9 (b)**

**CORRELAZIONI TRA ADRs E CARATTERISTICHE CLINICO-LABORATORISTICHE DEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO**

| <b>Caratteristiche clinico-laboratoristiche</b>     | <b>ADR Si</b>                             | <b>ADR No</b>                                | <b>p</b> |
|---|---|--|----------|
| Eosinofili (/μL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range)   | 108.9 ± 95<br>90 (0 – 390)                | 132 ± 204<br>90 (0 – 2.190)                  | 0.7      |
| Eosinofili, n. (%)<br>Normale<br>Alto               | 48 (25.95)<br>9 (20.93)                   | 137 (74.05)<br>34 (79.07)                    | 0.49     |
| Piastrine (/μL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range)    | 174,420±89,870<br>171,000 (7,000-401,000) | 183,400 ± 119,270<br>176,000 (1,000-619,000) | 0.87     |
| Piastrine, n. (%)<br>Normale<br>Basso<br>Alto       | 55 (27.78)<br>32 (28.32)<br>1 (7.69)      | 143 (72.22)<br>81 (71.68)<br>12 (92.31)      | 0.27     |
| Creatinina (mg/dL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range) | 0.85 ± 0.23<br>0.84 (0.4-1.6)             | 0.9 ± 0.36<br>0.82 (0.45-3.5)                | 0.88     |
| Creatinina<br>Normale<br>Anomala                    | 62 (32.29)<br>20 (26.32)                  | 130 (67.71)<br>56 (73.68)                    | 0.34     |
| AST (U/dL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range)         | 23.5 ± 17.8<br>19 (10-117)                | 24.6 ± 20<br>19 (6-188)                      | 0.56     |
| AST<br>Normale<br>Anomala                           | 72 (30.90)<br>5 (20.00)                   | 161 (69.10)<br>20 (80.00)                    | 0.26     |
| ALT (U/dL)<br>Media ± SD<br>Mediana (range)         | 24.4 ± 23.5<br>17 (6-125)                 | 22.4 ± 16<br>17.5 (4-113)                    | 0.65     |
| ALT<br>Normale<br>Anomala                           | 72 (30.90)<br>10 (35.71)                  | 168 (70.00)<br>18 (64.29)                    | 0.53     |

I numeri assoluti e percentuali si riferiscono ai pazienti con dati disponibili per ciascuna variabile. Le definizioni di alto e basso indicano le anomalie rispetto ai range normali utilizzati nei laboratory di riferimento dei singoli Centri.

AST: aspartato aminotransferasi; ALT: alanina aminotransferasi.



**TABELLA 9 (c)**

**CORRELAZIONI TRA ADRs E CARATTERISTICHE CLINICO-LABORATORISTICHE DEI PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO**

| <b>Caratteristiche clinico-laboratoristiche</b>   | <b>ADR Si</b>                       | <b>ADR No</b>                       | <b>p</b> |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|----------|
| $\beta_2$ -microglobulina (mg/L)<br>Media $\pm$ SD<br>Mediana (range)                         | 3.6 $\pm$ 2.7<br>2.8 (0.1-2.2)      | 3.4 $\pm$ 2.2<br>2.87 (0.8 – 14.6)  | 0.58     |
| $\beta_2$ -microglobulina<br>Normale<br>Anomala   | 23 (28.75)<br>46 (32.39)            | 57 (71.25)<br>96 (67.61)            | 0.57     |
| Rai Clinical stage (LLC)<br>3<br>4  | 13 (37.1)<br>10 (34.4)              | 22 (62.9)<br>19 (65.6)              | 0.83     |
| Ann Arbor Clinical Stage (LNH)<br>2<br>3<br>4   | 21 (24.1)<br>19 (18.3)<br>18 (21.9) | 66 (75.9)<br>48 (71.7)<br>64 (78.1) | 0.66     |
| Infiltrazione midollare (%)<br>Media $\pm$ SD<br>Mediana (range)                              | 57.5 $\pm$ 33<br>75 (0 – 95)        | 36.5 $\pm$ 37.0<br>25 (0 – 95)      | 0.005    |
| Infiltrazione midollare, n. (%)<br>No<br>Si   | 10 (17.86)<br>28 (38.89)            | 46 (82.14)<br>44 (61.11)            | 0.01     |
| Soria di allergia, n. (%)<br>Si<br>No   | 22 (37.3)<br>66 (20)                | 37 (62.7)<br>248 (80)               | 0.007    |
| Splenomegalia, n. (%)<br>Si<br>No   | 32 (21.2)<br>36 (17.7)              | 119 (78.8)<br>167 (82.3)            | 0.01     |
| Infusioni di Rituximab, n.<br>Insieme alla prima chemioterapia<br>Dopo la prima chemioterapia | 24<br>38                            | 59<br>96                            | 0.64     |

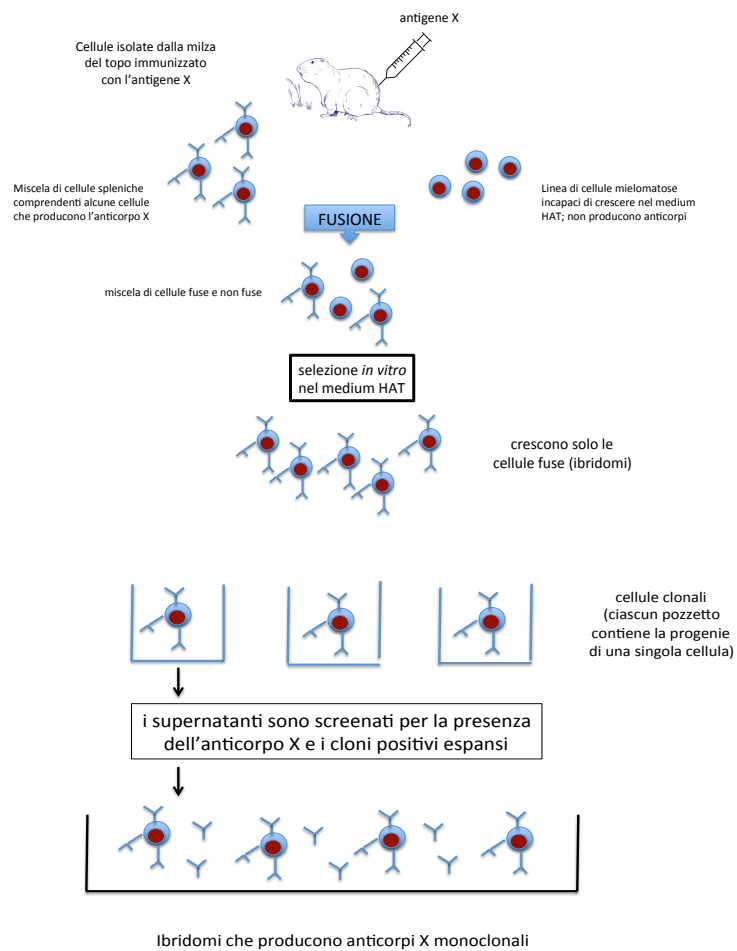
I numeri assoluti e percentuali si riferiscono ai pazienti con dati disponibili per ciascuna variabile. Le definizioni di alto e basso indicano le anomalie rispetto ai range normali utilizzati nei laboratory di riferimento dei singoli Centri.

**FIGURA 1**

**PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI  
CON LA TECNOLOGIA DEGLI IBRIDOMI**



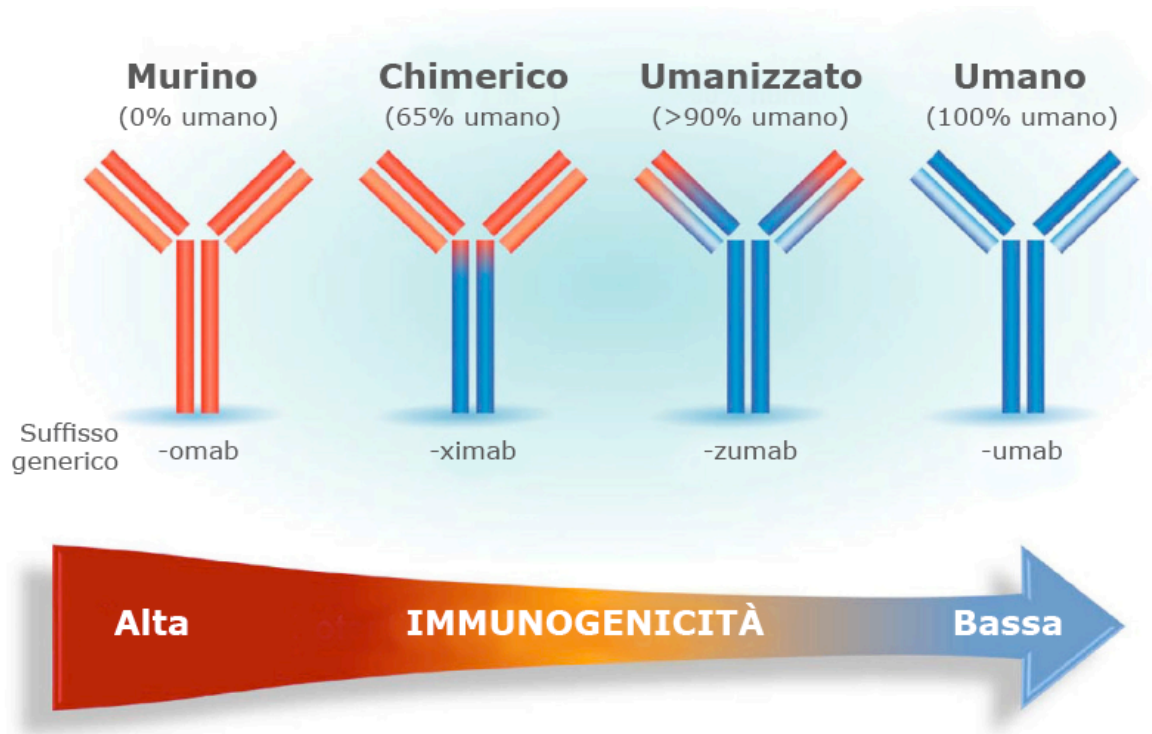
La tecnica iniziale per produrre anticorpi monoclonali è stata descritta per la prima volta da Georges Köhler e Cesar Milstein nel 1975 e che per questo furono insigniti del Premio Nobel nel 1984.



La tecnica comporta la fusione cellulare fra un linfocita B normale, che è quindi capace di produrre anticorpi, e una linea di mieloma (con formazione di un ibridoma) e la selezione delle cellule fuse, al fine di isolare linee cellulari che producono anticorpi della specificità desiderata (spiegazione più dettagliata della metodica in Introduzione). Modificata da Abbas <sup>(1)</sup>

**FIGURA 2**

**STRUTTURA DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI, NOMENCLATURA E IMMUNOGENICITÀ**



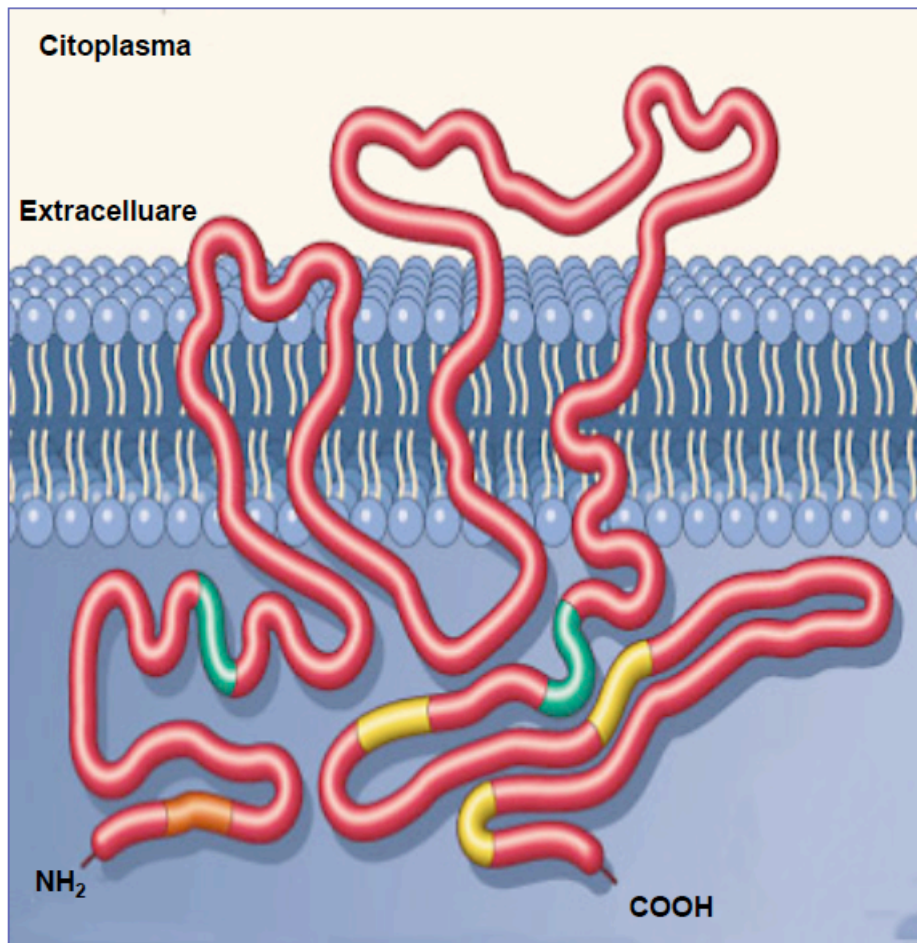
Gli anticorpi interamente murini si ottengono sensibilizzando i topi con un antigene specifico umano. Gli anticorpi chimerici si ottengono associando le regioni variabili, che sono di origine murina, a quelle costanti, che sono di origine umana. Con la tecnologia del DNA ricombinante si ottengono, invece, gli anticorpi umanizzati nei quali solo le regioni ipervariabili di legame con l'antigene sono di origine murina, tutto il resto è di origine umana. Infine, dai topi transgenici, che esprimono i geni delle immunoglobuline umane al posto di quelli delle immunoglobuline murine, si ottengono gli anticorpi completamente umani.

E' facile comprendere come l'immunogenicità, che è massima negli anticorpi murini, sia invece molto bassa in quelli interamente umani.

Il nome di un anticorpo monoclonale dà informazioni sulla natura dell'anticorpo stesso e sul suo target. Esso, infatti, termina con il suffisso "-mab" (monoclonal antibody) ed ha un suffisso aggiuntivo che ne identifica la fonte (ad esempio "-ximab" per gli anticorpi chimerici umani-murini; "-zumab" per gli anticorpi murini umanizzati, e "-mumab" per gli anticorpi completamente umani). Al centro del nome c'è un suffisso aggiuntivo che ne identifica la molecola target (ad es. "-tu-" per i tumori).

**FIGURA 3**

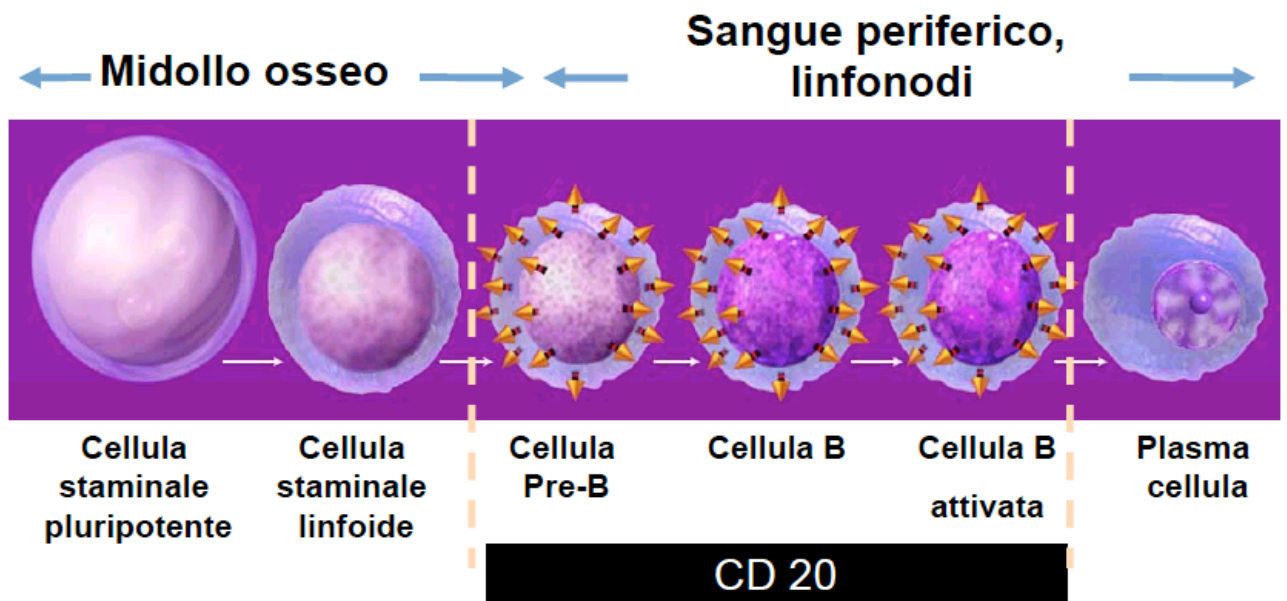
**STRUTTURA DELL'ANTIGENE DI SUPERFICIE  
IDENTIFICATO DALL'ANTICORPO MONOCLONALE CD20**



Il CD20 è una glicoproteina di membrana idrofobica con un peso molecolare di 35 kD che attraversa la membrana cellulare stessa 4 volte. Il CD20 non viene perso dalla superficie della cellula (shedding) e non viene, nel contempo, internalizzato. Inoltre molecole libere di CD20 non sono rilevabili in circolo per cui esso rappresenta un ideale target per un anticorpo monoclonale poiché quest'ultimo non può essere neutralizzato prima del suo legame alla cellula target.

**FIGURA 4**

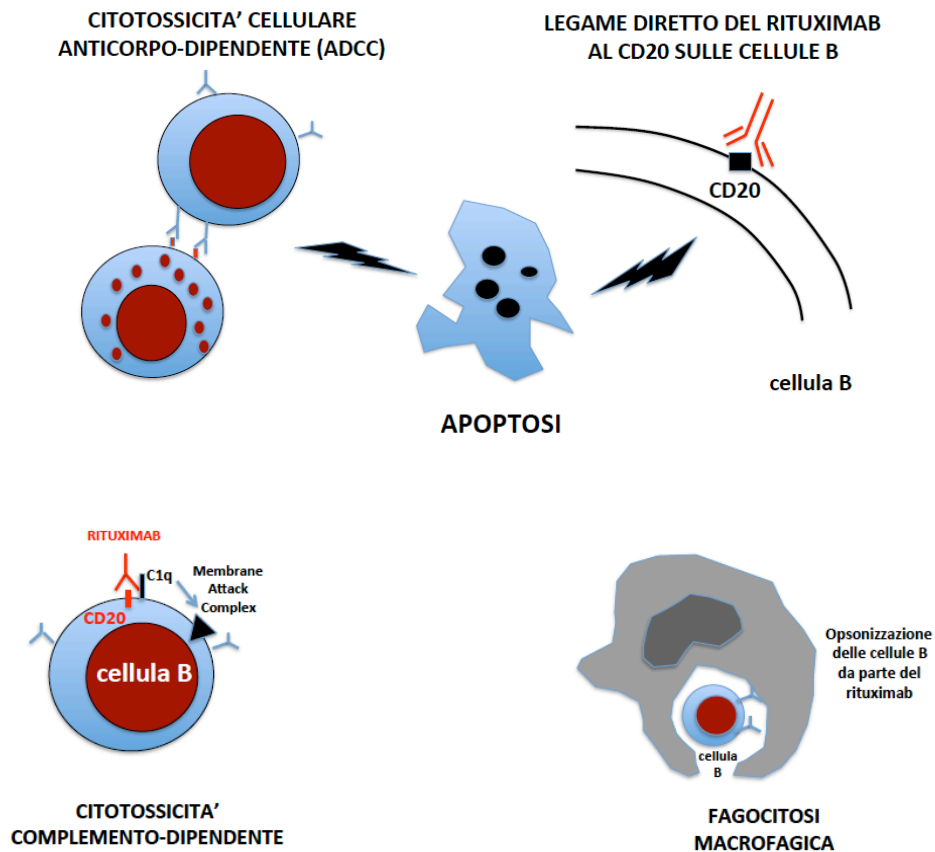
**ESPRESSIONE DEL CD20 SULLA SUPERFICIE DELLE CELLULE  
NELL'ONTOGENESI DELLE CELLULE B**



Il CD20 è espresso nelle fasi intermedie della ontogenesi dei linfociti B, scomparendo nello stadio di plasmacellula

**FIGURA 5**

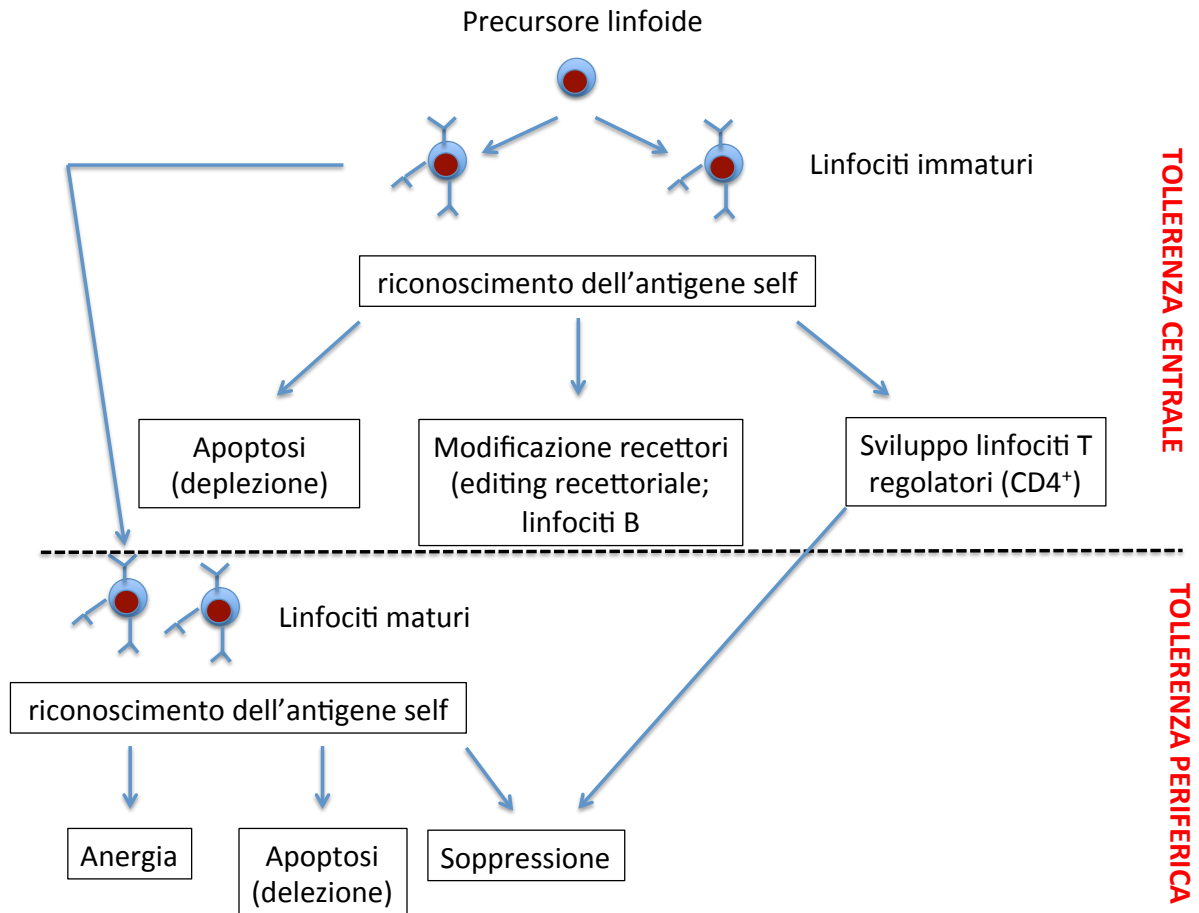
**MECCANISMO D'AZIONE DEL RITUXIMAB**



Il rituximab può determinare la morte della cellula target attraverso vari meccanismi: A) citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) con killing da parte dei neutrofili e con induzione dell'apoptosi della cellula target; B) il cross-linking del CD20 sulle cellule B è da solo sufficiente ad indurre apoptosi della cellula target; C) il legame del CD20 sulla cellula target può indurre una citotossicità complemento dipendente (CDC) e la cellula muore per la formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC); D) l'opsonizzazione delle cellule B da parte del rituximab può determinare una clearance delle cellule B circolanti attraverso la fagocitosi da parte delle cellule del sistema reticolo endoteliale, quali monociti e macrofagi.

**FIGURA 6**

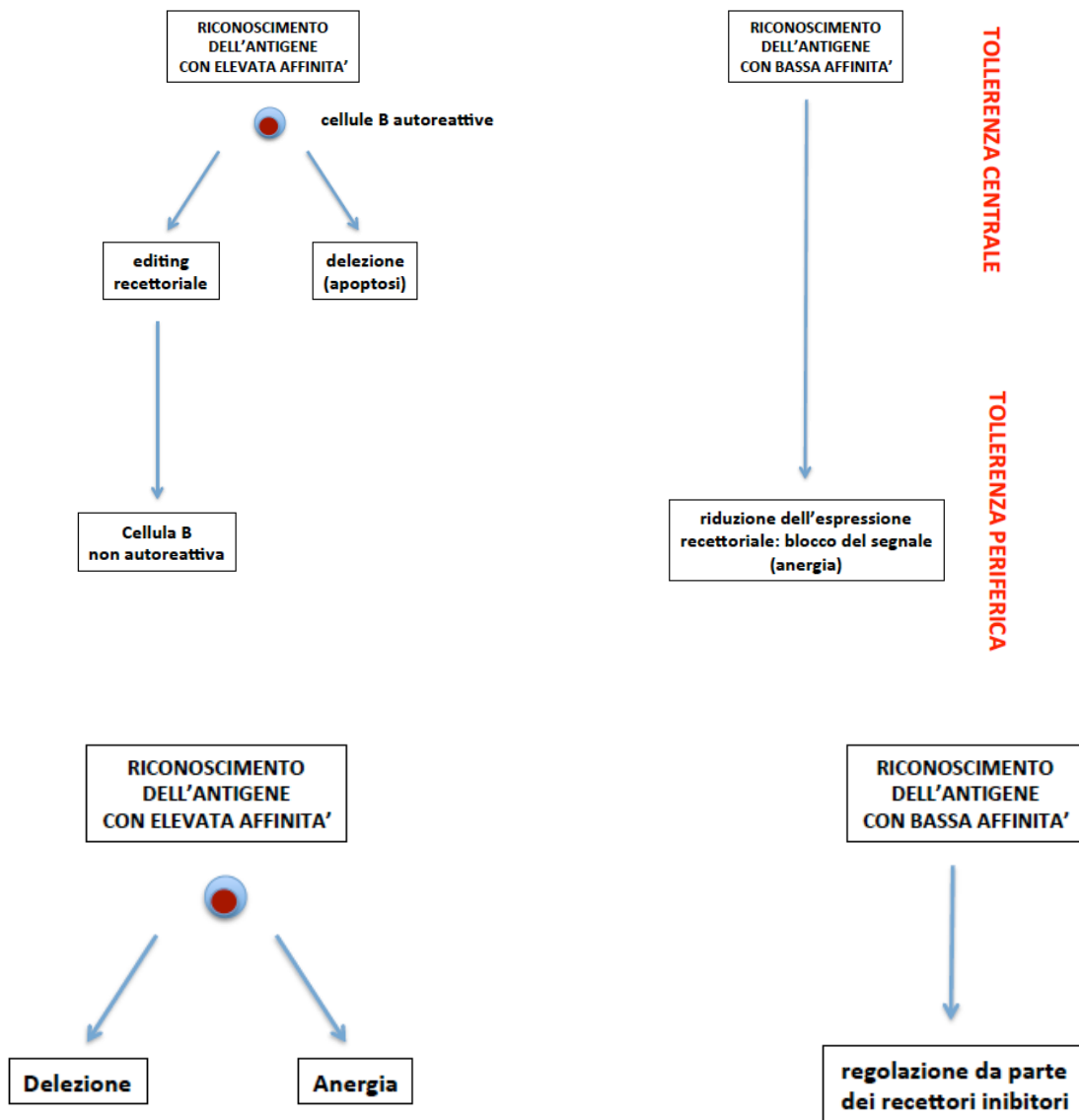
**TOLLERANZA CENTRALE E PERIFERICA DEI LINFOCITI T  
AGLI ANTIGENI AUTOLOGHI (SELF)**



La tolleranza dei linfociti T agli antigeni self viene indotta in seguito al riconoscimento dell'antigene negli organi linfoidi primari (tolleranza centrale) per apoptosi (delezione clonale), inibizione da parte di linfociti T regolatori, induzione al cambiamento della loro specificità antigenica (editing recettoriale dei linfociti B). Alcuni linfociti autoreattivi, tuttavia, possono maturare e poi migrare nei tessuti periferici laddove vengono inattivati (anergia), inibiti o soppressi (tolleranza periferica).

FIGURA 7

**TOLLERANZA CENTRALE E PERIFERICA DEI LINFOCITI B  
AGLI ANTIGENI AUTOLOGHI (SELF)**

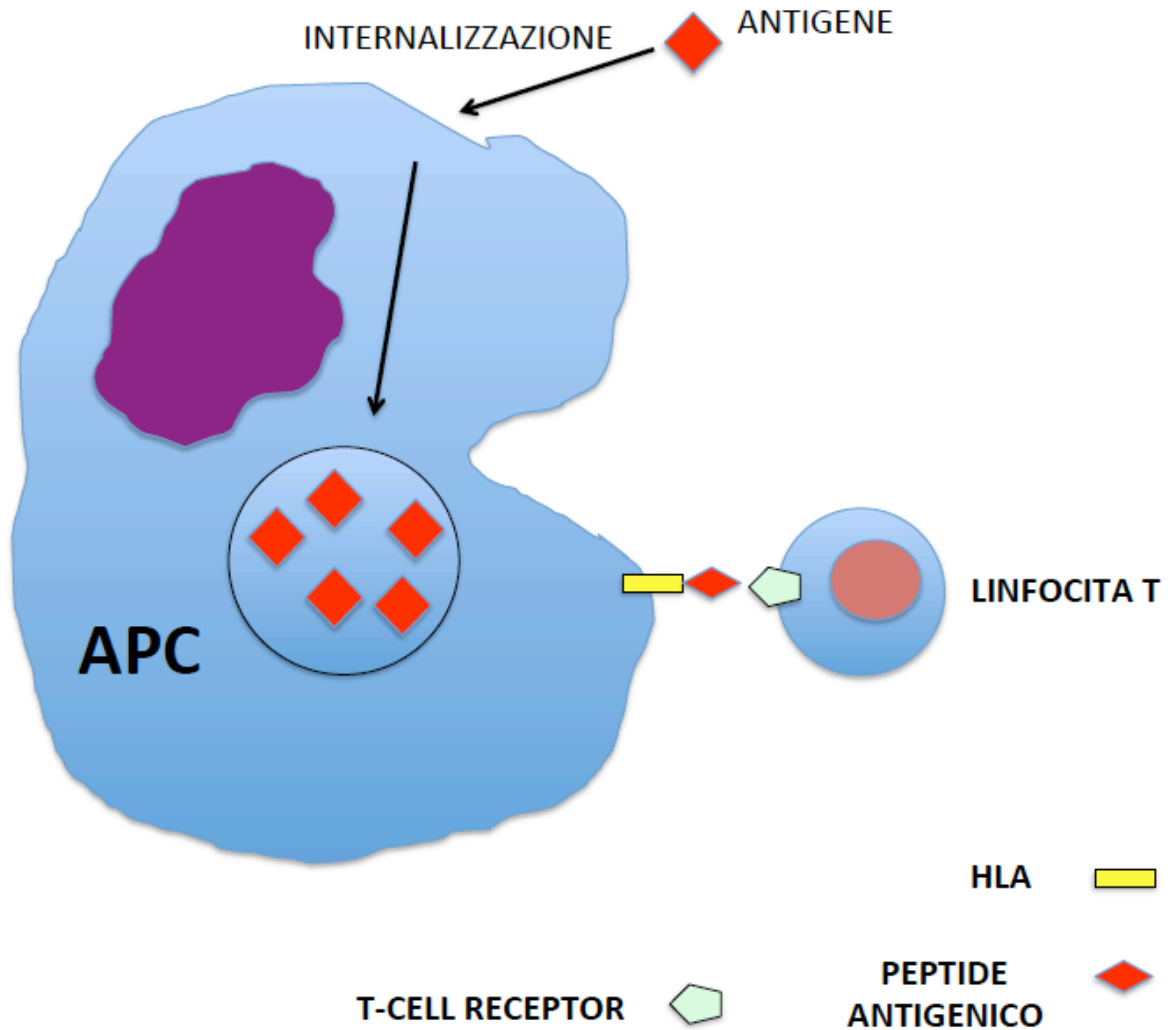


Anche i linfociti B immaturi autoreattivi vengono eliminati nel midollo osseo per apoptosi o vengono indotti a modificare la loro specificità recettoriale (tolleranza centrale). Invece, le cellule B che autoreattive che riescono ad andare in circolo, incontrando gli antigeni self, diventano anergiche o muoiono per apoptosi.



**FIGURA 8**

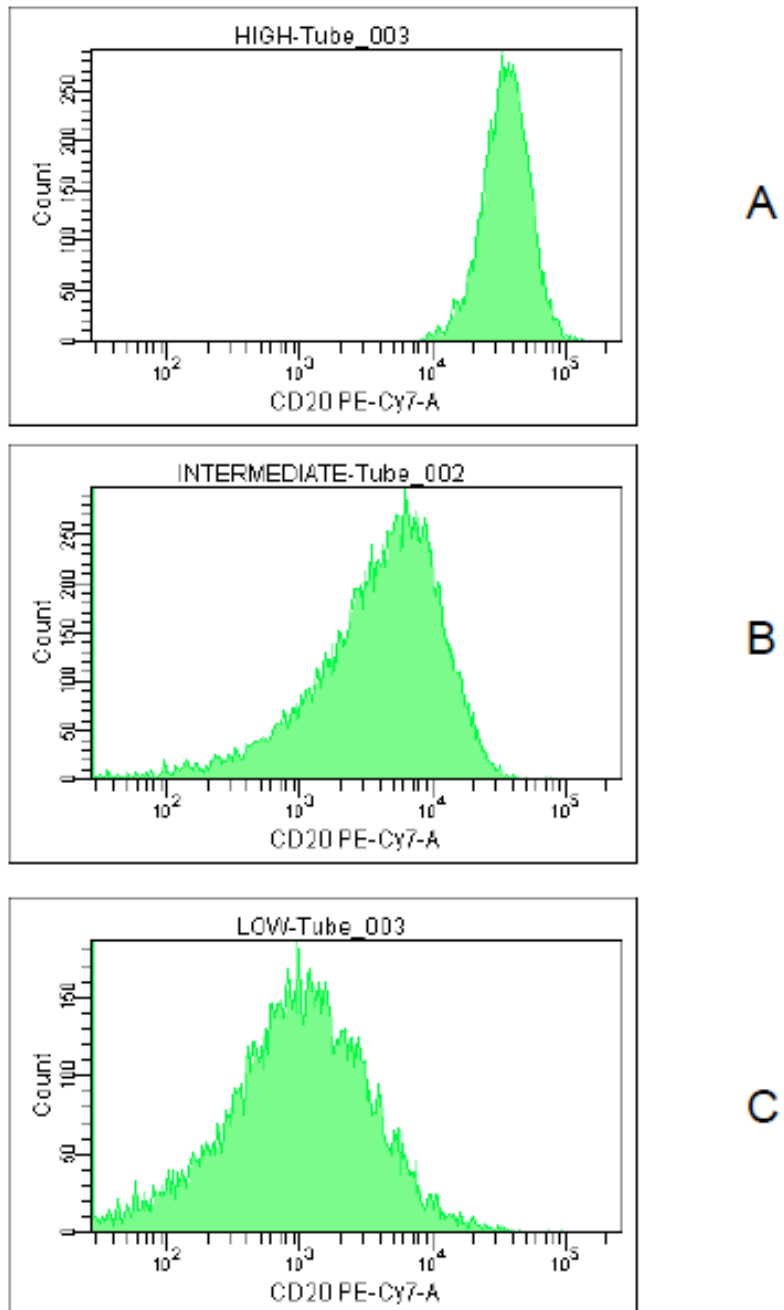
**PRESENTAZIONE DELL'ANTIGENE AL LINFOCITA T**



Una volta entrato negli organi linfoidi, un antigene è captato dai macrofagi (il sistema monocito-macrofagico è composto da vari tipi cellulari che si differenziano per morfologia, fenotipo e ubicazione tessutale: monociti circolanti, macrofagi alveolari, cellule di Kupfer, cellule dendritiche) e all'interno di queste cellule subisce un processo di frammentazione in peptidi che vengono assemblati nel citoplasma con le molecole del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA) per poi essere trasportati in superficie, esposti e presentati al linfocita T che li riconosce tramite il suo recettore per l'antigene. Anche i linfociti B sono in grado di legare l'antigene tramite il loro recettore specifico per poi degradarlo e presentarlo ai linfociti T complessato alla molecola HLA di classe II.

**FIGURA 9**

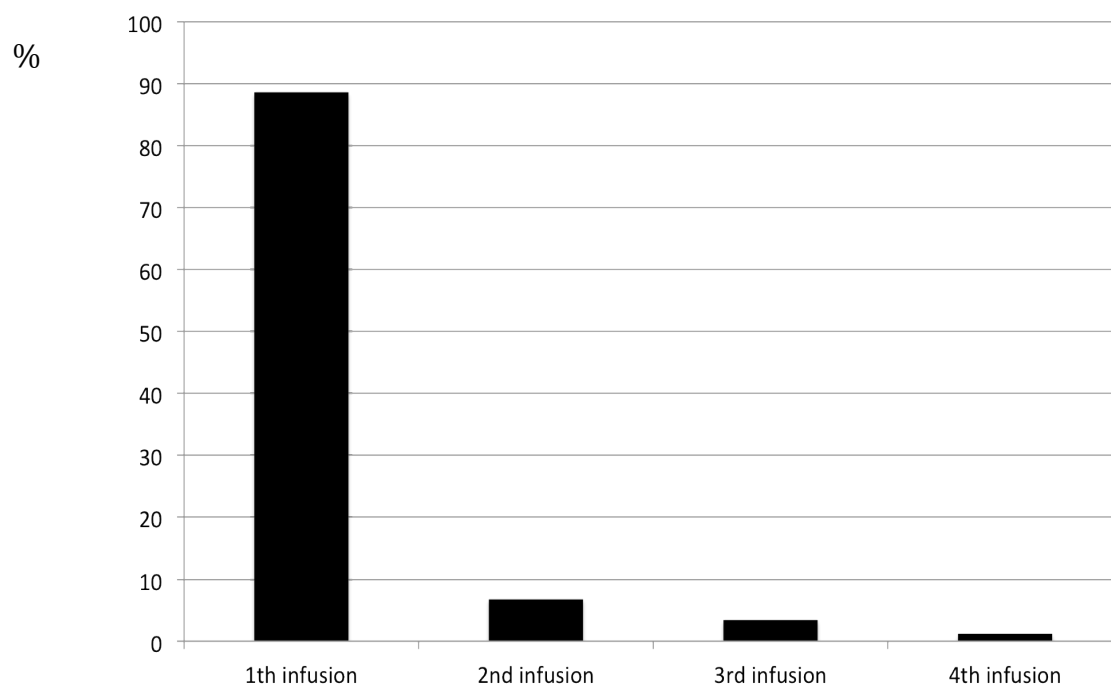
**INTENSITA' DI ESPRESSIONE DEL CD20**



Istogrammi dell'intensità di espressione del CD20 valutati sulle cellule B del sangue periferico per mezzo della citofluorimetria in 3 casi rappresentativi di pazienti con malattie linfoproliferative con alta (LNH follicolare: A), intermedia (LNH mantellare: B) e bassa (LLC: C) espressione del CD20.

**FIGURA 10**

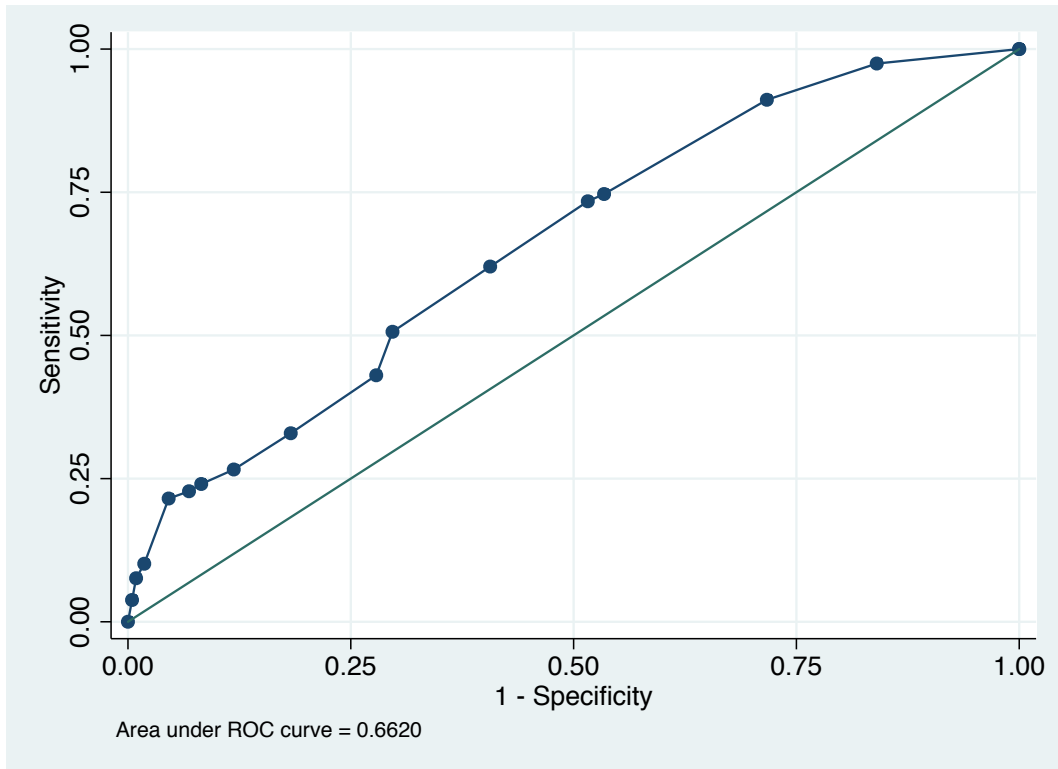
**INCIDENZA DI ADRs IN RAPPORTO  
ALLA SEQUENZA DI INFUSIONE DEL RITUXIMAB.**



Le ADRs si sono verificate più frequentemente nel corso della prima infusione di rituximab (88.6% dei pazienti) rispetto alle somministrazioni successive (2°: 6.8%; 3°: 3.4%; 4°: 1.2%).

**FIGURA 11**

**CURVA ROC**



L'Area under ROC curve del modello è 0.662, con 22% di sensibilità, 96% di specificità, e 76% pazienti correttamente classificati.

**FIGURA 12**

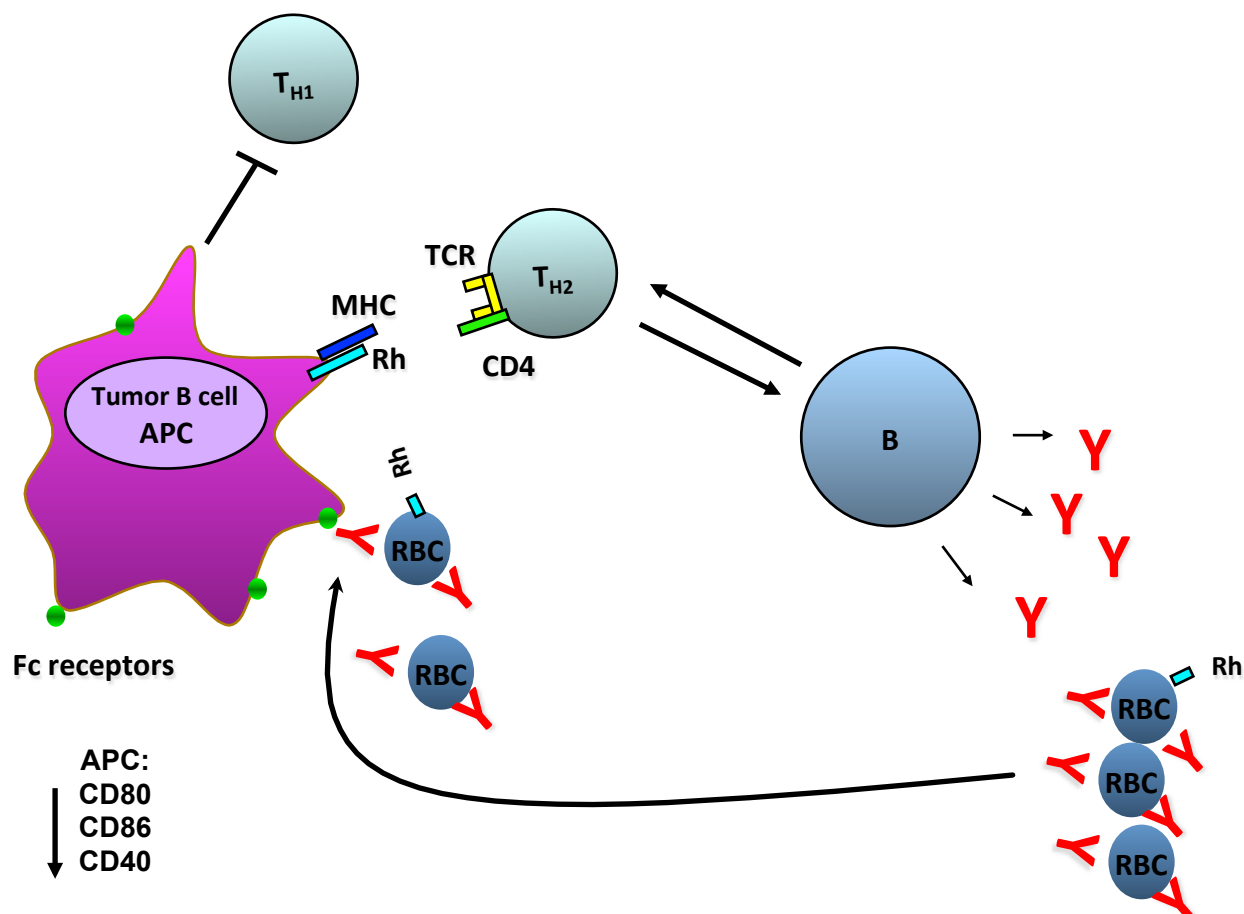
**HEAT-MAP PREDITTIVA DI RISCHIO DI ADRs**

| Probability | Splenomegaly | History of allergy | Hb $\geq$ 13 g/dl | Sex    |
|-------------|--------------|--------------------|-------------------|--------|
| 0.10        |              |                    |                   | Male   |
| 0.17        |              |                    |                   | Male   |
| 0.19        |              |                    |                   | Female |
| 0.20        |              |                    |                   | Male   |
| 0.22        |              |                    |                   | Male   |
| 0.29        |              |                    |                   | Female |
| 0.31        |              |                    |                   | Male   |
| 0.34        |              |                    |                   | Male   |
| 0.34        |              |                    |                   | Female |
| 0.37        |              |                    |                   | Female |
| 0.39        |              |                    |                   | Male   |
| 0.47        |              |                    |                   | Female |
| 0.50        |              |                    |                   | Female |
| 0.53        |              |                    |                   | Male   |
| 0.56        |              |                    |                   | Female |
| 0.69        |              |                    |                   | Female |

Heat-map predittiva di rischio, applicabile in singoli pazienti, nei quali le probabilità di ADRs in rapporto alla rilevanza dei fattori di rischio come singole e variabili combinate sono distribuite in 3 differenti, e progressivamente crescenti, aree di rischio.

FIGURA 13

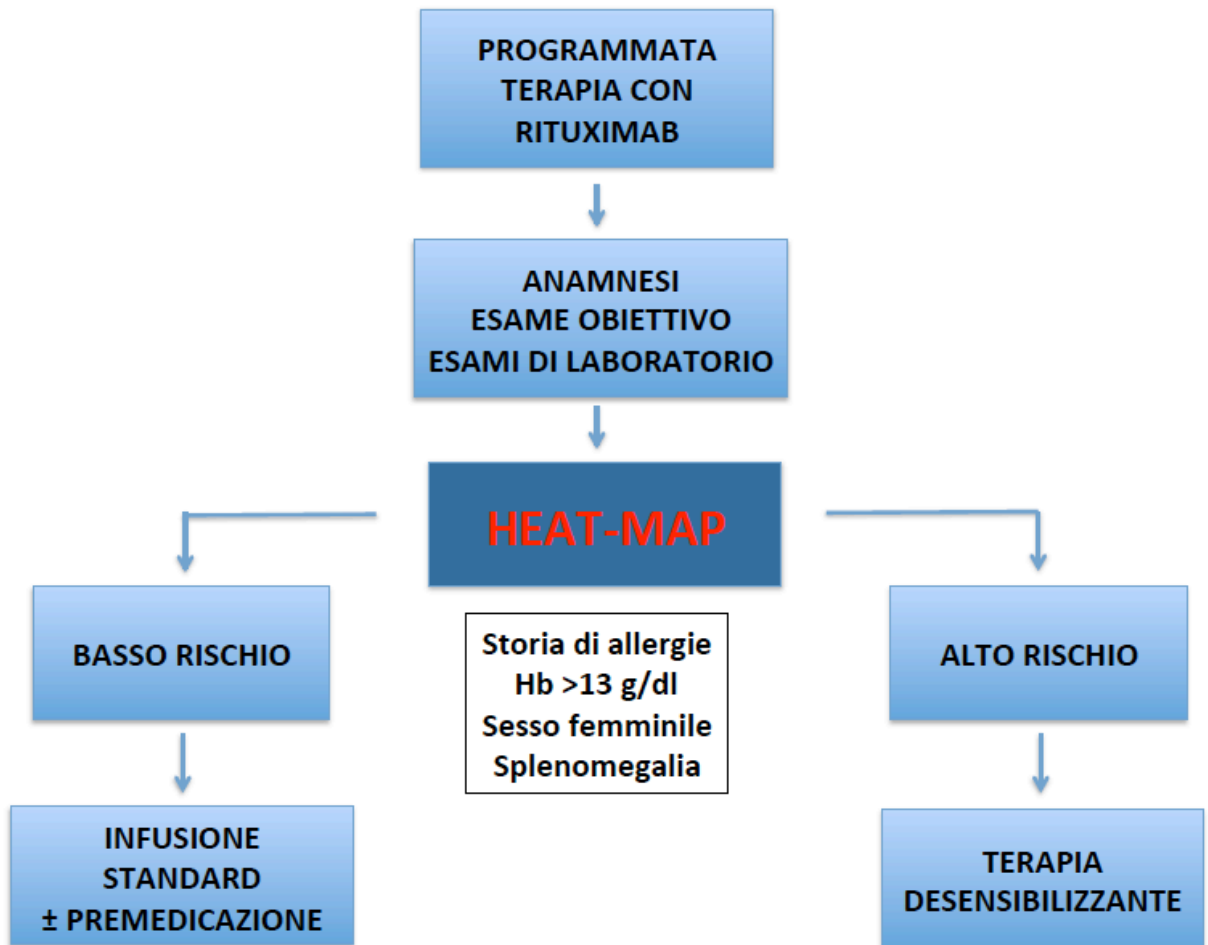
**AZIONE DEL RITUXIMAB SULLE CELLULE B NORMALI E NEOPLASTICHE:  
IL CASO DELL'ANEMIA EMOLITICA AUTOIMMUNE ASSOCIATA ALLA LEUCEMIA  
LINFATICA CRONICA**



Il caso della anemia emolitica autoimmune che complica il decorso della LLC e l'efficacia del rituximab nel suo trattamento è paradigmatico della doppia azione dell'anticorpo monoclonale sulle cellule B sia normali (quelle produttrici l'autoanticorpo) sia patologiche (cellule neoplastiche che presentano l'antigene ai linfociti T). Infatti, ci sono forti evidenze che l'autoanticorpo è prodotto dal linfocita B normale, sebbene i dati non siano ancora conclusivi, e che le cellule B neoplastiche della LLC sono delle efficienti (ed aberranti) cellule presentanti l'antigene dal momento che sono in grado di processare e presentare le proteine del sistema Rh per stimolare le cellule Thelper.

FIGURA 14

**VALUTAZIONE PRE-TERAPIA DEI PAZIENTI CANDIDATI A TERAPIA CON RITUXIMAB PER EVENTUALE TERAPIA RAPIDA DESENSIBILIZZANTE**



Ipotetica road map da seguire per uno screening rapido dei pazienti ad alto rischio di ADRs e per una altrettanto rapida terapia desensibilizzante al rituximab.

## Bibliografia

1. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Immunologia cellulare e molecolare. VII Edizione. Elsevier 2012.
2. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495-497.
3. Kennett RH. Monoclonal antibodies. Hybrid myelomas – a revolution in serology and immunogenetics. Am J Hum Genet 1979; 31: 539-547.
4. Chatenoud L. CD3 specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. Nature Rev Immunol 2003; 3: 123-132.
5. Leget GA, Czuczman MS. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. Curr Opin Oncol 1998; 10: 548-551.
6. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. Amer J Transplant 2006; 6: 859-866.
7. Seyfizadeh N, Seyfizadeh N, Hasenkamp J, Huerta-Yeppez S. A molecular perspective on rituximab: a monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. Critical Rev Oncol Hematol 2016; 275-290.
8. Coiffier B, Lepage E, Briere R, Herbrecht H, Tilly R, Bouabdallah R, Morel P, Van den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes P, Lederlin C, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl j med 2002; 346: 235-242.
9. Bello C, Sotomayor EM. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: rituximab and beyond. Hematol Am Soc Hematol Educ Program 2007; 233-242.



10. Engelhard M. Anti-CD20 antibody treatment of non-Hodgkin lymphomas. *Clin Immunol* 2016; 172: 101-104.
11. Smolen JS, Keystone EC, Emery P, Breedveld FC, Betteridge N, Burmester GR, Dougados M, Ferraccioli G, Jaeger U, Klareskog L, Kvien TK, Martin-Mola E, Pavelka K; Working Group on the Rituximab Consensus Statement. Consensus statement on the use of Rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 143-150.
12. Garvey B. Rituximab in the treatment of autoimmune haematological disorders. *Br J Haematol* 2008; 141: 149-169.
13. D'Arena G, Vigliotti ML, Coccaro M, Iodice G, Tartarone A, Matera R, Di Renzo N. Late and long-lasting response in an adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura after extended course of rituximab. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 561-562.
14. Edwards JCM, Szczepanski MD, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. Efficacy of B cell therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *NEJM* 2004; 350: 2572-2581.
15. D'Arena G, Laurenti L, Capalbo S, D'Aco AM, De Filippi R, Marcacci G, Di Renzo N, Storti S, Califano C, Vigliotti ML, Tarnani M, Ferrara F, Pinto A. Rituximab therapy for chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune haemolytic anemia. *Amer J Hematol* 2006; 81: 598-602.
16. D'Arena G, Califano C, Annunziata M, Tartarone A, Capalbo S, Villani O, Amendola G, Pietrantuono G, Ferrara F, Pinto A, Musto P, D'Arco AM, Cascavilla N. Rituximab for warm-type idiopathic autoimmune hemolytic anemia: a retrospective study of 11 adult patients. *Eur J Haematol* 2007; 79: 53-58.

17. D'Arena G, Cascavilla N. Chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune haemolytic anemia. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 1072-1080.
18. D'Arena G, Scalzulli PR, Nobile M, Dell'Olio M, Rossi G, Cascavilla N. Attenuated doses of rituximab for the treatment of adults with autoimmune cytopenias. *Am J Hematol* 2008; 83: 686-687.
19. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *NEJM* 2008; 359: 613-626.
20. D'Arena G, Taylor RP, Cascavilla N, Lindorfer M. Monoclonal antibodies: new therapeutic agents for autoimmune hemolytic anemia? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2008; 8: 62-68.
21. D'Arena G, Vigliotti ML, Dell'Olio M, Villa MR, Mantuano S, Scalzulli PR, La Sala A, Abbadessa A, Mastrullo L, Cascavilla N. Rituximab to treat chronic lymphoproliferative disorders-associated pure red cell aplasia. *Eur J Haematol* 2009; 82: 235-239.
22. D'Arena G, Cascavilla N. Chronic lymphocytic leukemia-associated pure red cell aplasia. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; 22: 279-286.
23. Gurcan HM, Keskin DB, Stern JNH, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune disease. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 10-25.
24. D'Arena G, Capalbo S, Laurenti L, Del Poeta G, Nunziata G, Deaglio S, Spinosa G, Tarnani M, De Padua L, Califano C, Ferrara F, Cascavilla N. Chronic lymphocytic leukemia-associated immune thrombocytopenia treated with rituximab: a retrospective study of 21 patients. *Eur J Haematol* 2010; 85: 502-507.

25. Barcellini W, Zanella A. Rituximab therapy for autoimmune haematological diseases. *Eur J Int Med* 2011; 22: 220-229.
26. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 278-287.
27. D'Arena G, Grandone E, Di Minno MND, Musto P, Di Minno G. Acquired hemophilia A successfully treated with rituximab. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2015 Mar 1; 7(1):e2015024.
28. D'Arena G, Grandone E, Di Minno MND, Musto P, Di Minno G. The anti-CD20 monoclonal antibody rituximab to treat acquired haemophilia A. *Blood Transfus* 2016; 14: 255-261.
29. Randall KL. Rituximab in autoimmune diseases. *Aust Prescr* 2016; 39: 131-134.
30. Dorner T, Radbruch A, Burmester GR. B-cell-directed therapies for autoimmune disease. *Nature Rev* 2009; 5: 433-441.
31. Pateinakis P, Pырpasopoulou A. CD20+ B cell depletion in systemic autoimmune diseases: common mechanism of inhibition or disease-specific effect on humoral immunity? *BioMed Res Int* 2014; article ID 973609, 5 pages.
32. Looney RJ. Treating human autoimmune disease by depleting B cells. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 863-866.
33. Rosman Z, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. *BMC Medicine* 2013; 11:88.
34. Yadav AR, Deo N. Rituximab therapy and autoimmune disease. *Curr Immunol Rev* 2012; 8: 94-100.
35. Riley JK and Sliwkowski MX. CD20: a gene in search of a function. *Semin Oncol* 2000; 27 (Suppl 12): 17-24.

36. Press OW. Radiolabeled antibody therapy of B-cell lymphomas. *Semin Oncol* 1999; 26(Suppl 14): 58-65.
37. Chung CH. Managing premedications and the risk for reactions to infusional monoclonal antibody therapy. *The Oncologist* 2008; 13: 725-732.
38. RITUXAN (rituximab), Package Insert. Calif., USA, Biogen Idec Inc., and Genentech Inc. 2011.
39. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *NEJM* 2000; 343: 37-49.
40. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *NEJM* 2000; 343: 108-117.
41. D'Arena G, Rossi G, Vannata B, Deaglio S, Mansueto G, D'Auria F, Statuto T, Simeon V, De Martino L, Marandino A, Del Poeta G, De Feo V, Musto P. Regulatory T-cells in chronic lymphocytic leukemia and autoimmune diseases. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012; 4(1):e2012053.
42. Ehrlich P, Morgenroth J. Six landmark communications on hemolysis. *Berl Klin Wochenschr* 1899; 36:6 and 481; 1900; 37: 453 and 681; 1901; 38: 251 and 569.
43. Hall AM, Vickers MA, McLeod E, Barker RN: Rh autoantigen presentation to helper T cells in chronic lymphocytic leukemia by malignant B cells. *Blood* 2005; 105: 2007-2015.
44. Kimby E. Tolerability and safety of rituximab (Mab Thera®). *Canc Treat Rev* 2005; 31: 456-473.
45. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N, Breedveld FC, Burmester G, Dörner T, Ferraccioli G, Gottenberg JE, Isaacs J, Kvien TK, Mariette X, Martin-Mola E, Pavelka K, Tak PP, van der Heijde D, van Vollenhoven RF, Emery P; Rituximab

- Consensus Expert Committee. Rituximab consensus expert committee. Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 909-920.
46. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO 3rd, Keystone EC, Fleischmann RM, Furst DE, Tyson N, Collinson N, Lehane PB. Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol* 2010; 37: 558-567.
47. Mok CC. Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update. *Drug Design, Development Therapy* 2014; 8: 87-100.
48. Hong DI, Bankova L, Cahill KN, Kyn T, Castells MC. Allergy to monoclonal antibodies: cutting-edge desensitization methods for cutting-edge therapies. *Expert Rev Clin Immunol* 2012; 8: 43-52.
49. Galvao VR, Castells MC. Hypersensitivity to biological agents—updated diagnosis, management, and treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015; 3: 175-185.
50. Reinhardt D, Diekamp S, Fleischhack G, Corbacioglu C, Jürgens H, Dworzak M, Kaspers G, Creutzig U, Zwaan CM. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in children with refractory or relapsed acute myeloid leukaemia. *Onkologie* 2004; 27: 269-272.
51. Stallmach A, Giese T, Schmidt C, Meuer SC, Zeuzem SS. Severe anaphylactic reaction to infliximab: successful treatment with adalimumab – report of a case. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 627-630.
52. Lelong J, Duburque C, Fournier C, Colombel JF, Desreumaux P, Tonnel AB, Wallaert B. Desensitization to infliximab in patients with Chron's disease. *Rev Mal Respir* 2005; 22: 239-246.

53. Lenz HJ. Anti-EGFR mechanism of action: antitumor effect and underlying cause of adverse events. *Oncology* 2006; 20(Suppl 2): 5-13.
54. Castells MC, Tennant NM, Sioane DE, Hsu I, Barrett NA, Hong DI, Laidlaw TM, Legere HJ, Nallamshetty SN, Palis RI, Rao JJ, Berlin ST, Campos SM, Matulonis UA. Hypersensitivity reactions to chemotherapy: outcomes and safety of rapid desensitization in 413 cases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 574-580.
55. Brennan PJ, Bouza TR, Hsu I, Sloane DE, Castells MC. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 1259-1266.
56. Patella V, Florio G, Magliacane D, Marone G. Hypersensitivity reactions to antineoplastic agents. *It J Allergy Clin Immunol* 2009; 19: 22-28.
57. Bonamichi-Santos R, Castells M. Desensitization for drug hypersensitivity to chemotherapy and monoclonal antibodies. *Curr Pharm Design* 2016; 22: 6870-6880.
58. Castells M, Sancho-Serra MC, Simarro M. Hypersensitivity to antineoplastic agents: mechanisms and treatment with rapid desensitization. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 1575-1584.
59. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE). V 4.02. Published: May 28, 2009. Available at <http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/> (accessed November 2, 2012).
60. D'Arena G, Cascavilla N, Musto P, Matera R, Carotenuto M. Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol* 2000; 64: 275-281.

61. Dorner T, Radbruch A, Burmester GR. B-cell-directed therapies for autoimmune disease. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 433-441.
62. Winkler U, Jensen M, Manzke O, Diehl V, Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab, IDEC-C298). *Blood* 1999; 94: 2217-24.
63. Byrd JC, Waselenko JK, Maneatis TJ, Murphy T, Ward FT, Monahan BP, Sipe MA, Donegan S, White CA. Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: association with increased infusion-related side effects and rapid blood tumor clearance. *J Clin Oncol* 1999; 17: 791-95.
64. McLaughlin P, Hagemester FB, Grillo-Lopez AJ. Rituximab in indolent lymphoma: the single-agent pivotal trial. *Semin Oncol* 1999; 26: 79-87.
65. Brown BA, Torabi M. Incidence of infusion-associated reactions with rituximab for treating multiple sclerosis: a retrospective analysis of patients treated at a US centre. *Drug Saf* 2011; 34: 117-123.
66. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH; HERMES Trial Group. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 676-688.
67. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, Keystone EC, Loveless JE, Burmester GR, Cravets MW, Hessey EW, Shaw T, Totoritis MC; REFLEX Trial Group. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized,

double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2793-2806.

68. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, Shanahan JC, Latinis KM, Oates JC, Utset TO, Gordon C, Isenberg DA, Hsieh HJ, Zhang D, Brunetta PG.. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 222-233.
69. Tony HP, Burmester G, Schulze-Koops H, Grunke M, Henes J, Kötter I, Haas J, Unger L, Lovric S, Haubitz M, Fischer-Betz R, Chehab G, Rubbert-Roth A, Specker C, Weinerth J, Holle J, Müller-Ladner U, König R, Fiehn C, Burgwinkel P, Budde K, Sörensen H, Meurer M, Aringer M, Kieseier B, Erfurt-Berge C, Sticherling M, Veelken R, Ziemann U, Strutz F, von Wussow P, Meier FM, Hunzelmann N, Schmidt E, Bergner R, Schwarting A, Eming R, Hertl M, Stadler R, Schwarz-Eywill M, Wassenberg S, Fleck M, Metzler C, Zettl U, Westphal J, Heitmann S, Herzog AL, Wiendl H, Jakob W, Schmidt E, Freivogel K, Dörner T; GRAID investigators.. Safety and clinical outcomes of rituximab therapy in patients with different autoimmune diseases: experience from a national registry (GRAID). *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R75.
70. Schwartzberg LS, Stepanski EJ, Fortner BV, Houts AC. Retrospective chart review of severe infusion reactions with rituximab, cetuximab, and bevacizumab in community oncology practices; assessment of clinical consequences. *Support Care Cancer* 2008; 16: 393-398.
71. D'Arena G, Simeon V, Laurenti L, Cimminiello M, Innocenti I, Gilio M, Padula A, Vigliotti ML, De Lorenzo S, Loseto G, Passarelli A, Di Minno MND, Tucci M, De Feo



V, D'Auria F, Silvestris F, Di Minno G, Musto P. Adverse drug reactions after intravenous rituximab infusion are more common in hematologic malignancies than in autoimmune disorders and can be predicted by the combination of few clinical and laboratory parameters: results from a retrospective, multicenter study of 374 patients. *Leuk Lymphoma* (submitted).

72. D'Arena G, De Lorenzo S, Vigliotti ML, Innocenti I, Cimminiello M, Simeon V, Autore F, Farina G, Patella V, De Feo V, Musto P, Laurenti L. Drug-related side effects after rituximab infusion in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Oncol* 2015; 20: 64-67.

73. Norin S, Björkstrand B, Rommel F, Timberg L, Andersson PO, Häggström J, Aldrin A, Hansson L. Severe infusion-related reactions are uncommon in rituximab-treated CLL patients in clinical practice: results from a Swedish national observational study. *Leuk Res* 2015; 39: 33-37.

74. Puxeddu I, Caltran E, Rocchi V, Del Corso I, Tavori A, Migliorini P. Hypersensitivity reactions during treatment with biological agents. *Clin Exp Pathol* 2016; 34: 129-132.

75. Makino K, Nakata J, Kawachi S, Hayashi T, Nakajima A, Yokoyama M. Treatment strategy for reducing the risk of rituximab-induced cytokine release syndrome in patients with intravascular large B-cell lymphoma: a case report and review of the literature. *J Med Case Reports* 2013; 7: 280.

76. Pfreundschuh M, Müller C, Zeynalova S, Kuhnt E, Wiesen MH, Held G, Rixecker T, Poeschel V, Zwick C, Reiser M, Schmitz N, Murawski N. Suboptimal dosing of rituximab in male and female patients with DLBCL. *Blood* 2014; 123: 640-646.

77. Habermann TM. Is rituximab one for all ages and each sex? *Blood* 2014; 123: 602-603.
78. Salar A, Avivi I, Bittner B, Bouabdallah R, Brewster M, Catalani O, Follows G, Haynes A, Hourcade-Potelleret F, Janikova A, Larouche JF, McIntyre C, Pedersen M, Pereira J, Sayyed P, Shpilberg O, Tumyan G. Final results of the BP22333 study demonstrate non-inferior pharmacokinetics (PK) and safety of subcutaneous (SC) administration of rituximab compared with intravenous (IV) administration as maintenance therapy in patients with follicular lymphoma (FL). *Blood* 2012; 120: abstr 1641.
79. Davies A, Merli F, Mihaljevic B, Siritanaratkul N, Solal-Céligny P, Barrett M, Berge C, Bittner B, Boehnke A, McIntyre C, Macdonald D. Pharmacokinetics and safety of subcutaneous rituximab in follicular lymphoma (SABRINA): stage 1 analysis of a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol* 2014; 15: 343-352.
80. Kipps T, Carson DA. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood* 1993; 81: 2475-2487.
81. Stallmach A, Giese T, Schmidt C, Meuer SC, Zeuzem SS. Severe anaphylactic reaction to infliximab: successful treatment with adalimumab – report of a case. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 627-630.