

## EDITORIALE

Transfusion Medicine Network 2018; 6-18 (Pubblicato luglio 2018)

### Anemia emolitica autoimmune: dall'approccio classico ai nuovi farmaci

**Bruno Fattizzo**

*Unità di Ematologia, IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico e Università di Milano*

#### INTRODUZIONE

L'anemia emolitica autoimmune (AEA) è una malattia ematologica rara la cui incidenza varia tra 0.8 e 3 per 105 abitanti/anno nell'adulto e ha una prevalenza di circa 17/105. Sebbene possa interessare ogni fascia di età e genere, è riportata una predominanza nelle donne in età media, come accade per varie patologie autoimmuni [1]. L'AEA può essere primitiva o secondaria a farmaci, infezioni, malattie autoimmuni e neoplasie, tra cui le sindromi linfoproliferative che rappresentano un'associazione tipica. La diagnosi viene posta grazie ai test di Coombs, anche detto test dell'antiglobulina diretto (TAD), che è in grado di dimostrare la presenza degli autoanticorpi adesi alla superficie degli eritrociti. In base alla positività del TAD, alla classe anticorpale dell'autoanticorpo patogenetico e al suo range termico di agglutinazione e lisi, è possibile classificare le AEA in forme calde (tipicamente TAD+ per IgG e più raramente anche per frazioni del complemento a basso titolo, con optimum termico prossimo ai 37°C), forme fredde (malattia da crioagglutinine di classe IgM con range termico da 0 a 34°C e TAD+ per la frazione C3d del complemento e autoagglutinazione a 20°C positiva), forme miste (TAD+ per IgG e C3d ad alto titolo e autoagglutinazione a 20°C positiva), e forme atipiche (forme mediate da IgA, da IgM con range termico prossimo ai 37°C o TAD negative). La classe, il range termico, l'affinità dell'autoanticorpo e la sua efficienza nel legare il complemento [2-4] rendono conto dell'attività di malattia. Tuttavia alla patogenesi dell'AEA partecipano molti altri attori, quali numerose citochemochine, la tossicità cellulare dipendente dall'anticorpo (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) e le cellule effettrici dell'immunità cellulo-mediata, quali i linfociti T CD8+ e le cellule natural killer [1,2].

La gravità di presentazione è altrettanto eterogenea e va da casi di emolisi perfettamente compensata e asintomatica, che richiede unicamente monitoraggio clinico ed occasionale supporto trasfusionale, a crisi emolitiche

fulminanti che mettono a rischio la vita del paziente. Infatti, sebbene l'AEA sia generalmente considerata una patologia benigna e di semplice gestione clinica, i casi più gravi (circa 20-30% negli studi retrospettivi, in particolare forme miste, atipiche e calde con TAD+ per IgG e C) sono spesso refrattari a più linee di terapia e presentano un aumentato rischio di eventi trombotici, con una mortalità complessiva dell'11% (in studi storici) e di circa il 4% in un'ampia coorte di pazienti recentemente pubblicata [1,2] principalmente legata a sepsi grave (specie nei pazienti splenectomizzati), insufficienza renale acuta, presenza di sindrome di Evans e al trattamento con numerose linee di terapia immunosoppressiva [2].

La gravità clinica dipende oltre che dall'attività dell'emolisi, anche dal compenso midollare. Tali momenti fisiopatologici trovano il proprio corrispettivo clinico-laboratoristico nei valori di LDH (come marker di emolisi attiva e intravascolare) e nella conta reticolocitaria (in valore assoluto o come indice di risposta midollare BMRI), che vanno usati per monitorare l'attività di malattia e guidare le tempistiche e l'aggressività dell'approccio terapeutico [3]. La terapia delle AEA andrà quindi ritagliata in base alle caratteristiche della malattia (tipo, attività emolitica, compenso midollare) e del paziente, quali età e comorbidità (cardiopatia, deficit vitaminico, insufficienza renale cronica, concomitante piastrinopenia immune, infezione cronica o acuta intercorrente) che potrebbero abbassare il valore soglia di Hb per il supporto trasfusionale [5]. Il riconoscimento delle forme secondarie è altrettanto importante, perché la cura dell'AEA dipenderà più o meno strettamente dal controllo della malattia di base. In questo articolo verranno discusse le opzioni terapeutiche dell'AEA a partire dall'approccio classico attualmente suggerito dalle linee guida, per poi focalizzarsi sulle nuove terapie "a bersaglio" rappresentate schematicamente nella tabella 1 e nella figura 1. Verranno analizzati i pro e i contro dei vari trattamenti e le evidenze dalla letteratura utili nella scelta terapeutica più idonea.

## LA TERAPIA TRADIZIONALE

La terapia tradizionale è ad oggi basata per lo più su “opinions” di esperti, su studi retrospettivi, case reports e pochi studi randomizzati di fase 2 [5-11]. L’approccio va differenziato per le forme calde e per la malattia da crioagglutinine, mentre per le forme miste e atipiche non vi sono ad oggi delle chiare indicazioni [1,2]. Gli steroidi (solitamente prednisone 1 mg/Kg/die) rappresentano la terapia standard di prima linea nell’AEA da autoanticorpi caldi, con una risposta nel 70-85% dei casi, di cui circa il 20-30% potrà essere considerato “guarito”. Il tempo alla risposta è solitamente breve (15-30 giorni) ed è consigliabile un successivo lento decalage [1,2]. Il rischio di sanguinamento gastrico, sviluppo di sindrome cushingoida, immunosoppressione e osteoporosi, va correttamente monitorato e, laddove possibile, prevenuto. La splenectomia è un’efficace terapia di seconda linea, potenzialmente curativa, con risposte in circa il 70% dei pazienti. E’ di scelta in soggetti giovani e selezionati con AEA da anticorpi caldi, dopo un’attenta valutazione del rischio chirurgico. La profilassi vaccinale per i batteri capsulati è mandatoria e i pazienti dovranno essere monitorati nel tempo e istruiti a riconoscere e segnalare prontamente i segni e sintomi di infezione, considerato il rischio, non del tutto escluso dalla vaccinazione, di sepsi post-splenectomia (post-splenectomy overwhelming sepsis OPSI) e di trombosi [2]. Nei casi con rischio chirurgico, infettivo o trombotico elevato o nei pazienti anziani, la terapia di seconda linea di scelta è rituximab, un anticorpo monoclonale diretto contro il CD20 espresso sulla superficie dei linfociti B che producono l’autoanticorpo patogenetico [6-8]. Le specifiche di questa terapia saranno discusse in un paragrafo dedicato.

I farmaci citotossici immunosoppressori, quali azatioprina, ciclofosfamide e ciclosporina, classicamente utilizzati nelle connettiviti autoimmuni, hanno un’efficacia limitata nell’AEA. Le risposte riportate sono per lo più aneddotiche e vanno dal 40 al 60% a seconda dei lavori [1,2]. Attualmente il loro utilizzo è limitato a partire dalla terza linea di terapia, come agente steroid-sparing, o in pazienti recidivati/refrattari quando la splenectomia sia controindicata e rituximab non disponibile o inefficace. Durante l’utilizzo di questi farmaci andranno attentamente monitorati il rischio infettivo e le citopenie, oltre che quello di secondi tumori e l’impatto sulla fertilità nelle pazienti giovani. Un cenno a parte meritano le immunoglobuline Ig vena, che possono essere associate alla terapia steroidea, specialmente in pazienti con infezione concomitante o in forme molto gravi (e.g. Hb<6 g/dL) e a lenta risposta. Sono utilizzate soprattutto nel paziente pediatrico in presenza di piastrinopenia

autoimmune e sindrome di Evans, con buone risposte [12]. Di recente è stato riportato un rischio paradossale di emolisi legata alle Ig vena. Il meccanismo patogenetico sarebbe quello di una fagocitosi ritardata da parte di monociti attivati dalle stesse Ig vena, che si è osservata particolarmente nei pazienti di gruppo AB, trattati con Ig vena per la prima volta e che non stanno assumendo contemporanea terapia immunosoppressiva [13].

Per quanto concerne la malattia da crioagglutinine, circa un 10-20% dei casi non richiederà mai terapia specifica, eccezion fatta per supporto trasfusionale occasionale, in caso di incremento dei valori di LDH/calò dei livelli di Hb o comparsa di sintomi da crioagglutinine (es. acrocianosi), e di costante protezione dalle basse temperature. La terapia steroidea è sconsigliata in queste forme, in quanto efficace solo a dosi elevate e inaccettabili e solo in una piccola percentuale di pazienti (14-35%). Rituximab è ad oggi considerato il farmaco di scelta in prima linea (vedi paragrafo dedicato) e può essere ripetuto alla ricaduta, specie se precedentemente efficace. La splenectomia è inefficace in queste forme e risulta pertanto controindicata [1,5], mentre gli immunosoppressori tradizionali già citati rappresentano un’alternativa, per quanto con scarse evidenze, nelle linee successive di terapia.

## LA TERAPIA DI SUPPORTO

Vitamine e ferro: la supplementazione vitaminica è cruciale per sostenere un’efficace risposta midollare. I livelli di vitamina B12 e acido folico vanno valutati e quest’ultimo va somministrato anche in caso di assenza di deficit, dato che le scorte epatiche di questo fattore sono a rapido consumo. Lo stato marziale va inoltre valutato, in quanto una sideropenia potrebbe ritardare la crisi reticolocitaria. Infine, la vitamina D, noto attore dell’omeostasi del calcio e del tessuto osseo, dovrebbe essere dosata e supplementata in caso di deficit, particolarmente se sussiste un’importante rischio di osteoporosi metasteroidea. Inoltre, è stato descritto un ruolo immunomodulante per questa vitamina in varie malattie autoimmuni organo e non organo-specifiche, inclusa l’AEA [14].

Protezione dal freddo: è mandatoria in tutti i casi di malattia da crioagglutinine e nei pazienti con anticorpi che emolizzano alle basse temperature a prescindere dalla classe autoanticorpale. Il paziente va attentamente sensibilizzato a mettere in atto condotte di evitamento delle basse temperature che possono verificarsi anche durante le stagioni calde [1,2].

Trasfusione: la presenza di autoanticorpi liberi nel siero è dimostrabile nel 40% dei casi di AEA tramite il test di Coombs indiretto. La loro reattività verso le emazie del donatore è stata

**Tabella 1**  
**nuovi farmaci nell'anemia emolitica autoimmune**

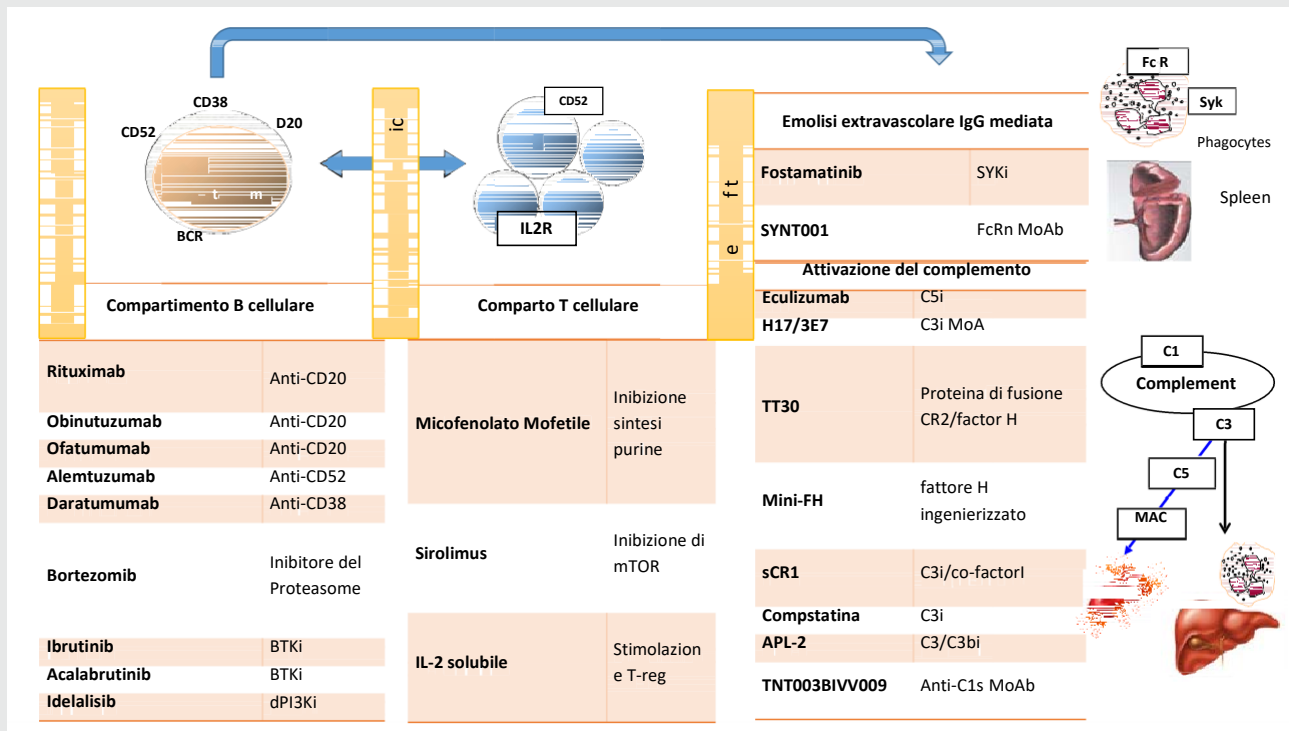
|   | <b>Meccanismo d'azione</b>      | <b>Via di somministrazione</b>      | <b>Setting d'uso</b>                               | <b>Bibliografia</b>  |
|---|---------------------------------|-------------------------------------|--|--|
| <b>Anticorpi monoclonali diretti contro il comparto B-cellulare</b> |                                 |                                     |  |  |
| <b>Rituximab</b>  | <b>Anti-CD20</b>                | <b>endovena</b><br><b>sottocute</b> | <b>AEA calde/fredde</b><br><b>AEA calde/fredde</b> | <b>Michel M, Am J Hematol 2017</b><br><b>Fu R, Int J Hematol 2016</b><br><b>Barcellini W, Eur J Haematol 2013</b><br><b>Birgens H, Br J Haematol 2013</b><br><b>Barcellini W, Blood 2012</b> |
| <b>Rituximab-Fludarabina</b>  | <b>+analogo purinico</b>        | <b>endovena</b>                     | <b>AEA fredde</b>                                  | <b>Berentsen S, Blood 2010</b>   |
| <b>Rituximab-CTX-desametasone</b>                                   | <b>+alchilante</b>              | <b>endovena</b>                     | <b>AEA calde</b>                                   | <b>Bocian H, Blood 2016</b>  |
| <b>Rituximab-Bendamustina</b>                                       | <b>+purina/alchilante</b>       | <b>endovena</b>                     | <b>AEA fredde</b>                                  | <b>Berentsen S, Blood 2017</b>   |
| <b>Obinutuzumab</b>   | <b>Anti-CD20</b>                | <b>endovena</b>                     | <b>Artrite reumatoide</b>                          | <b>Lachowiez C, Am J Case Rep. 2017</b>  |
| <b>Ofatumumab</b>   | <b>Anti-CD20</b>                | <b>endovena</b>                     | <b>AEA secondaria</b>                              | <b>Nader K, Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2013</b>   |
| <b>Alemtuzumab</b>  | <b>Anti-CD52</b>                | <b>endovena</b>                     | <b>AEA secondaria</b>                              | <b>Osterborg A, J.Curr Hematol Malig Rep 2009</b>  |
| <b>Daratumumab</b>  | <b>Anti-CD38</b>                | <b>endovena</b>                     | <b>AEA secondaria</b>                              | <b>Lauro A, Case Rep Transplant 2014</b><br><b>Vanessa P, Blood 2016</b>   |
| <b>Inibitori del proteasoma</b>                                     |                                 |                                     |  |  |
| <b>Bortezomib</b>   | <b>Inibitore del Proteasome</b> | <b>endovena</b>                     | <b>AEA secondaria</b><br><br><b>AEA fredde</b>     | <b>Khandelwal P, Biol Blood Marrow Transplant 2014</b><br><b>Metha B, Blood Cancer 2014</b><br><b>Hosoba S, Transfusion 2015</b><br><b>Rossi G, Blood 2017</b>                               |
| <b>Inibitori del B-cell receptor</b>                                |                                 |                                     |  |  |
| <b>Ibrutinib</b>  | <b>BTKi</b>                     | <b>Orale</b>                        | <b>AEA secondarie</b>                              | <b>Cavazzini F, Leuk Lymphoma 2016</b>   |
| <b>Acalabrutinib</b>  | <b>BTKi</b>                     | <b>Orale</b>                        | <b>Studi preclinici</b>                            | <b>Manda S, Br J Haematol 2015</b>   |
| <b>Idelalisib</b>   | <b>PI3Ki</b>                    | <b>Orale</b>                        | <b>-</b>   | <b>Kerry A, Blood 2016</b>   |

| <b>Inibitori della fagocitosi IgG mediata</b> |   |                  |   |  |
|---|---|------------------|---|--|
| <b>Fostamatinib</b>                           | <b>SYKi</b>                             | <b>Orale</b>     | <b>AEA calde</b>                          | <b><a href="https://clinicaltrials.gov/NCT02612558">https://clinicaltrials.gov NCT02612558</a></b> |
| <b>SYNT001</b>                                | <b>FcRn MoAb</b>                        | <b>Endovena</b>  | <b>AEA calde</b>                          | <b><a href="https://clinicaltrials.gov/NCT03075878">https://clinicaltrials.gov NCT03075878</a></b> |
| <b>Inibitori del complemento</b>              |   |                  |   |  |
| <b>Eculizumab</b>                             | <b>C5i</b>                              | <b>Endovena</b>  | <b>AEA fredde/miste</b>                   | <b>Roth A, Blood 2009</b>  |
| <b>H17/3E7</b>                                | <b>C3i MoAb</b>                         | <b>endovena</b>  | <b>PNH</b>                                | <b>Gupta N, Ann Hematol 2014</b>   |
| <b>TT30</b>                                   | <b>Proteina di fusione CR2/factor H</b> | <b>In vitro</b>  | <b>PNH</b>                                | <b>Lindorfer MA, Blood 2010</b>  |
| <b>Mini-FH</b>                                | <b>fattore H ingegnerizzato</b>         | <b>In vitro</b>  | <b>PNH</b>                                | <b>Risitano AM, Blood 2012</b>   |
| <b>sCR1</b>                                   | <b>C3i/co-factor I</b>                  | <b>In vitro</b>  | <b>Danno polmonare acuto</b>              | <b>Hebecker M, J Immunol 2013</b>  |
| <b>Compstatina</b>                            | <b>C3i</b>                              | <b>In vitro</b>  | <b>PNH</b>                                | <b>Zimmerman JL, Crit Care Med 2000</b>  |
| <b>APL-2</b>                                  | <b>C3/C3bi</b>                          | <b>Sottocute</b> | <b>AEA calde/fredde</b>                   | <b>Risitano AM, Blood 2014</b>   |
|   |   |                  | <b>AEA fredde</b>                         | <b>Grossi FV, Blood 2016</b>   |
| <b>TNT003/BIVV009</b>                         | <b>Anti-C1s MoAb</b>                    | <b>Endovena</b>  | <b>AEA fredde</b>                         | <b>Jaeger U, Blood 2017</b><br><b>Not yet recruiting</b>   |
| <b>Inibitori del comparato T-cellulare</b>    |   |                  |   |  |
| <b>Micafenolato Mofetile</b>                  | <b>Inibizione sintesi purine</b>        | <b>Orale</b>     | <b>AEA calde/fredde /secondarie/Evans</b> | <b>Howard J, Br J Haematol 2002</b>  |
|   |   |                  |   | <b>Kotb R, Eur J Hematol 2005</b>  |
|   |   |                  |   | <b>Miano M, Br J Haematol 2016</b>   |
| <b>Sirolimus</b>                              | <b>Inibizione di mTOR</b>               | <b>Orale</b>     | <b>Evans/AEA secondarie</b>               | <b>Park JA, Transfus Med Rev 2016</b>  |
|   |   |                  |   | <b>Jasinski S, J Pediatr Hematol Oncol 2017</b>  |
| <b>IL-2 solubile</b>                          | <b>Stimolazione T-reg</b>               | <b>Sottocute</b> | <b>AEA calde</b>                          | <b><a href="https://clinicaltrials.gov/NCT02389231">https://clinicaltrials.gov NCT02389231</a></b> |

storicamente considerata come una sfida clinico-laboratoristica. Tuttavia, l'emolisi extravascolare a livello del sistema reticolo-endoteliale risulta auto-limitante una volta che i siti di fagocitosi siano saturati, e diminuisce con il rate trasfusionale. In questo modo, una parte degli eritrociti trasfusi sopravvivranno, permettendo di tamponare l'anemia grave acuta nel tempo richiesto dalla terapia immunosoppressiva per agire. Si ritiene inoltre che il rischio di reazioni emolitiche trasfusionali nei pazienti con AEA sia sovrastimato e non dovrebbe pertanto impedire la

trasfusione in caso di urgenza clinica, dove risulta al contrario fortemente consigliata [16,17,18, [19,20]. Tuttavia, in un recente studio su AEA primitive, fino al 30% dei pazienti presentava una non risposta alla trasfusione in termini di mancato incremento di Hb post-trasfusionale, rappresentando una vera e propria sfida per il clinico e il laboratorista [2,12]

Terapia anticoagulante: sebbene la fisiopatologia della trombosi in corso di AEA sia in gran parte non chiarita, un evento trombotico può complicare il follow up clinico fin nel 10% dei



**Figura 1**  
Momenti patogenetici, potenziali target e nuovi farmaci nella AEA

Il compartimento B cellulare produce gli autoanticorpi patogenetici e rappresenta dunque un ottimo target per numerosi nuovi farmaci ad azione intra (bortezomib) ed extra-cellulare (anticorpi monoclonali). L'attivazione dei linfociti B patogenetici avviene anche grazie al cross-talk con i linfociti T, che a loro volta offrono ulteriori target per nuovi farmaci immunosoppressori (anticorpi monoclonali, IL-2 solubile ecc...). Gli effettori finali dell'emolisi immuno-mediata sono rappresentati dalla fagocitosi in sede perlopiù splenica IgG mediata e dall'emolisi intra- ed extra-vascolare (questa prevalentemente epatica) complemento mediata. Entrambi questi momenti patogenetici trovano oggi specifici farmaci inibitori.

**casi, particolarmente in presenza di marcata emolisi intravascolare e attivazione del complemento [2]. Pertanto, nei pazienti con alto rate emolitico è opportuno valutare i fattori di rischio addizionali di trombosi (modificabili e non modificabili) e istruire il paziente a riferire prontamente eventuali sintomi e segni di diatesi trombofilica. Inoltre, andrà sempre valutato il rischio trombotico iatrogeno, in particolare nel paziente splenectomizzato e immobilizzato, e potrà essere opportuno discutere l'indicazione a una profilassi anticoagulante con gli specialisti dedicati.**

**Eritropoietina (EPO): gli agenti stimolanti l'eritropoiesi sono il trattamento di scelta dell'anemia secondaria all'insufficienza renale cronica e nelle mielodisplasie (MDS) a basso rischio. Tuttavia, l'utilizzo di EPO nell'AEA è supportato da recenti pubblicazioni [15]. La dose, le tempistiche di somministrazione e di valutazione della risposta non sono state valutate prospetticamente. Tuttavia, in un importante studio retrospettivo, 13 dei 14 pazienti trattati mostravano una risposta ad EPO [2]. Il suo utilizzo andrebbe quindi preso in considerazione nei pazienti con AEA cronica, con livelli bassi o**

**inappropriatamente normali di EPO endogena, o in presenza di reticolocitosi inadeguata, concomitante MDS a basso rischio e/o insufficienza renale cronica [12].**

Rituximab in monoterapia o in associazione

**Rituximab, un MoAb diretto contro il CD20, un antigene B-linfocitario largamente espresso, è diventato il farmaco di scelta in seconda linea per l'AEA da autoanticorpi caldi recidivata/refrattaria alla terapia steroidea. Il farmaco è stato inizialmente sviluppato per le sindromi linfoproliferative, ma si è dimostrato efficace anche in diverse patologie autoimmuni, quali l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico, la sclerosi multipla e numerose altre malattie ematologiche immunomediata, quali la trombocitopenia autoimmune primitiva, l'emofilia acquisita, la porpora trombotica trombocitopenica e l'anemia emolitica autoimmune [16,17]. Per quanto riguarda quest'ultima, rituximab è efficace sia nelle forme idiopatiche che nelle forme secondarie, incluse quelle associate a patologia autoimmune e neoplasia linfoidale, nonché nelle forme associate a trapianto di midollo osseo [18,19]. In uno studio prospettico condotto in una coorte di pazienti**



pediatrici, si è osservata una risposta dell'87% in 15 bambini con anemia emolitica autoimmune ricaduta/refrattaria con un follow-up mediano dopo la terapia con rituximab di 13 mesi [20]. Rituximab è stato anche confrontato con la ciclofosfamide somministrata a dosi intermittenti, sempre nel setting del paziente ricaduto/refrattario, mostrando risposte superiori e un buon profilo di tollerabilità [21]. Il tempo alla risposta è altamente variabile e va da alcune settimane ad alcuni mesi. In uno studio retrospettivo multicentrico, il tempo mediano alla risposta era di 1 mese nell'87,5% dei casi e 3 mesi nel 12,5% [20,22,23]. Nel complesso, l'utilizzo di rituximab nella terapia di seconda linea dell'AEA da autoanticorpi caldi permette di ottenere risposte fino all'80% dei casi e la terapia può essere ripetuta per migliorare o rievocare una precedente risposta [17]. Più di recente, la terapia con rituximab è stata utilizzata anche nella prima linea di trattamento: uno studio randomizzato ha paragonato rituximab associato a prednisolone con prednisolone in monoterapia in 64 casi di AEA da autoanticorpi caldi e ha dimostrato una risposta significativamente superiore a 12 mesi (75% versus 36%) e una migliore sopravvivenza libera da recidiva a 36 mesi (70% verso 45%) nel gruppo trattato con prednisolone e rituximab [8]. Un altro studio randomizzato controllato in doppio cieco, ha mostrato un'efficacia superiore e una maggiore durata della risposta utilizzando rituximab in monoterapia rispetto al placebo (nello studio era permesso utilizzare prednisone o prednisolone alla dose di 1 mg/Kg/die in entrambi i bracci per le prime due settimane di terapia) in adulti con AEA di nuova diagnosi [11]. Rituximab si è dimostrato essere efficace, ben tollerato e sicuro anche nel paziente anziano e le reazioni peri-infusionali sembrano scomparire dopo la prima somministrazione [24]. Infine, il rischio di immunosoppressione va sempre tenuto in considerazione e deve indurre un'adeguata profilassi della riattivazione delle più comuni epatiti virali. Per quanto riguarda le AEA da autoanticorpi freddi, rituximab rappresenta oggi la prima linea di terapia raccomandata, data la efficacia limitata della terapia steroidea in queste forme (solo ad alte dosi e per tempi inaccettabili) e la presenza di un clone linfoide dimostrabile nella maggior parte dei pazienti con diagnosi di malattia da crioagglutinine primitiva [25]. Ad ogni modo, nella malattia da crioagglutinine la monoterapia con rituximab induce perlopiù risposte parziali con una durata mediana inferiore a 12 mesi. Per questo sono state valutate possibili associazioni di rituximab con farmaci citotossici immunosoppressori, mutualmente importati dagli schemi chemio-immunoterapici utilizzati nella cura delle sindromi linfoproliferative. L'associazione di rituximab a dose standard con fludarabina orale alla dose di 40 mg/mq dal giorno 1 al giorno 5 di 4 cicli di 28

giorni ciascuno, ha permesso di ottenere un 76% di risposte complessive (21% complete e 55% parziali) in uno studio prospettico multicentrico che ha incluso 29 pazienti con malattia da crioagglutinine [9]. La durata mediana della risposta si è stimata essere superiore ai 66 mesi e 7 dei 10 pazienti precedentemente trattati con rituximab da solo hanno mostrato una migliore risposta all'associazione. Tuttavia, il 41% dei casi è andato incontro ad un effetto collaterale grave (perlopiù tossicità ematologica di grado 3-4) e gli Autori suggeriscono che il beneficio di tale associazione andrebbe attentamente bilanciato alla luce delle tossicità, in particolar modo nei pazienti anziani e con comorbidità [9]. Uno studio più recente ha riportato un'alta efficacia e una minore tossicità per l'associazione di rituximab con la bendamustina. Tale associazione è stata testata in 45 pazienti con malattia da crioagglutinine alla dose di 90 mg/mq nei giorni 1 e 2 di 4 cicli da 28 giorni ciascuno in cui rituximab veniva somministrato il giorno 1. Le risposte complessive erano nell'ordine del 70%, con 40% di risposte complete. Si è osservata una risposta anche nel 50% dei casi che erano già stati sottoposti a terapia con rituximab da solo o associato a fludarabina. Le risposte ottenute si sono dimostrate durature ed eventi avversi di grado 3-4 si sono verificati nel 33% dei casi (neutropenia), di cui solo l'11% ha presentato un'infezione conseguente [10]. È stato quindi suggerito che tale associazione possa essere portata in prima linea nel trattamento dell'AEA da autoanticorpi freddi. Per quanto concerne le forme calde, uno studio ha riportato l'efficacia di un'associazione tra rituximab, ciclofosfamide, e desametasone nel trattamento di forme secondarie a sindrome linfoproliferativa. Bocian e Colleghi hanno trattato 19 casi di AEA da autoanticorpi caldi (12 primitive di cui 6 mai trattate) con tale associazione, ottenendo una risposta complessiva nel 97% dei casi (8 risposte complete e 10 parziali) [26]. Tuttavia, considerate le alte percentuali di risposta indotte dalla terapia steroidea in prima linea e da rituximab in monoterapia nella seconda linea, l'utilizzo di questa associazione prima della terza linea di terapia richiede ulteriori studi prospettici randomizzati di validazione [26].

Rituximab a bassa dose: partendo dal rationale che nelle patologie autoimmuni l'infiltrato linfoide è inferiore rispetto alle sindromi linfoproliferative e con l'obiettivo di minimizzare gli effetti collaterali e ridurre i costi della terapia, si è studiato l'utilizzo di rituximab a bassa dose (100 mg/settimana per quattro settimane). Questa posologia è stata valutata in varie malattie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, alcune vasculiti e la porpora trombotica trombocitopenica, con risultati molto interessanti [27-29]. Nelle citopenie autoimmuni, i primi dati sono stati prodotti per la piastrinopenia

immune primitiva; in questa patologia uno studio prospettico ha dimostrato percentuali di risposte pari al 60%, sebbene di breve durata [30]. Un altro studio prospettico randomizzato ha riportato delle risposte sostenute di lunga durata con rituximab a bassa dose paragonato allo steroide in monoterapia, sebbene le percentuali di risposta risultassero simili in entrambi i bracci dello studio [31]. Il primo trial prospettico nell'AEA è stato effettuato in pazienti steroide-refrattari, a cui è stato somministrato rituximab a bassa dose combinato con l'anticorpo monoclonale alemtuzumab, anti-CD52, ottenendo una risposta in tutti i casi (100% di risposte complessive) [32]. Infine, uno studio multicentrico italiano ha valutato rituximab a bassa dose nell'AEA primitiva (sia malattia da crioagglutinine che AEA da autoanticorpi caldi), mostrando delle percentuali di risposta paragonabili a quelle riportate per la dose standard nelle forme calde (70-80%); mentre nelle forme fredde le risposte erano inferiori (circa 50% di risposta complessiva) [7]. Inoltre, tali risposte venivano mantenute a lungo termine [33]; gli Autori concludevano che questa terapia è consigliabile e ripetibile nei pazienti con AEA recidivata refrattaria, e che coloro i quali non ricadevano entro i primi 13 mesi avevano la più alta probabilità di una remissione persistente (si potrebbe forse parlare di "cura") [7,33].

Vie alternative di somministrazione di rituximab: poiché rituximab è classicamente somministrato per via endovenosa e possono verificarsi reazioni potenzialmente fatali, tale farmaco è generalmente somministrato in regime intraospedaliero di day-hospital e richiede la premedicazione con farmaci antistaminici e paracetamolo, oltre a un monitoraggio continuo dei parametri vitali con il conseguente adeguamento della velocità di infusione. Poiché tali procedure implicano dei costi diretti e indiretti per il paziente, il caregiver, e il servizio sanitario, sono state esplorate vie alternative di somministrazione. In particolare si è studiata la somministrazione per via sottocutanea. La nuova formulazione (1400 mg sc a dose fissa) è stata per la prima volta approvata per alcuni tipi di linfoma non-Hodgkin, sulla base di risultati di sicurezza ed efficacia provenienti da studi dedicati [34,35]. Due recenti report descrivono i risultati dell'amministrazione domiciliare eseguita dallo stesso paziente rispettivamente in 6 e 3 casi di AEA, confermando l'alta fattibilità e sicurezza della via di somministrazione sottocutanea [36,37]. Questo approccio potrebbe semplificare e abbreviare i tempi di somministrazione, favorendo l'accessibilità del farmaco anche ai setting con meno risorse e aprendo la strada all'utilizzo autonomo domiciliare.

## LE NUOVE TERAPIE EMERGENTI

### Micofenolato (MMF)

MMF è un profarmaco dell'acido micofenolico, un prodotto di fermentazione derivato da molte specie di *Penicillium*. Il MMF è un potente immunosoppressore e agisce attraverso l'inibizione dell'enzima inosina-5-monofosfato deidrogenasi, cruciale nella sintesi delle purine, portando all'arresto della proliferazione dei linfociti [38]. Tale farmaco causa inoltre la deplezione del guanosina trifosfato, con una conseguente riduzione dell'espressione delle molecole di adesione dei leucociti e conseguente diminuito reclutamento degli stessi a livello dei siti di infiammazione [38]. Il farmaco è stato classicamente utilizzato per prevenire il rigetto dei trapianti di organi solidi. MMF è generalmente ben tollerato e i principali eventi avversi sono dati dall'intolleranza gastroenterica e dalla soppressione del midollo osseo. MMF è stato anche utilizzato come prevenzione per la malattia del trapianto contro l'ospite nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo, nonché in varie malattie autoimmuni compresa l'artrite reumatoide e la malattia di Crohn. Per quanto riguarda le citopenie immuni, i principali dati sull'efficacia vengono dal setting pediatrico, dove si è dimostrato attivo nei pazienti con piastrinopenia autoimmune e sindrome di Evans, con risposte superiori nella seconda (81% versus 58% in un recente studio) [39]. La successiva applicazione di tale farmaco negli adulti con AEA steroide dipendente/refrattaria, ha confermato le alte percentuali di risposta, sebbene in un numero limitato di casi (100% di risposte in 2 studi che includevano rispettivamente 4 AEA e 4 AEA + 1 Evans) [40,41]. Poiché MMF è efficace e sicuro, potrebbe avere un ruolo in seconda linea o nelle linee successive in questa patologia.

### Bortezomib

Bortezomib è un inibitore del proteasoma che è stato impiegato con successo nelle patologie caratterizzate da un'iperproduzione di immunoglobuline, in particolare nel mieloma multiplo. Tale farmaco agisce inibendo il turnover proteico con conseguente apoptosi della cellula B secernente le immunoglobuline. Alcuni dati di efficacia sono stati riportati anche in pazienti con AEA recidivata/refrattaria grave, perlopiù nella forma di report in pazienti pediatrici [42-44]. Pochi dati sono disponibili per i pazienti adulti, sia per la malattia da agglutinine fredde che per l'AEA da autoanticorpi misti, dove il farmaco si è dimostrato efficace sia in monoterapia che associato agli immunosoppressori [45,46]. Più di recente, è stato realizzato uno studio prospettico multicentrico di fase 2, che ha valutato l'efficacia e la sicurezza di un singolo ciclo di bortezomib alla dose di 1,3 mg/mq nei pazienti con malattia da crioagglutinine recidivata/refrattaria [47]. Tre

dei 19 pazienti trattati hanno raggiunto una risposta completa, e 3 una risposta parziale (risposte complessive 31,6%). Si sono osservati cinque eventi avversi di grado 3 (cefalea, diarrea, aumento dei livelli di bilirubina, anemia, infezioni del tratto respiratorio superiore) e uno di grado quattro (embolia polmonare), tutti considerati non relati al farmaco eccetto che l'infezione delle vie urinarie. Una risposta prolungata e sostenuta a 12 mesi dalla somministrazione si è osservata nel 67% dei pazienti "responders". Gli Autori concludevano che un breve corso di terapia con bortezomib possa rappresentare un trattamento efficace con tossicità limitata da riservare a un subset di pazienti con malattia da crioagglutinine sintomatica nel setting recidivato/refrattario [47].

#### Inibitori del Complemento

L'attivazione del sistema del complemento nell'AEA può essere responsabile dell'emolisi extravascolare e risultare occasionalmente in emolisi intravascolare. Gli autoanticorpi di classe IgM, che si trovano caratteristicamente nelle AEA da autoanticorpi freddi, ma anche in una considerevole percentuale di pazienti con AEA da autoanticorpi caldi, sono in grado di attivare il complemento in vivo [48]. Pertanto, il blocco della cascata del complemento potrebbe razionalmente interrompere o attenuare l'emolisi in queste forme, particolarmente nella fase acuta di malattia. Eculizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato, che lega la frazione C5 del complemento, inibendo l'attivazione della frazione terminale della cascata. Il suo ruolo nel trattamento della emoglobinuria parossistica notturna (EPN), malattia caratterizzata da emolisi intravascolare complemento mediata per via di un deficit acquisito di proteine inibitorie, è consolidato [49]. Tale farmaco è stato somministrato con successo anche in pazienti con anemia emolitica autoimmune multi-refrattaria, particolarmente nelle forme fredde, con miglioramento dell'emolisi e della sintomatologia clinica [50, 51]. Eculizumab esercita la propria efficacia solo sull'emolisi intravascolare, poiché gli eventi più precoci della cascata del complemento non vengono bloccati. In particolare il farmaco non impedisce la deposizione del C3 sulla superficie dei globuli rossi [52]. Tale deposizione è responsabile della fagocitosi dei globuli rossi opsonizzati da C3 a livello degli organi reticoloendoteliali, in particolare nel fegato. In più, il blocco di C5 porta con sé un significativo aumento del rischio infettivo, particolarmente di infezione da meningococco, che va conosciuto e prevenuto con adeguata vaccinoprofilassi ed eventuale somministrazione di antibiotici a lungo termine. Il blocco del C3 sarebbe dunque un approccio interessante in questa patologia. L'anticorpo monoclonale anti-C3 H17/3E7 si è dimostrato in grado di inibire efficientemente l'emolisi in pazienti con EPN [53]. TT30 è una proteina di

fusione in grado di legarsi al recettore per il C2, prevenendo la formazione della C3 convertasi della via alternativa. Inoltre, tale farmaco inibisce in modo efficiente la deposizione di C3 e l'emolisi delle emazie EPN, prevenendo sia la distruzione intravascolare che quella extravascolare [54]. Sebbene rivesta un ruolo minoritario nell'emolisi delle AEA, la via alternativa del complemento potrebbe anche essere bloccata attraverso il fattore H ingegnerizzato (mini-H), che presenta un'alta affinità per le frazioni C3b e C3d di in vitro [55]. Ancora, il CR1 solubile ricombinante è una molecola in grado di inibire in modo efficace sia la via classica che la via alternativa del complemento, sempre agendo a livello del C3. Ciò si realizza attraverso un legame diretto al C4b e C3b, ma anche come cofattore per l'inattivazione del fattore I [56]. C3 potrebbe inoltre essere inibito dal peptide ciclico compstatina, una molecola in grado di prevenire la formazione della C3 convertasi, bloccando via classica, via alternativa e via della lectina. Recentemente, si è dimostrato che la compstatina è in grado di bloccare l'emolisi delle cellule EPN e la deposizione del C3 [57]. Questo composto non è ancora stato testato in vivo e il suo potenziale blocco completo della cascata del complemento genera alcune perplessità legate al rischio di eventi infettivi. In modo simile, APL-2, un peptide ciclico di sintesi coniugato a un polimero di polietilene glicole che lega specificatamente il C3 e il C3b (inibitore di tutte e tre le vie di attivazione del complemento), ha mostrato un buon profilo di efficacia e sicurezza in uno studio di fase 1 [58] e uno studio prospettico per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia in pazienti con AEA è attualmente in fase di arruolamento [59]. È stata poi valutata, l'inibizione selettiva della via classica del complemento, con risparmio della via alternativa. L'inibitore endogeno del C1 si è dimostrato in grado di impedire la deposizione del C3 e prevenire l'emolisi in vitro. Dati di sicurezza sull'inibizione del C1 sono disponibili nei pazienti affetti da deficit ereditario di C1-inibitore trattati con C1-inibitore purificato dal plasma per lungo tempo [60]. Il farmaco TNT003, un anticorpo monoclonale diretto contro la serina proteasi C1s, è in grado di inibire in maniera efficace sia l'emolisi intravascolare che quella extravascolare indotta da autoanticorpi derivati da pazienti con AEA da autoanticorpi freddi [61]. TNT003 è anche in grado di ridurre la generazione di molecole proinfiammatorie e vasoattive quali le anafilotossine. Sebbene il rischio infettivo sarebbe razionalmente inferiore rispetto agli "inibitori a tre vie", l'inibizione a lungo termine della via classica del complemento potrebbe incrementare il rischio di sviluppo di disordini autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico [62]. Recentemente sono stati riportati i dati di 6 pazienti con malattia da crioagglutinine trattati con l'anticorpo monoclonale diretto contro il C1s,



**BIVV009**, in un trial open label di fase 1-1b [63]. Da questi dati emerge una risposta del 100% durante 6 settimane di trattamento, con buona tollerabilità. Come atteso, l'emolisi e l'anemia ricorrevano una volta che la somministrazione del farmaco veniva interrotta e i livelli farmacologici ematici si riducevano. È interessante notare che la riesposizione al farmaco era in grado di instaurare nuovamente in modo efficace la risposta con una lunga durata (18 mesi) [63].

Inibitori del recettore delle cellule B

La cascata di trasmissione del segnale a valle del recettore dei linfociti B riveste un ruolo critico nella proliferazione e nel funzionamento delle cellule B. Le molecole BTK (Bruton-tyrosin-kinase) e PI3K (phospho-inositide-3-kinase) sono state di recente oggetto di terapie target che hanno rivoluzionato il management delle sindromi linfoproliferative. I pazienti con leucemia linfatica cronica sottoposti a terapia con ibrutinib, un inibitore di prima generazione di BTK, sperimentavano bassissima incidenza di AEA (circa 2%) rispetto a quanto riportato nella popolazione generale con linfatica cronica [64]. Ciò suggerisce che il farmaco potrebbe anche avere un ruolo nel ridurre la risposta autoanticorpale. In modelli preclinici murini di AEA, l'utilizzo degli inibitori di BTK come ibrutinib e acalabrutinib riduceva in maniera significativa la risposta autoanticorpale anti-eritrociti [65]. Ciò sembra suggerire una possibile efficacia clinica nei pazienti con AEA. Vari report hanno mostrato l'efficacia di ibrutinib nelle AEA secondarie a sindromi linfoproliferative [66,67]. In un recente studio retrospettivo su pazienti con leucemia linfatica cronica trattati con ibrutinib, 37 di essi presentavano una storia clinica di citopenia autoimmune e 15 erano sotto terapia immunosoppressiva all'inizio del trattamento con ibrutinib; 66% di questi ultimi hanno potuto smettere o ridurre la terapia immunosoppressiva ad un tempo mediano di 2 mesi dopo l'inizio della terapia con ibrutinib [68]. C'è una conoscenza limitata dell'utilizzo di idelalisib, un inibitore di PI3K, nel management delle citopenie secondarie. Ad ogni modo, l'alta incidenza di complicanze autoimmuni, inclusa l'epatite autoimmune, la colite e la polmonite infiammatoria nei pazienti trattati con idelalisib sembra scoraggiarne l'utilizzo in questo contesto [69].

Terapie target per l'emolisi extra-vascolare mediata da IgG

Fostamatinib è un inibitore orale della chinasi SYK, altamente espressa a livello degli organi del sistema reticoloendoteliale. Tale enzima è coinvolto nella proliferazione e differenziazione cellulare e nella fagocitosi. In particolare, l'inibizione del segnale della cascata di trasmissione mediata da SYK a valle dell'interazione IgG-Fc-gamma receptor del macrofago, porta all'inibizione dell'attivazione di mastociti, macrofagi e linfociti B. La riduzione

delle risposte infiammatorie mediate da queste popolazioni cellulari riduce il danno tissutale conseguente. Le attività antiinfiammatoria e immunomodulante di fostamatinib sono di grande interesse per tutte le patologie mediate da autoanticorpi di classe IgG e sono disponibili dei dati di efficacia in varie patologie autoimmuni, inclusa l'artrite reumatoide e la piastrinopenia autoimmune recidivata refrattaria [70]. Fostamatinib potrebbe essere attivo anche nell'AEA da autoanticorpi caldi, generalmente mediata da IgG e caratterizzata da un'emolisi extra-vascolare che si realizza attraverso l'interazione IgG-recettore Fc-gamma. Il farmaco attualmente è oggetto di un trial clinico di fase 2 alla dose di 150 mg due volte al giorno [71]. Un altro approccio interessante è quello di bersagliare il recettore per l'Fc neonatale (FcRn). Tali recettori ricoprono fisiologicamente le IgG circolanti, inclusi gli autoanticorpi patogenetici, proteggendoli dal catabolismo e regolano le risposte dell'immunità innata e adattativa mediata dagli immuno-complessi di IgG. Queste proprietà rendono tali recettori circolanti un potenziale target per l'immunoterapia nelle patologie mediate da IgG. Il farmaco SYNT001 è un anticorpo monoclonale umanizzato che ha come bersaglio l'FcRn, tramite legame a livello del sito di riconoscimento per le IgG. Tale legame impedisce l'interazione FcRn-IgG, alterando l'omeostasi delle IgG e, di conseguenza, l'attivazione dell'immunità innata e adattativa. In un recente studio, SYNT001 si è dimostrato ben tollerato e in grado di indurre una rapida riduzione dei livelli di tutte le sottoclassi di IgG in volontari sani [72]. Attualmente è in corso uno studio di fase 1B multicentrico per valutare l'attività di questo farmaco nei pazienti con AEA da autoanticorpi caldi cronica, con l'obiettivo di valutarne l'efficacia la tollerabilità e la sicurezza [73].

Nuove terapie dirette contro le cellule T

Sebbene l'AEA sia un tipico modello di autoimmunità umorale, poiché causata da linfociti B auto-reattivi sfuggiti ai sistemi di tolleranza centrale in grado di produrre autoanticorpi contro i globuli rossi, il "cross talking" con i linfociti T è necessario per avere il secondo segnale e attivare la risposta immune [74]. In uno studio recente sono stati valutati i meccanismi di tolleranza centrale e periferica dei linfociti T ad autoantigeni specifici per i globuli rossi in modelli murini. Gli autori hanno dimostrato che cellule T CD4+ auto-reattive verso globuli rossi umani non venivano selezionate negativamente dalla tolleranza centrale a livello timico, né venivano trasformati in cellule T-regolatorie, dimostrando che la tolleranza periferica è il principale meccanismo deputato a prevenire l'autoimmunità in questo setting [75]. Altri studi hanno mostrato che le cellule T-regolatorie sono particolarmente basse nei

pazienti con AEA rispetto ai controlli e vi sono delle correlazioni con i parametri ematologici [76,77]. Infine, uno studio recente ha mostrato che i pazienti con AEA con aumentati livelli midollari di linfociti T CD3+ mostrano una migliore risposta alla terapia immunosoppressiva [78]. Nell'AEA sono state utilizzate varie terapie dirette contro il versante T cellulare, inclusi gli steroidi stessi e gli inibitori della calcineurina come la ciclosporina. Questi farmaci generalmente bersagliano un recettore intracellulare che porta ad una cascata di trasmissione del segnale a valle che raggiunge il nucleo dove si realizza un incremento o una riduzione dell'espressione genica di citochine infiammatorie e immunomodulatorie (ad esempio interleukina-2, citochina fondamentale per l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T). Alemtuzumab è un anticorpo monoclonale diretto contro il CD52, espresso anche dai linfociti T, e usato in varie malattie autoimmuni, nella prevenzione della malattia del trapianto contro l'ospite, e nelle citopenie immuni, in particolare secondarie a sindrome linfoproliferativa o trapianto [79,80]. Il ruolo di questo farmaco rimane controverso in un setting benigno, considerato il potenziale rischio infettivo e l'alta attività immunosoppressiva. Un altro target potenziale è rappresentato dalla serina treonina chinasi mTOR (mammalian target of rapamycin) che è parte della via di trasmissione del segnale del recettore dei linfociti T e che regola la sintesi proteica, la crescita e la proliferazione cellulare. Vari inibitori di questa chinasi sono ad oggi disponibili, la maggior parte di essi usati in malattie linfoproliferative e come agenti anti-rigetto nei trapianti di organi solidi e di midollo osseo. Tuttavia sono stati pubblicati dei dati anche nelle patologie autoimmuni, in particolare per sirolimus, che si è dimostrato efficace in pazienti con AEA refrattaria post-trapianto (sia di organi solidi che di midollo osseo) [81]. Inoltre, l'analisi retrospettiva di 17 pazienti pediatrici con piastrinopenia immune persistente (12) e sindrome di Evans (5) trattati con sirolimus ha mostrato delle percentuali di risposta del 73% e dell'80% rispettivamente. Nei pazienti che raggiungevano la risposta completa (100% delle ITP e 50% degli Evans), questa era generalmente di lunga durata (90% ancora in risposta a due anni dall'inizio della terapia) [82]. Infine, considerata la associazione tra livelli di Hb e livelli di cellule T-regolatorie nei pazienti con AEA, un trial clinico sta valutando l'efficacia di basse dosi di IL-2 (noto agente in grado di favorire l'espansione delle cellule T-regolatorie in vitro) per via sottocutanea in pazienti con AEA da autoanticorpi caldi [83].

## CONCLUSIONI

Possiamo concludere che ad oggi sono disponibili numerose opzioni terapeutiche

emergenti per i pazienti con AEA. La maggior parte di esse sono in via di sviluppo clinico o preclinico e sono dirette a colpire tutti i momenti patogenetici di questa malattia. L'implementazione clinica di questi nuovi farmaci potrà presto cambiare la flow-chart terapeutica di questa malattia che seppur benigna è spesso di difficile gestione clinica. Infatti l'AEA è un modello di patologia particolarmente eterogenea, e tale eterogeneità rispecchia la complessità intricata della risposta immune che comprende il cross-talking tra cellule B e cellule T, la produzione di auto anticorpi e i meccanismi di fagocitosi e di rilascio citokinico. L'autoanticorpo è il principale fattore patogenetico in questa malattia, tuttavia il compartimento B-cellulare non può essere l'unico target terapeutico, in quanto altri meccanismi potrebbero prevalere e favorire la "fuga immune" con conseguente cronicizzazione e ricaduta della malattia. Inoltre, durante il follow-up clinico, un singolo meccanismo potrebbe diventare prevalente (umorale, cellulare, alterazione del microambiente) e andrebbe idealmente riconosciuto e bersagliato. È auspicabile che i nuovi farmaci, in particolare quelli diretti contro gli step finali della cascata emolitica (ad esempio gli inibitori del complemento e della fagocitosi), trovino un ruolo nello schema terapeutico dell'AEA, probabilmente negli stati iperacuti; al contempo, le terapie immunosoppressive e quelle che bersagliano il compartimento B e T cellulare sono molto interessanti per quanto riguarda l'utilizzo a lungo termine e l'induzione di una fase di lunga remissione della patologia. L'utilizzo dei nuovi farmaci non potrà prescindere dal riconoscimento e dall'accurata prevenzione delle tossicità, che richiedono un'attenta valutazione rischio/beneficio in questo ambito di benignità clinica. Infine, solo uno sforzo collettivo per la raccolta di dati prospettici e randomizzati in questa rara ed eterogenea malattia permetterà il corretto utilizzo, la giusta associazione e l'adeguata collocazione dei nuovi farmaci nella flow-chart terapeutica dell'AEA. Questo è particolarmente vero per le forme atipiche e di difficile diagnosi e gestione, che rappresentano al momento un bisogno insoddisfatto.

## REFERENZE

1. Petz LD, Garratty G. Immune Hemolytic Anemias. 2nd ed Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004.
2. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, et al. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients. *Blood*. 2014 Nov 6; 124(19):2930-6.
3. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis Markers*. 2015;2015:635670.
4. Fattizzo B, Zaninoni A, Nesa F, et al. Lessons from very severe, refractory, and fatal primary autoimmune hemolytic anemias. *Am J Hematol*. 2015 Aug;

- 90(8):E149-51.
5. Barcellini W. Current treatment strategies in autoimmune hemolytic disorders. *Expert Review of Hematology*. 2015;8(5):681–691.
  6. Berentsen S, Ulvestad E, Gjertsen BT, Hjorth-Hansen H, Langholm R, Knutsen H, et al. Rituximab for primary chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 37 courses of therapy in 27 patients. *Blood*. 2004;103:2925–8.
  7. Barcellini W, Zaja F, Zaninoni A, Imperiali FG, Battista ML, Di Bona E, et al. Low-dose rituximab in adult patients with idiopathic autoimmune hemolytic anemia: clinical efficacy and biological studies. *Blood*. 2012;119:3691–7.
  8. Birgens H, Frederiksen H, Hasselbalch HC, et al. A phase III randomized trial comparing glucocorticoid monotherapy versus glucocorticoid and rituximab in patients with autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2013;163:393-9.
  9. Berentsen S, Randen U, Vågan AM, et al. High response rate and durable remissions following fludarabine and rituximab combination therapy for chronic cold agglutinin disease. *Blood* 2010;116:3180-3184.
  10. Berentsen S, Randen U, Oksman M, et al. Bendamustine plus rituximab for chronic cold agglutinin disease: results of a Nordic prospective multicenter trial. *Blood*. 2017;130(4):537-541.
  11. Michel M, Terriou L, Roudot-Thoraval F, et al. A randomized and double-blind controlled trial evaluating the safety and efficacy of rituximab for warm autoimmune hemolytic anemia in adults (the RAIHA study). *Am J Hematol*. 2017;92(1):23-27.
  12. Salama A. Treatment Options for Primary Autoimmune Hemolytic Anemia: A Short Comprehensive Review. *Transfus Med Hemother*. 2015;42(5):294-301.
  13. Pendergrast J, Binnington B, Tong TN, et al. Incidence and Risk Factors for IVIG-Mediated Hemolysis. *Blood* 2017 130:2398. 59th annual meeting of the American Society of Hematology; 2017 Dec 9-12; Atlanta, GA.
  14. Fattizzo B, Zaninoni A, Giannotta JA, et al. Reduced 25-OH vitamin D in patients with autoimmune cytopenias, clinical correlations and literature review. *Autoimmun Rev*. 2016 Jul;15(7):770-5
  15. Salama A, Hartnack D, Lindemann HW, et al. The effect of erythropoiesis-stimulating agents in patients with therapy-refractory autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Med Hemother*. 2014;41:462–468.
  16. Garvey B. Rituximab in the treatment of autoimmune haematological disorders. *Br J Haematol* 2008;141(2):149-169.
  17. Barcellini W, Zanella A. Rituximab therapy for autoimmune haematological diseases. *Eur J Intern Med* 2011;22(3):220-229.
  18. Peñalver FJ, Alvarez-Larrán A, Díez-Martin JL, et al. Rituximab is an effective and safe therapeutic alternative in adults with refractory and severe autoimmune hemolytic anemia. *Ann Hematol*. 2010;89:1073–80.
  19. D’Arenà G, Laurenti L, Capalbo S, et al. Rituximab therapy for chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol*. 2006;81:598–602.
  20. Zecca M, Nobili B, Ramenghi U, et al. Rituximab for the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia in children. *Blood*. 2003;101(10):3857-61.
  21. Fu R, Yan S, Wang X, et al. A monocentric retrospective study comparing pulse cyclophosphamide therapy versus low dose rituximab in the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia in adults. *Int J Hematol*. 2016;104(4):462-7.
  22. Zaja F, Vianelli N, Sperotto A, et al. Anti-CD20 therapy for chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune diseases. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:1951–5.
  23. Maung SW, Leahy M, O’Leary HM, et al. A multi-center retrospective study of rituximab use in the treatment of relapsed or resistant warm hemolytic anemia. *Br J Haematol*. 2013;163:118–22.
  24. Laribi K, Bolle D, Ghnaya H, et al. Rituximab is an effective and safe treatment of relapse in elderly patients with resistant warm AIHA. *Ann Hematol*. 2016;95(5):765-9.
  25. Berentsen S, Ulvestad E, Langholm R, et al. Primary chronic cold agglutinin disease: a population based clinical study of 86 patients. *Haematologica*. 2006;91(4):460-6.
  26. Bocian H, Piatek C, Liebman HA, et al. Combination Treatment of Rituximab, Cyclophosphamide, and Dexamethasone for Warm Autoimmune Hemolytic Anemia. *Blood* 2016;128:4802.
  27. Mariette X, Rouanet S, Sibilia J, et al. Evaluation of low-dose rituximab for the retreatment of patients with active rheumatoid arthritis: a non-inferiority randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1508-14.
  28. Vazquez-Mellado A, Pequeño-Luévano M, Cantu-Rodríguez OG, et al. More about low-dose rituximab and plasma exchange as front-line therapy for patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology* 2016;21:311-6.
  29. Visentini M, Tinelli C, Colantuono S, et al. Efficacy of low-dose rituximab for the treatment of mixed cryoglobulinemia vasculitis: Phase II clinical trial and systematic review. *Autoimmun Rev* 2015;14:889-96.
  30. Zaja F, Vianelli N, Volpetti S, et al. Low-dose rituximab in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2010;85(4):329-334.
  31. Li Z, Mou W, Lu G, et al. Low-dose rituximab combined with short-term glucocorticoids up-regulates Treg cell levels in patients with immune thrombocytopenia. *Int J Hematol* 2011;93(1):91-98.
  32. Gómez-Almaguer D, Solano-Genesta M, Tarin-Arzaga L, et al. Low-dose rituximab and alemtuzumab combination therapy for patients with steroid-refractory autoimmune cytopenias. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4783-5.
  33. Barcellini W, Zaja F, Zaninoni A, et al. Sustained response to low-dose rituximab in idiopathic autoimmune hemolytic anemia. *Eur J Haematol*. 2013;91(6):546-51.
  34. Davies A, Merli F, Mihaljevic B, et al. Pharmacokinetics and safety of subcutaneous rituximab in follicular lymphoma (SABRINA): stage 1 analysis of a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2014; 15(3):343-52.
  35. Assouline S, Buccheri V, Delmer A, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of subcutaneous versus intravenous rituximab plus chemotherapy as treatment for chronic lymphocytic leukaemia (SAWYER): a phase 1b, open-label, randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet Haematol*. 2016; 3(3):e128-38
  36. Wolfrohm A, Mittaine B, Gandrille N, et al. Home Administration of Subcutaneous Rituximab Is Safe and Associated with Significant Cost Saving: A Single Center Experience. 59th annual meeting of the American Society of Hematology; 2017 Dec 9-12; Atlanta, GA.
  37. Iuliano F, Iuliano E, Perricelli A, et al. Rituximab Subcutaneous Formulation (SC-R) Is Safe, Effective and Cost-Saving in Patients Suffering from Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA). 58th annual meeting of the American Society of Hematology; 2016 Dec 3-6; San Diego, CA.
  38. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*. 2000;47(2-3):85-118.
  39. Miano M, Ramenghi U, Russo G. Mycophenolate mofetil for the treatment of children with immune thrombocytopenia and Evans syndrome. A retrospective data review from the Italian association of paediatric haematology/oncology. *Br J Haematol*. 2016;175(3):490-



- 495.
40. Howard J, Hoffbrand AV, Prentice HG, et al. Mycophenolate mofetil for the treatment of refractory auto-immune haemolytic anaemia and auto-immune thrombocytopenia purpura. *Mehta A. Br J Haematol.* 2002; 117(3):712-5.
41. Kotb R, Pinganaud C, Trichet C, et al. Efficacy of mycophenolate mofetil in adult refractory auto-immune cytopenias: a single center preliminary study. *Eur J Haematol.* 2005 Jul; 75(1):60-4.
42. Khandelwal P, Davies SM, Grimley MS, et al. Bortezomib for refractory autoimmunity in pediatrics. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(10):1654-9.
43. Mehta B, Mahadeo K, Zaw R, et al. Bortezomib for effective treatment of a child with refractory autoimmune hemolytic anemia post allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(12):2324-5.
44. Hosoba S, Jaye DL, Cohen C, et al. Successful treatment of severe immune hemolytic anemia after allogeneic stem cell transplantation with bortezomib: report of a case and review of literature. *Transfusion.* 2015;55(2):259-64.
45. Carson KR, Beckwith LG, Mehta J. Successful treatment of IgM-mediated autoimmune hemolytic anemia with bortezomib. *Blood.* 2010;115(4):915.
46. Danchaivijitr P, Yared J, Rapoport AP. Successful treatment of IgG and complement-mediated autoimmune hemolytic anemia with bortezomib and low-dose cyclophosphamide. *Am J Hematol.* 2011;86(3):331-2.
47. Rossi G, Paoloni F, Fattizzo B. Short Course of Bortezomib in Anemic Patients with Refractory or Relapsed Cold Agglutinin Disease. a Phase II Prospective Study By the Gimema Group. 59th annual meeting of the American Society of Hematology; 2017 Dec 9-12; Atlanta, GA.
48. Wouters D, Zeerleder S. Complement inhibitors to treat IgM-mediated autoimmune hemolysis. *Haematologica.* 2015;100(11):1388-95.
49. Parker CJ, Kar S, Kirkpatrick P. Eculizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(7):515-516.
50. Roth A, Huttman A, Rother RP, et al. Long-term efficacy of the complement inhibitor eculizumab in cold agglutinin disease. *Blood* 2009;113(16):3885-3886.
51. Gupta N, Wang ES. Long-term response of refractory primary cold agglutinin disease to eculizumab therapy. *Ann Hematol* 2014;93(2):343-344.
52. Hill A, Rother RP, Arnold L, et al. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica* 2010; 95(4):567-573.
53. Lindorfer MA, Pawluczko AW, Peek EM, et al. A novel approach to preventing the hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: both complement-mediated cytolysis and C3 deposition are blocked by a monoclonal antibody specific for the alternative pathway of complement. *Blood* 2010; 115(11):2283-2291.
54. Risitano AM, Notaro R, Pascariello C, et al. The complement receptor 2/factor H fusion protein TT30 protects paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes from complement-mediated hemolysis and C3 fragment. *Blood* 2012;119(26):6307-6316.
55. Hebecker M, Alba-Dominguez M, Roumenina LT, et al. An engineered construct combining complement regulatory and surface-recognition domains represents a minimal-size functional factor H. *J Immunol* 2013;191(2):912-921.
56. Zimmerman JL, Dellinger RP, Straube RC, et al. Phase I trial of the recombinant soluble complement receptor 1 in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2000;28(9):3149-3154.
57. Risitano AM, Ricklin D, Huang Y, et al. Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2014;123(13):2094-2101.
58. Grossi FV, Bedwell P, Deschatelets P, et al. APL-2, a Complement C3 Inhibitor for the Potential Treatment of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH): Phase I Data from Two Completed Studies in Healthy Volunteers. 58th annual meeting of the American Society of Hematology; 2016 Dec 3-6; San Diego, CA.
59. Clinicaltrials.gov [internet]. Study to Assess the Safety, Tolerability, Efficacy and PK of APL-2 in Patients With wAIHA or CAD. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03226678>.
60. Wouters D, Stephan F, Strengers P, et al. C1-esterase inhibitor concentrate rescues erythrocytes from complement-mediated destruction in autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 2013;121(7):1242-1244.
61. Shi J, Rose EL, Singh A, et al. TNT003, an inhibitor of the serine protease C1s, prevents complement activation induced by cold agglutinins. *Blood* 2014;123(26):4015-4022.
62. Botto M, Walport MJ. C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology* 2002; 205(4-5):395-406.
63. Jaeger U, D'Sa S, Schoergenhofer C, et al. Long Term Efficacy, Safety and PK/PD Profile of the Anti-C1s Antibody (BIVV009) in Primary Cold Agglutinin Disease Patients. 59th annual meeting of the American Society of Hematology; 2017 Dec 9-12; Atlanta, GA.
64. Rogers KA, Ruppert AS, Bingman A, et al. Incidence and description of autoimmune cytopenias during treatment with ibrutinib for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2016;30(2):346-50.
65. Rogers KA, Lehman AM, Cheney C, et al. Inhibitors of Bruton's Tyrosine Kinase Reduce Anti-Red Blood Cell Response in a Murine Model of Autoimmune Hemolytic Anemia. 58th annual meeting of the American Society of Hematology; 2016 Dec 3-6; San Diego, CA.
66. Cavazzini F, Lista E, Quaglia FM, et al. Response to ibrutinib of refractory life-threatening autoimmune hemolytic anemia occurring in a relapsed chronic lymphocytic leukemia patient with 17p deletion. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(11):2685-8.
67. Manda S, Dunbar N, Marx-Wood CR, et al. Ibrutinib is an effective treatment of autoimmune haemolytic anaemia in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2015;170(5):734-6.
68. Hampel PJ, Larson MC, Kabat B, et al. Autoimmune Cytopenias in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Treated with Ibrutinib. 59th annual meeting of the American Society of Hematology; 2017 Dec 9-12; Atlanta, GA.
69. Tsang M, Parikh SA. A Concise Review of Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017;12(1):29-38.
70. Newland A, Lee EJ, McDonald V, et al. Fostamatinib for persistent/chronic adult immune thrombocytopenia. *Immunotherapy.* 2018;10(1):9-25.
71. Clinicaltrials.gov [internet]. Phase 2, Multi-Center, Open Label, Simon Two-Stage Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Fostamatinib Disodium in the Treatment of Warm Antibody. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02612558>.
72. Blumberg L, Humphries JE, Lasseter KC, et al. SYNT001: A Humanized IgG4 Monoclonal Antibody That Disrupts the Interaction of FcRn and IgG for the Treatment of IgG-Mediated Autoimmune Diseases. 59th annual meeting of the American Society of Hematology; 2017 Dec 9-12; Atlanta, GA.
73. Clinicaltrials.gov [internet]. A Phase 1b, Multicenter,



- Open-Label, Safety, Tolerability, and Activity Study of SYNT001 in Subjects With Chronic, Stable Warm Autoimmune Hemolytic Anemia (WAIHA).** Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03075878>.
74. **Calkins CE.** Regulatory T cells essential to prevent the loss of self-tolerance in murine models of erythrocyte-specific autoantibody responses. *Immunol Res.* 2011;51(2-3):134-44.
  75. **Wong ASL, Richards AL, Hudson KE.** Tolerization of CD4+ Recent Thymic Emigrants Is Required to Prevent RBC-Specific Autoimmunity. 59th annual meeting of the American Society of Hematology; 2017 Dec 9-12; Atlanta, GA.
  76. **Zhou QN, Xing LM, Fu R, et al.** Count and function of CD8(+)CXCR3(+) regulatory T cells in peripheral blood of patients with autoimmune hemolytic anemia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2011 28;91(24):1687-90.
  77. **Ahmad E, Elgohary T, Ibrahim H.** Naturally occurring regulatory T cells and interleukins 10 and 12 in the pathogenesis of idiopathic warm autoimmune hemolytic anemia. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2011;21(4):297-304.
  78. **Fattizzo B, Zaninoni A, Gianelli U, et al.** Prognostic impact of bone marrow fibrosis and dyserythropoiesis in autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol.* 2017 Dec 23. doi: 10.1002/ajh.25020. [Epub ahead of print]
  79. **Osterborg A, Karlsson C, Lundin J.** Alemtuzumab to treat refractory autoimmune hemolytic anemia or thrombocytopenia in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2009;4(1):47-53.
  80. **Lauro A, Stanzani M, Finelli C, et al.** Alemtuzumab plus cyclosporine treatment of the autoimmune hemolytic anemia in an adult bowel transplant. *Case Rep Transplant.* 2014;2014:262953.
  81. **Park JA, Lee HH, Kwon HS, et al.** Sirolimus for Refractory Autoimmune Hemolytic Anemia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Case Report and Literature Review of the Treatment of Post-Transplant Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfus Med Rev.* 2016;30(1):6-14.
  82. **Jasinski S, Weinblatt ME, Glasser CL.** Sirolimus as an Effective Agent in the Treatment of Immune Thrombocytopenia (ITP) and Evans Syndrome (ES): A Single Institution's Experience. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2017;39(6):420-424.
  83. **Clinicaltrials.gov [internet].** Evaluating the Interest of Interleukine-2 for Patients With Active Warm Hemolytic Anemia Resistant to Conventional Treatment (ANEMIL). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02389231>.