



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Factors clínics i biològics  
associats a toxicitat en el tractament  
de la leucèmia limfoblàstica aguda pediàtrica**

Montserrat Mesegué Medà



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License**.

# **ESTUDI DE FACTORS CLÍNICS I BIOLÒGICS ASSOCIATS A TOXICITAT EN EL TRACTAMENT DE LA LEUCÈMIA LIMFOBLÀSTICA AGUDA PEDIÀTRICA**

Memòria de tesi doctoral presentada per:  
Montserrat Mesegué Medà

Per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

Dirigida per

Dra. Susana Rives Solà  
Hematòloga consultora  
Cap de la Unitat de Leucèmies i Limfomes  
Hospital Sant Joan de Déu

Dra. Mireia Camós Guijosa  
Hematòloga especialista sènior  
Laboratori d'Hematologia  
Hospital Sant Joan de Déu

Tutora

Dra. Ofelia Cruz Martínez  
Consultora en Oncologia Pediàtrica  
Unitat de Neuro-oncologia Pediàtrica. Cancer Center  
Hospital Sant Joan de Déu

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut



Gener de 2023




Barcelona, 25 de gener de 2023

**Autorització de les directores de tesi sobre la presentació del treball de tesi**

Les dres. Susana Rives Solà i Mireia Camós Guijosa, com a directores de la tesi doctoral titulada “Estudi de factors clínics i biològics associats a toxicitat en el tractament de la leucèmia limfoblàstica aguda pediàtrica” de la doctoranda Montserrat Mesegué Medà, confirmem la seva qualitat i rellevància clínica i autoritzem la seva presentació.

Atentament,



Dra. Susana Rives Solà



Dra. Mireia Camós Guijosa





A la meva mare, el meu pare i la meva padrina.

Al Liam.

Si camines sol, arribaràs ràpid. Si camines acompanyat, arribaràs més lluny.

I de fons sona Chopin, nocturn #20 en C menor.



## AGRAÏMENTS



A les meves directores de tesi, Susana Rives i Mireia Camós. Per la vostra confiança, per animar-me a començar (i sobretot, a continuar i acabar) aquesta tesi, per acompanyar-me, per tot el temps que m'heu regalat, per tot el que m'heu ensenyat a tots els nivells, per les vostres abraçades en tants formats diferents durant tots aquests anys. Mireia, gràcies per estructurar el meu món interior científic, per les teves revisions exhaustives que m'han ensenyat el valor de la feina ben feta, per la teva disponibilitat i per tot el que hem compartit tant dins com fora de l'hospital, gairebé tantes PCRs com converses. Susana, gràcies per tot el *carinyo* amb el que has revisat cada punt i cada coma d'aquest treball, pels teus consells, per ser-hi sempre, per haver-me pogut amarar gota a gota d'aquest *savoir faire* tan teu.

A les companyes del laboratori presents des de l'inici d'aquest treball; Camino, Seli, Rosa, Elena, Nerea, Emili i Justo; per les vostres mans, per la vostra paciència ensenyant-me la recepta secreta de les PCRs, pels vostres ànims incansables, pels vostres savis consells i per tot el que hem compartit més enllà. A la Teresa Toll i la Montse Torreadell, per tot el que he après de vosaltres i per haver-me fet sentir com a casa entre tantes rialles i "converses del lab". A la Susanna Gassiot, Edurne Sarrate, Sara Montesdeoca, Anna Monter i Nacho Isola.

A la Marta Batllori, per l'ajuda amb la tesi des de la teva experiència, per les trobades bianuals a l'Estudiantil, que son aliment per a l'ànima.

A l'Anna Alonso per haver-me ajudat amb l'estadística i per la teva companyia tots aquests anys des del primer dia de la residència.

A la resta de la família hematològica; Anna Ruiz, Mia, Rubén, Elisa, Albert, José Luís, Núria (la meva *partner in crime* en el món de l'asparaginasa), Vero, Anna Faura, Laura Arqués, Cris Rivera i Jesús Estella; per haver contribuït a que m'enamores de l'Hematologia, per tot el que m'heu ensenyat, pels vostres ànims, perquè la vostra manera de ser i de fer omple de llum el dia a dia. Muchas gracias Elisa por el tiempo que me regalaste y que me permitió dar el último empujón a este trabajo. A les companyes de l'equip de TPH; Maria, Júlia, Adriana, Isabel Badell i Montse Rovira.

A la Georgina Morón, pel teu saber escoltar i ser aigües en calma.

A totes les fellows amb qui he compartit camí durant aquests anys, en especial a l'Ana Jose i la Cris Larrosa. Muchas gracias por haber podido compartir con vosotras mis tesi-neuras (iy muchas otras!), por vuestra compañía y vuestro apoyo, por haberme mostrado vuestro mundo interior y exterior. Quin regal!

Al meu company de tesi, Juan Pablo. ¡Muchas gracias por acompañarme durante estos años! Finalmente podremos elevar un poco la mirada en el horizonte y cambiar la vista de la pantalla del ordenador con words y excels por la vista del espectáculo que esconde el espacio exterior a miles de años luz.

A l'equip d'infermeria i auxiliars de consultes externes, hospital de dia i planta. En especial a la Jessi, la Núria, la Cris Benedicto, la Georgina, la Meri, l'Eli, la Moni, la Yoli, la Montse, l'Ade i l'Helena. Per ser un exemple tractant sempre, siguin quines siguin les circumstàncies, amb professionalitat, cura i amor als nostres pacients.

A l'equip d'administratives, en especial a la Mariona Marsal, la Karina, la Pepi, la Vicky, la Lúdia, la Paula, l'Emma i el Dani. Per la vostra ajuda, la vostra disponibilitat i per la vostra voluntat de fer-ho tot fàcil. *Mr. Wolf (Pulp Fiction)* no té res a envejar-vos.

A l'equip de farmàcia; Mònica, Joelle, Ariadna (també *partner in crime* en l'asparaginasa), Ferran i Joan. Moltes gràcies per la vostra excel·lència i per la vostra predisposició a donar sempre un cop de mà.

A l'Edgar Zapico, per processar i analitzar les activitats d'asparaginasa de tots els nostres pacients, la teva contribució ha sigut clau en aquest treball. Per ser sempre tan accessible, per la teva immediatesa de resposta quan l'hem necessitat.

A la Sara Pérez-Jaume, per l'anàlisi estadístic, per fer alquímia convertint bases de dades indesxifrables en gràfics i conclusions en temps rècord. Per la teva ajuda amb les revisions i els re-anàlisis.

A l'Ofelia, per acceptar la tutoria d'aquesta tesi.

A tots els pacients i les seves famílies per tot el que he après d'ells a tants nivells, per ajudar-me a créixer, per regalar-me moments que guardo, al cap i al cor, com un tresor.

A les meves nenes de sempre, amb qui no recordem el moment en el que ens vam conèixer perquè, a aquella edat, encara no teníem capacitat de recordar: Natàlia, Elena (Melindret) i Vir.

A la Núria (Nurietes), per agafar-me de la mà des de fa tants anys i per compartir-me el prisma tan creatiu i genuí a través del qual veus el món.

A la Ro, perquè encara que l'òrbita de les nostres vides sigui el·líptica apropant-nos més o menys segons el punt del camí que estiguem transitant, d'una manera o altra sempre hi ets com un *ostinato*. Aquestes retrobades després d'un temps que em fan sentir que l'últim cop que ens vam veure va ser ahir.

A la Carmeta, per saber-te coixinet on poder deixar-me caure i descansar després de tants anys. Per la teva companyia constant mentre nosaltres i tot va canviant, re-coneixent-nos a cada pas.

A la Marta, la meva Mari. Per estar sempre pendent i disponible. Per obrir-me la porta de casa teva i del teu món. Per endolcir el meu dia a dia i emplenar-lo de complicitat vivint i aprenent.

A la meva mare i al meu pare. Per la vida, l'amor i el recolzament. Per ser-hi sempre, incondicionalment. Per aquest aprenentatge constant.

A la meva padrina Concepció. Per ser des de sempre la meva còmplice, per aquest vincle, per tot aquest amor que m'has donat sempre acompanyant-me d'una manera tan respectuosa. Que especial que ets per a mi!

Al Liam, *et à notre lune bleue*. Per la teva ajuda, la teva companyia i la teva mirada incansable durant tots aquests anys, mirant-nos de cara, de cantó i de reüll. Per l'amor en tants formats, per la il·lusió i per ser casa. Per aquest ball que és *bigger than*. Per fer-me tan feliç!

A aquesta tesi, que m'ha ensenyat a treballar la paciència i la constància, a enfocar els canvis de rumb amb una visió constructiva.

Al món de l'asparaginasa, sempre canviant i reinventant-se. Per ser un toc d'humilitat i relaxar l'ego. Un reflex fidel de la idea de impermanència, de canvi continu, com la vida mateixa.

A mi mateixa, per haver pogut destil·lar tants aprenentatges d'aquesta experiència.





AJUDES



### **Ajudes no institucionals**

He d'agrair de forma especial les ajudes constants del projecte "Força Miquel", sense les quals no hagués sigut possible desenvolupar aquest treball de tesi i que han permès desenvolupar una línia de recerca per prevenir i disminuir la toxicitat al tractament més enllà d'aquest treball. Vull agrair també les nombroses aportacions de famílies de pacients, particulars i empreses, a través de l'Obra Social de l'Hospital Sant Joan de Déu.



# ÍNDEX



# ÍNDEX

AGRAÏMENTS.....	7
AJUDES .....	13
ÍNDEX.....	17
I. GLOSSARI .....	27
II. ARTICLES QUE COMPONEN LA TESI .....	31
III. INTRODUCCIÓ.....	35
1. LEUCÈMIA AGUDA PEDIÀTRICA .....	37
2. SUPERVIVÈNCIA .....	39
3. TRACTAMENT.....	50
3.1 Mecanisme d'acció.....	52
3.2 Transplantament de progenitors hematopoètics (TPH) .....	53
3.3 Nous tractaments.....	54
3.3.1 Teràpies dirigides a una molècula diana.....	54
3.3.2 Immunoteràpia .....	55
4. TOXICITAT .....	59
4.1 Toxicitat específica de cada fàrmac .....	60
4.2 Disminució de la toxicitat (ponte di Legno).....	65
4.3 Supervivència lliure de toxicitat greu .....	65
4.4 Experiència reportada pels pacients .....	66
5. ASPARAGINASA.....	67
5.1 Formulacions.....	67
5.2 Supervivència .....	68
5.3 Toxicitat.....	70
5.3.1 Pancreatitis .....	70
5.3.2 Tromboembolisme venós .....	71
5.3.3 Hipersensibilitat .....	72
5.3.4 Toxicitat i factors biològics.....	77
IV. HIPÒTESI .....	83
V. OBJECTIUS .....	87
VI. MATERIAL I MÈTODES .....	91
VII. RESULTATS.....	101
VIII. DISCUSSIÓ.....	131
IX. CONCLUSIONS .....	147
X. BIBLIOGRAFIA .....	151



XI. ANNEX ..... 167

## ÍNDIX DE FIGURES I TAULES



# ÍNDIX DE FIGURES

**Figura 1.** Incidència del càncer infantil a Espanya a l'any 2020.

**Figura 2.** Distribució per edat de la incidència de leucèmia limfoblàstica aguda.

**Figura 3.** Supervivència global (SG) de pacients pediàtrics afectes de LLA segons l'any de tractament en la institució Saint Jude Children's Research Hospital (SJCRH).

**Figura 4.** Supervivència lliure d'esdeveniment (SLE) de pacients pediàtrics amb LLA segons l'any de tractament obtinguda amb els protocols successius de la SEHOP.

**Figura 5.** Supervivència lliure d'esdeveniment (SLE) en LLA-B pediàtrica en funció dels grups de risc citogenètics.

**Figura 6.** Supervivència lliure d'esdeveniment (SLE) en LLA segons l'edat al diagnòstic.

**Figura 7.** Distribució dels subtipus de LLA-B dins de cada grup d'edat.

**Figura 8.** Supervivència lliure d'esdeveniment (SLE) en LLA segons el subtipus biològic.

**Figura 9.** Distribució dels subtipus genètics de LLA.

**Figura 10.** Relació entre la malaltia residual mínima (MRM) i el risc de recaiguda en cada subtipus genètic de LLA.

**Figura 11.** Immunoteràpia en LLA.

**Figura 12.** Supervivència lliure de malaltia als 6 anys de seguiment en els pacients que van rebre un tractament d'intensificació amb ASP, i en els que no, dins del protocol d'estudi DFCI 77-01.

**Figura 13.** Toxicitat relacionada amb ASP en la LLA infantil en relació amb el polimorfisme de repetició en tàndem i els haplotips resultants en el gen *ASNS*.

**Figura 14.** Disseny *in house* dels primers per a la realització de l'estudi del gen *ASNS*.

**Figura 15.** Cromatogrames resultat de l'anàlisi de seqüenciació Sanger dels polimorfismes rs3757676.

**Figura 16.** Diagrama de flux del tractament rebut: esquema seqüencial *E. coli*-ASP nativa seguida de PEG-ASP vs. PEG-ASP com a única formulació.

**Figura 17.** Incidència acumulada d'al·lèrgia dels 126 pacients pediàtrics diagnosticats de leucèmia limfoblàstica aguda inclosos en l'estudi (A) i només dels pacients de risc intermedi (B).

**Figura 18.** Activitat d'asparaginasa de tots els pacients els dies 7 i 14 posteriors a l'administració de PEG-ASP 1.000 UI/ m<sup>2</sup> per via intramuscular.

**Figura 19.** Incidència acumulada de pancreatitis en els 126 pacients pediàtrics diagnosticats de leucèmia limfoblàstica aguda inclosos en l'estudi.

**Figura 20.** (A) Associació entre l'activitat d'asparaginasa (AAS) i l'amoní. (B) Associació entre AAS i albúmina. (C) Associació entre AAS i triglicèrids.

# ÍNDIX DE TAULES

**Taula 1.** Troballes rellevants de les últimes dues dècades en diferents protocols d'estudi de LLA.

**Taula 2.** Factors de risc en LLA pediàtrica.

**Taula 3.** Subtipus genètics en LLA i aproximació terapèutica.

**Taula 4.** Criteris per a la definició de recaiguda en LLA pediàtrica. (4.1) Recaiguda medul·lar (MRM disponible). (4.2) Recaiguda medul·lar (MRM no disponible). (4.3) Recaiguda a sistema nerviós central.

**Taula 5.** Mecanisme d'acció dels fàrmacs quimioteràpics.

**Taula 6.** Toxicitat específica de cada fàrmac.

**Taula 7.** Supervivència lliure de malaltia i supervivència lliure d'esdeveniment als 9 anys de seguiment en els pacients que van rebre un tractament d'intensificació amb ASP (ASP) i en els que no (NO ASP) dins del protocol d'estudi DFCI 77-01.

**Taula 8.** Polimorfismes en el gen *ASNS* en relació amb toxicitat relacionada amb asparaginasa.

**Taula 9.** Freqüència dels genotips del gen *ASNS* dels pacients analitzats i la seva freqüència esperada segons la base de dades Ensembl.

**Taula 10.** Característiques clíniques al diagnòstic, característiques biològiques i toxicitat dels 211 pacients pediàtrics afectes de LLA inclosos en l'estudi dividits segons el protocol de tractament rebut.

**Taula 11.** Distribució dels polimorfismes rs3757676 i rs3832526 en el gen *ASNS* en els 211 pacients pediàtrics afectes de LLA inclosos en l'estudi dividits segons protocol de tractament rebut.

**Taula 12.** Correlació entre els polimorfismes relacionats amb pancreatitis secundària a ASP i la incidència d'aquesta toxicitat en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

**Taula 13.** Correlació entre els polimorfismes relacionats amb al·lèrgia a ASP i la incidència d'aquesta toxicitat en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

**Taula 14.** Correlació entre variables clíniques i la incidència de pancreatitis en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

**Taula 15.** Regressió logística univariada entre pancreatitis i factors de risc clínics i biològics en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

**Taula 16.** Correlació entre variables clíniques i la incidència de pancreatitis en els pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.

**Taula 17.** Regressió logística univariada per a avaluar la correlació entre variables clíniques i biològiques i la incidència de pancreatitis en els pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.

**Taula 18.** Correlació entre variables clíniques i la incidència d'al·lèrgia clínica en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

**Taula 19.** Correlació entre el grup de risc i la incidència d'al·lèrgia clínica en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

**Taula 20.** Regressió logística univariada entre al·lèrgia clínica i factors de risc clínics i biològics en el global de pacients inclosos en l'estudi.

**Taula 21.** Regressió logística multivariada entre al·lèrgia clínica i factors de risc clínics i biològics en el global de pacients inclosos en l'estudi.

**Taula 22.** Correlació entre variables clíniques i la incidència d'al·lèrgia en els pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005.

**Taula 23.** Regressió logística univariada entre al·lèrgia clínica i factors de risc clínics i biològics en el grup de pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005.

**Taula 24.** Associació entre els diferents haplotips del gen *ASNS* (haplotip de risc, protector i altres) en el global de pacients.

**Taula 25.** Associació entre ètnia, toxicitats associades a ASP i factors clínics i biològics relacionats amb aquestes toxicitats.

**Taula 26.** Característiques clíniques al diagnòstic dels 126 pacients pediàtrics afectes de leucèmia limfoblàstica aguda inclosos en l'estudi.

**Taula 27.** Característiques de les reaccions al·lèrgiques relacionades amb l'administració d'asparaginasa.

## I. GLOSSARI





# GLOSSARI

AAS: activitat d'asparaginasa en sèrum  
ADN: àcid desoxiribonucleic  
AIEOP: *Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica*  
AR: alt risc  
ASNS: asparagin-sintetasa  
ASP: asparaginasa  
BFM: *Berlin-Frankfurt-Münster*  
CAR-T: *chimeric antigen receptor-modified T cells*  
CCG: *Children Cancer Group*  
CI: interval de confiança  
COG: *Children Oncology Group*  
CTCAE: *Common Terminology Criteria for Adverse Events*  
DCOG: *Dutch Childhood Oncology Group*  
DFCI: *Dana-Farber Cancer Institute*  
DMSO: Dimetilsulfòxid  
DTMP: desoxitimidina monofosfat  
ECG: electrocardiograma  
*E. coli*-ASP nativa: asparaginasa d'*Escherichia coli* nativa  
EMA: *European Medicines Agency*  
ETP: *Early T-cell precursor*  
EV: endovenós  
*Erwinia*-ASP: asparaginasa d'*Erwinia chrysanthemi*  
FDA: *US Food and Drug Administration*  
G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*  
GWAS: *Genome-Wide Association Studies*  
HSJD: Hospital Sant Joan de Déu  
IC: incidència acumulada  
IM: intramuscular  
IS: inactivació silent  
LALA: leucèmia aguda de línia ambigua  
LCR: líquid cefalorraquidi

LLA: leucèmia limfoblàstica aguda  
LLA-B: leucèmia limfoblàstica aguda de fenotip B  
LLA Ph+: leucèmia limfoblàstica aguda amb cromosoma Philadelphia  
LLA-T: leucèmia limfoblàstica aguda de fenotip T  
LMA: leucèmia mieloide aguda  
MAR: molt alt risc  
MRM: malaltia residual mínima  
NGS: *next generation sequencing*  
NOPHO: *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology*  
OR: *Odds ratio*  
PCR: proteïna C reactiva  
PEG-ASP: asparaginasa d'*Escherichia coli* polietilè glicolat  
PETHEMA: Protocolo para el Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas  
POG: *Pediatric Oncology Group*  
PREM: *patient-reported experience measure*  
PRO: *patient-reported outcome*  
PROM: *patient-reported measure*  
PdL: *Ponte di Legno Consortium*  
PTWG: *Ponte di Legno Toxicity Working Group*  
RE: risc estàndard  
RI: risc intermedi  
RC: remissió completa  
scFV: regió variable de cadena única de les immunoglobulines  
SEHOP: Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas  
SG: supervivència global  
SIADH: síndrome de secreció inadequada d'hormona antidiürètica  
SJCRH: *Saint Jude Children's Research Hospital*  
SLE: supervivència lliure d'esdeveniment  
SLTG: supervivència lliure de toxicitat greu  
SNC: sistema nerviós central  
TEV: tromboembolisme venós  
TPH: transplantament de progenitors hematopoiètics  
TPMT: tiopurinmetiltransferasa  
VP-16: etopòsid

## II. ARTICLES QUE COMPONEN LA TESI



Tesi en format clàssic amb un treball no publicat i 1 article annexat. Els dos treballs s'enfoquen en l'estudi de factors de toxicitat al tractament de la leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) pediàtrica.

**Treball 1:** Estudi de factors clínics i biològics associats a toxicitat en el tractament de la LLA pediàtrica.

**Treball 2:** Estudi de la incidència d'al·lèrgia clínica a l'asparaginasa (ASP) en una sèrie de pacients pediàtrics amb LLA tractats amb el mateix protocol terapèutic i emprant diferents formulacions i esquemes d'administració del fàrmac. Treball publicat en forma d'article: **Mesegué M**, Alonso-Saladrigues A, Pérez-Jaume S, et al. Lower incidence of clinical allergy with PEG-asparaginase upfront *versus* the sequential use of native *E. coli* asparaginase followed by PEG-ASP in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol.* 2021;39(5):687-696. Factor impacte 4,850, quartil 2, àrea de coneixement Hematologia.



### III. INTRODUCCIÓ

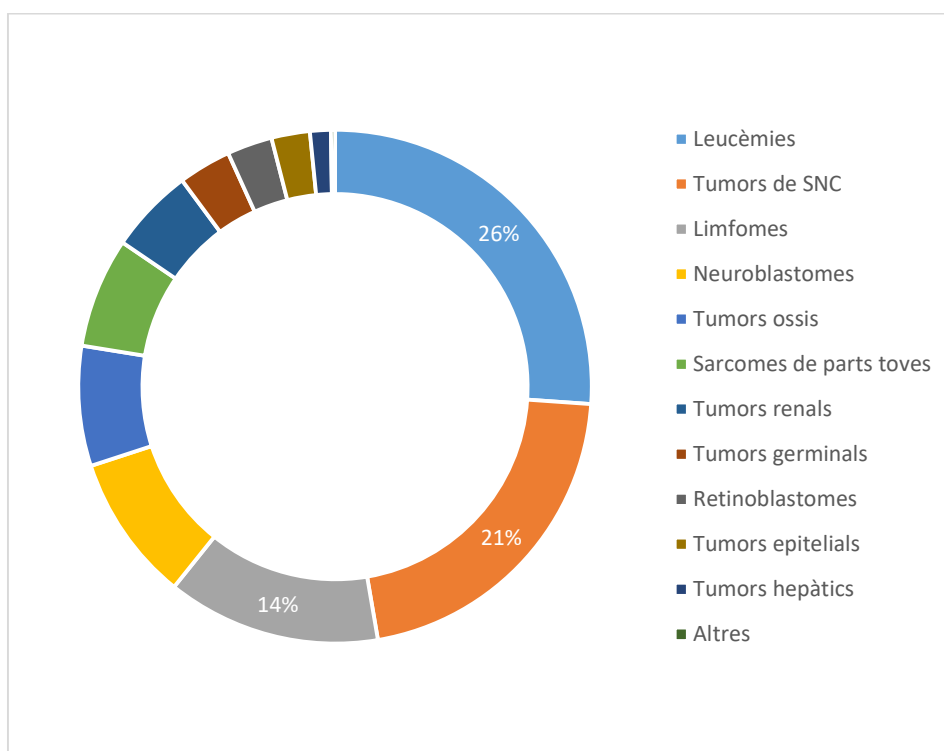




## 1. LEUCÈMIA AGUDA PEDIÀTRICA

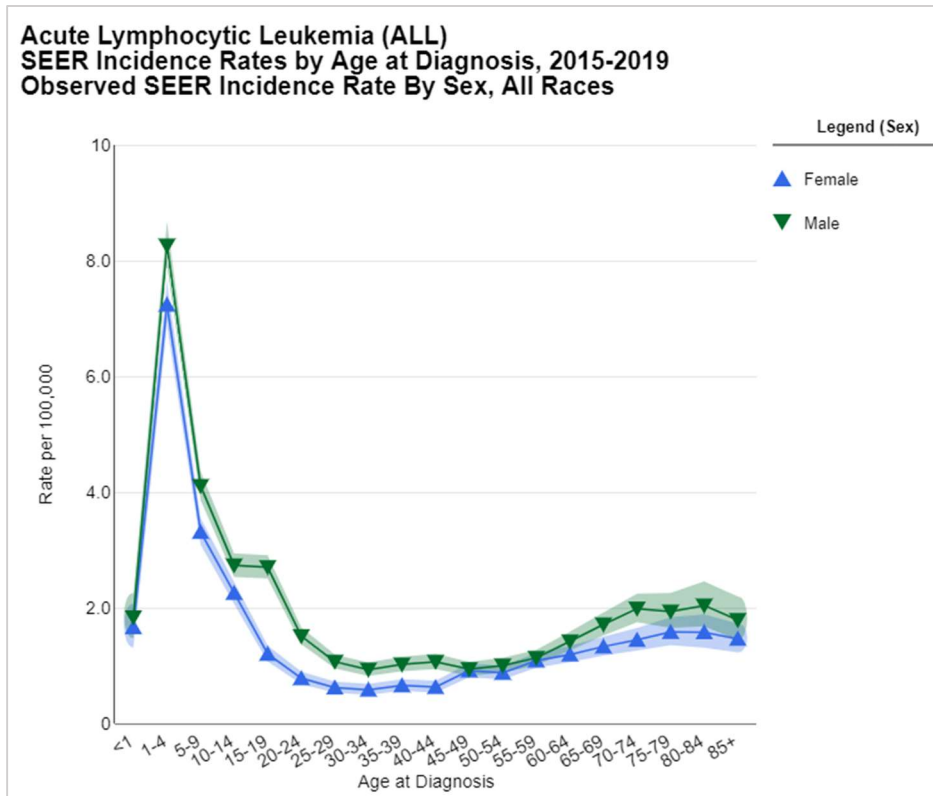
La leucèmia aguda és una malaltia neoplàsica caracteritzada per l'expansió clonal de cèl·lules malignes originades a partir de cèl·lules progenitores hematopoètiques de línia limfoide (leucèmia limfoblàstica aguda, LLA) o mieloide (leucèmia mieloide aguda, LMA). La LLA es classifica en LLA-B o LLA-T segons el seu immunofenotip. L'immunofenotip més freqüent és la LLA-B i representa el 85% dels casos pediàtrics, tot i que aquest percentatge pot variar en funció de l'edat al diagnòstic o l'ètnia(1). En una proporció infreqüent de casos (1-5%) la leucèmia aguda és de línia ambigua (LALA). La LALA inclou els casos amb fenotip complex amb múltiples llinatges leucèmics de forma simultània, ja sigui com a poblacions cel·lulars diferents o com una sola població que expressa diferents característiques, i les leucèmies indiferenciades(2).

La LLA és el càncer pediàtric més freqüent i representa aproximadament el 25% dels càncers diagnosticats en l'edat pediàtrica(1), tal i com mostra la figura 1.



**Figura 1.** Incidència del càncer infantil a Espanya a l'any 2020. Figura realitzada a partir de les dades publicades en el registre RETI-SEHOP(3) de la incidència del càncer infantil a Espanya a l'any 2020.

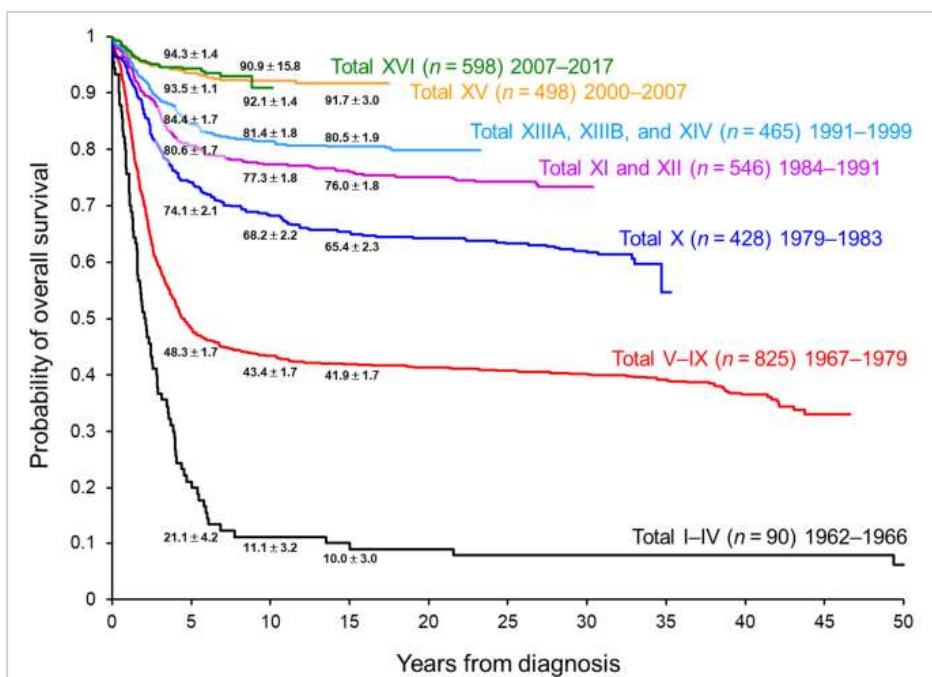
La **incidència** de la LLA pediàtrica és de 36,2 casos/1.000.000 habitants l'any, amb un pic d'edat entre els 2 i els 5 anys(1) (veure figura 2).



**Figura 2.** Distribució per edat de la incidència de leucèmia limfoblàstica aguda. Extret de National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End results program (SEER) explorer(4).

## 2. SUPERVIVÈNCIA

La supervivència dels pacients pediàtrics afectes de LLA ha augmentat de forma molt important en les últimes dècades gràcies a una millor estratificació dels pacients en grups de risc, l'adaptació de la intensitat del tractament quimioteràpic per a cada cas segons el seu risc de recidiva i la millora en el tractament de suport (p.e.: tractament i profilaxi de les infeccions). Actualment la taxa de supervivència als 5 anys dels pacients pediàtrics afectes de LLA en països de renda alta supera el 90%(1,5) (veure figura 3).



**Figura 3.** Supervivència global (SG) de pacients pediàtrics afectes de LLA segons l'any de tractament en la institució Saint Jude Children's Research Hospital (SJCRH)(1).

Un altre factor que ha contribuït en gran part a aconseguir aquesta alta taxa de supervivència són les millores en les noves combinacions de fàrmacs i esquemes quimioteràpics. Molts d'aquests fàrmacs ja eren coneguts des de fa dècades. De forma empírica, i dins del marc de protocols internacionals, s'han anat introduït canvis en els esquemes quimioteràpics basats en els resultats d'estudis comparatius amb cohorts històriques i assajos clínics aleatoritzats(6). La creació de grans grups cooperatius nacionals i internacionals per a l'estudi i tractament de la LLA ha sigut clau per a avançar gràcies a l'aplicació de protocols en el context d'assaigs clínics.

Algunes de les troballes rellevants en les últimes dues dècades en els diferents protocols d'estudi de LLA son les següents. En el protocol de la *Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica* (AIEOP)/*Berlin-Frankfurt-Münster* (BFM) ALL 2000 s'evidencià que l'administració de dexametasona en inducció, en canvi de prednisona, no aporta beneficis en termes de supervivència exceptuant el subgrup de pacients amb LLA-T i bona resposta a prednisona.

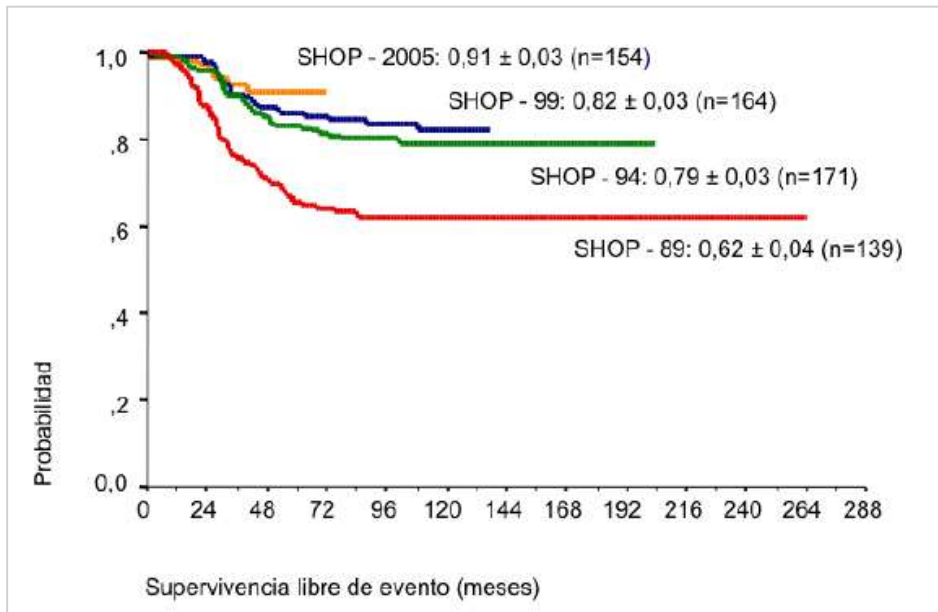
Els resultats del protocol COG AALL0331 van mostrar que, en els pacients de risc estàndard (RE), una intensificació de la consolidació no millora el pronòstic. El *Dana-Farber Cancer Institute* (DFCI) *ALL Consortium protocol 05-001* confirmà que ambdues vies d'administració d'asparaginasa pegilada (PEG-ASP), endovenosa (ev) i intramuscular (im), presenten un perfil similar d'eficàcia i de toxicitat. L'adaptació de la intensitat del tractament en funció dels nivells de malaltia residual mínima (MRM) pot millorar els resultats i ha estat útil en diversos protocols com el DCFI, DCOG entre altres(5) (veure taula 1).

Study	Years of study	
AIEOP/BFM ALL 2000	2000-2006	Dexamethasone in induction resulted in less relapse but more treatment-related mortality than did prednisone. There was no survival benefit with dexamethasone except for T-ALL patients with good prednisone response.
COG AALL0232	2004-2011	5-y EFS and OS were better with HD-MTX than with C-MTX. Patients aged 1-9 y who received dexamethasone and HD-MTX had better outcomes than those in other groups.
COG AALL0331	2005-2010	SR patients had excellent outcomes. Adding intensified consolidation did not improve outcomes in patients with SR-average disease.
COG AALL0434	2007-2014	5-y DFS and OS were better with C-MTX than with HD-MTX.
DFCI ALL Consortium Protocol 05-001	2005-2010	IV PEG-asparaginase had similar toxicity and efficacy and resulted in less anxiety when compared with IM native <i>E. coli</i> asparaginase.
DCOG ALL10	2004-2012	MRD-based therapy reduction and intensification were successful.
MRC UK ALL 2003	2003-2011	MRD-based therapy reduction and intensification were successful.
NOPHO ALL2008	2008-2014	Pediatric-based protocol is tolerable and effective for young adults.
SJCRH Total XVI	2007-2017	Additional intrathecal therapy during early induction improved CNS control (any CNS relapse at 5-y: 1.5%).

AIEOP/BFM: Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica/Berlin-Frankfurt-Münster; ALL: acute lymphoblastic leukemia; B: B-lineage; CI: confidence interval; CNS: central nervous system; C-MTX: Capizzi methotrexate; COG: Children's Oncology Group; DCOG: Dutch Childhood Oncology Group; Dex: dexamethasone; DFCI: Dana-Farber Cancer Institute; DFS: disease-free-survival; EFS: event-free survival; HD-MTX: high-dose methotrexate; HCT: hematopoietic cell transplantation; HR: high-risk; IM: intramuscular; IR: intermediate-risk; IV: intravenous; k.  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ; LR: low-risk; MRC UK: Medical Research Council United Kingdom; MRD: minimal residual disease; MTX: methotrexate; n: number; NA: not available; NOPHO: Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology; OS: overall survival; PEG: polyethylene glycol; Pred: prednisolone; pts: patients; R: randomization; SE: standard error; SER: slow early response; SJCRH: St. Jude Children's Research Hospital; SR: standard-risk; T: T-lineage; WBC: white blood cell; y: year.

**Taula 1.** Troballes rellevants en les últimes dues dècades en els diferents protocols d'estudi de LLA. Taula adaptada de (5).

A Espanya, l'aplicació dels diversos protocols terapèutics consecutius dins el context de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas (SEHOP), també s'ha traduït en un increment progressiu de la supervivència global (SG) i lliure d'esdeveniment (SLE) (veure figura 4).



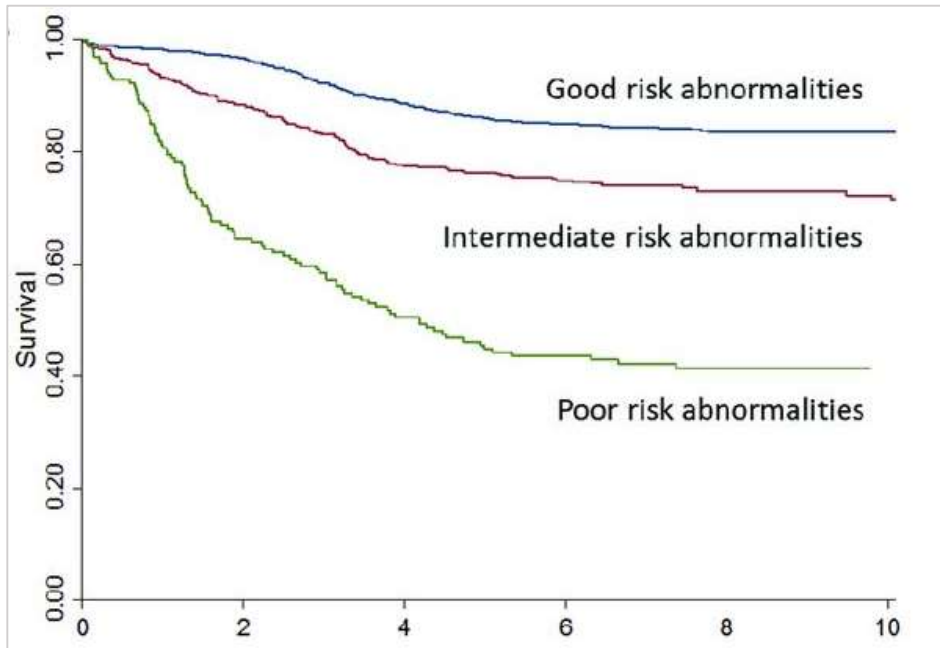
**Figura 4.** Supervivència lliure d'esdeveniment (SLE) de pacients pediàtrics amb LLA segons l'any de tractament obtinguda amb els protocols successius de la SEHOP. Extret de la guia Recomendaciones terapéuticas LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 Versión 2.0 (09.10.2014). Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. [internet](7).

Donades les altes taxes actuals de SG, aconseguir una millora encara més gran en el pronòstic utilitzant la quimioteràpia convencional és tot un repte. De fet, si comparem les taxes de SG als 5 anys de dos dels protocols de tractament de referència més recents (*St. Jude Total Therapy XV i XVI*), no es troba milloria (93,5% vs. 94,1% respectivament)(8,9).

La intensitat terapèutica dels règims quimioteràpics actuals ha arribat al límit de la tolerància. Per tant, una major intensificació de la quimioteràpia convencional només comportaria un mínim increment en la supervivència a expenses d'un augment dels efectes adversos o, fins i tot, cap millora degut a l'augment de mortalitat secundari a la toxicitat. Com a estratègies prometedores per a millorar el pronòstic d'aquests pacients, recentment han aparegut diverses teràpies dirigides a nivell molecular i nous tractaments basats en immunoteràpia. Per a poder optimitzar l'ús d'aquests nous tractaments són imprescindibles la caracterització genètica detallada de les cèl·lules leucèmiques i l'avaluació de la resposta al tractament personalitzada mitjançant la determinació dels nivells de MRM.

## Estratificació

Els protocols de tractament quimioteràpic actuals estratifiquen als pacients dins dels diferents grups de risc en funció de factors clínics (p.e.: edat 1-9,9 anys vs. < 1 any o > 10 anys), xifra de leucòcits al debut (<50.000/mm<sup>3</sup> vs. >50.000/mm<sup>3</sup>), característiques citogenètiques i genòmiques dels blasts i la resposta al tractament avaluada mitjançant la MRM(1) (veure figura 5).



**Figura 5.** Supervivència lliure d'esdeveniment (SLE) en LLA-B pediàtrica en funció dels grups de risc citogenètics(10).

L'edat (< 1 any ó ≥ 10 anys d'edat), la xifra de leucòcits (≥20 ó ≥50 x 10<sup>9</sup>/L segons el protocol), la raça (hispanics i negres), el sexe masculí, el llinatge T, la infiltració del sistema nerviós central (SNC) i els pacients afectes de síndrome de Down són factors de mal pronòstic (taula 2), tot i que el seu efecte pot estar matisat pels nous esquemes quimioteràpics i un millor tractament de suport.

Factor	Better	Worse
<b>Patient and clinical characteristics</b>		
Age at diagnosis	1 to <10 years	<1 year or ≥10 years
Sex	Female	Male
Race	Caucasian, Asian	African American, Hispanic
Down syndrome	No	Yes
WBC counts at diagnosis	<50 × 10 <sup>9</sup> /L	≥50 × 10 <sup>9</sup> /L
CNS involvement at diagnosis	CNS 1	CNS 2 and CNS 3, traumatic tap with blasts
Testicular involvement	No	Yes
Immunophenotype	B-ALL	T-ALL
<b>Cytogenetic and genetics</b>		
	High hyperdiploidy (51-65 chromosomes) <i>ETV6-RUNX1</i> : t(12;21)(p13.2;q22.1) <i>NUMT1</i> rearrangement	Hypodiploidy (<44 chromosomes) <i>KMT2A</i> rearrangement: t(v;11q23.3) <i>BCR-ABL1</i> : t(9;22)(q34.1;q11.2) (Ph+) <i>BCR-ABL1</i> -like (Ph-like) <i>TCF3-HLF</i> : t(17;19)(q22;p13) <i>MEF2D</i> rearrangement iAMP21 <i>BCL2</i> or <i>MYC</i> rearrangements
Minimal residual disease	Negative Continuously decreasing and becoming negative	Positive Increasing and/or persistently positive while monitored

WBC: white blood cell; CNS: central nervous system; ALL: acute lymphoblastic leukemia; Ph: Philadelphia chromosome.

Taula 2. Factors de risc en LLA pediàtrica. Taula adaptada de (5).

El principal factor pronòstic clínic és l'edat. Els pacients entre 1 i 10 anys conformen el grup de millor pronòstic, mentre que el risc de recaiguda és més elevat en adolescents i lactants menors d'un any (figura 6).

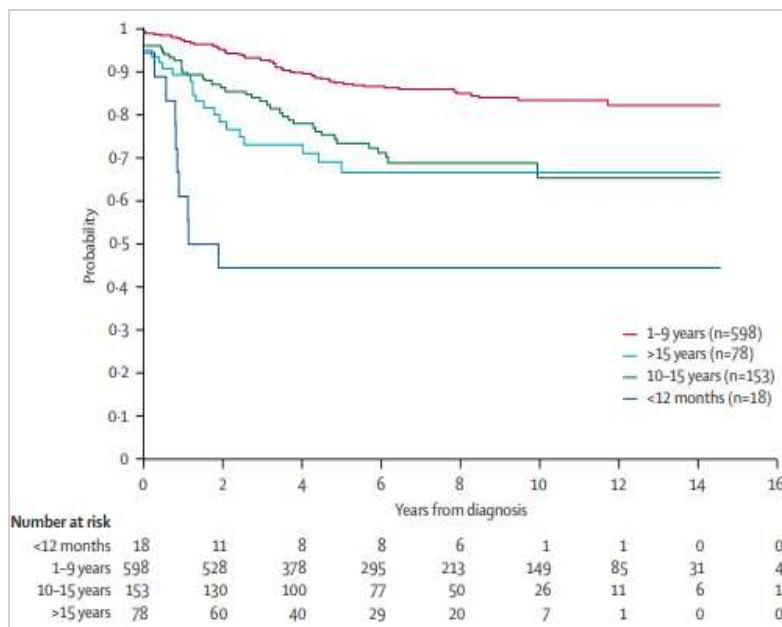


Figura 6. SLE en LLA segons l'edat al diagnòstic(11).



La diferència en la supervivència entre pacients menors de 10 anys i els adolescents pot explicar-se per les diferents característiques genètiques de la leucèmia: els pacients adolescents tenen una major incidència d'alteracions biològiques d'alt risc (reordenament *BCR::ABL1*, *LLA-T*, etc.) i una menor incidència d'alteracions biològiques favorables (alta hiperdiploidia, *t(12;21)/ETV6::RUNX1*)(5,12), (figures 7 i 8). D'altra banda, els pacients entre 1 i 10 anys tenen una millor tolerància al tractament.

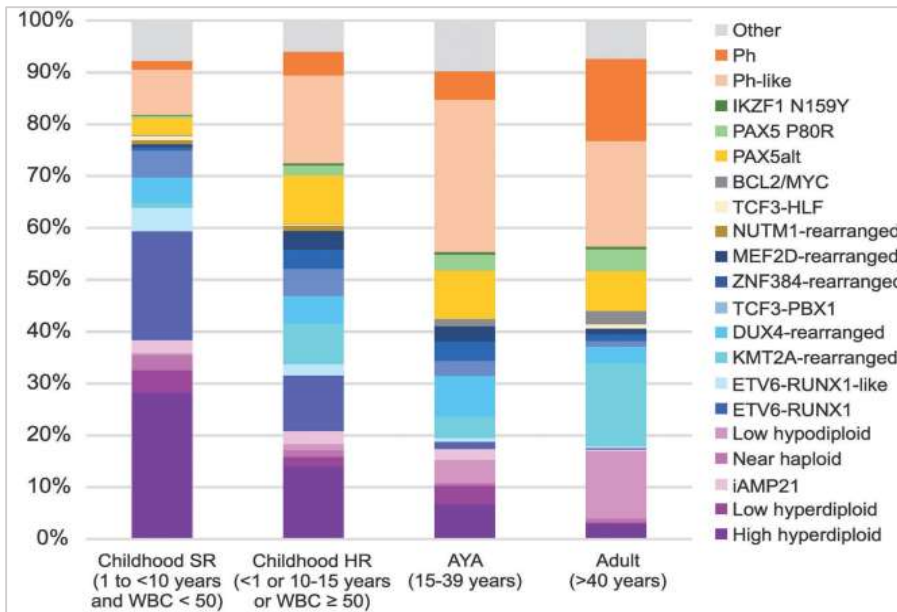


Figura 7. Distribució dels subtipus de LLA-B dins de cada grup d'edat(5).

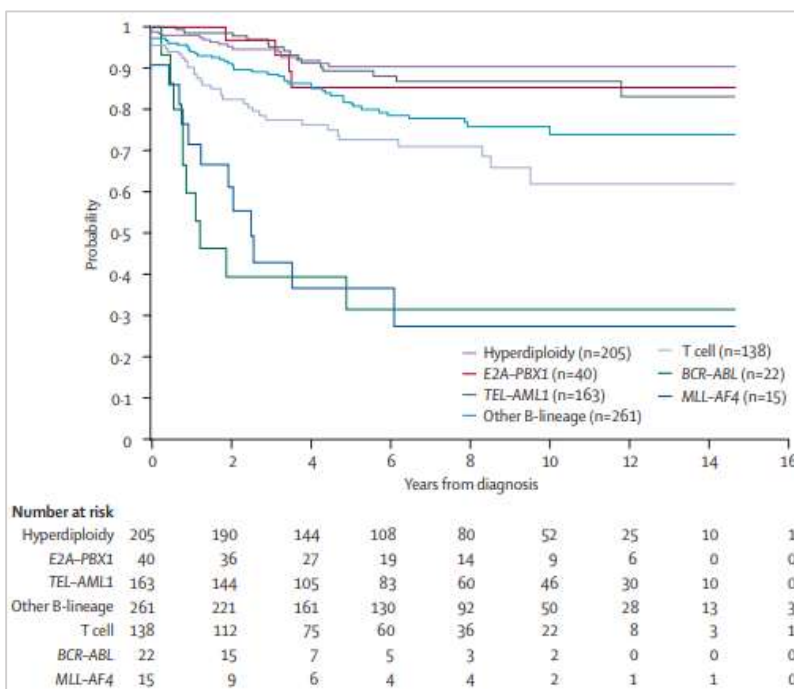


Figura 8. Supervivència lliure d'esdeveniment (SLE) en LLA segons el subtipus biològic(11).

Gràcies als estudis genòmics, la LLA pediàtrica s'ha subdividit en més de 30 subgrups genètics amb importància pronòstica. En la LLA-B els subtipus genòmics més freqüents són les aneuploïdies (hiperdiploïdia amb més de 50 cromosomes o hipodiploïdia amb menys de 40 cromosomes) i els reordenaments genètics (gens de fusió *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *BCR::ABL1* i el reordenament de *KMT2A* (*MLL*). En els últims anys s'han descrit noves alteracions genètiques amb pronòstic definit, algunes de les quals ja s'han incorporat als protocols terapèutics actuals per estratificar els pacients. Algunes d'elles són les LLA *BCR::ABL1*-like o LLA Ph-like, l'amplificació intracromosòmica del cromosoma 21 (iAMP21), els reordenaments de *DUX4*, *ZNF384*, *MEF2D*, *PAX5*, *NUTM1* i les LLA *ETV6::RUNX1*-like. Existeixen diverses alteracions genètiques que es poden detectar en la LLA-T però, fins al moment, no s'ha descrit una associació clara amb el pronòstic o són alteracions en les que la seva relació amb el pronòstic depèn del protocol de tractament utilitzat(13,14) (figura 9).

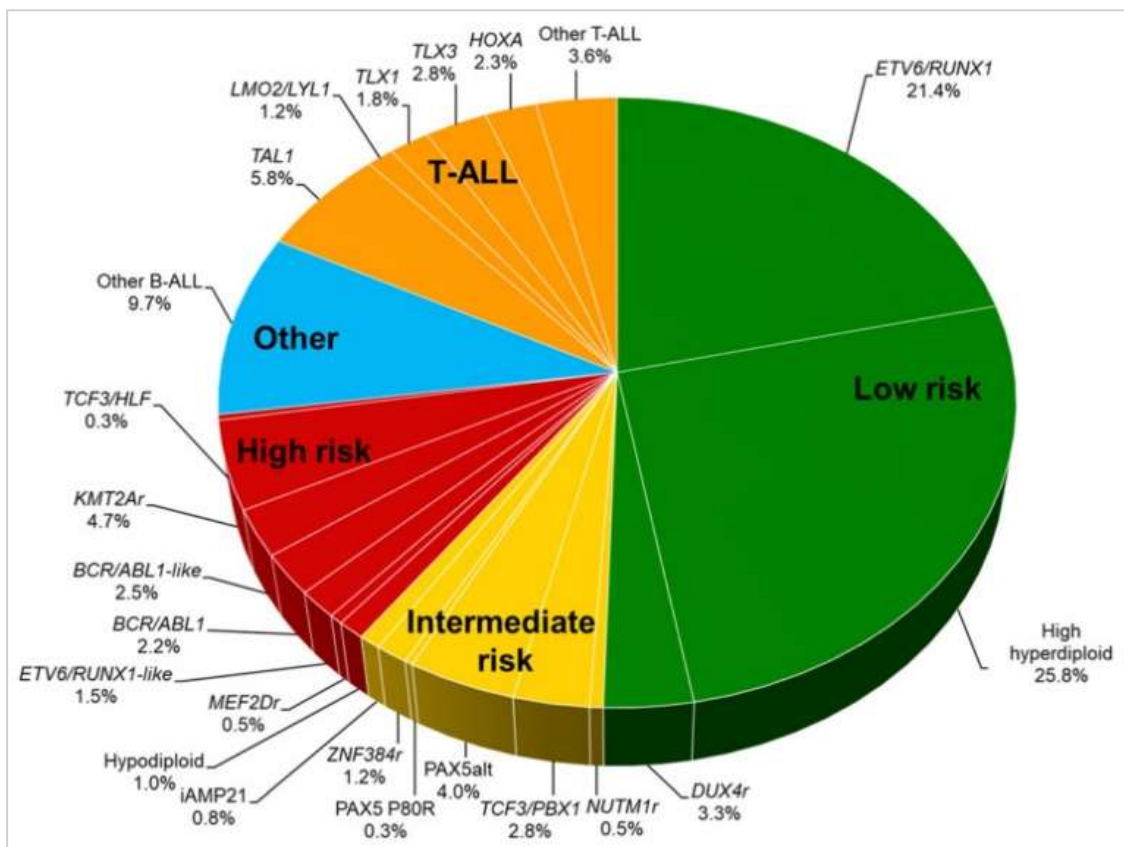


Figura 9. Distribució dels subtipus genètics de LLA(1).

La caracterització de les alteracions genètiques en les cèl·lules blàstiques permet la identificació d'alteracions de mal pronòstic i la possibilitat d'incorporar el tractament amb teràpies dirigides a nivell molecular per a reduir el risc de recaiguda (taula 3).

Category	Characteristics	Therapeutic Approach
<b>B-lymphoblastic leukemia</b>		
<b>Low-risk genetics</b>		
<i>ETV6/RUNX1</i>	Excellent prognosis	Reduction of intensity, MRD based
Hyperdiploidy	Excellent prognosis	Reduction of intensity, MRD based
<i>DUX4</i> -rearranged	Most have focal <i>ERG</i> deletions and favorable outcome despite <i>IKZF1</i> alterations	Standard dose intensity, MRD based
<b>Intermediate-risk genetics</b>		
<i>TCF3/PBX1</i>	Higher incidence in African Americans, cytoplasmic $\mu$ -chain	Standard dose intensity, MRD based, intensive intrathecal therapy
PAX5alt	<i>PAX5</i> fusions, mutation, or amplifications	Standard dose intensity, MRD based
PAX5 p.Pro80Arg	Frequent signaling pathway alterations	Standard dose intensity, MRD based, JAK inhibitors
<i>ZNF384</i> -rearranged	Peak age and prognosis vary by fusion partner, expression of myeloid markers	Standard dose intensity, MRD based
iAMP21	Additional copies of chromosome 21, worse outcome with low-intensity therapy	Intensification of therapy
<i>NUTM1</i> -rearranged *	Rare; more common in infants, excellent prognosis	Standard dose intensity, MRD based
<b>High-risk genetics</b>		
Near-haploid	24–31 chromosomes, Ras-activating mutations, inactivation of <i>IKZF3</i>	Intensification of therapy, MRD based, BCL-2 inhibitors
Low-hypodiploid	32–39 chromosomes, <i>TP53</i> mutations (somatic and germline)	Intensification of therapy, MRD based, BCL-2 inhibitors
<i>BCR/ABL1</i>	Prognosis improved with ABL1 inhibitors, common deletions of <i>IKZF1</i>	ABL1 inhibitors, BCL-2 inhibitors
<i>BCR/ABL1</i> -like; JAK-STAT activating mutation	<i>CRLF2</i> rearranged ( <i>IGH-CRLF2</i> , <i>P2RY8-CRLF2</i> ), <i>JAK1/2</i> , <i>EPOR</i> , <i>IL7R</i> , <i>SH2B3</i> mutation	JAK inhibitors, BCL-2 inhibitors
<i>BCR/ABL1</i> -like; <i>ABL1</i> -class	Kinase-activating lesions, potentially amenable to kinase inhibition	ABL1 inhibitors, BCL-2 inhibitors
<i>KMT2A (MLL)</i> -rearranged	Common in infant ALL, few cooperating mutations	DOT1L inhibitors, menin inhibitors, proteasome inhibitors, histone deacetylase inhibitors, BCL-2
<i>MEF2D</i> -rearranged	Mature B cell leukemia morphology, cytoplasmic $\mu$ -chain	Histone deacetylase inhibitors, proteasome inhibitors
<i>TCF3-HLF</i>	Rare; dismal prognosis	BCL-2 inhibitors
<i>ETV6/RUNX1</i> -like *	Similar gene expression profile to <i>ETV6-RUNX1</i> but lacks fusion	Intensification of therapy, MRD based
<b>T-lymphoblastic leukemia</b>		
Non-early T-cell precursor	Deregulation of <i>TAL1</i> , <i>TAL2</i> , <i>LYL1</i> , <i>LMO1</i> , <i>LMO2</i> , <i>TLX1 (HOX11)</i> , <i>TLX3 (HOX11L2)</i> , and <i>HOXA</i> ; <i>NOTCH1</i> activating mutation	Standard dose intensity, MRD based, nelarabine, BCL-2 inhibitors
JAK-STAT activating mutation	Approximately 25% of patients with T-ALL	Standard dose intensity, MRD based, nelarabine, JAK inhibitors, BCL-2 inhibitors
<i>ABL1</i> fusions (e.g., <i>NUP214-ABL1</i> )	Fusion with <i>BCR</i> and <i>NUP214</i> , potentially amenable to tyrosine kinase inhibition	Standard dose intensity, MRD based, ABL1 inhibitors, nelarabine, BCL-2 inhibitors
Early T-cell precursor ALL	Mutations in transcriptional regulators, JAK-STAT and Ras signaling, and epigenetic modifiers	Standard dose intensity, MRD based, JAK inhibitors, BCL-2 inhibitors
* Newly identified subgroups, necessary to confirm their prognosis in a larger number of patients. Abbreviations: MRD, minimal residual disease; iAMP21, intrachromosomal amplification of chromosome 21; ALL, acute lymphoblastic leukemia.		

Taula 3. Subtipus genètics en LLA i aproximació terapèutica. Taula adaptada de (1).

Tot i que la caracterització genètica és essencial per a la estratificació en grups de risc, l'avaluació de la resposta al tractament mitjançant la MRM té un impacte important ja que és un dels principals factors pronòstics(15).

Aquest factor pronòstic engloba els factors inherents a la malaltia (biologia de la leucèmia), els factors de l'hoste (genètica del pacient) i el tractament rebut. La resposta al tractament es valora mitjançant la microscòpia òptica: la presència de blasts en sang perifèrica després de 8 dies de tractament amb prednisona o a la medul·la òssia després de 15 dies de tractament quimioteràpic. També es pot avaluar la resposta en termes de MRM amb mètodes més sensibles i específics, com la citometria de flux o tècniques de biologia molecular. La citometria de flux avalua la MRM mitjançant la identificació de l'immunofenotip aberrant de la leucèmia amb una elevada sensibilitat ( $1 \times 10^{-4}$  o superior). Les tècniques de biologia molecular, com la PCR quantitativa, avaluen la MRM estudiant el reordenament específic de cada pacient dels gens de les immunoglobulines i els receptors de cèl·lules T, o bé els transcrits dels gens de fusió si estan presents, amb una sensibilitat d' $1 \times 10^{-5}$ -  $1 \times 10^{-6}$ . L'avaluació de la MRM al final de la inducció o consolidació i en punts més tardans del tractament és el factor pronòstic més important(16,17). A més a més, en molts protocols, la MRM ha permès readaptar la intensitat del tractament en els diferents punts d'avaluació(15).

En els últims anys, les noves tecnologies d'alta complexitat com la *next generation sequencing* (NGS) s'han començat a implantar en l'estudi de la MRM en diferents grups cooperatius. La NGS té una sensibilitat de  $1 \times 10^{-5}$  o superior. Amb aquesta tecnologia, la MRM negativa al final d'inducció determinada mitjançant NGS s'ha associat amb una SG del 100% en pacients de risc estàndard(18).

Recentment, en un treball de consens entre diferents experts dels principals protocols internacionals en LLA, inclòs el grup espanyol SEHOP-PETHEMA, s'han incorporat les tècniques d'avaluació de MRM en els criteris de resposta al tractament, incorporant aquestes tècniques en les definicions de remissió i recaiguda de forma que, quan és possible, aquestes tècniques poden fins i tot substituir la definició clàssica de resposta citològica(19) (taula 4).

BM 1		BM 2†
Cytomorphology	Others	Cytomorphology
M3	Not necessary to define relapse	Not necessary to define relapse
M2	One other test* with ≥1% blasts	Not necessary to define relapse
M2	None	M2
M1	Two other tests* with ≥1% blasts	Not necessary to define relapse

† Second bone marrow evaluation ≥1 wk later.

\* FISH/karyotype/PCR demonstrating leukemia-specific marker.

BM 1		BM 2†
MRD	Others	MRD
≥25%	Not necessary to define relapse	Not necessary to define relapse
Five to <25%	One other test* with ≥1% blasts	Not necessary to define relapse
Five to <25%	None	Two tests* with ≥1% blasts
One to <5%	Two other tests* with ≥1% blasts	Not necessary to define relapse
One to <5%	Zero or 1 other test* with ≥1% blasts	Two tests* with ≥1% blasts

† Second bone marrow evaluation ≥1 wk later.

\* FCM/PCR/NGS-based MRD or FISH/karyotype/PCR demonstrating leukemia-specific marker or M2/M3 morphology.

CSF 1	CSF 2†	
Cytomorphology	Cytomorphology	Others
CNS3*	Not necessary to define relapse	Not necessary to define relapse
CNS2	CNS2	One other positive test

† Second CSF evaluation ≥1 wk later.

\* May be defined by cytomorphology, imaging, or biopsy.

**Legend for table 1, 2 and 3:**

BM: bone marrow, CNS: central nervous system, CSF: central spinal fluid, EM: extramedullary sites, FCM-MRD: flow cytometric minimal residual disease, FISH: fluorescence *in situ* hybridization, MRD: minimal residual disease, NGS-MRD: next generation sequencing minimal residual disease, PCR-MRD: polymerase chain reaction minimal residual disease.

**Taula 4.** Criteris per a la definició de recaiguda en LLA pediàtrica. Taula adaptada de (19).

**Taula 4.1.** Recaiguda medul·lar (MRM no disponible).

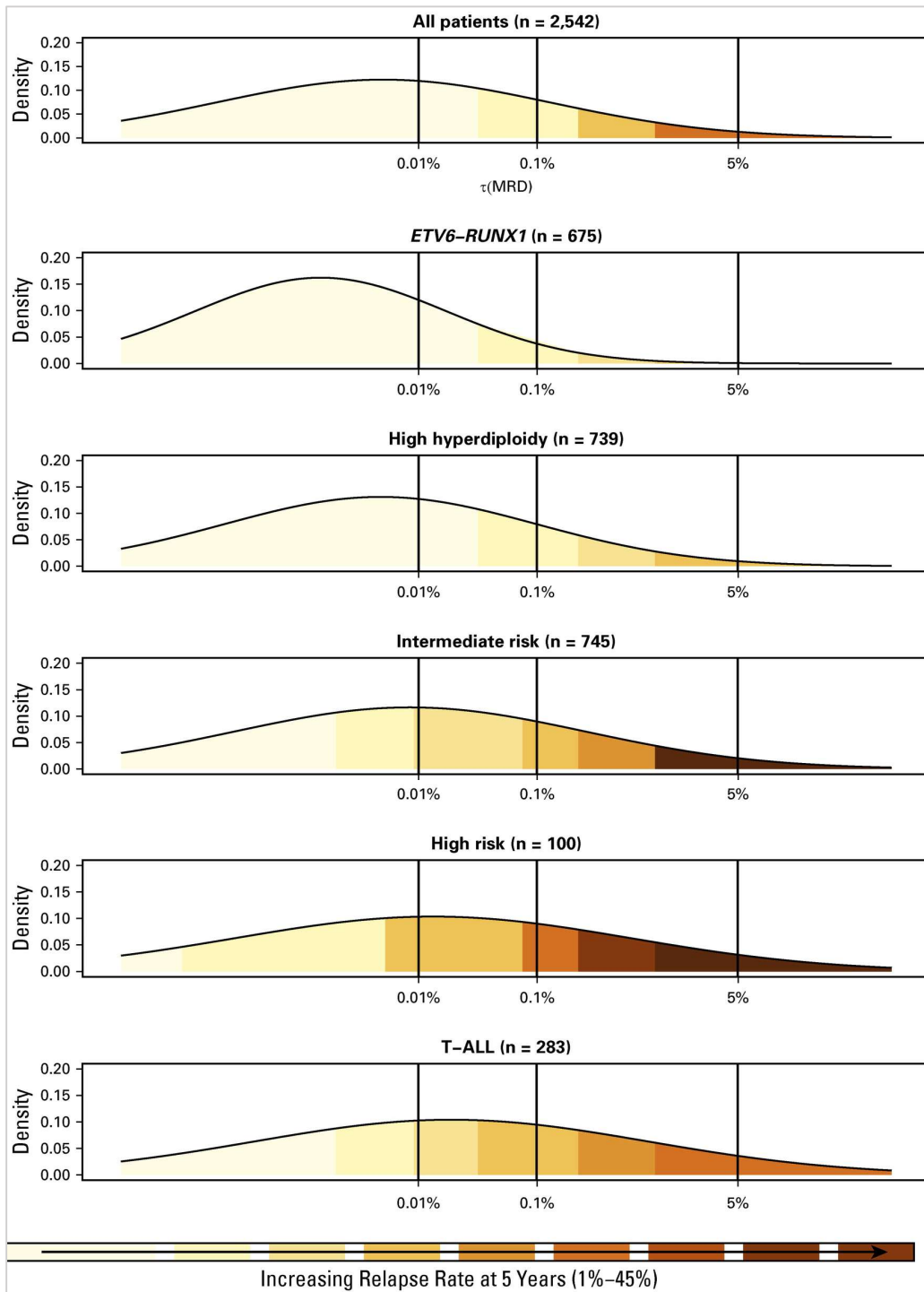
**Taula 4.2.** Recaiguda medul·lar (MRM disponible).

**Taula 4.3.** Recaiguda a sistema nerviós central.

En pacients pediàtrics afectes de LLA que han rebut un transplantament al·logènic de progenitors hematopoiètics (al·lo-TPH), una MRM negativa pre al·lo-TPH i la MRM negativa post al·lo-TPH s'han associat de forma significativa amb un nombre menor de recaigudes i una millor supervivència(20). De la mateix manera, els pacients que presenten una MRM per NGS negativa post teràpia amb *chimeric antigen receptor-modified T cells* (CAR-T) tenen un millor pronòstic comparat amb aquells amb MRM positiva(21,22).

A l'hora de considerar l'estratificació en grups de risc, s'ha de considerar la MRM juntament amb la classificació genètica i els factors clínics (edat, xifra de leucòcits al diagnòstic, immunofenotip). Els pacients amb alteracions genètiques de bon pronòstic solen negativitzar la MRM més ràpid que aquells que presenten alteracions genètiques de mal pronòstic o immunofenotip LLA-T. A més a més, tal i com s'ha vist en les LLA amb el reordenament

*ETV6::RUNX1* o hiperdiploides, alguns pacients amb alteracions genètiques de bon pronòstic però una negativització lenta de la MRM es poden curar augmentant la intensitat de la quimioteràpia(1). Per altra banda, els pacients amb alteracions genètiques d'alt risc de recaiguda tenen un pitjor pronòstic tot i presentar una MRM negativa al final de la inducció(23) (figura 10).



**Figura 10.** Relació entre la MRM i el risc de recaiguda en cada subtipus genètic de LLA(23).

### 3. TRACTAMENT

El tractament de la LLA consta de 3 fases: remissió a la inducció, consolidació (o intensificació) per a eliminar residus de la leucèmia i manteniment (o continuació) per a assegurar el manteniment de la remissió. El tractament inclou tant la profilaxi com el tractament de la infiltració del SNC i dura entre 2 i 2 anys i mig.

La majoria de fàrmacs quimioteràpics convencionals van ser desenvolupats abans de 1970. La dosificació i les pautes òptimes dels règims de poliquimioteràpia es van desenvolupar gràcies a ajustos de dosis basats en la tolerabilitat i, en les dues últimes dècades, la resposta al tractament avaluada mitjançant la MRM i estudis individualitzats de farmacogenòmica i farmacodinàmica. El TPH s'ha utilitzat com a tractament en pacients de molt alt risc de recaiguda. Durant l'última dècada, han aparegut com a noves estratègies terapèutiques les teràpies moleculars dirigides i la immunoteràpia. Inicialment eren utilitzades en protocols de recaiguda però actualment ja s'han incorporat com a estratègies de tractament en primera línia(5).

L'objectiu del tractament d'**inducció** és induir una remissió completa (RC) mitjançant l'erradicació de la població inicial de cèl·lules leucèmiques i la restauració de la hematopoesi normal. El tractament d'inducció a la remissió, la fase IA, inclou 3 fàrmacs (glucocorticoides [prednisona o dexametasona], vincristina i asparaginasa (ASP)) o 4 fàrmacs incloent antraciclínics (generalment daunorubicina). El tractament d'inducció s'administra durant 4-6 setmanes i permet assolir la RC (és a dir,  $\leq 5\%$  de blasts a la medul·la òssia) en aproximadament el 98% dels pacients pediàtrics(5). Els pacients que no aconsegueixen arribar a la RC al final de la inducció tenen un pronòstic molt desfavorable. Aquests pacients, així com els que tenen una MRM alta ( $>1\%$ ) al finalitzar la inducció o persistent després de la consolidació són candidats a tractaments més intensius, que inclouen el al·lo-TPH(24).

Amb la restauració de l'hemopoesi normal, els pacients en RC seguiran amb el tractament de **consolidació**. La consolidació inclou ciclofosfamida, citarabina i 6-mercaptopurina. En pacients afectes de LLA-B, la SLE als 5 anys és del 92,3% en aquells que presenten una MRM negativa al final de la fase IA (dia +33 de tractament) i de la fase IB (dia +78). Per altra banda, els pacients que presenten una MRM positiva post IA i/o post IB tenen pitjor pronòstic: si la MRM és positiva però  $< 10^{-3}$  al dia +78 la SLE és del 77,6% i si és  $\geq 10^{-3}$  al dia +78 la SLE disminueix fins al 50,1%(16).

El metotrexat és un quimioteràpic important per al control de la leucèmia a nivell sistèmic i de la malaltia a SNC i testicular. El metotrexat s'administra a altes dosis (2-5g/m<sup>2</sup>) amb rescats de folinat i 6-mercaptopurina o a dosis intermèdies en escalada (100-300 mg/m<sup>2</sup>) sense rescats de folinat i seguit de tractament amb ASP (règim Capizzi)(25).

El tractament de consolidació va seguit del tractament de **reinducció** que consisteix en una combinació de fàrmacs similar a la utilitzada durant les fases IA i IB. La fase de reinducció és un període crític en el tractament de la LLA, tant en els pacients de risc estàndard com en els pacients d'alt risc. La reducció de la durada i de les dosis de quimioteràpia del tractament de reinducció comporta un augment del risc de recaiguda en els pacients de risc estàndard, en especial aquells que no presenten un reordenament *ETV6::RUNX1* o que tenen una edat  $\geq 7$  anys en el moment del diagnòstic(26).

Les nenes i nens amb LLA requereixen tractament de continuació o **manteniment** a llarg termini. El tractament de manteniment sol durar  $\geq 1$  any i consisteix en 6-mercaptopurina diària i metotrexat setmanal, amb o sense ASP i/o vincristina amb polsos de corticoesteroides. Els intents d'escurçar la durada del tractament s'han traduït en un alt risc de recaiguda després del cessament de la teràpia, amb l'excepció dels pacients amb LLA-B madura (tipus Burkitt) que segueixen protocols específics més curts. Els resultats d'un estudi van mostrar que la suspensió del tractament de manteniment al cap d'un any del diagnòstic augmentava el risc de recaiguda de forma significativa ( $38,8 \pm 2,8\%$  als 12 anys des del diagnòstic), tot i que alguns subgrups genètics com *TCF3::PBX1* i *ETV6::RUNX1* s'associaven a un pronòstic excel·lent(27). Una adherència  $<95\%$  al tractament amb 6-mercaptopurina diària s'ha associat amb un risc de recaiguda 2,7 cops major si ho comparem amb els pacients amb una adherència  $\geq 95\%$ (28). Clàssicament, les indicacions referents a l'administració de la 6-mercaptopurina eren administrar-la al vespre, sense mesclar-la amb productes làctics i prendre-la en dejú. Tanmateix, sembla que, amb els protocols actuals, aquestes restriccions no afecten al pronòstic ni als nivells de tioguanina intraeritrocitària sempre i quan s'administri a la mateixa hora cada dia(29).

El tractament de la LLA inclou la **teràpia dirigida al SNC**. Donat l'alt risc de seqüeles neurocognitives tardanes, alteracions endocrinològiques i segons tumors, la radioteràpia intracranial en primera línia s'ha substituït àmpliament per la quimioteràpia intratecal i quimioteràpia sistèmica amb activitat a nivell de SNC (dexametasona, metotrexat a altes dosis i ASP). En un metaanàlisi internacional, la radioteràpia intracranial disminuïa la incidència de la recaiguda aïllada a SNC en pacients amb infiltració del SNC al diagnòstic (SNC-3) però la SG era



similar a la d'aquells pacients que no havien rebut quimioteràpia intracranial(30). Tant els pacients amb SNC-3 com aquells amb SNC-2 (<5 leucòcits/ $\mu$ L amb presència de blasts) en el moment del diagnòstic s'han associat amb un pitjor pronòstic i un risc augmentat de recaiguda a SNC. Per tant, aquests pacients requereixen un tractament quimioteràpic intratecal més intensiu(31). Una punció lumbar traumàtica en el moment del diagnòstic pot introduir blasts circulants al líquid cefalorraquidi (LCR) i també s'associa a pitjor pronòstic(32).

### **3.1 Mecanisme d'acció**

Els mecanismes d'acció dels fàrmacs antitumorals es resumeixen a la taula adjunta (taula 5). La majoria dels fàrmacs produeixen el seu efecte citotòxic interferint en alguna fase de la síntesi d'ADN i ARN en les cèl·lules tumorals o en la funció d'algun àcid nucleic essencial per a aquest procés. Desafortunadament, aquests agents també alteren les mateixes vies metabòliques de les cèl·lules sanes, fet que comporta l'aparició d'efectes no desitjats.

Grup farmacològic		Mecanisme d'acció
<b>ALQUILANTS</b>		<b>Actuen sobre l'ADN.</b> Introdueixen grups alquil intra i entre els filaments d'ADN evitant o alterant la duplicació cel·lular. Actuen en la fase S cel·lular.
Ciclofosfamida	Mostassa nitrogenada	
Ifosfamida	Mostassa nitrogenada	
<b>ANTIMETABOLITS</b>		<b>Actuen sobre l'ADN.</b> Son substàncies anàlogues als components del metabolisme intermediari cel·lular. Interfereixen en el seu metabolisme, sobretot en la síntesi d'ADN i ARN. Son específics de la fase S cel·lular.
Metotrexat	Anàleg d'àcid fòlic	Inhibeix competitivament l'enzim dihidrofolat reductasa bloquejant la conversió de folats a la seva forma activa. Inhibeix la síntesi de purines i de desoxitimidina monofosfat (DTMP). Inhibeix la producció de desoxiribonucleòtids
6- Mercaptopurina 6- Tioguanina	Anàlegs de purina	Inhibeixen la síntesis de purines actuant com a fals substrat. Inhibeixen la producció de ribonucleòtids.
Citarabina	Anàleg de pirimidina	Inhibeix l'ADN polimerasa i inhibeix l'elongació de l'ADN
Nelarabina	Anàleg de guanina	Inhibeix la síntesi d'ADN incorporant-s'hi en forma de ara-GTP
Fludarabina	Anàleg d'adenosina	Inhibeix l'ADN polimerasa i la ribonucleòtid reductasa

<b>ANTIBIÒTICS CITOTÒXICS</b>		<b>Actuen sobre l'ADN.</b> Mecanisme d'acció múltiple: 1) s'intercalen entre les bases de l'ADN alterant la replicació i transcripció proteica. 2) Inhibeixen la topoisomerasa II donant lloc al trencament de l'ADN i l'alteració dels processos de reparació. 3) Alteren la membrana cel·lular mitjançant la unió a proteïnes específiques (cardiolipina) i donant lloc a la producció de radicals lliures.
Antraciclina	Doxorubicina Daunorubicina	
<b>ALCALOIDES</b>		
Alcaloides de la vinca	Vincristina Vinblastina	<b>Actuen sobre els microtúbuls.</b> Actuen sobre la mitosi sense afectar l'ADN. S'uneixen a la tubulina i bloquegen la seva capacitat de polimeritzar-se en microtúbuls fent que s'aturi la divisió cel·lular
Epipodofilotoxines	Etopòsid	<b>Actua sobre l'ADN.</b> Inhibeix la topoisomerasa II donant lloc al trencament irreversible de l'ADN. Inhibeix la síntesi d'ARN.
<b>MISCEL·LÀNIA</b>		
Corticoesteroides	Prednisona, dexametasona, prednisolona	Inhibeixen la proliferació leucocitària. Activen les vies d'apoptosi alterant l'expressió genètica a nivell d'ARNm.
L-Asparaginasa		<b>Actua sobre les proteïnes.</b> Hidrolitza l'aminoàcid L-asparagina, necessari per a la síntesi de proteïnes, essencial per als blasts i no essencial per a la resta de cèl·lules.

**Taula 5.** Mecanisme d'acció dels fàrmacs quimioteràpics. Taula realitzada a partir de les dades del Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría(33).

### **3.2 Transplantament de progenitors hematopoètics (TPH)**

Les indicacions de l'al·lo-TPH és un tema en constant revisió. L'al·lo-TPH augmenta la intensitat del tractament mitjançant l'administració d'un acondicionament amb quimioteràpia a dosis altes associat sovint a radioteràpia (irradiació corporal total). La irradiació corporal total ha demostrat ser un component molt important en l'acondicionament en la LLA(34).

A més, l'al·lo-TPH aporta com a mecanisme antileucèmia l'efecte de l'empelt contra la leucèmia. Aquest contribueix a la reducció del risc de recidiva, tot i que s'associa a una taxa de morbi-mortalitat més elevada que la quimioteràpia. Des de l'extensió del tipatge d'alta resolució per mètodes moleculars que assegurin una millor elecció dels donants no emparentats, els resultats de l'al·lo-TPH amb donant familiar i donant no emparentat compatible són similars. Tradicionalment, la font de progenitors hemopoètics d'elecció en pacients pediàtrics amb LLA

ha estat la medul·la òssia enfront de la sang perifèrica, degut a una major incidència de malaltia empelt contra receptor i de mortalitat relacionada amb el trasplantament quan s'utilitza aquesta última(35). En referència als factors pronòstics en la supervivència després del trasplantament, un dels principals factors és el nivell de MRM pre-trasplantament(36,37).

### **3.3 Nous tractaments**(1,5)

#### 3.3.1 TERÀPIES DIRIGIDES A UNA MOLÈCULA DIANA

En el context actual d'un millor coneixement de les alteracions genètiques en la LLA, estan sorgint tractaments dirigits a la mutació genètica impulsora i/o la via de senyalització associada. Aquest nou enfocament és atractiu, ja que pot sumar-se a la quimioteràpia convencional, substituir-ne alguns components o reduir-ne la intensitat. Això implica una possibilitat de millora de l'eficàcia i/o reducció de la toxicitat en alguns subgrups de pacients.

Els **inhibidors de tirosin kinasa** s'han utilitzat combinats amb la quimioteràpia convencional per a millorar-ne l'eficàcia. Els inhibidors d'*ABL1* (p.e.: imatinib, dasatinib, nilotinib i ponatinib) s'utilitzen en el tractament de la LLA Philadelphia positiva (LLA Ph+) i s'està estudiant el seu ús en les LLA *BCR::ABL*-like amb fusions de la classe *ABL1*(38).

Ruxolitinib s'està utilitzant dins d'assajos clínics per a pacients afectes de LLA *BCR::ABL*-like amb mutacions activadores de la via JAK-STAT. Tanmateix, avui en dia, la utilització d'aquests tractaments dirigits està limitat a menys del 10% dels pacients pediàtrics afectes de LLA. La identificació de noves mutacions i les seves dianes permetrà expandir l'ús dels inhibidors de tirosin kinasa.

Les proteïnes de la família BCL-2 juguen un paper crític en la via d'apoptosi. Venetoclax és un **inhibidor de la proteïna antiapoptòtica BCL-2**. Els resultats d'estudis preclínic han mostrat que venetoclax podria ser útil en el tractament de leucèmies d'alt risc com les LLA amb hipodiploïdia i reordenaments de *KMT2A*, *BCR::ABL*, *TCF3::HLF*, i LLA-T (incloent les *early-T cell precursor*)(39).

Actualment hi ha diversos assajos clínics oberts sobre l'ús de venetoclax en LLA en recaiguda. Un estudi fase I/II sobre la combinació de quimioteràpia de baixa intensitat i venetoclax en pacients afectes de LLA recaiguda / refractària (NCT03808610); un fase I/II sobre la combinació de venetoclax, ponatinib i corticoesteroides en LLA Ph+ recaiguda / refractària (NCT03576547) i

un fase IB/II sobre la combinació de venetoclax i vincristina liposomal en LLA B i T recaiguda / refractària (NCT03504644).

Els **inhibidors del proteosoma** (bortezomib) han demostrat ser eficaços en LLA en recaiguda i tenen un efecte sinèrgic amb fàrmacs quimioteràpics com els corticoesteroides i la doxorubicina. Actualment s'estan investigant nous inhibidors del proteosoma com carfilzomib i ixazomib.

En la LLA apareix freqüentment la desregulació de les vies de senyalització PI3K/AKT/mTOR i s'associa amb una resistència a la quimioteràpia. Els **inhibidors de mTOR**, com és everolimus, inhibeixen la proliferació dels blasts, reverteixen la resistència als glucocorticoides i tenen un efecte sinèrgic amb altres fàrmacs quimioteràpics com dexametasona, vincristina i doxorubicina. S'han publicat diversos assajos clínics sobre aquest fàrmac. En un assaig clínic en fase I es demostrà que la combinació d'everolimus amb 4 fàrmacs quimioteràpics en el tractament de reinducció de pacients pediàtrics afectes de LLA en recaiguda era ben tolerat i s'associava a una taxa prometedora de segona RC(40). En un altre assaig clínic en fase I/II sobre l'administració d'everolimus en combinació amb l'esquema quimioteràpic HyperCVAD en pacients afectes de LLA refractària o en recaiguda també es demostrà una correcta tolerància i una eficàcia moderada, especialment en els casos de LLA-T(41).

Les modificacions epigenètiques s'han implicat en la patogènesi del càncer. Les modificacions epigenètiques inclouen la metilació de l'ADN i la modificació de les histones, regulant l'expressió dels diferents gens. Aquestes modificacions poden silenciar els gens supressors tumorals o activar oncogens. Son prevalents en la LLA i s'associen amb la resistència a la quimioteràpia i a un augment de risc de recaiguda. Les modificacions epigenètiques es poden revertir amb teràpies dirigides com els **inhibidors de ADN-metiltransferasa** (com decitabina) i els **inhibidors de histona deacetilasa** (com vorinostat). En estudis preclínic, els inhibidors de ADN-metiltransferasa i de histona deacetilasa mostren resultats prometedors en el tractament de les LLA amb reordenament de *KMT2A*(42).

### 3.3.2 IMMUNOTERÀPIA

Actualment en pacients pediàtrics afectes de LLA s'estan utilitzant diferents tipus d'immunoteràpia com son anticossos biespecífics (p.e.: blinatumomab), cèl·lules CAR-T (p.e.: tisagenlecleucel) i conjugats anticòs-fàrmac (p.e.: inotuzumab ozogamicin). La immunoteràpia

s'ha utilitzat majoritàriament en la LLA-B donat que els marcadors de superfície CD19, CD20 i CD22 s'expressen només en les cèl·lules B i no en altres teixits. Aquest tractament pot eliminar no només els blasts en una LLA-B sinó també les cèl·lules B normals. D'aquesta manera causa una hipogammaglobulinèmia que es pot manejar mitjançant l'administració d'immunoglobulines intravenoses o subcutànies. Aquest nou tractament ha millorat la taxa de resposta i el pronòstic en pacients amb LLA-B recaiguda o refractària. Per al tractament de les LLA-T, s'està investigant sobre anticossos (p.e.: daratumumab dirigit contra CD38) i cèl·lules CAR-T (p.e.: dirigides contra CD1a, CD5 i CD7) (figura 11).

#### **Anticossos biespecífics:**

Blinatumomab consta de fragments Fv de cadena única biespecífics que uneixen la cèl·lula T CD3+ amb la cèl·lula leucèmica B CD19+ causant una resposta immune citotòxica. El seu ús està aprovat per la *US Food and Drug Administration* (FDA) i per la *European Medicines Agency* (EMA) per al tractament de la LLA-B adulta i pediàtrica. Les indicacions aprovades per la FDA són la LLA-B adulta i pediàtrica tant en recaiguda/refractària com amb MRM positiva. Les indicacions de la EMA són la LLA-B adulta en recaiguda/refractària/MRM positiva i LLA-B pediàtrica recaiguda / refractària a dues o més línies de tractament (o amb al·lo-TPH previ) i en pacients amb LLA Ph negativa amb alt risc de recaiguda com a part del tractament de consolidació. Dos estudis aleatoritzats (estudi europeu IntReALL) i un estudi nord-americà (grup COG) en pacients pediàtrics, adolescents i adults joves afectes de LLA-B refractària o recaiguda de risc intermedi o alt risc van mostrar els beneficis de blinatumomab enfront la quimioteràpia intensiva de consolidació. Recentment, s'ha comunicat en el congrés americà que aquest benefici també s'observa en el subgrup de pacients de recaiguda de baix risc(43–46). La pèrdua d'expressió de CD19 és un dels mecanismes de fracàs del tractament amb blinatumomab. Aquest mecanisme també s'observa en el tractament amb cèl·lules CAR-T.

#### **Cèl·lules T amb receptor d'antigen quimèric (CAR-T):**

Les cèl·lules CAR-T expressen un receptor que consisteix en fragments de la regió variable de cadena única de les immunoglobulines (scFV) contra els antígens tumorals presents en les cèl·lules leucèmiques de línia B. Per exemple, en el cas de les LLA de línia B, les cèl·lules CART es dirigeixen en front a l'antigen CD19 o al CD22 o a ambdós (CART19, CART20 o CARTs duals 19 i 20). Un estudi internacional en fase 2 de cèl·lules CAR-T anti-CD19 (tisagenlecleucel)

en pacients pediàtrics i adults joves afectes de LLA-B recaiguda/refractària va mostrar unes taxes de remissió completa del 81% als 3 mesos i una SLE i SG del 73% i 90% respectivament, als 6 mesos. Actualment, tisagenlecleucel està aprovat per al tractament de pacients pediàtrics i adults joves de fins a 25 anys afectes de LLA-B refractària, o en segona recaiguda o posterior, i en recaiguda després d'un al·lo-TPH(47,48). Les cèl·lules CAR-T poden migrar a localitzacions extramedul·lars com a SNC, on s'ha demostrat la presència de cèl·lules CAR-T al LCR. Si bé a l'assaig clínic que va dur a l'aprovació de tisagenlecleucel(47) es van excloure els pacients amb malaltia extramedul·lar aïllada, sí que en aquest assaig i en altres es van incloure pacients amb recaigudes combinades on es va mostrar l'eficàcia en malaltia extramedul·lar. D'altra banda, hi ha estudis en els que sí que s'han inclòs pacients amb malaltia extramedul·lar aïllada i on s'ha vist la seva eficàcia. Tot i que les cèl·lules CAR-T poden ser un tractament curatiu per sí mateix, també s'utilitza com a teràpia pont a al·lo-TPH(49,50).

#### **Conjugats anticòs-fàrmac:**

Inotuzumab ozogamicin és un anticòs monoclonal humanitzat anti-CD22 que està unit a la calicheamicina, un antibiòtic antitumoral citotòxic que provoca trencaments en la doble hèlix de l'ADN. Inotuzumab està actualment aprovat per al tractament de pacients adults afectes de LLA-B recaiguda/refractària. En un estudi pediàtric en fase 1 es va utilitzar una dosificació setmanal fraccionada en LLA-B recaigudes/refractàries(51). Es va objectivar un perfil de toxicitat similar al dels adults, unes taxes de RC del 80% i una MRM negativa en el 84% dels pacients. Actualment està en curs un estudi fase 2 on els resultats preliminars confirmen les dades de seguretat i d'eficàcia.

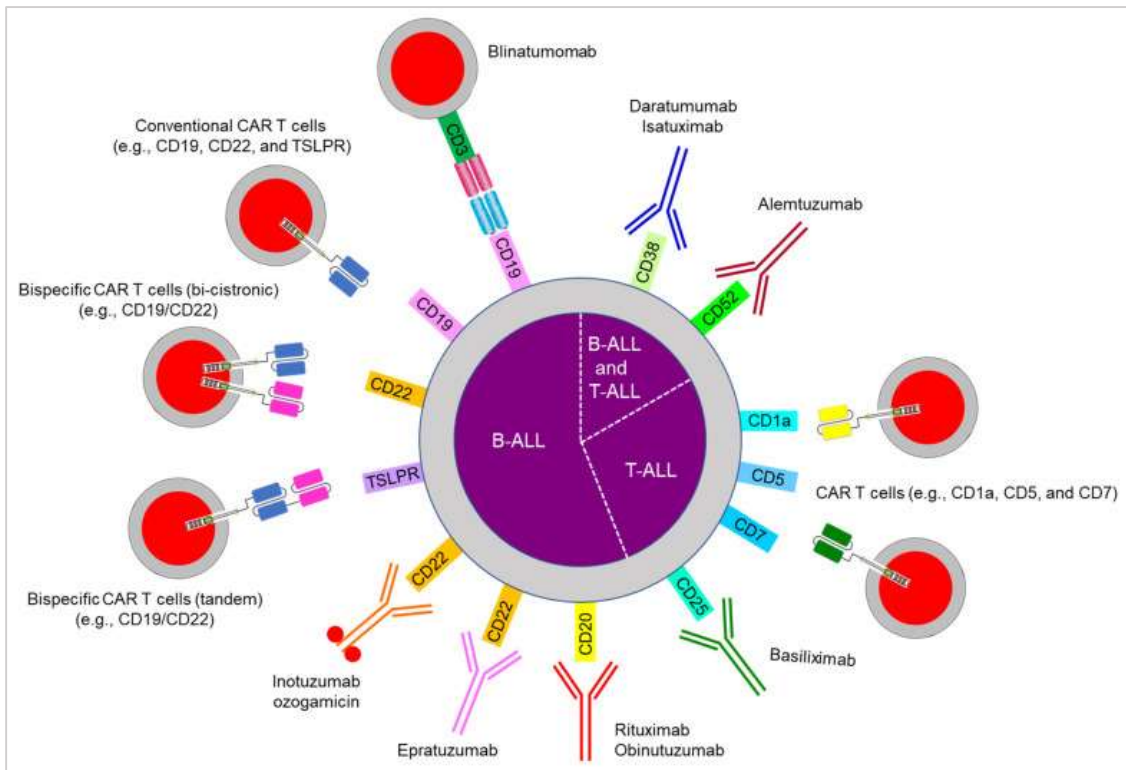


Figura 11. Immunoteràpia en la LLA(1).

#### 4. TOXICITAT

Donades les altes taxes de supervivència actuals en la LLA pediàtrica, aconseguir una millora en el pronòstic mitjançant la quimioteràpia convencional és tot un repte. La majoria de fàrmacs quimioteràpics convencionals s'utilitzen des de fa dècades i ja s'ha arribat al límit tolerable de la seva intensitat terapèutica. Per tant, una intensificació de la quimioteràpia convencional podria comportar una millora mínima en el pronòstic o fins i tot ser contraproductiu per l'augment de la mortalitat tòxica. Un nombre important de pacients presenten efectes tòxics secundaris al tractament quimioteràpic, alguns d'ells greus i/o crònics. La incidència de les diverses toxicitats varia àmpliament en funció del protocol de tractament i de la intensitat del mateix(1,52).

Entre els **efectes secundaris** del tractament quimioteràpic es poden distingir aquells a **curt termini**, com la toxicitat hematològica (anèmia, trombopènia, neutropènia), l'hepatotoxicitat, la toxicitat neurològica (convulsions, alteracions de la sensibilitat, etc.), la presència de trombosis en diversos territoris vasculars, infeccions greus, mucositis, alopecía, pancreatitis i molts altres. Per altra banda, el tractament pot ocasionar efectes secundaris a **llarg termini**, com complicacions osteo-articulars (necrosi avascular de maluc, que sovint requereix la col·locació de pròtesis en adolescents o adults joves, osteoporosi, fractures òssies, etc.), cardíques (insuficiència cardíaca), neurocognitives (dèficit d'atenció, disminució del rendiment escolar), endocrinològiques o segons tumors, depenent del tipus de leucèmia i del tractament administrat. Aquests efectes a llarg termini cada cop adquireixen major rellevància degut al major nombre d'individus adults supervivents d'una leucèmia en la infància i al major seguiment, amb adults de més de 50 anys que han superat la leucèmia però que presenten aquestes complicacions en l'edat adulta derivades del seu tractament(53).



#### 4.1 Toxicitat específica de cada fàrmac (veure taula 6).

Fàrmac	Toxicitat	Estratègies profilàctiques i terapèutiques per a reduir la toxicitat
<b>Corticoesteroides</b>	Immunosupressió	Profilaxi antiinfecciosa
	Osteonecrosi i fractures òssies	Administració a setmanes alternes en canvi de contínua(54)
	Alteracions neuropsiquiàtriques (labilitat emocional, irritabilitat, eufòria, depressió, psicosi, insomni...) Sobretot dexametasona	Tractament concomitant amb hidrocortisona(55)
	Miopatia	Fisioteràpia
	Estries vinoses	Tractament tòpic, làser
	Alteracions hidroelectrolítiques: hiperglucèmia, hipopotassèmia, retenció hídrica	Administració d'electròlits Tipus d'hidratació ev ajustada a la situació
	Hipertensió arterial	Tractament antihipertensiu
	Síndrome de Cushing, hiperfàgia	-
	Gastritis	Protecció gàstrica (inhibidors de la bomba de protons, anti H2)
Desviació a l'esquerra	-	
<b>Vincristina</b>	Neurotoxicitat: neuropatia perifèrica i motora (sobretot en pacients amb polimorfisme en la regió promotora del gen CEP72(56,57))	Profilaxi: evitar l'administració concomitant amb antifúngics azòlics i altres inhibidors del CYP3A4 (disminueixen la metabolització de la vincristina). Profilaxi: valorar ajustament de dosi en cas de pacients amb polimorfismes de risc (NCT03117751). Fisioteràpia
	Dolor músculo-esquelètic/neuropàtic	Gabapentina
	Parestèsies	-
	Síndrome de secreció inadequada d'hormona antidiürètica (SIADH) +/- hipoaldosteronisme secundari	Control de balanç hídric Restricció hídrica Diürètics (furosemida) Correcció lenta de la hiponatrèmia Mineralocorticoides
	Estrenyiment	Tractament laxant
	Vesicant. Necrosi si extravasació	Compreses calentes Hialuronidasa subcutània

<b>Citarabina</b>	Conjuntivitis/queratitis (altes dosis)	Profilaxi: col·liri de corticoides des de l'inici de l'administració fins 2 dies post
	Erupció màculo-papular, febre, clínica pseudogripal	Tractament simptomàtic
	Neurotoxicitat (altes dosis)	Profilaxi: administració vitamina B6 Tractament de suport
	Mielosupressió: leucopènia, trombocitopènia, anèmia	Control d'hemograma Transfusió d'hemoderivats Profilaxi antiinfecciosa Si neutropènia, administració de G-CSF
	Nàusees i vòmits (altes dosis)	Tractament antiemètic
<b>Ciclofosfamida</b>	Cistitis hemorràgica	Hiperhidratació Protecció vesical (mesna) Monitorització de l'hematúria Diürètics en cas de cistitis hemorràgica establerta.
	SIADH +/- hipoadosteronisme secundari	Control de balanç hídric Restricció hídrica (si és possible) Diürètics (furosemida) Correcció lenta de la hiponatrèmia Mineralocorticoides
	Nàusees i vòmits	Tractament antiemètic
	Molèsties abdominals, diarrea	Tractament de suport: analgèsia, hidratació.
	Mielosupressió. Més habitual leucopènia que trombopènia o anèmia	Controls d'hemograma Transfusió hemoderivats Profilaxi antiinfecciosa Si neutropènia, administració de G-CSF
	Alopècia	-
<b>Ifosfamida</b>	Cistitis hemorràgica	Hiperhidratació Protecció vesical (mesna) Monitorització de l'hematúria Diürètics (si cistitis hemorràgica establerta)
	SIADH +/- hipoadosteronisme secundari	Control de balanç hídric Restricció hídrica (si és possible) Diürètics (furosemida) Correcció lenta de la hiponatrèmia Mineralocorticoides
	Mielosupressió. Sobretot leucopènia amb nadir als 10-14 dies i recuperació als 21 dies	Controls d'hemograma Profilaxi antiinfecciosa Si neutropènia, administració de G-CSF
	Nàusees i vòmits	Tractament antiemètic
	Neurotoxicitat (sobretot si administració a altes	Administrar amb precaució en cas d'insuficiència renal

	dosis o insuficiència renal): letargia, confusió, convulsions, atàxia cerebel·losa, debilitat, al·lucinacions, alteració de parells cranials, estupor i coma	Blau de metilè (tractament)
	Rash cutani, hiperpigmentació, canvis unguials	-
	Alopècia	-
<b>L-Asparaginasa</b>	Hipersensibilitat	<i>Veure apartat III.5 Asparaginasa</i>
	Pancreatitis	
	Trombosi venosa	
	Hipoalbuminèmia Hipertrigliceridèmia Hipertransaminasèmia Hiperbilirubinèmia Hiperglucèmia Hipofibrinogenèmia Hiperamonièmia	
<b>Etopòsid (VP-16)</b>	Hipersensibilitat	Observació Administració a una menor velocitat d'infusió En cas d'al·lèrgia clínica valorar antihistamínics, corticoides, adrenalina
	Mielosupressió	Controls d'hemograma Suport transfusional Profilaxi antiinfecciosa Si neutropènia, administració de G-CSF
	Alopècia	-
	Nàusees i vòmits	Tractament antiemètic
	Segones neoplàsies (LMA amb reordenament MLL)	Profilaxi: reduir el seu ús a pacients d'alt risc
	Irritant/vesicant. Necrosi si extravasació	Compreses calentes Hialuronidasa subcutània
<b>Doxorubicina Daunorubicina Idarubicina</b>	Cardiotoxicitat  -Aguda (2-3 dies post administració, excepcional en pediatria): arrítmies, canvis en el ECG, pericarditis, miocarditis  -Crònica: miocardiopatia dilatada amb progressió a insuficiència cardíaca congestiva	Monitorització de la funció cardíaca abans, durant i després del tractament Profilaxi: evitar dosis màximes acumulades > 300-450 mg/m <sup>2</sup> , tot i que en pacients pediàtrics i especialment en menors de 2 anys aquesta dosi no està clara. Profilaxi: administració concomitant de dexrazoxà com a cardioprotector. Profilaxi: administració de formulacions liposomals.

	Toxicitat cutània (sobretot post radioteràpia)	Utilitzar amb precaució en pacients amb antecedent de radioteràpia Evitar exposició solar directa Protecció solar
	Mielosupressió. Sobretot trombopènia amb nadir als 10-14 dies i recuperació als 21 dies	Controls d'hemograma Suport transfusional Profilaxi antiinfecciosa Si neutropènia, administració de G-CSF
	Mucositis	Tractament de suport: analgèsia, hidratació ev.
	Nàusees i vòmits Diarrea	Tractament de suport: antiemètics, hidratació ev.
	Hiperpigmentació unguial	-
	Alopècia	-
	Molt vesicant. Necrosi si extravasació	Profilaxi: administració per via central Compreses fredes Dimetilsulfòxid (DMSO) tòpic
<b>Metrotrexat</b>	Neurotoxicitat aguda i subaguda: convulsions, síndrome <i>stroke-like</i> , afàsia, atàxia...	Profilaxi secundària amb teofil·lina Tractament amb teofil·lina, dextrometorfà i tractament de suport
	Hipertransaminasèmia	-
	Mucositis, estomatitis, gingivitis (dosi depenent)	Profilaxi: rescats amb folinat Tractament de suport: analgèsia, hidratació ev
	Insuficiència renal (dosis altes)	Profilaxi: hiperhidratació, alcalinització urinària, monitorització de nivells sèrics, funció renal i administració de rescats amb folinat Tractament de suport Hemofiltració Carboxipeptidasa
	Nàusees i vòmits	Tractament antiemètic
	Fotosensibilitat	Evitar exposició solar directa Protecció solar
	Mielosupressió, sobretot si eliminació lenta	Controls d'hemograma Suport transfusional Profilaxi antiinfecciosa
<b>Mercaptopurina</b>	Mielosupressió, sobretot leucopènia i neutropènia	Estudi de polimorfismes de la tiopurinmetiltransferasa (TPMT) i del gen NUDT15(58) Profilaxi antiinfecciosa
	Hepatotoxicitat: augment de transaminases i bilirubina	Monitorització de la funció hepàtica
	Nàusees i vòmits lleus	Tractament antiemètic
	Diarrea	Tractament de suport: hidratació

	Anorèxia i molèsties abdominals	Tractament simptomàtic: analgèsia
<b>Tioguanina</b>	Mielosupressió Leucopènia precedeix a la trombopènia	Control d'hemograma Suport transfusional Profilaxi antiinfecciosa
	Nàusees i vòmits lleus	Tractament antiemètic
	Diarrea	Tractament de suport: hidratació
	Hepatotoxicitat: augment de transaminases i bilirubina, síndrome d'obstrucció sinusoidal(59)	Monitorització de la funció hepàtica
<b>Imatinib</b>	Retard en el creixement	Monitorització ponderal
	Retenció de líquids, edemes	Diürètics
	Hepatotoxicitat	Evitar, si és possible, fàrmacs hepatotòxics concomitants (paracetamol...)
<b>Blinatumomab</b>	Neurotoxicitat	Tractament de suport
	Síndrome d'alliberament de citocines	Profilaxi: disminució de la càrrega de malaltia pre-tractament, administració concomitant de dexametasona, augment progressiu de la dosi
<b>Inotuzumab</b>	Síndrome d'obstrucció sinusoidal (sobretot post al·lo-TPH)	Administració fraccionada, a dosis baixes Interval > 2 mesos entre l'administració d'inotuzumab i TPH Evitar règims d'acondicionament que incloguin > 1 agent alquilant Evitar fàrmacs hepatotòxics concomitants (p.e.: azols)
	Mielosupressió. Sobretot trombopènia	Controls d'hemograma Suport transfusional
	Aplàsia de limfòcits B, hipogammaglobulinèmia	Administració de gammaglobulines substitutives
<b>CAR-T</b>	Síndrome d'alliberament de citocines Neurotoxicitat	Tocilizumab (anticòs monoclonal anti-receptor de IL-6)(60) Corticoesteroides Inici precoç del tractament de suport del síndrome d'alliberament de citocines Siltuximab (anticòs monoclonal anti IL-6) Anakinra (antagonista del receptor de IL-1)(61)
	Aplàsia de limfòcits B, hipogammaglobulinèmia	Administració de gammaglobulines substitutives

**Taula 6.** Toxicitat específica de cada fàrmac. Taula realitzada a partir de les dades incloses en els següents recursos(1,5,7,62,63)

#### **4.2 Disminució de la toxicitat (Ponte di Legno)**

La progressiva intensificació del tractament de la LLA durant les últimes 3 dècades ha fet que, actualment, la probabilitat d'èxitus relacionat amb el tractament sigui equiparable al risc de recaiguda en pacients de baix risc. Per tant, els diversos protocols de tractament no tenen com a objectiu exclusiu la introducció de quimioteràpics més potents, sinó també la disminució dels efectes tòxics dels mateixos. Davant la necessitat de col·laboració internacional en aquest aspecte, *Ponte di Legno consortium* (PdL) ha creat un grup de treball sobre toxicitat, *Ponte di Legno Toxicity Working Group* (PTWG), per a avaluar els diversos efectes adversos greus associats amb el tractament de la LLA pediàtrica i d'aquesta manera millorar el pronòstic d'aquests pacients(64).

#### **4.3 Supervivència lliure de toxicitat greu**

Les taxes de supervivència global a 5 anys en la LLA han superat el 90%, però actualment els supervivents tenen el risc de patir seqüeles permanents. La SLE representa un reflex fidel del pronòstic dels càncers amb una SG escassa, però aquesta mesura és menys adequada quan les taxes de curació són altes però associades a complicacions greus i persistents. En conseqüència, un grup d'experts en hematologia-oncologia pediàtrica en representació de 17 grups internacionals d'estudi de la LLA, va presentar una iniciativa per a dissenyar una mesura, designada supervivència lliure de toxicitat greu (SLTG), per quantificar l'aparició de toxicitats. Dins de la SLTG s'avaluen 21 toxicitats greus que afecten de forma substancial les activitats de la vida diària, que són refractàries al tractament (per exemple, convulsions refractàries), que no tenen opcions terapèutiques (per exemple, ceguesa) o que requereixen un tractament substancialment invasiu (per exemple, trasplantament cardíac)(65). La incorporació de l'avaluació de la SLTG als assaigs clínics té el potencial de millorar i diversificar les estratègies de tractament, centrant-se no només en els ítems de resultat tradicionals i la supervivència general, sinó també en la incidència de les toxicitats més greus.

#### **4.4 Experiència reportada pels pacients**

En les últimes dues dècades, l'esforç per a integrar la visió dels pacients en la investigació clínica i en l'avaluació de l'atenció sanitària ha anat en augment. Per aquest motiu, s'han dissenyat diverses eines per a canalitzar la informació relacionada amb l'experiència del pacient: *patient-reported outcomes* (PROs), *patient-reported measures* (PROMs) i *patient-reported experience measures* (PREMs). Els PROs són informes que proporcionen els pacients sobre la seva pròpia salut, qualitat de vida o estat funcional associats a l'atenció sanitària o tractament que han rebut. Els PROMs són instruments que s'utilitzen per a mesurar i informar dels PROs, com ara els qüestionaris de qualitat de vida. Els PREMs són eines genèriques que informen sobre la satisfacció del pacient amb un servei de salut i s'utilitzen sovint per capturar l'experiència global del pacient en l'atenció sanitària. Hi ha una creixent atenció internacional pel que fa a l'ús de PREMs com a indicador de qualitat de l'atenció i seguretat del pacient(66). La supervivència tradicional, la malaltia i els resultats fisiològics poden demostrar els beneficis fisiològics del tractament; tanmateix, la perspectiva del pacient proporciona una interpretació més holística i una avaluació integral dels beneficis del tractament.

## 5. ASPARAGINASA

L'asparaginasa (ASP) és un enzim que catalitza la hidròlisi dels aminoàcids asparagina i glutamina en àcid aspàrtic, àcid glutàmic i amoníac en el medi extracel·lular. L'asparagina és un aminoàcid necessari per al creixement i diferenciació cel·lular i està produïda per l'enzim asparagin-sintetasa (ASNS), que catalitza la reacció de síntesi a partir d'aspartat i glicina. La majoria de les cèl·lules normals tenen la capacitat de sintetitzar asparagina però els limfoblasts, donats els seus baixos nivells d'ASNS, presenten una incapacitat per a produir-la i depenen de les fonts extracel·lulars. Mitjançant una depleció prolongada d'asparagina en el medi extracel·lular, l'ASP provoca una reducció en la síntesi d'ADN, ARN i proteïnes que condueix a l'apoptosi dels limfoblasts. D'aquesta manera, l'ASP provoca l'apoptosi selectiva de les cèl·lules leucèmiques(67).

L'ASP apareix per primer cop en la literatura mèdica al 1922, quan Clementi va descobrir les propietats de l'activitat enzimàtica de l'ASP de sèrum de conillet d'índies (*Cavia porcellus*)(68). Posteriorment, investigadors de la Universitat de Cornwell van demostrar l'efecte anti-limfoma del sèrum de conillet d'índies i van ser capaços d'atribuir aquest efecte a l'ASP present en el sèrum(69,70). Durant els següents anys, estudis *in vitro* van confirmar l'activitat anti-leucèmica en línies cel·lulars i va ser als anys 60 quan l'ASP es va utilitzar per primer cop en pacients pediàtrics afectes de LLA(71–73).

### 5.1 Formulacions

Actualment estan disponibles al mercat tres **formulacions** diferents d'ASP. Dues de les formulacions, l'asparaginasa *Escherichia coli* nativa (*E. coli*-ASP nativa) i l'asparaginasa de polietilè glicolat (PEG-ASP), deriven del bacteri *Escherichia coli*. La tercera preparació, asparaginasa d'Erwinia (*Erwinia*-ASP), deriva del bacteri *Erwinia chrysanthemi*(74). Les diverses formulacions d'ASP difereixen en la seva vida mitja, la més curta per a *Erwinia*-ASP i la més llarga per a PEG-ASP gràcies a la pegilació. Tant la via im com ev estan aprovades per a l'administració d'ASP tot i que, depenent de la via d'administració, la farmacocinètica del fàrmac és diferent. La semivida plasmàtica d'*E. coli*-ASP nativa administrada via ev vs. im és de 18,3 hores vs. 41,7 hores respectivament. La d'*Erwinia*-ASP és de 7,5 hores vs. 15,6 hores. La semivida plasmàtica de PEG-ASP és marcadament més llarga que la d'*E. coli*-ASP nativa i *Erwinia*-ASP i no presenta

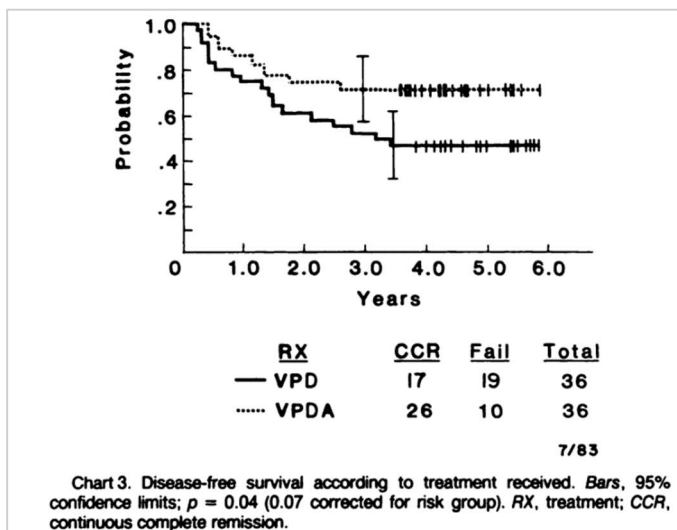


grans diferències en funció de la via d'administració: 5,29 dies via ev vs. 5,73 dies via im(75,76). El diferent origen bacterià d'*Erwinia*-ASP li confereix un perfil immunogènic únic, de manera que no mostra reactivitat creuada amb *E. coli*-ASP nativa o PEG-ASP. Per aquest motiu, *Erwinia*-ASP està indicada per al tractament de pacients amb LLA que han desenvolupat hipersensibilitat a les asparaginases derivades d'*E. coli*(74).

## 5.2 Supervivència

La **supervivència** dels pacients pediàtrics afectes de LLA ha millorat de forma dràstica gràcies als règims actuals de poliquimioteràpia i l'ús intensiu i perllongat d'ASP. L'objectiu clínic del tractament amb ASP és millorar el pronòstic dels pacients afectes de LLA i existeix evidència que vincula el tractament intensiu amb ASP amb una millora en la supervivència(77–79).

L'estudi 77-01 del grup DFCI va ser un dels primers assajos clínics aleatoritzats que van comparar la supervivència de pacients tractats i no tractats amb ASP durant la fase d'intensificació dins del règim de tractament poliquimioteràpic. Amb un temps de seguiment mitjà de 9,4 anys, els pacients de la branca de tractament que incloïa *E. coli*-ASP nativa van mostrar una SLE major que aquells que no la van rebre ( $71 \pm 9\%$  vs.  $31 \pm 11\%$ , respectivament;  $p=0,03$ ) (figura 13, taula 7).



**Figura 12.** Supervivència lliure de malaltia als 6 anys de seguiment en els pacients que van rebre un tractament d'intensificació amb ASP (línia discontinua) i en els que no (línia contínua) dins del protocol d'estudi DFCI 77-01(80).

Protocol			%LFS	P value	%EFS	P value	Median F/U (yrs)
77-01	NO ASP	(N=36)	43 ± 9	0.02	31 ± 11	0.03	9.4
	ASP	(N=28)	77 ± 8		71 ± 9		

ASP, asparaginase; EFS, event-free survival; LFS, leukemia-free survival; F/U, follow-up

**Taula 7.** Supervivència lliure de malaltia i supervivència lliure d'esdeveniment als 9 anys de seguiment en els pacients que van rebre un tractament d'intensificació amb ASP (ASP) i en els que no (NO ASP) dins del protocol d'estudi DFCl 77-01. Taula adaptada de (81).

Aquesta millora del pronòstic gràcies a la inclusió del tractament intensiu amb ASP ha estat recolzada per altres estudis. En el protocol 91-01 del grup DFCl, en el que es va estendre l'ús d'ASP durant la fase d'intensificació de 20 a 30 setmanes, aquells pacients que van rebre menys de 26 setmanes de tractament per intolerància a ASP (al·lèrgia a una o més formulacions, pancreatitis, trombosi/hemorràgia de SNC, trombosi venosa profunda, hiperglucèmia, hiperlipèmia i hepatitis) van presentar una pitjor SLE als 5 anys que aquells que van poder rebre almenys 26 setmanes de tractament (73% vs. 90%;  $p < 0,01$ )(79). En l'estudi IDH-ALL-91 del grup BFM per a pacients de risc estàndard, els pacients que van rebre 20 setmanes de tractament amb ASP durant la fase de continuació van presentar una SLE als 10 anys major que els que no el van rebre (87,5% vs. 78,7%;  $p = 0,03$ )(77). En l'estudi *POG study 8704* del *Pediatric Oncology Group* (POG) en pacients afectes de LLA-T, els pacients que van rebre una consolidació amb altes dosis d'ASP durant 20 setmanes van presentar una taxa de RC als 4 anys major que els que no la van rebre (68% vs. 55%;  $p = 0,002$ )(78). Aquests resultats fiquen de manifest la importància del tractament continu amb ASP, sempre i quan la toxicitat es pugui manejar de forma adequada.

### **5.3 Toxicitat**

El tractament amb ASP s'associa amb **toxicitats** freqüents i a vegades greus, entre les quals destaquen la hipersensibilitat, la pancreatitis i la trombosi. Aquestes toxicitats poden comportar la suspensió del tractament amb ASP i un augment del risc de recaiguda(74,75,79,82).

#### 5.3.1 PANCREATITIS

La patogènesi de la **pancreatitis** és desconeguda i la seva implicació clínica és rellevant, no tant sols per la gravetat del quadre sinó perquè la seva presentació pot implicar la discontinuació indefinida del tractament amb ASP, donat el possible risc de recurrència. La incidència reportada de pancreatitis és d'un 2-18%. Aquesta variabilitat en la incidència de pancreatitis s'explica per la falta de criteris estandarditzats per al seu diagnòstic abans de que es definissin els criteris diagnòstics de PTWG al 2016. A més a més, també hi podria jugar un paper les diferents pautes d'ASP administrades en els diversos protocols de tractament amb una intensitat variable i una associació diferent d'altres fàrmacs. La majoria d'episodis de pancreatitis van acompanyats d'una síndrome de resposta sistèmica inflamatòria i poden ser fàcilment mal interpretats com una sèpsia(64,75,83–85). La taxa de mortalitat per pancreatitis és baixa, un 2% segons l'estudi realitzat pel PTWG, però els pacients que l'han presentat tenen un risc augmentat de desenvolupar pseudoquistes (26%) i diabetis mellitus aguda (21%) o persistent (9% dels pacients que han presentat diabetis mellitus aguda). L'octreòtid s'ha utilitzat tant com a profilaxi com tractament coadjuvant en alguns pacients però no ha demostrat un benefici clar(75,84,86–88). També s'ha investigat sobre el paper de la L-carnitina com a possible factor protector però es requereixen més estudis per a confirmar el seu benefici(89).

S'han relacionat algunes variables clíniques amb el risc de presentar pancreatitis en pacients pediàtrics afectes de LLA en tractament amb ASP: 1) l'edat major de 10 anys al diagnòstic (tot i que l'estudi de Wolthers dins del grup *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology* (NOPHO), aquest augment de risc ja s'evidencia a partir dels 5 anys: 5,4% en pacients de 1 a 4,9 anys; 10,2% de 5 a 8,9 anys i 10,4% de 9 a 16,9 anys)(52,79,83,87,90–97) i 2) l'esquema de quimioteràpia d'alt risc amb dosis acumulades elevades d'ASP(88,90,92,98,99), tot i que l'estudi de Chen mostra una correlació més important amb la intensitat pic de la dosi més que amb la dosi acumulada(91). La via d'administració d'ASP, ev o im, no s'ha relacionat de forma clara amb el risc de presentar pancreatitis(75). L'ètnia tampoc s'hi ha relacionat de forma clara, tot i que

els resultats de l'estudi de Liu sí que descriuen un augment de risc de pancreatitis en pacients amb ascendència nativa americana(92) i els de l'estudi de Grimes un augment de prevalença d'un polimorfisme de risc de pancreatitis (variant V2103 en el gen de l'ASNS) en pacients d'ètnia hispana(100).

Existeixen pocs estudis sobre reexposició a ASP. Tanmateix, els estudis realitzats pels grups NOPHO i PTWG descriuen una incidència del 45% de segon episodi de pancreatitis en pacients reexposats. La gravetat del primer episodi no s'ha relacionat amb un risc augmentat de patir un segon episodi, la gravetat del mateix ni amb un augment de risc de complicacions secundàries. La probabilitat de presentar un segon episodi de pancreatitis no s'ha relacionat amb la presència de cap de les següents variables en el primer episodi: edat, sexe, inestabilitat hemodinàmica, necessitat de ventilació mecànica invasiva, presència de pseudoquistes pancreàtics, insulinoteràpia en moment agut, nivells de proteïna C reactiva (PCR), nivells de lipasa o amilasa al diagnòstic ni el fet de que la pancreatitis hagi estat greu(84,93).

### 5.3.2 TROMBOEMBOLISME VENÓS

El **tromboembolisme venós** (TEV) és una complicació freqüent en els pacients afectes de LLA sota tractament amb ASP, en especial si s'associa a altres factors de risc concomitants com son la presència de malaltia activa (LLA en no remissió), tractament concomitant amb corticoides o presència de catèter venós central. La incidència reportada de TEV simptomàtic en aquests pacients és del 3-14%, i fins a un 50% si s'inclouen els TEV asimptomàtics(101).

Els factors de risc associats al TEV en pacients pediàtrics afectes de LLA tractats amb ASP son l'edat major de 10 anys, immunofenotip LLA-T, la presència de blasts a sang perifèrica, la presència de massa mediastínica, el grup sanguini no 0 i l'ús de via venosa central. Històricament, el fet de presentar un factor hereditari de trombofília no s'havia relacionat de forma clara amb un risc augmentat de TEV. Tanmateix, en un estudi recentment publicat per Ruiz-Llobet et. al, s'han identificat com a possibles factor de risc de TEV el factor V de Leiden (G1691A) i la mutació de la protrombina (G20210A). A excepció del factor V de Leiden i la mutació de la protrombina, cap altre polimorfisme relacionat amb TEV en població general s'ha associat de forma significativa amb el risc de presentar TEV en el context d'una LLA(102–107).

### 5.3.3 HIPERSENSIBILITAT

Donat que l'ASP és una proteïna externa, l'efecte del fàrmac es pot veure compromès per una resposta immune resultant en la producció d'anticossos anti-ASP causant una reacció d'**hipersensibilitat**. La hipersensibilitat és l'efecte secundari més freqüent i una de les raons més habituals que duen a la suspensió del tractament amb aquest fàrmac(74,76,79,82,108,109). Degut al desenvolupament d'anticossos neutralitzants, les reaccions d'hipersensibilitat solen causar una inactivació del fàrmac(76,82,110).

El perfil de toxicitat de les diverses formulacions d'ASP és similar, exceptuant la potencial menor immunogenicitat de PEG-ASP. Tanmateix, aquest aspecte encara no està clar ja que els estudis que han comparat la incidència d'hipersensibilitat entre les diferents formulacions mostren resultats poc concloents(74,76,79,94,109,111–115). En un estudi en pacients adults i dos assajos clínics aleatoritzats en pacients pediàtrics, no es van observar diferències significatives en la incidència d'al·lèrgia(76,79,109,111,112,114,115). S'han descrit diverses variables clíniques relacionades amb un risc augmentat de presentar hipersensibilitat: segones línies de tractament (protocols de recaiguda), la pauta d'administració (esquemes d'administració discontinua d'ASP amb períodes lliures d'exposició entre administracions) i l'edat del pacient (pacients pediàtrics > 10 anys). Alguns treballs han descrit que l'ús concomitant de corticoides podria disminuir la incidència d'al·lèrgia. L'augment de risc d'hipersensibilitat quan l'ASP s'administra de forma discontinua amb períodes lliures d'exposició és degut a que el risc de formació d'anticossos augmenta amb cada reexposició a ASP. Degut a aquest fet, les reaccions d'hipersensibilitat són més freqüents durant les primeres administracions després d'un període lliure d'exposició. Per tant, una exposició prolongada a ASP sense períodes lliures d'exposició s'ha associat amb un menor desenvolupament d'anticossos(74,76,112,116,117). Pel que fa a la via d'administració, en estudis recents no s'han observat diferències en la incidència d'hipersensibilitat comparant la via im amb la ev(118).

Una de les formes de presentació de la hipersensibilitat és l'**al·lèrgia clínica**. La presentació més habitual de l'al·lèrgia clínica és urticària, sensació de mareig i simptomatologia respiratòria, tot i que en alguns casos pot aparèixer clínica d'anafilaxi(76). La incidència d'al·lèrgia clínica descrita en la literatura és molt variable en funció de la formulació, forma d'administració, nombre de dosis i seqüència. S'han reportat taxes d'al·lèrgia clínica a *E. coli*-ASP nativa de fins un 75% en protocols d'alt risc amb exposició repetida i discontinua, tot i que

normalment van d'un 10 a un 30%. La incidència descrita en pacients que han rebut PEG-ASP és entre un 3 i un 24% i en pacients que han rebut *Erwinia*-ASP entre un 3 i un 37%(74,76,108,110,119–124). S'han descrit diferències en la incidència d'al·lèrgia a PEG-ASP en funció de si s'administra com a formulació única des de la fase d'inducció o si es realitza un esquema seqüencial en el que s'administra *E. coli*-ASP nativa en les primeres fases del tractament i posteriorment PEG-ASP. El grup DCOG, va comparar la incidència d'al·lèrgia en els seus dos protocols de tractament DCOG ALL-10 i DCOG ALL-11. En el protocol DCOG ALL-10, on s'utilitzava un esquema seqüencial *E. coli*-ASP nativa - PEG-ASP, la incidència d'al·lèrgia clínica a PEG-ASP era del 22%. En següent protocol, DCOG ALL-11, on s'utilitzava com a única formulació PEG-ASP, la incidència disminuïa de forma significativa fins a un 10%(110). Diversos grups han estudiat la incidència d'al·lèrgia en funció de la via d'administració d'ASP amb resultats poc concloents. Donada aquesta variabilitat en les taxes d'al·lèrgia reportades i el fet de que algunes de les reaccions relacionades amb l'administració via ev podrien correspondre a reaccions infusionals i ser mal interpretades com a reaccions al·lèrgiques, son necessaris més estudis per a caracteritzar les diferències en la prevalença d'al·lèrgia clínica segons la via d'administració. En relació a la gravetat clínica de l'al·lèrgia en funció de la via d'administració, els resultats dels diversos estudis son discordants(76,112,120,121). Tot i que la premedicació amb corticoides i antihistamínics pot reduir la incidència de símptomes clínics d'al·lèrgia, no està clar si també pot reduir el desenvolupament d'anticossos neutralitzants anti-ASP. Per altra banda, la premedicació podria emascarar la simptomatologia d'al·lèrgia sense eliminar els anticossos(76). Per aquest motiu, és necessària la monitorització de l'activitat d'asparaginasa en sèrum (AAS). En el cas de PEG-ASP, les reaccions d'hipersensibilitat tant poden ser degudes al desenvolupament d'anticossos neutralitzants anti-ASP com al desenvolupament d'anticossos anti-PEG. Diversos estudis han descrit la presència d'anticossos anti-PEG tant en pacients sota tractament amb PEG-ASP com en individus sans (22-25% en una cohort de donants de sang i 13,9% IgG anti-PEG i 29,1% IgM anti-PEG en pacients pediàtrics afectes de LLA previ a l'administració de la primera dosi d'ASP). En alguns casos, aquests anticossos anti-PEG s'han relacionat amb una menor semivida de PEG-ASP i un impacte potencial en el pronòstic del pacient(76,125).

Alguns pacients desenvolupen autoanticossos neutralitzants amb absència de manifestacions clíniques. Aquest fenomen, conegut com **inactivació silenciosa (IS)**, s'inclou dins de l'espectre de reaccions d'hipersensibilitat. La IS només es pot detectar mitjançant la determinació de l'AAS(76,82,126). S'ha descrit en la literatura una incidència d'IS secundària a *E. coli*-ASP nativa entre un 8 i 29%(82,127). La incidència d'IS a PEG-ASP històricament era

relativament alta quan s'administrava de forma seqüencial PEG-ASP post *E. coli*-ASP nativa en la fase d'inducció (3-15% en l'estudi del grup DCOG). Posteriorment, aquest i altres grups han administrat PEG-ASP des de l'inici del tractament. Utilitzant PEG-ASP d'entrada, la incidència de IS és molt més baixa, d'un zero a un 3%(110,114,128–131). La incidència d'IS a *Erwinia*-ASP descrita en la literatura és d'un 3,8%. S'ha de tenir en compte que *Erwinia*-ASP és una formulació d'ASP que s'administra en segona línia i que, per tant, l'exposició a *Erwinia*-ASP (número de dosis i línies de tractament) és menor(119).

Donat que no estan clars els **nivells d'AAS** que assegurin una correcta depleció d'asparagina en el medi extracel·lular, no hi ha un consens universal sobre els nivells d'AAS per a definir la IS. En diversos estudis s'ha investigat la relació entre l'AAS i la depleció d'asparagina. Tanmateix, el nivell  $> 100$  UI/L s'ha utilitzat en molts protocols de recerca i tractament per a definir una AAS en rang terapèutic. Aquest llindar  $> 100$  UI/L ha demostrat una depleció completa d'asparagina en sèrum i ha sigut acceptat en el recent consens de recomanacions d'experts per al maneig de l'al·lèrgia i IS a ASP(76,122). Altres treballs han demostrat que amb nivells menors d'AAS, 50 UI/L, també s'assoleix una depleció completa d'asparagina en sèrum però insuficient en LCR. De fet, encara no s'ha identificat un llindar d'AAS que assegurin una depleció completa d'asparagina a LCR. Rizzari *et al.* van realitzar un estudi per avaluar la depleció d'asparagina en LCR en pacients tractats amb PEG-ASP. En aquest estudi van evidenciar que, independentment de l'AAS, els nivells d'asparagina en LCR es reduïen de forma significativa però només en un 28% de les mostres s'aconseguia una depleció completa d'asparagina. De totes les mostres amb una AAS  $\geq 1.500$  UI/L, només un 33-37% associaven una depleció completa d'asparagina a LCR(132,133). Per altra banda, altres estudis com el del grup COG AALL07P4 han mostrat que es requereix una AAS  $> 400$  UI/L per a assolir una depleció completa en sèrum. Aquest estudi posa de manifest que els nivells d'asparagina sèrics comencen a repuntar quan l'AAS es troba entre 100 i 400 UI/L(134). Un altre fet a tenir en compte, i que l'exemplifiquen diversos estudis, és l'alta variabilitat d'AAS entre pacients que reben el mateix esquema de tractament amb ASP i també intrapacient(135–139). També s'ha descrit variabilitat d'AAS en funció de la via d'administració, im o ev(118) i en funció de la formulació d'ASP administrada(82,110,114).

Referent a l'AAS i les diverses toxicitats relacionades amb l'ASP, s'ha descrit que no hi ha relació entre els nivells d'AAS i el risc de TEV o de toxicitat a nivell de SNC. Sí que existeix una relació directa entre l'AAS i els nivells de triglicèrids però, en el context de LLA pediàtrica, l'augment de la xifra de triglicèrids no s'ha relacionat fins al moment amb un augment de risc de presentar

pancreatitis, trombosi ni toxicitat a nivell de SNC. Referent a la relació entre AAS i pancreatitis, en un estudi recent del grup NOPHO s'ha descrit una possible associació entre AAS i risc de pancreatitis(140–142).

La guia de consens d'experts sobre el maneig de l'al·lèrgia i IS a ASP defineix la IS a PEG-ASP com una AAS  $\leq 100$  UI/L al dia +7 post administració o menor al límit inferior de detecció de la tècnica al dia +14, la IS a *Erwinia*-ASP com una AAS menor al límit inferior de detecció de la tècnica a les 48 hores post administració i la IS a *E. coli*-ASP nativa com una AAS menor al límit inferior de detecció de la tècnica a les 72 hores post administració. Per a confirmar una IS son necessàries dues mostres(110,122). El grup DFCI en el seu protocol DFCI ALL 00-01 defineix la IS a PEG-ASP com l'AAS  $< 100$  UI/L al dia +15 post administració en dues mostres consecutives(79).

Donat que l'objectiu del tractament amb ASP és assolir la depleció d'asparagina, la monitorització de nivells d'asparagina semblaria la forma d'avaluació més directa de l'activitat d'ASP; tanmateix, aquesta estratègia és poc viable ja que la determinació de nivells d'asparagina és tècnicament difícil degut a la ràpida metabolització *ex-vivo* de l'asparagina en presència d'ASP. La determinació d'anticossos anti-ASP tampoc és una estratègia efectiva donada la seva baixa especificitat (64%) i el fet de que molts pacients presenten anticossos anti-ASP en sèrum mantenint una activitat d'ASP correcta (anticossos no neutralitzants). La monitorització de l'AAS és la tècnica *gold standard* per a l'avaluació de l'efectivitat del tractament amb ASP, ja que és la tècnica que millor correlaciona amb l'efectivitat de l'ASP(82,110,122). Històricament, quan no es disposava de la possibilitat de mesurar l'AAS, s'havia plantejat utilitzar els nivells d'amoni com a indicador de l'activitat d'ASP. En cas d'una AAS correcta, l'ASP hidrolitza l'asparagina en aspartat i amoni i secundàriament els nivells d'amoni haurien d'augmentar. En el cas de IS, l'ASP no hidrolitzaria l'asparagina i els nivells d'amoni no haurien d'augmentar. Tong et al, en el seu estudi sobre la possible utilització de les xifres d'amoni com a substitut de la determinació d'AAS, van concloure que els nivells d'amoni no son uns bon predictors de l'AAS, donat que en el seu estudi dues tercers parts dels pacients amb IS presentaven uns nivells d'amoni discretament elevats(143).

Els pacients que presenten al·lèrgia clínica o IS tenen un pitjor pronòstic si no es canvia a una formulació d'ASP sense reactivitat creuada com és *Erwinia*-ASP. Si es canvia a la formulació *Erwinia*-ASP, el pronòstic dels pacients amb hipersensibilitat a ASP derivades d'*E. coli* és equiparable al dels pacients que no han presentat mai hipersensibilitat. Per aquest motiu, el fet d'identificar els pacients afectes d'al·lèrgia clínica o IS i oferir-los una formulació d'ASP sense



reactivitat creuada pot tenir una relació directa amb el seu pronòstic(74,76,82,122,126). Per a poder identificar correctament a aquests pacients és imprescindible conèixer la seva AAS, per tant és recomanable monitoritzar l'AAS en tots els pacients(122,144). En cas de no disposar d'una formulació alternativa d'ASP per a tractar als pacients que han presentat una reacció d'hipersensibilitat amb clínica lleu-moderada o IS es pot plantejar la realització d'un protocol de dessensibilització amb premedicació amb corticoides i antihistamínics. Aquesta estratègia es pot plantejar en casos d'hipersensibilitat a ASP derivada d'*E. coli* en els que no es disposi d'*Erwinia*-ASP o en els casos en els que també presenti el pacient hipersensibilitat a *Erwinia*-ASP. En tal cas, és imprescindible la monitorització d'AAS per a confirmar l'eficàcia del protocol demostrant una AAS adequada. L'aplicació del protocol de dessensibilització s'ha de plantejar com a última opció, ja que la recuperació de l'AAS pot implicar un període de temps impredecible i, a vegades, molt llarg(76,122,145–148). Actualment es disposa d'una formulació d'ASP encapsulada dins d'eritròcits (eryaspase), que podria ser útil en casos d'hipersensibilitat a ASP derivades d'*E. coli* i no disponibilitat d'*Erwinia*-ASP. També existeixen dues ASP recombinants d'*Erwinia*: una és la JZP-458, produïda en *Pseudomonas fluorescens* i amb la mateixa seqüència que *Erwinia*-ASP, l'altra és pegcrisantaspase, que al ser pegilada presenta una semivida més llarga. Ambdues, igual que *Erwinia*-ASP, no tenen reactivitat creuada amb les ASP derivades d'*E. coli*. JZP-458 i pegcrisantaspase podrien ser una alternativa terapèutica per aquells pacients amb hipersensibilitat a ASP derivada d'*E. coli* en situacions de desabastiment d'*Erwinia*-ASP. Malauradament, totes les noves formulacions anteriorment esmentades actualment només estan disponibles en el context d'assajos clínics(149–151).

Recentment, la determinació d'AAS ha permès identificar alguns pacients que presenten les anomenades **reaccions pseudoal·lèrgiques**, reaccions al·lèrgiques simptomàtiques amb absència d'anticossos neutralitzants i que mantenen una AAS adequada. La incidència de les reaccions pseudoal·lèrgiques és difícil d'estimar donat que la seva simptomatologia sovint es solapa amb la de l'al·lèrgia clínica real i tradicionalment s'han descrit en conjunt sense diferenciar-les. Tanmateix, un dels pocs estudis que descriuen la incidència de reaccions pseudoal·lèrgiques és l'estudi realitzat per Nadeem que mostra una incidència del 13% en pacients sota tractament amb PEG-ASP ev. Ni la simptomatologia ni la gravetat de la mateixa permeten diferenciar la pseudoal·lèrgia de l'al·lèrgia real. Per tant, l'única forma de diferenciar-les és mitjançant la determinació d'AAS (absent en al·lèrgia real i present en pseudoal·lèrgia). El mecanisme mitjançant el qual es desenvolupa la pseudoal·lèrgia no està clar. S'ha postulat la hipòtesi d'una reacció al·lèrgica no mediada per anticossos, una reacció infusional relacionada

amb l'administració ev de l'ASP o una reacció relacionada amb el ràpid augment d'amoní causat per l'ASP. Tanmateix, s'han descrit casos que no s'expliquen per cap d'aquests 3 mecanismes. L'actitud recomanada per a les següents administracions d'ASP en un pacient que ha presentat un episodi de pseudoal·lèrgia és, en cas de que la clínica hagi estat lleu o moderada, mantenir la mateixa formulació, premedicar amb corticoides i antihistamínics i seguir monitoritzant l'AAS. En cas de que la clínica hagi estat greu, es pot plantejar canviar a una formulació alternativa sense reactivitat creuada(76,119,152).

És un fet que, tot i la reducció potencial de la immunogenicitat de PEG-ASP, pocs estudis han comparat la incidència d'al·lèrgia clínica d' *E. coli*-ASP nativa *versus* PEG-ASP dins del mateix protocol. Per aquest motiu, l'objectiu d'un dels nostres dos estudis és comparar la incidència d'al·lèrgia clínica en pacients pediàtrics afectes de LLA que han rebut *E. coli*-ASP nativa *versus* PEG-ASP dins del mateix protocol (LLA/SEHOP PETHEMA 2013).

#### 5.3.4 TOXICITAT I FACTORS BIOLÒGICS

A nivell biològic, s'han relacionat certs polimorfismes genètics amb la pancreatitis i la hipersensibilitat associades a ASP. S'entén com a polimorfisme una variant de l'ADN present en almenys un 1% de la població. El tipus més freqüent de polimorfisme és el que comporta una substitució d'un únic nucleòtid (*single nucleotide polymorphism, SNP*), però també es consideren polimorfismes variants de més nucleòtids, com les repeticions en tàndem de dos o més nucleòtids.

Tot i que el mecanisme exacte de la **pancreatitis** associada a ASP és desconegut, és cert que la genètica hi podria exercir un paper. En l'estudi de Wolthers, mitjançant la tecnologia *genome-wide association study* (GWAS), es va demostrar que els pacients amb el polimorfisme rs281366 en el gen *ULK2* o el rs17179470 en el gen *RGS6* presentaven una incidència acumulada de pancreatitis secundària a ASP de 30,2 i 29,7%, respectivament. A més a més, en els pacients menors de 10 anys que presentaven tant el rs281366 com el rs17179470, la incidència augmentava al 85,7%, en comparació amb la incidència acumulada del 4,1% en els pacients que no eren portadors d'aquests al·lels de risc(93). En un estudi posterior, també publicat per Wolthers, els al·lels associats a un augment d'expressió del gen *PRSS1* (rs13228878 i rs10273639) es van relacionar amb un risc augmentat de pancreatitis per ASP ( $p=0,03$  i  $p=0,04$  respectivament). El gen *PRSS1* és el gen que codifica al tripsinogen i aquestes dues variants són

variants de risc ja conegudes per a la pancreatitis en adults tant associada a alcohol com esporàdica. L'excisió del tripsinogen intrapancreàtic en tripsina proteolítica indueix l'autodigestió i la pancreatitis(97). Liu *et al.* van estudiar una cohort de 5.185 pacients pediàtrics i adults joves afectes de LLA i tractats amb ASP. D'aquests, 117 (2,3%) van presentar com a mínim un episodi de pancreatitis secundària a ASP durant el tractament. L'estudi GWAS en aquesta cohort va demostrar que aquells pacients que presentaven el polimorfisme rs199695765 en el gen de la carboxipeptidasa A2 (*CPA2*) tenien un risc augmentat de pancreatitis(92). Altres polimorfismes implicats en la pancreatitis secundària a ASP son: rs11556218 en el gen de *IL6*, rs34708521 en el gen *SPEF2*, rs3809849 en el gen *MYBBP1A* i polimorfismes de la via de l'asparaginasa, com el rs3832526 en el gen *ASNS*(100,153–155). Grimes va publicar un estudi sobre la base genètica que confereix als pacients pediàtrics d'ètnia hispana un augment de risc de pancreatitis. Partint de la base de que en la majoria d'estudis que avaluen la pancreatitis en LLA pediàtrica els pacients d'ètnia hispana hi estan poc representats, Grimes va realitzar un estudi en població pediàtrica (0-21 anys) d'ètnia hispana comparant els polimorfismes genètics que van presentar els pacients amb pancreatitis vs. sense pancreatitis. En el grup de pacients que van presentar pancreatitis hi havia un percentatge major del polimorfisme V470M (rs213950) del gen *CFTR* comparat amb el grup control (64,2% vs. 34,8% respectivament, OR 4,27 p=0,025). Referent als polimorfismes de risc de pancreatitis relacionats amb la via de l'asparagina, aquest mateix estudi descriu que, entre els gens implicats en el metabolisme de l'asparagina, les variants en el gen *ASNS* van ser més freqüents en els pacients amb pancreatitis. En particular, la variant V210E es va detectar en 10 dels 14 casos i en 18 dels 46 controls (OR 3,89, p=0,034)(100).

També s'han descrit polimorfismes genètics relacionats amb el risc d'**al·lèrgia** a ASP en els gens *GRIA1*, *HLA-DRB1*, *NFATC2*, *ASNS*, *CNOT3*, *HLA-DQA1* i *MYBBP1A*(76,153,156–160).

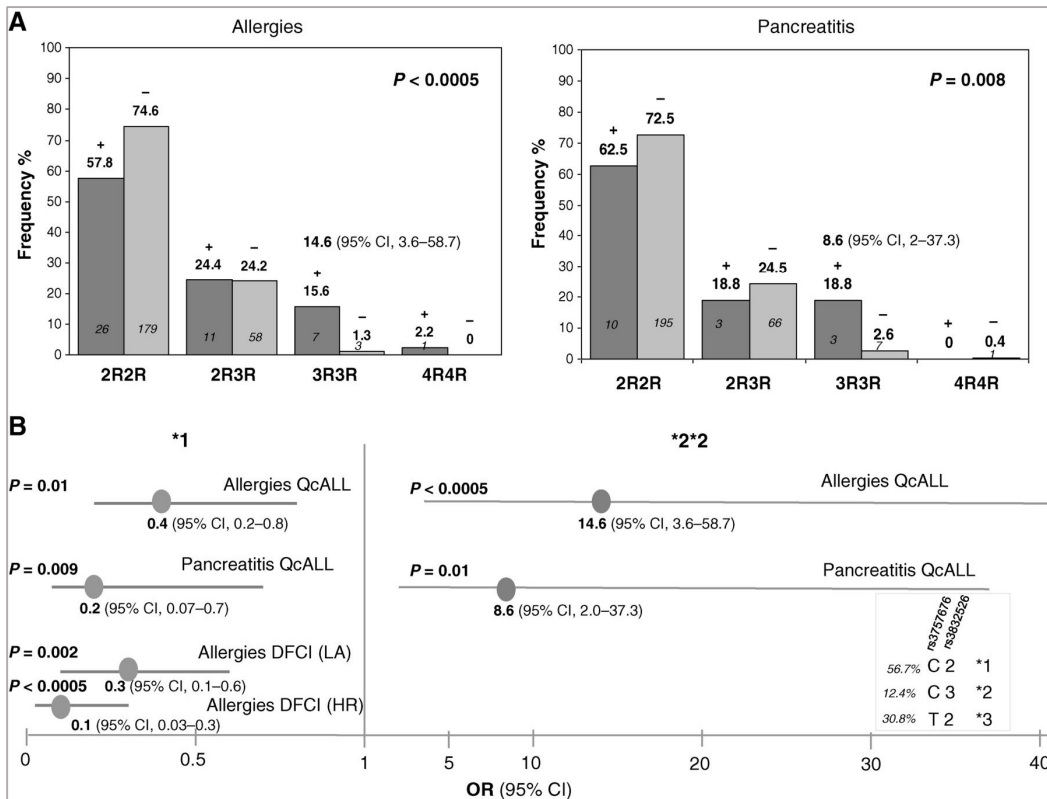
Al 2015, Tanfous va publicar un treball sobre l'associació entre polimorfismes del gen *ASNS* i el risc de toxicitats associades a ASP (**pancreatitis i al·lèrgia**). En aquest estudi es van incloure 285 pacients pediàtrics afectes de LLA d'ètnica caucàsica tractats amb els protocols del grup DFCI 87-01, 91-01, 95-01, o 00-01 (cohort d'estudi) i es va utilitzar com a grup validació a 248 pacients pediàtrics caucàsics tractats amb els protocols DFCI 95-01 i 00-01 ALL. Els polimorfismes que es van estudiar van ser el rs3832526, consistent en una repetició en tàndem (2R vs. 3R), i el rs3757676, consistent en la substitució C-181T en el promotor (taula 8).

Polymorphisms			
gene	dbSNP	position	variation
ASNS	rs3757676	-181	<u>T/C (-strand)</u>
	rs3832526	232	<u>2R/3R ou 4R (-strand)</u> R : CCTGCGCCCCG(C/T)GC

**Taula 8.** Polimorfismes en el gen ASNS en relació amb toxicitat relacionada amb asparaginasa. L'al·lel ancestral figura en negreta i l'al·lel menor figura subratllat. La posició del polimorfisme està descrita respecte al *locus* d'inici de transcripció. Taula adaptada de (154).

En la cohort d'estudi es va observar una associació del polimorfisme de repetició en tàndem (rs3832526) amb pancreatitis i al·lèrgia ( $p=0,008$  i  $p<0,0005$ , respectivament). També es van analitzar els haplotips del gen ASNS formats pel polimorfisme de repetició en tàndem (rs3832526) i la substitució C-181T del promotor (rs3757676) representats com haplotip \*1 (C/C i C/T + 2R/2R) i haplotip \*2 (3R/3R). L'homozigosi per l'haplotip \*2, definit únicament per l'al·lel 3R, es va associar amb un augment de risc tant per al·lèrgia com per pancreatitis (haplotip de risc o d'alta sensibilitat) (figura 13.A). L'haplotip \*1, definit pels al·lells C-181 i 2R es va associar amb un efecte protector tant per al·lèrgia com per pancreatitis (haplotip protector o de baixa sensibilitat) (OR per a al·lèrgia, 0,4; IC 95%, 0,2-0,8; i OR per a pancreatitis, 0,2; IC 95%, 0,07-0,7;  $p \leq 0,01$ ) (figura 13.B).

Com a comprovació dels resultats, es va realitzar l'anàlisi dels polimorfismes i la seva associació amb al·lèrgia i pancreatitis en la cohort de validació. En la cohort de validació no es va observar l'efecte de risc del genotip 3R3R (o haplotip \*2) en al·lèrgia ni en pancreatitis, tot i que sí que es va mantenir l'efecte protector de l'haplotip \*1 enfront només d'al·lèrgia, especialment en el cas de reaccions al·lèrgiques locals i en pacients d'alt risc ( $p=0,002$  i  $p<0,0005$ , respectivament. Figura 13.B).



**Figura 13.** Toxicitat relacionada amb ASP en la LLA infantil en relació amb el polimorfisme de repetició en tàndem i els haplotips resultants en el gen *ASNS*(154).

**A:** polimorfisme de repetició en tàndem en relació amb al·lèrgia i pancreatitis en pacients afectes de LLA de la cohort d'estudi. Freqüència d'individus amb el polimorfisme de repetició en tàndem en pacients amb al·lèrgia i pancreatitis (barres grises fosques, +) i sense (barres grises clares, -). A cada gràfic s'hi indica el nombre d'individus representats per cada barra, un valor *p* per a la diferència entre els diferents polimorfismes i el risc associat al genotip 3R3R (OR amb IC del 95%).

**B:** risc d'al·lèrgia i pancreatitis en relació amb els haplotips del gen *ASNS*. Representació lineal del risc (OR amb IC del 95%) associat a l'haplotip \*1 i \*2 als grups d'estudi (QcALL) i de validació (DFCI) basat en la substitució C-181T (rs3757676) i el polimorfisme de repetició en tàndem (rs3832526). L'efecte protector de l'haplotip \*1 al grup DFCI va ser més evident contra les al·lèrgies locals i al grup d'alt risc. La seqüència i la freqüència dels tres principals haplotips s'indiquen al requadre de la part inferior dreta.

Els autors plantegen que l'absència de replicació en la cohort validació de l'augment de risc de pancreatitis i al·lèrgia relacionat amb el polimorfisme 3R3R podria ser degut a una baixa freqüència del genotip 3R3R, a la diferent distribució de les pancreatitis greus/moderades i de les al·lèrgies sistèmiques/locals entre els dos grups, a la diferent localització geogràfica i ètnica i als diferents protocols de tractament amb diferents dosis d'ASP entre els dos grups(154).

La identificació dels pacients amb polimorfismes de risc de desenvolupar pancreatitis i al·lèrgia associades a ASP podria ser útil per a avaluar el risc/benefici de cara a guiar el seu tractament. Per aquest motiu, l'objectiu d'un dels nostres dos estudis és avaluar l'associació

entre els haplotips de risc i protector en el gen de *ASNS* descrits en l'article de Tanfous(154) i la incidència de pancreatitis i al·lèrgia en una cohort de pacients del nostre centre (Hospital Sant Joan de Déu, HSJD).



## IV. HIPÒTESI





El pronòstic dels pacients pediàtrics afectes de LLA ha millorat dràsticament amb els esquemes actuals de poliquimioteràpia i el major ús del tractament intensiu amb ASP. El tractament amb ASP s'associa amb toxicitats freqüents, i a vegades greus, com al·lèrgia, pancreatitis i trombosi. L'aparició d'aquestes toxicitats pot implicar la interrupció del tractament amb ASP i un augment del risc de recaiguda. Actualment hi ha tres formulacions diferents d'ASP disponibles: la forma nativa (nativa *E. coli*-ASP) i pegilada (PEG-ASP) derivada d'*E. coli* i la derivada d'*E. chrysanthemi* (*Erwinia*-ASP). El seu perfil de toxicitat és similar, excepte per una reducció potencial de la immunogenicitat de PEG-ASP; tanmateix aquest fet no està encara del tot clar. L'al·lèrgia a ASP és una de les raons més habituals per a la seva discontinuació. Degut al desenvolupament d'anticossos neutralitzants, l'al·lèrgia provoca la inactivació del fàrmac. Alguns pacients desenvolupen anticossos neutralitzants sense cap manifestació clínica. Aquest fenomen, conegut com IS, es pot detectar mesurant l'AAS. Els pacients que presenten al·lèrgia o IS tenen pitjor pronòstic si no es canvia a una formulació d'ASP sense reactivitat creuada, com *Erwinia*-ASP en el cas de les formulacions derivades d'*E. coli*. Recentment, l'AAS ha permès identificar alguns pacients que presenten reaccions al·lèrgiques simptomàtiques sense la presència d'anticossos neutralitzants. Aquests fenomen es coneix com a reacció pseudoal·lèrgica.

Estudis previs han relacionat diferents variables clíniques i biològiques amb la presència de toxicitat a l'ASP. D'una banda, a nivell biològic, s'ha descrit un possible paper de certs polimorfismes genètics en la predisposició a presentar toxicitat relacionada amb ASP: pancreatitis i al·lèrgia. Per tant, en cas de confirmar-se aquesta associació entre els polimorfismes de risc i l'aparició de pancreatitis i al·lèrgia associades a ASP, la identificació d'aquests polimorfismes podria aportar informació útil per a avaluar el risc/benefici de cara a guiar el seu tractament. D'altra banda, en relació a les formulacions i formes d'administració del fàrmac, tot i la possible reducció de la immunogenicitat de PEG-ASP, pocs estudis han comparat directament la incidència d'al·lèrgia clínica a *E. coli*-ASP nativa *versus* PEG-ASP dins del mateix protocol.

Així, a l'hora de dissenyar els estudis que componen el present treball de Tesi Doctoral, es varen plantejar les següents hipòtesis:

1. L'anàlisi de polimorfismes en gens relacionats amb toxicitat secundària a ASP podria identificar els pacients amb major risc de pancreatitis o al·lèrgia.
2. La incidència d'al·lèrgia clínica en pacients pediàtrics afectes de LLA que reben un esquema seqüencial d'*E. coli*-ASP nativa seguida de PEG-ASP podria ser major a la dels pacients que reben PEG-ASP com a única formulació dins del mateix protocol clínic (LAL/SEHOP-PETHEMA 2013).
3. Amb la dosi més baixa de PEG-ASP segons fitxa tècnica (1.000 UI/m<sup>2</sup>) es podrien aconseguir nivells d'AAS suficients per a una correcta efectivitat clínica ( $\geq 100$  UI/L).

## V. OBJECTIUS



Els **objectius principals** van ser dos:

- El primer objectiu va ser estudiar la correlació entre els polimorfismes en el gen de l'asparagin-sintetasa relacionats amb toxicitat a asparaginasa en una sèrie de pacients pediàtrics afectes de leucèmia limfoblàstica aguda diagnosticats i tractats al nostre centre (Hospital Sant Joan de Déu).
- El segon objectiu va ser comparar la incidència d'al·lèrgia clínica en pacients pediàtrics amb leucèmia limfoblàstica aguda que han rebut diferents esquemes d'administració d'asparaginasa dins el mateix protocol terapèutic.

Els **objectius específics** adreçats en el projecte s'enumeren a continuació:

- Crear una base de dades de toxicitat i al·lèrgia associades a asparaginasa dels pacients afectes de leucèmia limfoblàstica aguda tractats amb protocols de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas.
- Correlacionar les dades obtingudes amb variables clíniques i biològiques al diagnòstic.
  - Descriure les característiques de les reaccions al·lèrgiques a asparaginasa d'*E. coli* nativa i a asparaginasa d'*E. coli* pegilada: gravetat, moment d'aparició, formulació d'asparaginasa relacionada amb l'episodi, canvi a formulació sense reactivitat creuada, grup de risc del pacient.
  - Comparar la incidència d'al·lèrgia clínica en pacients pediàtrics amb leucèmia limfoblàstica aguda que van rebre un esquema seqüencial amb dos formulacions d'asparaginasa: asparaginasa d'*E. coli* nativa seguida d'asparaginasa d'*E. coli* pegilada *versus* asparaginasa d'*E. coli* pegilada com a única formulació, dins del mateix protocol terapèutic LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 (*Leucemia aguda linfoblàstica / Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas - Protocolo para el Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas 2013*).
- Descriure els nivells d'activitat d'asparaginasa sèrica assolits tant en pic (dia 7) com en vall (dia 14) post administració de asparaginasa pegilada a 1.000 UI/m<sup>2</sup> via intramuscular.
- Analitzar la incidència d'inactivació silent relacionada amb asparaginasa d'*E. coli* pegilada administrada a 1.000 UI/m<sup>2</sup> via intramuscular.
- Comparar la incidència de pancreatitis en pacients pediàtrics afectes de leucèmia limfoblàstica aguda que han rebut un esquema seqüencial (asparaginasa d'*E. coli* nativa seguida d'asparaginasa d'*E. coli* pegilada) *versus* asparaginasa d'*E. coli* pegilada com a única formulació

dins del mateix protocol (*LAL/SEHOP-PETHEMA 2013, Leucemia aguda linfoblàstica / Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas - Protocolo para el Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas 2013*).

- Analitzar les variables relacionades amb l'augment de risc de pancreatitis secundària a asparaginasa.
- Descriure les característiques del episodi de pancreatitis secundària a asparaginasa: gravetat, seqüeles i formulació d'asparaginasa relacionada amb l'episodi.
- Avaluar la correlació entre nivells d'activitat d'asparaginasa sèrica d'asparaginasa d'*E. coli* pegilada i els nivells d'amoni, albúmina i triglicèrids.

## VI. MATERIAL I MÈTODES





## **Disseny general del projecte**

### Treball 1

Es tracta d'un estudi observacional, descriptiu i inferencial. S'han recollit en una base de dades les variables clíniques al diagnòstic i de toxicitat. L'al·lèrgia clínica s'ha avaluat segons els criteris *Common Terminology Criteria for Adverse Events* v 4.0(161) i la pancreatitis segons els criteris del PTWG(84). Paral·lelament, s'ha creat de forma prospectiva una col·lecció d'ADN aprofitant l'excés de les mostres per a la determinació d'AAS, previ consentiment informat per part del pacient i/o els seus representants legals. En aquestes mostres, i en les de la col·lecció d'ADN en remissió confirmada de la leucèmia del nostre centre, s'han estudiat polimorfismes relacionats amb pancreatitis i al·lèrgia a ASP mitjançant amplificació i seqüenciació directa de Sanger. Finalment, s'han correlacionat les dades obtingudes amb variables clíniques i biològiques mitjançant l'anàlisi estadístic (explicat en l'apartat corresponent).

### Treball 2

Es tracta d'un estudi observacional, descriptiu i inferencial. S'han recollit en una base de dades les variables clíniques al diagnòstic i de toxicitat. L'al·lèrgia clínica s'ha avaluat segons els criteris de CTCAE versió 4.0(161) i la pancreatitis segons els criteris de PTWG(84). Paral·lelament, de forma prospectiva s'ha monitoritzat en tots els pacients l'hemograma, creatinina, bilirubina, transaminases, amoni, albúmina i triglicèrids i s'ha determinat de forma prospectiva l'AAS mitjançant el test de  $\beta$ -hidroxamat d'àcid aspàrtic. Mitjançant l'anàlisi estadístic, s'han avaluat les diferències en el risc de presentar toxicitat (al·lèrgia o pancreatitis) entre els dos grups de pacients diferenciats segons la formulació d'ASP rebuda. Finalment, també s'ha avaluat l'associació entre l'AAS i possibles substituïts de la mateixa (amoni, albúmina i triglicèrids) mitjançant models lineals mixtes.

## **Pacients**

### Treball 1

En l'estudi s'han inclòs pacients pediàtrics d'1 a 19 anys amb diagnòstic de LLA en un únic centre (HSJD) des de febrer de 2006 fins a agost de 2019. Inicialment es van incloure retrospectivament mostres d'ADN en remissió de 144 pacients tractats amb els protocols de tractament LAL/SHOP-2005 i LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 emmagatzemades al biobanc del HSJD; durant el període de tesi, es van incloure de forma prospectiva 67 nous pacients tractats amb el protocol de tractament LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 des de juny de 2015 fins a agost de 2019.

## Treball 2

En l'estudi s'han inclòs 126 pacients pediàtrics d'1 a 19 anys amb diagnòstic recent de LLA en un únic centre (HSJD) des de maig de 2013 fins a febrer de 2020 tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.

### **Variables d'estudi**

#### Treball 1

S'ha creat una base de dades informatitzada en format anònim, d'accés limitat al personal investigador del projecte. S'han recollit les principals variables clínic-biològiques al diagnòstic (edat, sexe, ètnia, protocol de tractament, afectació extramedul·lar, paràmetres hematològics, percentatge de blasts en medul·la òssia, fenotip dels blasts, alteracions citogenètiques i moleculars) i de tractament (grup de risc i formulació d'ASP administrada) així com variables evolutives (MRM, data de RC), de toxicitat (al·lèrgia clínica segons els criteris de CTCAE versió 4.0(161) i pancreatitis segons PTWG(84)). Totes aquestes dades, de la mateixa manera que els resultats obtinguts en els estudis de polimorfismes, s'han registrat en forma de variables qualitatives o quantitatives en una base de dades informatitzada per al seu anàlisi.

#### Treball 2

S'ha creat una base de dades informatitzada en format anònim, d'accés limitat al personal investigador del projecte. S'han recollit les principals variables clínic-biològiques al diagnòstic (edat, sexe, protocol de tractament, afectació extramedul·lar, fenotip dels blasts) i de tractament (intensitat i formulació d'ASP administrada) així com variables de toxicitat (al·lèrgia clínica segons els criteris de CTCAE versió 4.0(161) i pancreatitis segons PTWG(84)) i la presència d'IS. Totes aquestes dades s'han registrat en forma de variables qualitatives o quantitatives en una base de dades informatitzada per al seu anàlisi.

### **Determinacions de laboratori**

#### Treball 1

Estudi de polimorfismes:

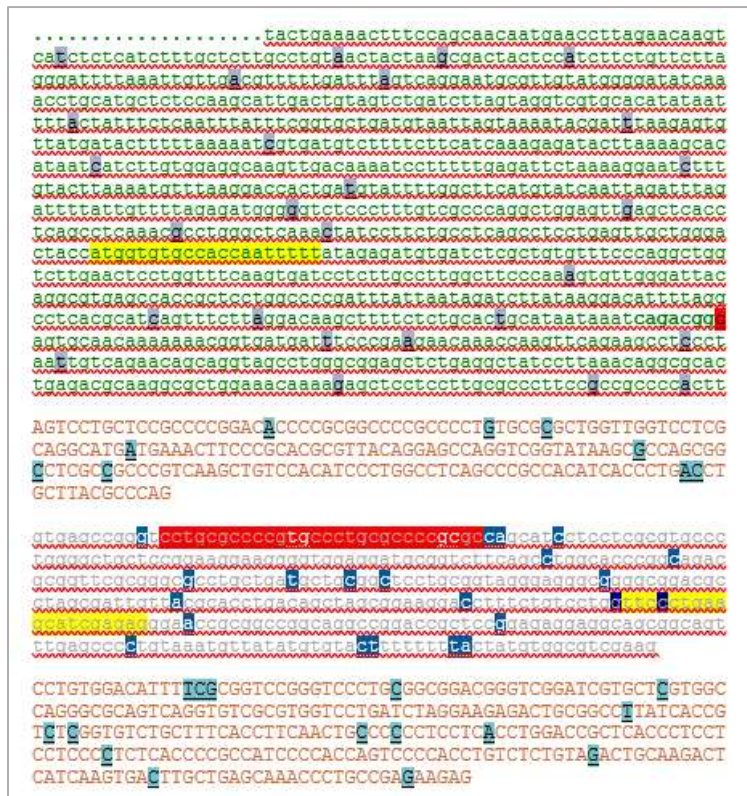
S'han estudiat dos polimorfismes en mostres d'ADN genòmic en el gen *ASNS*, relacionat amb toxicitat per asparaginasa (al·lèrgia i pancreatitis). Els dos polimorfismes que s'han estudiat son 1) rs3757676: presència d'una citosina (C) o d'una timina (T) en la posició 181 del promotor del gen, i 2) rs3832526: presència d'una repetició en tàndem com a duplicació (2R) o triplicació (3R) en la posició 232 del gen. La combinació d'aquests dos polimorfismes s'ha estudiat agrupant-los en dos haplotips. L'haplotip \*1 està compost per la presència d'una citosina en homozigosi o

heterozigosi en la posició 181 i una duplicació en tàndem en la posició 232 (C-181T + 2R). L'haplotip \*2 està compost únicament per la presència d'una triplicació en tàndem dels nucleòtids CCTGCGCCCCG(C/T)GC en la posició 232 (3R/3R)(154). S'han analitzat els polimorfismes del gen *ASNS* amplificant l'ADN mitjançant la tècnica de seqüenciació directa de Sanger. Els *primers* necessaris per a la realització de la reacció d'amplificació, és a dir, les seqüències curtes d'àcids nucleics complementaris a la seqüència que volem amplificar i que actuen com a punt d'inici per a realitzar l'amplificació del gen, s'han obtingut mitjançant el disseny propi dels oligonucleòtids (*in house*) amb el programa Primer3plus(162). A partir de la seqüència del gen *ASNS* definida a les bases de dades *Ensembl*(163) i *Nucleotide blast*(164) es van dissenyar els *primers* per a amplificar en una sola reacció les regions dels polimorfismes rs3757676 (substitució C-181T en el promotor) i rs3832526 (repetició en tàndem 2R vs. 3R en la posició 232 del gen). Les seqüències dels *primers* finals dissenyades són les següents (fig. 14):

ASNS-F 5' ATGGTGTGCCACCAATTTTT 3'

ASNS-R 5' CTCTCGATGCTTCAGGGAAC 3'

Per a l'amplificació de l'ADN es va fer servir una concentració mínima de 500ng de DNA genòmic i les següents condicions de la mescla: en un volum final de 25 µL es van barrejar 0,5µL (10mM) de dNTP, 2,5 µL de buffer, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 5 µL de Q Solution (per l'elevada quantitat de GC en la seqüència), 0,3 µL Taq Polimerasa (Qiagen, Hilden, Germany) i 1µL de cada *primer*. El programa d'amplificació incloïa una desnaturalització inicial a 95°C 10' i 40 cicles de desnaturalització (95°C per 30"), *annealing* (55°C per 30") i extensió (72°C per 30"), i una fase d'extensió final de 10' a 72°C. Un cop amplificat l'ADN, es va realitzar la seqüenciació directa amb el kit Big Dye 3.1 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, United States) segons instruccions del fabricant.



**Figura 14.** Disseny *in house* dels primers per a la realització de l'estudi del gen ASNS. Ressaltat groc: primer Forward i primer Revers. Ressaltat vermell: -181 C/T i 2R/3R.

## Treball 2

En tots els pacients s'ha monitoritzat de forma prospectiva l'hemograma, creatinina, bilirubina, transaminases, amoni, albúmina i triglicèrids cada 7 i/o 14 dies després de cada dosi de PEG-ASP. Des de l'any 2016, s'ha determinat l'AAS en sèrum mitjançant un mètode validat, el test de  $\beta$ -hidroxamat d'àcid aspàrtic, amb un límit inferior de detecció de 5 UI/L. La determinació d'AAS s'ha realitzat als dies 7 i 14 després de l'administració de PEG-ASP (1.000 UI/m<sup>2</sup>) per via im i al dia 2 o 3 després de l'administració d'*Erwinia*-ASP (20.000 UI/m<sup>2</sup> im). No s'ha realitzat la determinació d'anticossos anti-asparaginasa.

## Tractament

### Treball 1

S'ha estratificat als pacients en tres grups de tractament en funció del protocol rebut. Els criteris d'estratificació s'han basat en característiques clíniques, genètiques i de resposta al tractament. La resposta ha estat avaluada per morfologia i mitjançant els nivells de MRM determinada per citometria de flux.

Els pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005 s'han estratificat en els següents grups de risc: risc estàndard (RE), alt risc (AR) i molt alt risc (MAR). La guia terapèutica LAL/SHOP-2005

consisteix en una fase d'inducció de cinc fàrmacs, seguida d'una consolidació, intensificació i manteniment en pacients d'AR. Els pacients de RE no reben el bloc d'intensificació. Els pacients de MAR reben, posteriorment a la consolidació, 3 blocs d'intensificació. La durada total del tractament és de 2 anys. El grup de pacients de MAR reben un auto o al·lo-TPH en funció de la disponibilitat de donant HLA-idèntic.

Els pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 s'han estratificat en els següents grups de risc: AR, risc intermedi (RI) i RE. La guia terapèutica LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 està basada en l'esquema BFM i consisteix en una fase d'inducció de quatre fàrmacs (IA), seguida d'una inducció IB, consolidació, reinducció i manteniment en pacients de RI i RE. Els pacients d'AR reben 3 blocs d'alt risc, 3 cicles de reinducció, i manteniment. La durada total del tractament és de 2 anys. Només un petit subgrup de pacients d'AR, menys del 5% del total de pacients, reben un al·lo-TPH en primera RC.

Referent al tractament amb ASP, els pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005 van rebre les següents dosis d'ASP en funció del grup de risc. RE: en inducció 10 dosis d'*E. coli*-ASP nativa 5.000 UI/m<sup>2</sup> im a dies alterns. AR: en inducció 10 dosis d'*E. coli*-ASP nativa 10.000 UI/m<sup>2</sup> im a dies alterns, en intensificació 10 dosis d'*E. coli*-ASP nativa 10.000 UI/m<sup>2</sup> im a dies alterns i en manteniment 4 dosis d'*E. coli*-ASP nativa 10.000 UI/m<sup>2</sup> im de forma discontinua. MAR: en inducció 10 dosis d'*E. coli*-ASP nativa 10.000 UI/m<sup>2</sup> im a dies alterns i en els blocs d'intensificació 1 dosi de 10.000 UI/m<sup>2</sup> im en cadascun dels 3 blocs. Referent al protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013, al novembre de 2016 hi va haver una esmena al protocol amb la indicació de l'ús de PEG-ASP ja des de la inducció. Aquesta esmena va ser motivada per les altes taxes d'al·lèrgia clínica a ASP potencialment relacionades amb l'ús seqüencial d'*E. coli*-ASP nativa seguida de PEG-ASP. Abans de la realització de l'esmena, els pacients rebien *E. coli*-ASP nativa 10.000 UI/m<sup>2</sup> im/72 h, 8 dosis en inducció i 4 en reinducció, seguida d'una intensificació amb PEG-ASP 1.000 UI/m<sup>2</sup> im en pacients de RI i AR. Els esteroides s'administren simultàniament amb l'ASP, excepte en la fase de manteniment. Després de l'esmena, tots els pacients van rebre PEG-ASP 1.000 UI/m<sup>2</sup> im com a única formulació des de l'inici de tractament. Cal puntualitzar que tant abans com després de l'esmena els pacients van rebre el mateix esquema quimioteràpic, exceptuant la formulació d'ASP (nativa seguida de PEG-ASP vs. PEG-ASP des de l'inici) i la reducció del tractament amb dexametasona de 3 a 2 setmanes durant la fase de reinducció.

Després d'una reacció al·lèrgica (reacció local, erupció cutània o anafilaxi) o després de presentar una IS, en ambdós protocols de tractament LAL/SHOP-2005 i LAL/SEHOP-PETHEMA 2013, els pacients que van rebre *E. coli*-ASP nativa o PEG-ASP van canviar a la formulació *Erwinia*-ASP.

Després d'un episodi de pancreatitis lleu (definida segons els criteris de PTWG) o de trombosi, el tractament amb ASP es va suspendre fins a la resolució del quadre. En cas de pancreatitis greu o d'al·lèrgia a *Erwinia*-ASP, el tractament amb ASP es va suspendre de manera definitiva.

### Treball 2

El tractament rebut pels pacients inclosos a la guia terapèutica LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 ha estat descrit a l'apartat previ.

### **Avaluació de la toxicitat**

#### Treball 1

L'al·lèrgia clínica s'ha avaluat segons CTCAE versió 4.0(161) i la pancreatitis segons les definicions de PTWG(84). S'han recollit els següents efectes adversos: al·lèrgia clínica relacionada amb ASP (tots els graus) i pancreatitis (tots els graus).

#### Treball 2

L'al·lèrgia clínica s'ha avaluat segons CTCAE versió 4.0(161) i la pancreatitis segons les definicions de PTWG(84). S'han recollit els següents efectes adversos: al·lèrgia clínica relacionada amb ASP (tots els graus), pancreatitis (tots els graus) i, a partir de gener de 2016, també la IS. La IS s'ha definit com la AAS <100 UI/L el dia 7 o <20 UI/L el dia 14 després de l'administració de PEG-ASP, AAS <20 UI/L el dia 2 després de l'administració d'*Erwinia*-ASP, i AAS <5 UI/L el dia 3 després d'*E. coli*-ASP nativa. Tots els casos d'IS s'han confirmat en dues mostres diferents.

### **Anàlisi estadística**

#### Treballs 1 i 2

L'anàlisi estadística s'ha realitzat mitjançant el programari R v4.2.1(165), considerant que el valors  $p < 0,05$  són estadísticament significatius. Les variables qualitatives s'han descrit utilitzant les freqüències absolutes i els percentatges, i les variables quantitatives s'han descrit mitjançant la mediana, el mínim i el màxim. S'ha utilitzat la prova exacta de Fisher o la prova  $X^2$  per comparar variables qualitatives entre grups i la prova U de Mann-Whitney per comparar variables quantitatives entre 2 grups. Per estudiar l'associació entre el fet de presentar al·lèrgia o pancreatitis i les diverses variables clíniques s'han utilitzat models de regressió logística univariants i multivariants(166). D'aquests models s'han extret els odds ratio (OR) i el seu interval de confiança del 95%.

Al treball 2, per a calcular la incidència acumulada (IC) d'al·lèrgia i pancreatitis s'ha emprat l'estimador de Kaplan-Meier(167) i s'han comparat utilitzant el test de log-rank(168). El

seguiment s'ha censurat en el moment de l'esdeveniment (al·lèrgia o pancreatitis) o poc després de l'última administració d'ASP en pacients sense toxicitat (3 dies després de l'administració d'E. coli-ASP nativa i 15 dies després en el cas de PEG-ASP). Per a avaluar l'associació entre l'activitat d'ASP i l'amoní, l'albumina i els triglicèrids s'han utilitzat models lineals mixtes, que permeten tenir en compte la correlació entre les mesures dels mateixos pacients. S'ha utilitzat el mètode de maximització de l'índex de Youden(169) per estimar els punts de tall d'amoní, triglicèrids i albumina que discriminen de manera òptima els pacients amb activitat d'ASP baixa (<100 UI/m<sup>2</sup>) dels pacients amb activitat d'ASP correcta (≥100 UI/m<sup>2</sup>). Els intervals de confiança corresponents al 95% s'han calculat amb bootstrap(170).

### **Principis ètics**

#### Treballs 1 i 2

L'estudi s'ha dut a terme d'acord amb les normes ètiques i la Declaració d'Hèlsinki, seguint les directrius nacionals i internacionals, i ha estat aprovat pel Comitè d'ètica local. Per a l'estudi s'ha utilitzat material excedent de les proves diagnòstiques de caràcter assistencial que es realitzen a l'HSJD, pel que no s'ha realitzat cap extracció addicional. Totes les mostres s'han emmagatzemat al Biobanc de l'HSJD, reconegut per la legalitat vigent.

En tots els casos retrospectius es disposa del consentiment informat dels pacients o els seus representants legals per a realitzar estudis biològics aprovats pel comitè ètic del nostre centre. A més a més, s'ha sol·licitat la signatura d'un consentiment informat específic del projecte de forma prospectiva d'acord amb la legalitat vigent.





## VII. RESULTATS



El projecte de tesi es compon de 2 treballs, els resultats dels quals es resumeixen a continuació.

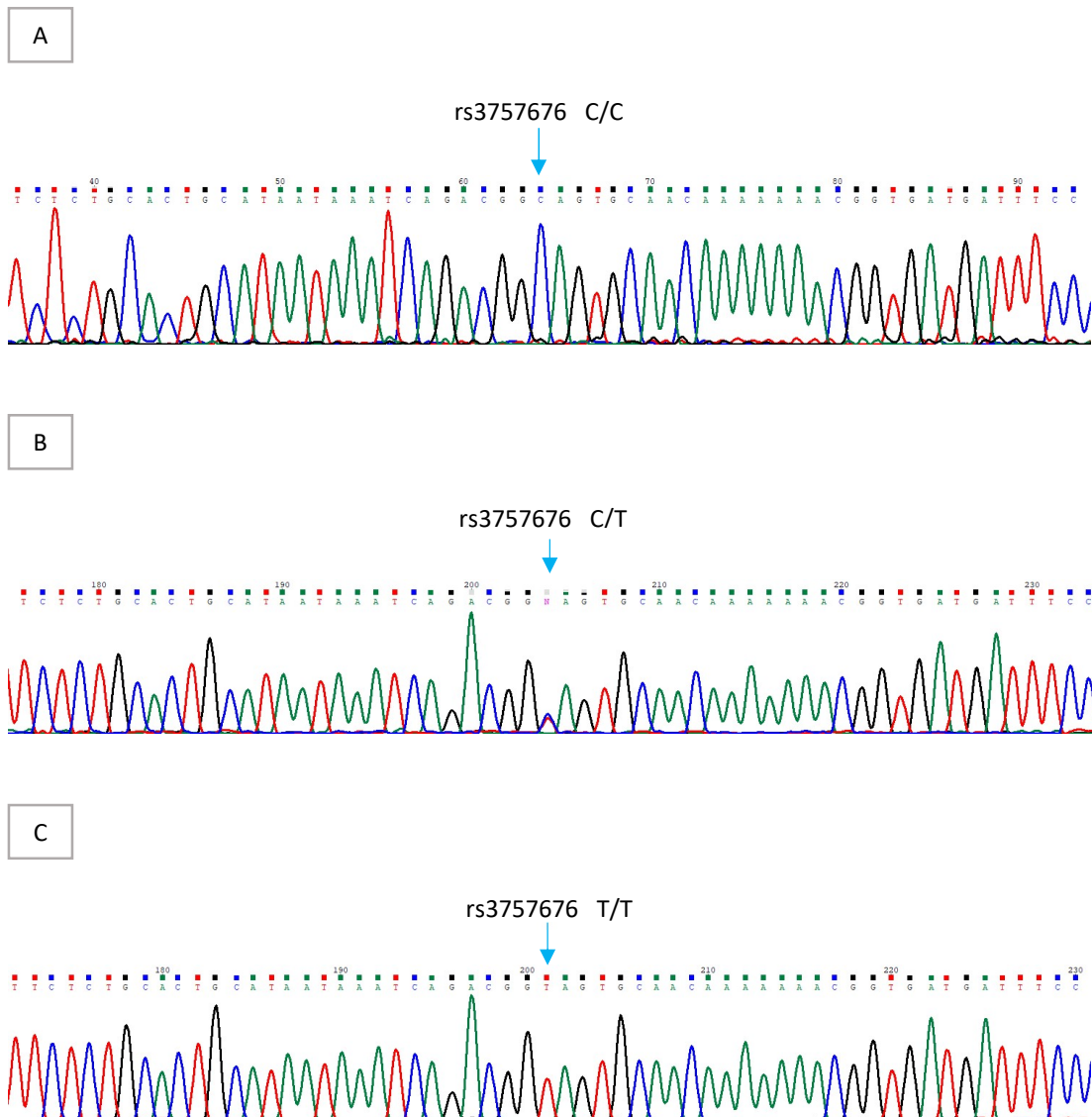
En el treball 1 s'ha estudiat la **correlació entre factors clínics i biològics relacionats amb l'aparició de toxicitat secundària a ASP (pancreatitis i al·lèrgia)**. Els resultats del treball 2 s'han publicat en forma d'article original amb el títol **"Reducció en la incidència d'al·lèrgia clínica amb PEG-asparaginasa enfront l'ús seqüencial d'asparaginasa nativa d'*E. coli* seguida de PEG-ASP en pacients pediàtrics amb leucèmia limfoblàstica aguda"**.

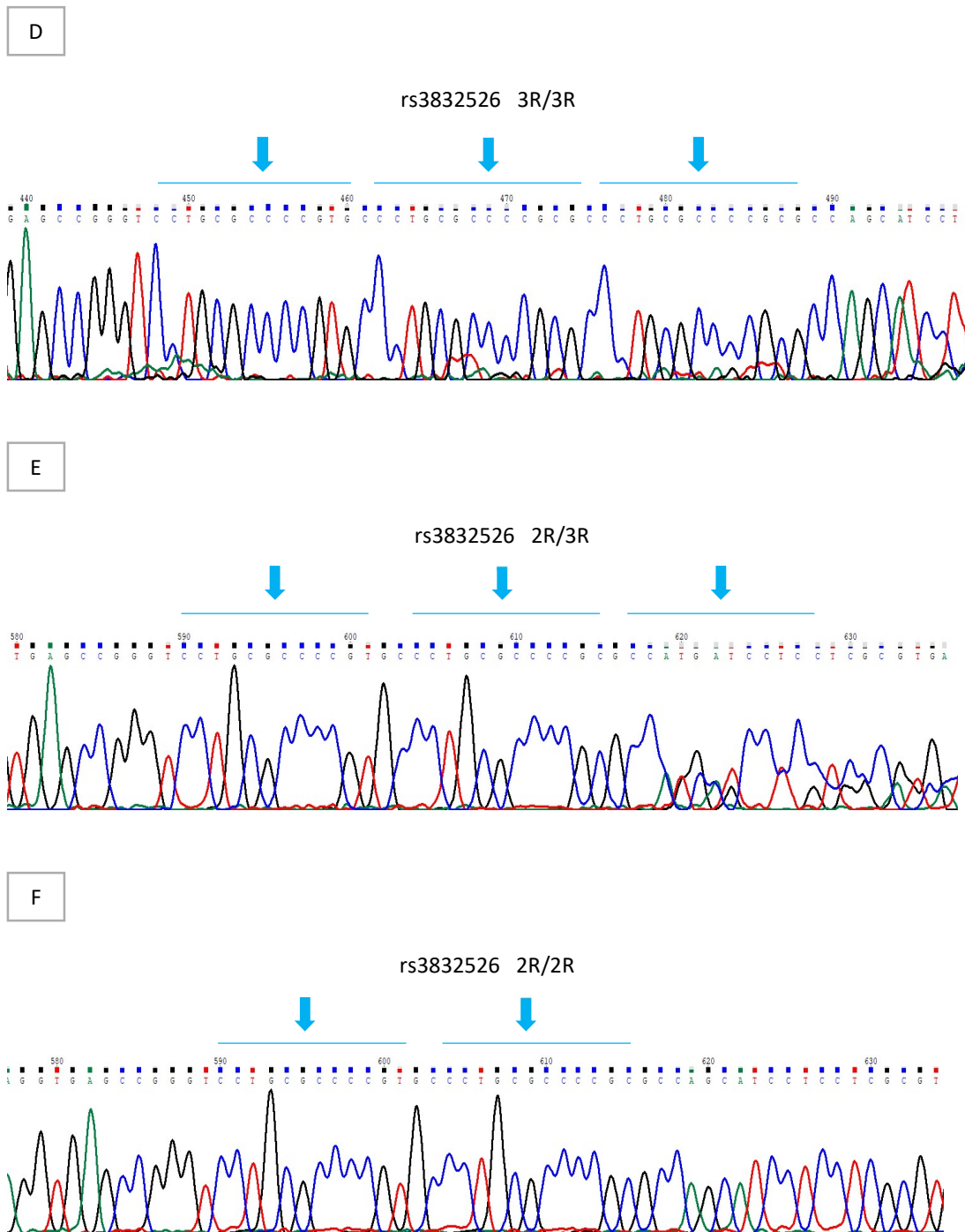
A continuació es detallen els resultats dels 2 treballs, agrupats en funció de cadascun dels objectius plantejats.

**TREBALL 1: Correlació entre factors clínics i biològics relacionats amb l'aparició de toxicitat secundària a asparaginasa (pancreatitis i al·lèrgia).**

Estudi dels polimorfismes i haplotips del gen ASNS

En aquest treball es van analitzar els diferents haplotips protectors i de risc descrits al gen ASNS. En total, es van analitzar 727 seqüències de les regions d'interès d'un total de 211 pacients. Després d'una primera fase en la que les seqüències obtingudes no eren òptimes per cobrir les dues regions on es troben els polimorfismes a estudi, es va dissenyar una sola reacció d'amplificació en la qual s'obtenia un sol producte o amplicó més llarg que permetia analitzar correctament els polimorfismes. Els primers i les condicions de la reacció han estat descrits amb detall a l'apartat de material i mètodes. La figura 15 mostra com a exemple els cromatogrames de cadascuna de les variants observades en els dos polimorfismes analitzats en la nostra sèrie.





**Figura 15.** Cromatogrames resultat de l'anàlisi de seqüenciació Sanger dels polimorfismes rs3757676 (substitució C-181T en el promotor) i rs3832526 (repetició en tàndem 2R vs. 3R en la posició 232 del gen). A) rs3757676: variant homozigota C/C. B) rs3757676: variant heterozigota C/T. C) rs3757676: variant homozigota T/T. D) rs3832526: variant homozigota amb 3 repeticions, 3R/3R. E) rs3832526: variant heterozigota amb 2 i 3 repeticions, 2R/3R. F) rs3832526: variant homozigota amb 2 repeticions 2R/2R.

La freqüència de les diferents variants i haplotips relacionats amb pancreatitis i al·lèrgia per ASP en la nostra sèrie, va ser la següent: **haplotip 1 o protector** (C/C ó C/T + 2R/2R) en 131/211 pacients (62,1%); **haplotip 2 o de risc** (3R/3R) en 4/211 pacients (1,9%). La resta de pacients, 76/211 (36,0%), va presentar altres haplotips no relacionats amb toxicitat prèviament.

La taula 9 mostra la freqüència obtinguda dels genotips dels pacients analitzats i la freqüència esperada segons la base de dades Ensembl(163).

	<b>C/C</b> <b>181</b> <b>ASNS</b>	<b>C/T</b> <b>181</b> <b>ASNS</b>	<b>T/T</b> <b>181</b> <b>ASNS</b>	<b>2R/2R</b> <b>232</b> <b>ASNS</b>	<b>2R/3R</b> <b>232</b> <b>ASNS</b>	<b>3R/3R</b> <b>232</b> <b>ASNS</b>	<b>3R/4R</b> <b>232</b> <b>ASNS</b>	<b>2R/4R</b> <b>232</b> <b>ASNS</b>
Freqüència obtinguda	80/211 (37,9%)	108/211 (51,2%)	23/211 (10,9%)	150/211 (71,1%)	53/211 (25,1%)	4/211 (1,9%)	1/211 (0,5%)	3/211 (1,4%)
Freqüència esperada	Europa 49,5%	Europa 40,4%	Europa 10,1%	Europa 76,1%	Europa 22,9%	Europa 1%	No consta	No consta
	Espanya 45,8%	Espanya 43,9%	Espanya 10,3%	Espanya 69,2%	Espanya 30,8%	Espanya 0%		

**Taula 9.** Freqüència dels genotips del gen *ASNS* dels pacients analitzats i la seva freqüència esperada segons la base de dades Ensembl(163).

### Característiques dels pacients i toxicitat

Es van incloure 211 pacients des de febrer 2006 fins a agost de 2019. Cent quatre pacients van ser tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005 i 107 pacients amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013. La taula 10 mostra les principals característiques clíniques i biològiques dels pacients juntament amb les toxicitats que van presentar (al·lèrgia i pancreatitis).

No es van observar diferències significatives entre els dos grups excepte pel nombre més elevat de pacients d'ètnia llatinoamericana en el grup de pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005 i la major incidència d'al·lèrgia en els pacients tractats amb aquest mateix protocol (veure taula 10). En el grup de pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005, un 19,2% eren llatinoamericans vs. un 80,8% de no llatinoamericans. En canvi, en el grup de pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013, un 7,5% eren llatinoamericans vs. el 92,5% de no llatinoamericans (p=0,021).

	LAL/SEHOP-PETHEMA 2013	LAL/SHOP-2005	<i>p</i>
	<i>n=107</i>	<i>n=104</i>	
Sexe:			0,75
Femení	46 (43,0%)	48 (46,2%)	
Masculí	61 (57,0%)	56 (53,8%)	
Edat diagnòstic (contínua)	5,9 [1,0;17,4]	6,0 [1,1;17,4]	0,74
Edat diagnòstic (cat):			0,55
<10 anys	84 (78,5%)	77 (74,0%)	
≥10 anys	23 (21,5%)	27 (26,0%)	
<b>Ètnia:</b>			<b>0,010</b>
Africana	6 (5,6%)	2 (1,9%)	
Asiàtica	7 (6,5%)	1 (1,0%)	
Europa de l'est	5 (4,7%)	3 (2,9%)	
Espanyola-Europea	73 (68,2%)	76 (73,1%)	
Gitana	2 (1,9%)	0 (0,0%)	
<b>Llatinoamericana</b>	8 (7,5%)	20 (19,2%)	
Altres	6 (5,6%)	2 (1,9%)	
Edat diagnòstic (contínua)	5,9 [1,0;17,4]	6,0 [1,1;17,4]	0,74
Edat diagnòstic (cat):			0,55
<10 anys	84 (78,5%)	77 (74,0%)	
≥10 anys	23 (21,5%)	27 (26,0%)	
Diagnòstic:			0,66
LLA-B	86 (80,4%)	87 (83,7%)	
LLA-T	21 (19,6%)	17 (16,3%)	
Grup de risc:			-
LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 RE	15 (14,0%)	-	
LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 RI	69 (64,5%)	-	
LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 AR	22 (20,6%)	-	
LAL/SHOP-2005 RE	-	16 (15,4%)	
LAL/SHOP-2005 AR	-	69 (66,3%)	
LAL/SHOP-2005 MAR	-	19 (18,3%)	



	LAL/SEHOP-PETHEMA 2013	LAL/SHOP-2005	<i>p</i>
	<i>n=107</i>	<i>n=104</i>	
Pancreatitis:			0,12
No	96 (89,7%)	100 (96,2%)	
Sí	11 (10,3%)	4 (3,8%)	
<b>Al·lèrgia:</b>			<b>0,015</b>
No	91 (85,0%)	73 (70,2%)	
Sí	16 (15,0%)	31 (29,8%)	
Haplotip:			0,13
Risc (3R/3R)	4 (3,7%)	0 (0,0%)	
Protector (C181T + 2R/2R)	63 (58,9%)	68 (65,4%)	
Altres	40 (37,4%)	36 (34,6%)	

**Taula 10.** Característiques clíniques al diagnòstic, característiques biològiques i toxicitat dels 211 pacients pediàtrics afectes de LLA inclosos en l'estudi dividits segons el protocol de tractament rebut.

Referent als polimorfismes prèviament relacionats amb pancreatitis i al·lèrgia secundàries a ASP, tampoc es van detectar diferències en la distribució de les variants entre els 2 grups de tractament (veure taules 10 i 11).

	LAL/SEHOP-PETHEMA 2013	LAL/SHOP-2005	<i>p</i>
<b>Polimorfismes ASNS</b>	<b>N=107</b>	<b>N=104</b>	
rs3757676: C181T			0,45
C/C	42 (39,3%)	38 (36,5%)	
C/T	51 (47,7%)	57 (54,8%)	
T/T	14 (13,1%)	9 (8,7%)	
rs3832526: repetició en tàndem			0,25
2R/2R	74 (69,2%)	76 (73,1%)	
2R/3R	27 (25,2%)	26 (25,0%)	
2R/4R	2 (1,9%)	1 (1,0%)	
3R/3R	4 (3,7%)	0 (0,0%)	
3R/4R	0 (0,0%)	1 (1,0%)	

**Taula 11.** Distribució dels polimorfismes rs3757676 i rs3832526 en el gen ASNS en els 211 pacients pediàtrics afectes de LLA inclosos en l'estudi dividits segons protocol de tractament rebut.

#### Relació entre polimorfismes i toxicitat per ASP

Es va estudiar la correlació entre polimorfismes de gens relacionats amb la toxicitat per ASP i l'aparició d'efectes adversos en els pacients per donar resposta a l'objectiu principal del treball. Els polimorfismes en el gen ASNS relacionats amb el risc d'al·lèrgia i pancreatitis no van presentar una correlació amb la incidència d'aquestes toxicitats en la població estudiada (veure taules 12 i 13).

	Pancreatitis. Tots els pacients		<i>p</i>
	Sí	No	
	<b>N=15</b>	<b>N=196</b>	
Haplotip:			0,57
Risc	0 (0,0%)	4 (2,0%)	
Protector	8 (53,3%)	123 (62,8%)	
Altres	7 (46,7%)	69 (35,2%)	

**Taula 12.** Correlació entre els polimorfismes relacionats amb pancreatitis secundària a ASP i la incidència d'aquesta toxicitat en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

Al·lèrgia clínica. Tots els pacients			
	Sí	No	p
	N=47	N=164	
Haplotip:			1,00
Risc	1 (2,1%)	3 (1,8%)	
Protector	29 (61,7%)	102 (62,2%)	
Altres	17 (36,2%)	59 (36,0%)	

**Taula 13.** Correlació entre els polimorfismes relacionats amb al·lèrgia a ASP i la incidència d'aquesta toxicitat en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

A continuació es presenten els resultats en quant als objectius específics: *Estudiar la correlació entre variables clíniques i l'aparició de pancreatitis i al·lèrgia secundàries a ASP.*

#### 1. PANCREATITIS

En l'estudi global dels pacients inclosos en l'estudi, l'única variable clínica que mostrà correlació amb l'aparició de pancreatitis va ser l'edat, amb un punt de tall als 10 anys. Ni el fenotip dels blastes (LLA-T vs. LLA-B), ni l'ètnia, ni el sexe ni el grup de risc no es van relacionar amb el risc de presentar pancreatitis (veure taula 14). En l'anàlisi univariat el risc de presentar pancreatitis es va associar amb més potència a l'edat  $\geq 10$  anys (OR=4,19) que a l'edat com a variable contínua (OR=1,16) (veure taula 15).

<b>Pancreatitis. Tots els pacients</b>			
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>p</b>
	<b>N=15</b>	<b>N=196</b>	
Sexe:			0,52
Femení	5 (5,3%)	89 (94,7%)	
Masculí	10 (8,5%)	107 (91,5%)	
<b>Edat diagnòstic</b> (variable contínua, anys)	10,1 [2,8;17,4]	5,7 [1,0;17,4]	<b>0,035</b>
<b>Edat diagnòstic</b> (variable categoritzada):			<b>0,010</b>
<10 anys	7 (4,3%)	154 (95,7%)	
≥10 anys	8 (16,0%)	42 (84,0%)	
Ètnia:			0,43
Llatinoamericana	3 (10,7%)	25 (89,3%)	
No llatinoamericana	12 (6,6%)	171 (93,4%)	
Diagnòstic:			1,00
LLA-B	13 (7,5%)	160 (92,5%)	
LLA-T	2 (5,3%)	36 (94,7%)	
Grup de risc:			0,20
SEHOP-PETHEMA 2013 RE	0 (0,0%)	15 (100,0%)	
SEHOP-PETHEMA 2013 RI	6 (8,7%)	63 (91,3%)	
SEHOP-PETHEMA 2013 AR	4 (18,2%)	18 (81,8%)	
SHOP-LAL-2005 RE	0 (0,0%)	16 (100,0%)	
SHOP-LAL-2005 AR	4 (5,8%)	65 (94,2%)	
SHOP-LAL-2005 MAR	0 (0,0%)	19 (100,0%)	

**Taula 14.** Correlació entre variables clíniques i la incidència de pancreatitis en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

	OR	95% CI	p
Fenotip dels blasts: LLA-T	0,68	0,10 2,62	0,63
Edat diagnòstic (variable contínua)	<b>1,16</b>	1,03 1,32	<b>0,014</b>
Edat diagnòstic (variable categoritzada) $\geq 10$ anys	<b>4,19</b>	1,43 12,60	<b>0,0087</b>
Ètnia llatinoamericana	1,71	0,37 5,84	0,43
Sexe: masculí	1,66	0,57 5,51	0,37
Haplotip: protector	0,68	0,23 2,01	0,47

**Taula 15.** Regressió logística univariada entre pancreatitis i factors de risc clínics i biològics en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

A continuació es presenten els resultats en funció del tractament rebut pels pacients. En el subgrup de pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013, igual que en el global de pacients, l'edat, amb un punt de tall als 10 anys, es correlacionà amb el risc de presentar pancreatitis. En l'anàlisi univariat, el risc de presentar pancreatitis es va associar amb més potència a l'edat  $\geq 10$  anys (OR=14,4) que a l'edat major com a variable contínua (OR=1,31). A més a més, en els pacients tractats amb aquest protocol, el grup de risc sí que es va relacionar també amb el risc de presentar pancreatitis. De la mateixa manera que en el global de pacients, ni el fenotip dels blasts (LLA-T vs. LLA-B), ni l'ètnia ni el sexe no es van relacionar amb el risc de presentar pancreatitis (veure taules 16 i 17).

<b>Pancreatitis. LAL/SEHOP-PETHEMA 2013</b>			
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>p</b>
	<b>N=11</b>	<b>N=96</b>	
Sexe:			0,34
Femení	3 (6,5%)	43 (93,5%)	
Masculí	8 (13,1%)	53 (86,9%)	
<b>Edat diagnòstic</b> (variable contínua, anys)	11,5 [3,1;17,4]	5,3 [1,0;16,7]	<b>0,0026</b>
<b>Edat diagnòstic</b> (variable categoritzada):			<b>0,00016</b>
<10 anys	3 (3,6%)	81 (96,4%)	
≥10 anys	8 (34,8%)	15 (65,2%)	
Ètnia:			0,19
Llatinoamericana	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
No llatinoamericana	9 (9,1%)	90 (90,9%)	
Diagnòstic:			1,00
LLA-B	9 (10,5%)	77 (89,5%)	
LLA-T	2 (9,5%)	19 (90,5%)	
<b>Grup de risc:</b>			<b>0,036</b>
RE	0 (0,0%)	15 (100,0%)	
RI	6 (8,7%)	63 (91,3%)	
AR	4 (18,2%)	18 (81,8%)	
Altres	1 (100,0%)	0 (0,0%)	

**Taula 16.** Correlació entre variables clíniques i la incidència de pancreatitis en els pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.

	OR	95% CI		p
Fenotip blasts: LLA-T	0,90	0,13	3,87	0,90
<b>Edat diagnòstic (cont)</b>	<b>1,31</b>	1,12	1,56	<b>0,00098</b>
<b>Edat diagnòstic (cat) ≥10</b>	<b>14,40</b>	3,71	71,77	<b>0,00027</b>
Ètnia llatinoamericana	3,33	0,44	17,18	0,18
Sexe: masculí	2,16	0,59	10,33	0,28
Haplotip: protector	0,82	0,23	3,03	0,76

**Taula 17.** Regressió logística univariada per a avaluar la correlació entre variables clíniques i biològiques i la incidència de pancreatitis en els pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.

En canvi, en el subgrup de pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005, ni l'edat, ni el grup de risc, ni cap altra de les variables clíniques no es va relacionar amb el risc de presentar pancreatitis.

## 2. AL·LÈRGIA CLÍNICA

En l'estudi global del total dels pacients inclosos en l'estudi, es va identificar que la variable clínica **ètnia** correlacionava amb el risc de presentar al·lèrgia ( $p=0,010$ ), de manera que els pacients llatinoamericans presentaven més risc d'al·lèrgia comparat amb els no llatinoamericans. També es va identificar que la variable **grup de risc** correlacionava amb el risc de presentar al·lèrgia ( $p=0,002$ ) de manera que els pacients del grup de MAR del protocol LAL/SHOP-2005 presentaven més risc d'al·lèrgia. Aquestes correlacions es van mantenir en l'anàlisi multivariat. Cap altra de les variables clíniques ni biològiques no es van associar amb el risc de presentar al·lèrgia (veure taules 18, 19, 20 i 21).

<b>Al·lèrgia clínica. Tots els pacients</b>			
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>p</b>
	<b>N=47</b>	<b>N=164</b>	
Sexe:			1,00
Femení	21 (22,3%)	73 (77,7%)	
Masculí	26 (22,2%)	91 (77,8%)	
Edat diagnòstic (variable contínua, anys)	5,9 [1,3;16,7]	6,0 [1,0;17,4]	0,73
Edat diagnòstic (variable categoritzada):			0,80
<10 anys	37 (23,0%)	124 (77,0%)	
≥10 anys	10 (20,0%)	40 (80,0%)	
<b>Ètnia:</b>			<b>0,010</b>
<b>Llatinoamericana</b>	12 (42,9%)	16 (57,1%)	
No llatinoamericana	35 (19,1%)	148 (80,9%)	
Diagnòstic:			0,66
LLA-B	37 (21,4%)	136 (78,6%)	
LLA-T	10 (26,3%)	28 (73,7%)	

**Taula 18.** Correlació entre variables clíniques i la incidència d'al·lèrgia clínica en el global dels pacients inclosos en l'estudi.

<b>Al·lèrgia clínica – Tots els pacients</b>			
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>p</b>
	<b>N=47</b>	<b>N=163</b>	
Grup de risc:			<b>0,0020</b>
LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 RE	2 (13,3%)	13 (86,7%)	
LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 RI	10 (14,5%)	59 (85,5%)	
LAL/ SEHOP-PETHEMA 2013 AR	4 (18,2%)	18 (81,8%)	
LAL/ SHOP-2005 RE	0 (0,0%)	16 (100,0%)	
LAL/ SHOP-2005 AR	22 (31,9%)	47 (68,1%)	
LAL/SHOP-2005 MAR	9 (47,4%)	10 (52,6%)	

**Taula 19.** Correlació entre el grup de risc i la incidència d'al·lèrgia clínica en el global dels pacients inclosos en l'estudi.



	OR	95% CI		p	Global p
Fenotip blasts: LLA-T	1,31	0,56	2,88	0,51	-
Edat diagnòstic (variable contínua)	0,99	0,91	1,07	0,78	-
Edat diagnòstic (variable categoritzada) $\geq 10$ anys	0,84	0,37	1,78	0,66	-
<b>Ètnia llatinoamericana</b>	<b>3,17</b>	1,36	7,29	<b>0,0067</b>	-
Sexe: masculí	0,99	0,52	1,92	0,98	-
Haplotip: protector	0,99	0,50	1,97	0,97	0,99
Haplotip: risc	1,16	0,06	9,71	0,90	
Grup risc: LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 RI	1,10	0,25	7,72	0,91	<b>0,039</b>
Grup risc: LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 AR	1,44	0,24	11,56	0,70	
<b>Grup risc: LAL/SHOP-2005 MAR</b>	<b>5,85</b>	1,18	44,37	<b>0,047</b>	

**Taula 20.** Regressió logística univariada entre al·lèrgia clínica i factors de risc clínics i biològics en el global de pacients inclosos en l'estudi.

	OR	95% CI		p	Global p
<b>Ètnia llatinoamericana</b>	<b>3,22</b>	1,32	7,77	<b>0,0092</b>	
Grup risc: LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 RI	0,96	0,21	6,74	0,96	<b>0,046</b>
Grup risc: LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 AR	1,25	0,21	10,13	0,81	
<b>Grup risc: LAL/SHOP-2005 MAR</b>	<b>5,52</b>	1,11	41,99	<b>0,055</b>	

**Taula 21.** Regressió logística multivariada entre al·lèrgia clínica i factors de risc clínics i biològics en el global de pacients inclosos en l'estudi.

Tanmateix, realitzant l'estudi per subgrups de pacients segons el protocol de tractament rebut, en subgrup de pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 cap de les variables clíniques ni biològiques es va relacionar amb el risc de presentar al·lèrgia. En contraposició als resultats del subgrup LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 i en la mateixa línia que els resultats en el global de pacients, en el subgrup de pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005, sí que es va relacionar tant l'ètnia com el grup de risc amb el risc de presentar al·lèrgia clínica. D'aquesta manera, els pacients llatinoamericans van presentar més episodis d'al·lèrgia que els no llatinoamericans en l'estudi univariat ( $p=0,032$ ) i els pacients pertanyents al grup d'alt risc i molt alt risc van presentar més episodis d'al·lèrgia en comparació amb els pacients de risc estàndard ( $p=0,0025$ ) (veure taules 22 i 23).

Al·lèrgia clínica. LAL/SHOP-2005			
	Sí	No	p
	N=31	N=73	
Sexe:			0,61
Femení	16 (33,3%)	32 (66,7%)	
Masculí	15 (26,8%)	41 (73,2%)	
Edat diagnòstic (variable contínua, anys)	6,2 [1,3;14,1]	5,7 [1,1;17,4]	0,60
Edat diagnòstic (variable categoritzada):			0,79
<10 anys	24 (31,2%)	53 (68,8%)	
≥10 anys	7 (25,9%)	20 (74,1%)	
Ètnia:			0,54
Llatinoamericana	10 (50,0%)	10 (50,0%)	
No llatinoamericana	21 (25,0%)	63 (75,0%)	
Diagnòstic:			0,16
LLA-B	23 (26,4%)	64 (73,6%)	
LLA-T	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
<b>Grup de risc:</b>			<b>0,0035</b>
RE	0 (0,0%)	16 (100,0%)	
AR	22 (31,9%)	47 (68,1%)	
MAR	9 (47,4%)	10 (52,6%)	
<b>Grup de risc categoritzat:</b>			
Risc estàndard	0 (0,0%)	16 (100,0%)	<b>0,0025</b>
No risc estàndard (AR i MAR)	31 (35,2%)	57 (64,8%)	

**Taula 22.** Correlació entre variables clíniques i la incidència d'al·lèrgia en els pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005.

	OR	95% CI		p
Fenotip blasts: LLA-T	2,47	0,84	7,24	0,096
Edat diagnòstic (variable contínua)	0,97	0,87	1,08	0,60
Edat diagnòstic (variable categoritzada) ≥10 anys	0,77	0,27	2,01	0,61
<b>Ètnia llatinoamericana</b>	<b>3,00</b>	1,09	8,33	<b>0,032</b>
Sexe: masculí	0,73	0,31	1,70	0,47
Haplotip: protector	1,16	0,48	2,92	0,74

**Taula 23.** Regressió logística univariada entre al·lèrgia clínica i factors de risc clínics i biològics en el grup de pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005.

Donat que en el nostre estudi es va detectar que els pacients d'ètnia llatinoamericana presentaven més risc d'al·lèrgia i aquest s'ha relacionat amb el fet de rebre un protocol d'alt risc (augment de dosis d'asparaginasa i de reexposicions a la mateixa), vam estudiar la distribució dels pacients llatinoamericans a través dels diversos grups de risc del protocol LAL/SHOP-2005. Es va confirmar que la representació de pacients llatinoamericans en els grups de tractament d'AR o MAR va ser, de forma significativa, major a la dels pacients no llatinoamericans ( $p=0,0074$ ).

### 3. ASSOCIACIÓ ENTRE ÈTNIA LLATINOAMERICANA I TOXICITAT SECUNDÀRIA A ASP

Donats els resultats presentats en l'apartat anterior, és a dir l'augment d'incidència d'al·lèrgia en els pacients llatinoamericans, en el nostre estudi vam avaluar en major profunditat l'associació entre pertànyer a aquesta ètnia, el risc de presentar al·lèrgia i el risc augmentat en aquesta població de presentar variables clíniques i biològiques relacionades amb el risc d'al·lèrgia.

Es va avaluar l'associació entre les diferents ètnies i els haplotips de risc i protector del gen *ASNS* en el grup de pacients global de l'estudi. S'evidencià que, en la majoria d'ètnies, l'haplotip predominant era el protector. En canvi, en l'ètnia llatinoamericana, els haplotips predominants eren els neutres (altres), igual que en l'ètnia asiàtica. Per tant, l'ètnia llatinoamericana estaria menys protegida enfront el risc de presentar al·lèrgia (veure taula 24). Aquesta associació significativa entre l'ètnia llatinoamericana i l'asiàtica i l'haplotip neutre com a predominant es manté en el subgrup de pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005 ( $p=0,045$ ).

Haplotip	Risc	Protector	Altres	<i>p</i>
	<i>N=4</i>	<i>N=131</i>	<i>N=76</i>	
Ètnia:				<b>0,024</b>
Africana	1 (12,5%)	6 (75,0%)	1 (12,5%)	
Asiàtica	1 (12,5%)	3 (37,5%)	4 (50,0%)	
Europa de l'est	0 (0,0%)	4 (50,0%)	4 (50,0%)	
Espanyola-Europea	2 (1,3%)	99 (66,4%)	48 (32,2%)	
Gitana	0 (0,0%)	2 (100,0%)	0 (0,0%)	
<b>Llatinoamericana</b>	0 (0,0%)	11 (39,3%)	17 (60,7%)	
Altres	0 (0,0%)	6 (75,0%)	2 (25,0%)	

**Taula 24.** Associació entre els diferents haplotips del gen *ASNS* (haplotip de risc, protector i altres) en el global de pacients.

També es va avaluar l'associació entre pertànyer a l'ètnia llatinoamericana, el risc de presentar al·lèrgia i el risc augmentat en aquesta població de presentar variables clíniques i biològiques relacionades amb el risc d'al·lèrgia. Tal i com mostra la taula 25, els pacients d'ètnia llatinoamericana tenien significativament més risc de presentar al·lèrgia en comparació amb la resta d'ètnies ( $p=0,017$ ). En canvi, no presentaven un risc augmentat de pancreatitis ni diferència d'edat en comparació amb els pacients no llatins.

	Llatinoamericans	No Llatinoamericans	<i>p</i>
	<i>N=28</i>	<i>N=183</i>	
Edat diagnòstic:			0,065
<10 anys	17 (60,7%)	144 (78,7%)	
≥10 anys	11 (39,3%)	39 (21,3%)	
<b>Haplotip:</b>			<b>0,017</b>
Altres	17 (60,7%)	59 (32,2%)	
Protector	11 (39,3%)	120 (65,6%)	
Risc	0 (0,0%)	4 (2,2%)	
<b>Al·lèrgia:</b>			<b>0,010</b>
Sí	12 (42,9%)	35 (19,1%)	
No	16 (57,1%)	148 (80,9%)	
Pancreatitis:			0,43
Sí	3 (10,7%)	12 (6,6%)	
No	25 (89,3%)	171 (93,4%)	

**Taula 25.** Associació entre ètnia, toxicitats associades a ASP i factors clínics i biològics relacionats amb aquestes toxicitats.

Per tant, els pacients llatinoamericans presenten significativament més al·lèrgia a ASP i més factors de risc relacionats amb al·lèrgia (menys haplotip protector en el global de pacients i major pertinença a grups d'AR i MAR del protocol LAL/SHOP-2005).

**TREBALL 2: Reducció en la incidència d'al·lèrgia clínica amb PEG-asparaginasa enfront l'ús seqüencial d'asparaginasa nativa d'*E. coli* seguida de PEG-ASP en pacients pediàtrics amb leucèmia limfoblàstica aguda.**

Característiques dels pacients

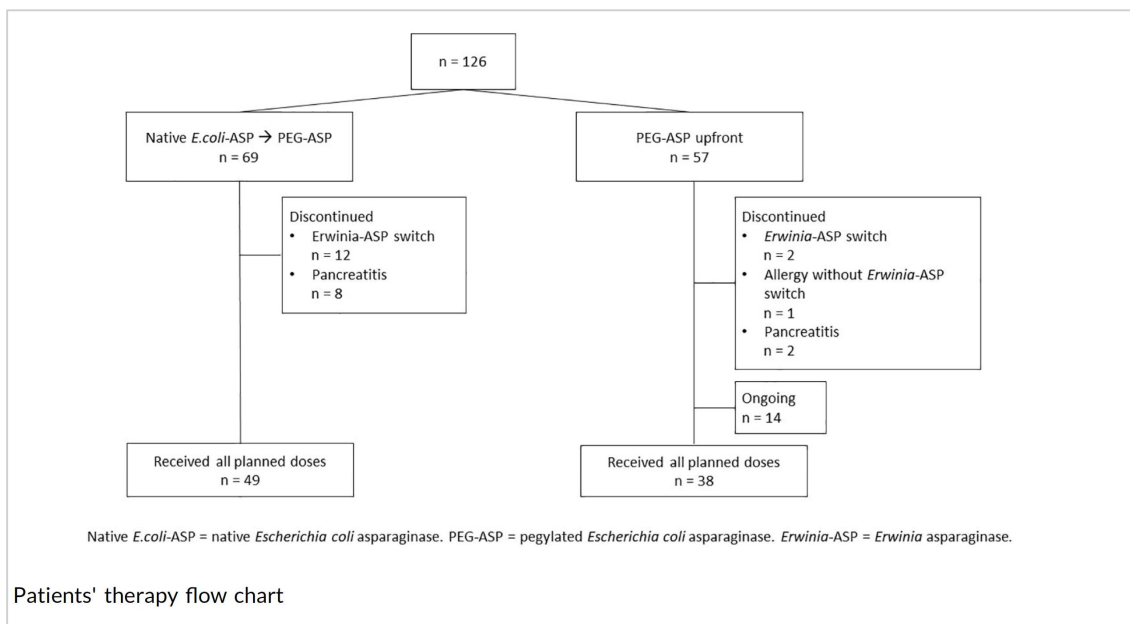
Es van incloure 126 pacients entre maig de 2013 i febrer de 2020. Seixanta-nou pacients van rebre un esquema seqüencial d'*E. coli*-ASP nativa seguida de PEG-ASP (grup 1) i 57 van ser tractats amb PEG-ASP en primera línia (grup 2). La taula 26 mostra les característiques principals dels pacients. No es van observar diferències significatives entre els dos grups excepte pel nombre més elevat de pacients en la branca d'alt risc del grup 2.

	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP scheme (n = 69) n (%)	PEG-ASP upfront scheme (n = 57) n (%)	p-value
Sex, girls	31 (44.9)	20 (35.1)	0.35
Age, years median (range)	5.0 (1.1-16.7)	6.3 (1.1-17.7)	0.39
<10 years	54 (78.3)	47 (82.5)	0.72
≥10 years	15 (21.7)	10 (17.5)	
BCP-ALL	58 (84.1)	45 (78.9)	0.61
T-ALL	11 (15.9)	12 (21.1)	
Standard risk	13 (18.8)	2 (3.5)	0.01
Intermediate risk	45 (65.2)	36 (63.2)	
High risk	11 (15.9)	19 (33.3)	

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; BCP, B-cell precursor; Native *E. coli*-ASP, native *E. coli*-asparaginase; PEG-ASP, polyethylene glycosylated *E. coli*-asparaginase.

**Taula 26.** Característiques clíniques al diagnòstic dels 126 pacients pediàtrics afectes de leucèmia limfoblàstica aguda inclosos en l'estudi.

Dels pacients del grup 1, 49/69 (71,0%) van completar totes les dosis planificades d'ASP. Dels pacients d'aquest grup que no van poder completar totes les dosis d'ASP, en 12 es va substituir per *Erwinia*-ASP per hipersensibilitat a ASP derivada d'*E. coli* i en 8 pacients es va suspendre el tractament amb ASP perquè van presentar pancreatitis. Entre els pacients del grup 2, 38/57 (66,7%) van completar totes les dosis d'ASP planificades. En 2 pacients es va substituir per *Erwinia*-ASP, en 3 pacients es va suspendre (en 2 casos degut a pancreatitis i en 1 cas degut a al·lèrgia clínica durant la fase de manteniment), i 14 pacients estaven encara sota tractament amb ASP dins de la fase de manteniment en el moment de l'anàlisi de les dades (figura 16). Tot i així, tots ells havien rebut, com a mínim, el 80% de les dosis planificades d'ASP.

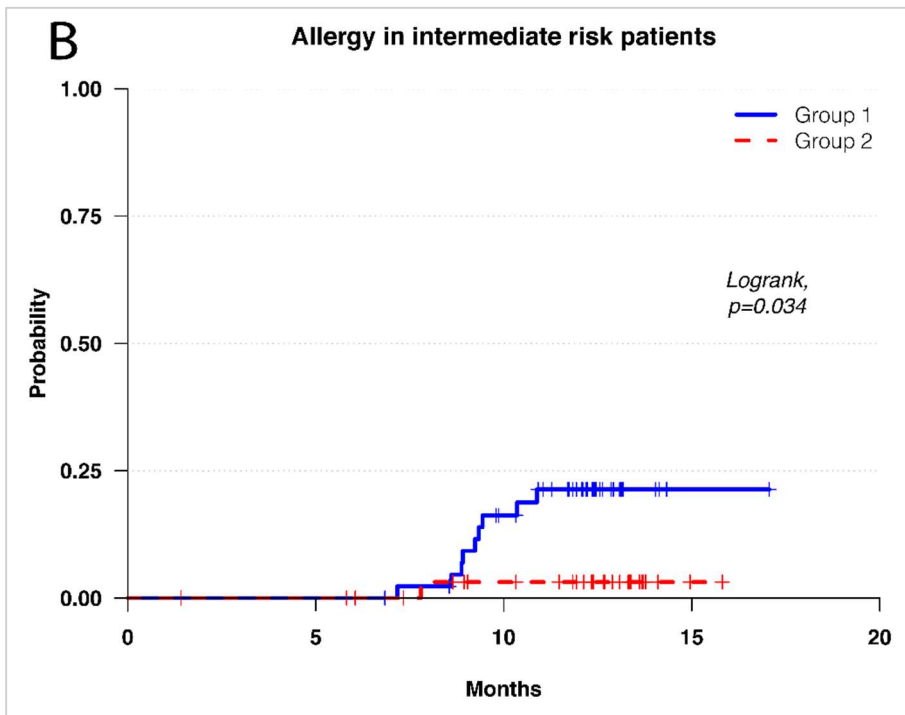
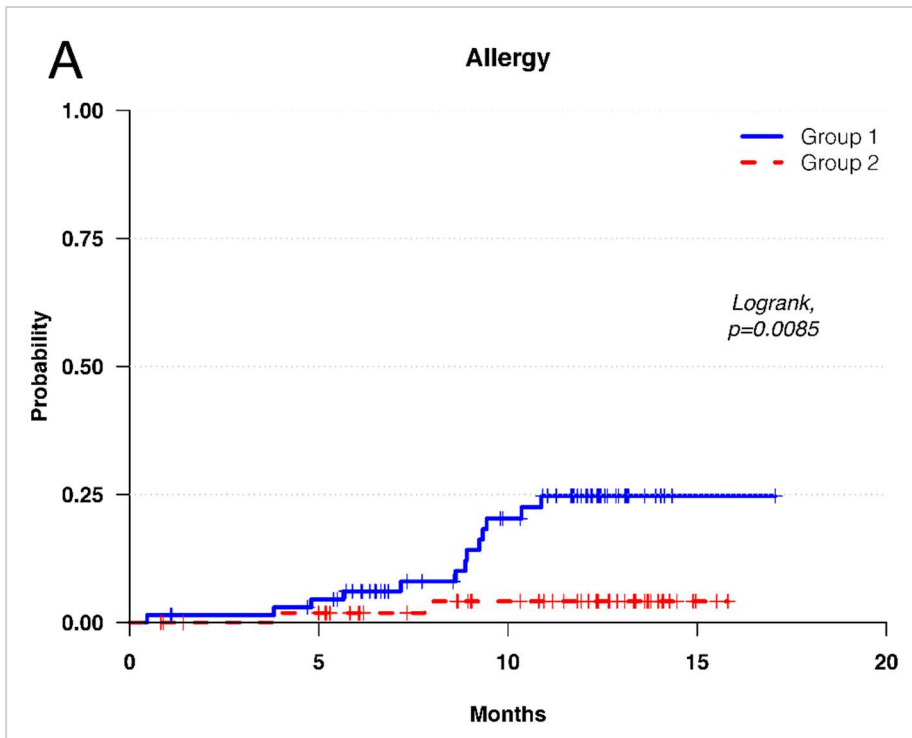


**Figura 16.** Diagrama de flux del tractament rebut.

A continuació es presenten els resultats en quant als objectius principals i específics.

- *Comparar la incidència d'al·lèrgia clínica en pacients pediàtrics afectes de LLA que han rebut un esquema seqüencial (E. coli-ASP nativa seguida de PEG-ASP) versus PEG-ASP com a única formulació dins del mateix protocol (LAL/SEHOP-PETHEMA 2013).*

La incidència acumulada (IC) d'al·lèrgia als 15 mesos va ser significativament major en el grup 1 (esquema seqüencial) que en el grup 2 (PEG-ASP com a única formulació) ( $p = 0,0085$ ), 24,7% i 4,1% respectivament (figura 17). Encara que només dos pacients del grup que va rebre PEG-ASP com a única formulació van desenvolupar al·lèrgia, un va requerir tractament de suport a la unitat de cures intensives per clínica d'anafilaxi fluctuant.



**Figura 17.** Incidència acumulada d'al·lèrgia dels 126 pacients pediàtrics diagnosticats de leucèmia limfoblàstica aguda inclosos en l'estudi (A) i només incloent els pacients de risc intermedi (B).



- *Descriure les característiques de les reaccions al·lèrgiques a E. coli-ASP nativa i PEG-ASP: gravetat, moment d'aparició, formulació d'ASP relacionada amb l'episodi, canvi a formulació sense reactivitat creuada, grup de risc del pacient.*

Es va observar al·lèrgia simptomàtica en l'11,9% dels pacients (15/126). La taula 27 mostra les característiques de les reaccions al·lèrgiques. Tots els episodis d'al·lèrgia relacionats amb *E. coli*-ASP nativa van ser lleus, però 8/11 (73%) episodis d'al·lèrgia relacionats amb PEG-ASP van ser greus i 2 van requerir tractament de suport a la unitat de cures intensives.

La majoria de les reaccions al·lèrgiques es van produir després d'un període lliure d'ASP, amb només una reacció (1/15, 6,7%) durant la inducció, sis (40%) durant els blocs o reinduccions d'alt risc, i vuit (53%) durant el manteniment, majoritàriament després de la segona o tercera dosi de PEG-ASP.

En la majoria dels pacients que van presentar al·lèrgia a ASP derivades d'*E. coli* (13/15, 87%) es va canviar la formulació a *Erwinia*-ASP, dos d'ells (15%) també van desenvolupar al·lèrgia a *Erwinia*-ASP.

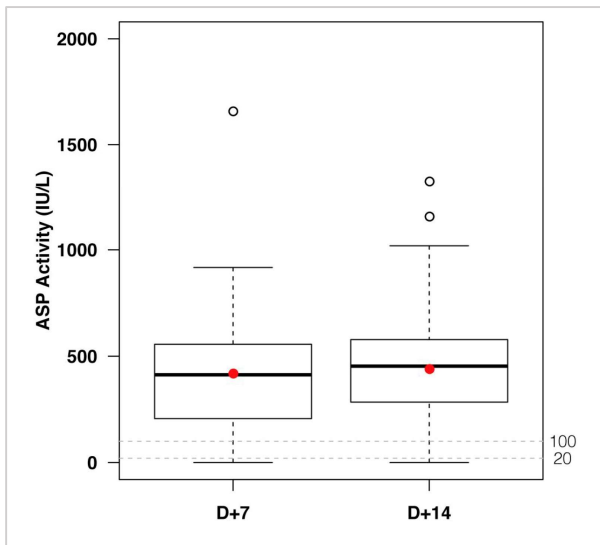
Group	Risk group <sup>a</sup>	ASP formulation	Grade and type of reaction	Treatment phase	Switch to <i>Erwinia</i>	Allergy to <i>Erwinia</i>
Pt. 1	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	SR	Native <i>E. coli</i> -ASP Allergy grade 1 (mild) cutaneous	I	Yes	No
Pt. 2	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	SR	Native <i>E. coli</i> -ASP Allergy grade 2 (moderate) allergic reaction	Rel	Yes	No
Pt. 3	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	Native <i>E. coli</i> -ASP Allergy grade 1 (mild) cutaneous	Rel	Yes	No
Pt. 4	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	Native <i>E. coli</i> ASP Allergy grade 1 (mild) cutaneous	Rel	Yes	No
Pt. 5	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP Allergy grade 2 (moderate) urticarial rash	M	No	No
Pt. 6	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP Anaphylaxis grade 4 (severe) ICU admission	M	Yes	No
Pt. 7	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	No
Pt. 8	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP Allergy grade 2 (moderate) rash	M	Yes	No
Pt. 9	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	No
Pt. 10	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	Yes
Pt. 11	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	No
Pt. 12	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	HR	PEG-ASP Anaphylaxis grade 3 (severe)	HR-block 2	Yes	Yes
Pt. 13	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	HR	PEG-ASP Allergy grade 2 (moderate) rash	HR-block 2	Yes	No
Pt. 14	PEG-ASP upfront	IR	PEG-ASP Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	No
Pt. 15	PEG-ASP upfront	HR	PEG-ASP Anaphylaxis grade 4 (severe) ICU admission	HR-block 2	N	N

Note: Allergy was assessed using the Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0.  
Abbreviations: HR, high risk; I, induction; ICU, intensive care unit; IR, intermediate risk; M, maintenance; Native *E. coli*-ASP, native *E. coli*-asparaginase; PEG-ASP, polyethylene glycosylated *E. coli*-asparaginase; Pt, patient; Rel, re-induction; SR, standard risk.  
<sup>a</sup>Patients 12 and 15 were initially classified to IR and allocated in the HR due to poor minimal residual disease clearance (see Table S1).

**Taula 27.** Característiques de les reaccions al·lèrgiques relacionades amb l'administració d'asparaginasa.

- *Descriure els nivells d'AAS assolits tant en pic (dia 7) com en vall (dia 14) post administració de PEG-ASP 1.000 UI/m<sup>2</sup> via im.*

Els nivells d'AAS es va mesurar en 368 mostres després d'haver administrat 1.000 UI/m<sup>2</sup> im de PEG-ASP. Al dia 14 post administració, l'AAS estava per sobre de 100 UI/L en el 90,6% (259/286) dels mostres. L'AAS després de l'administració de PEG-ASP 1.000 UI/m<sup>2</sup> im va ser de 412,5 UI/L (rang 0-1.656) el dia 7 i 453,0 UI/L (rang 0-1.325) el dia 14 (figura 18).



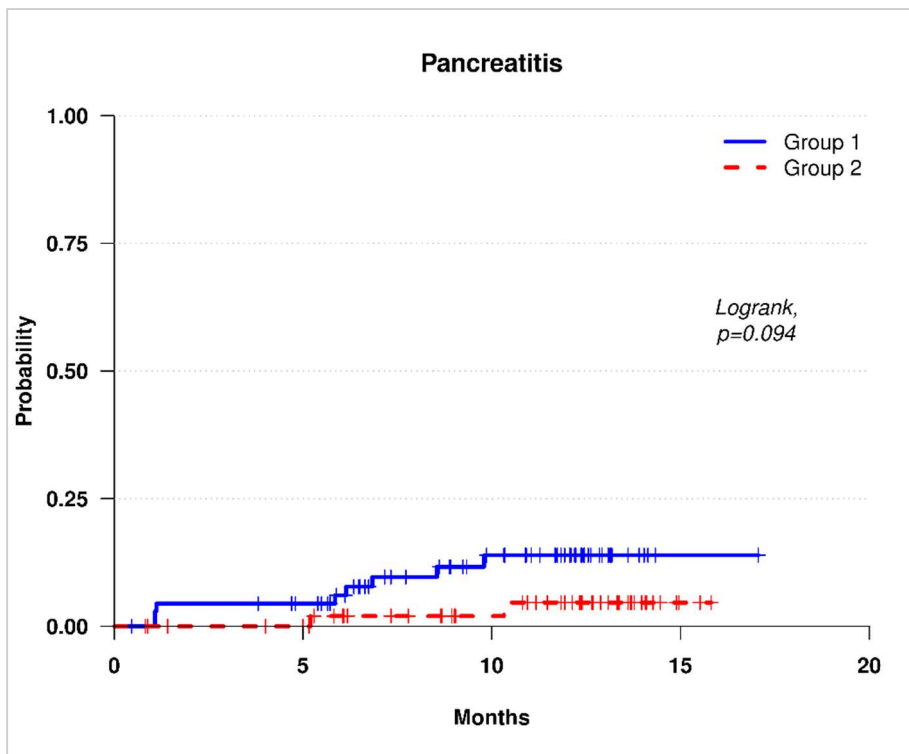
**Figura 18.** Activitat d'asparaginasa de tots els pacients els dies 7 i 14 posteriors a l'administració de PEG-ASP 1.000 UI/ m<sup>2</sup> per via intramuscular. Descripció del diagrama de caixes: les tres línies horitzontals dins del quadre representen el primer, segon i tercer quartils, respectivament; els bigotis representen 1,5 vegades el rang interquartil de la caixa; els punts blancs representen valors atípics i els punts vermells representen el valors mitjans.

- *Analitzar la incidència de IS relacionada amb PEG-ASP administrada a 1.000 UI/m<sup>2</sup> via im.*

L'AAS es va determinar en 399 mostres de 68 pacients, la majoria pertanyents al grup 2 (56/68). Es va detectar IS en 4/68 pacients (5,9%). La incidència de IS fou menor en el grup 2 (2/56, 3,6%) enfront el grup 1 (2/12, 16,7%) però de forma no significativa ( $p = 0,14$ ). Tots els pacients que van presentar IS van canviar de formulació a *Erwinia*-ASP i posteriorment tots van assolir una AAS adequada.

- *Comparar la incidència de pancreatitis en pacients pediàtrics afectes de LLA que han rebut un esquema seqüencial (E. coli-ASP nativa seguida de PEG-ASP) versus PEG-ASP com a única formulació dins del mateix protocol (LAL/SEHOP-PETHEMA 2013).*

Pel que fa a la formulació d'ASP, no vam observar diferències estadísticament significatives en la incidència de pancreatitis al comparar els pacients que van rebre l'esquema seqüencial (grup 1) versus els que van rebre PEG-ASP com a única formulació (grup 2). La incidència acumulada de pancreatitis als 15 mesos va ser del 13,9% (CI 95% 4,3-22,6) i del 4,6% (CI 95% 0-10,8) per als grups 1 i 2, respectivament ( $p = 0,094$ ) (figura 19).



**Figura 19.** Incidència acumulada de pancreatitis en els 126 pacients pediàtrics diagnosticats de LLA inclosos en l'estudi.

- *Analitzar les variables relacionades amb l'augment de risc de pancreatitis secundària a ASP.*

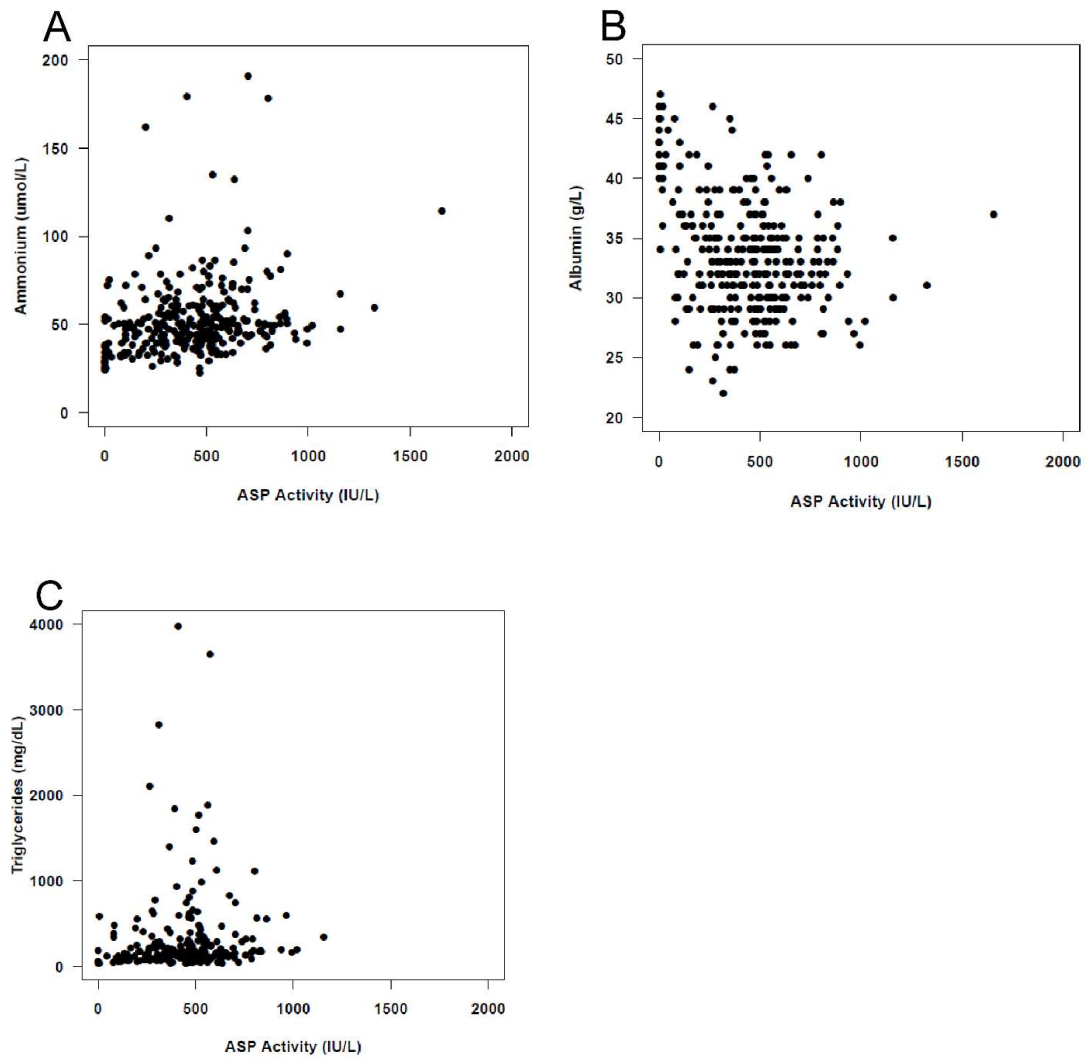
Els episodis de pancreatitis van ser més freqüents de forma significativa entre els pacients majors de 10 anys. En aquest grup d'edat van presentar pancreatitis 7/25 pacients (28%) enfront els 3/101 (3,0%) dins del grup d'edat de pacients més joves, menors de 10 anys ( $p = 0,0005$ ).

- *Descriure les característiques del episodis de pancreatitis secundària a ASP: gravetat, seqüeles i formulació d'ASP relacionada amb l'episodi.*

Dels 126 pacients, 10 van presentar pancreatitis (7,9%). En 8 pacients l'episodi de pancreatitis fou greu i en 2 pacients es va associar a seqüeles cròniques (diabetis i pseudoquist). La meitat de les pancreatitis es van produir després d'haver rebut *E. coli*-ASP i l'altra meitat després de PEG-ASP.

- *Avaluar la correlació entre nivells d'AAS de PEG-ASP i els nivells d'amoni, albúmina i triglicèrids.*

En el nostre estudi, la comparació directa de les dades quantitatives va mostrar una associació significativa entre els nivells d'AAS, els nivells d'amoni ( $p < 0,0001$ ), d'albúmina ( $p < 0,0001$ ), i de triglicèrids ( $p = 0,037$ ) (figura 20).



**Figura 20.**

**A.** Associació entre AAS i l'amoni. Per cada 100 UI/L d'augment d'AAS, l'amoni augmenta en 2,1 unitats (CI 95% 1,2-3,1) ( $p < 0,0001$ ).

**B.** Associació entre AAS i albúmina. Per cada 100 UI/L d'augment d'AAS, l'albúmina disminueix 0,53 unitats (CI 95% 0,33-0,73) ( $p < 0,0001$ ).

**C.** Associació entre AAS i triglicèrids. Per cada 100 UI/L d'augment d'AAS, els triglicèrids augmenten 32,2 unitats. (CI 95% 6,4-58,1) ( $p = 0,015$ ).



## VIII. DISCUSSIÓ





PEG-ASP és un fàrmac aprovat per la FDA i l'EMA pel tractament en primera línia de la LLA que ha substituït l'*E. coli*-ASP nativa en primera línia en molts protocols de LLA. La toxicitat i l'eficàcia d'ambdues formulacions sembla que no difereixen, excepte per una possible reducció de les reaccions d'hipersensibilitat i una tendència a una hepatotoxicitat més elevada amb PEG-ASP en adults(111). A nivell clínic, s'han relacionat algunes variables amb el risc de presentar toxicitat. Així, s'ha descrit un augment de pancreatitis en els pacients d'edat major de 10 anys, i en els que reben protocols de tractament més intensiu per presentar un alt risc de recaiguda(52,79,83,87,88,90–99). També s'ha observat la relació entre el risc de hipersensibilitat i protocols de tractament per a pacients d'alt risc que inclouen múltiples reexposicions a ASP(171). A nivell biològic, també s'ha descrit l'associació entre certs polimorfismes genètics i el risc de desenvolupar pancreatitis i hipersensibilitat associades a ASP(76,92,97,100,153–155,157–160).

A partir dels treballs que componen la tesi, i amb l'objectiu de poder definir d'una forma més acurada aquelles variables relacionades amb el risc de presentar toxicitat secundària a ASP, vam estudiar la correlació entre polimorfismes en gens relacionats amb la toxicitat per ASP i l'aparició de toxicitat (gen *ASNS*, pancreatitis i al·lèrgia) i vam comparar la incidència d'al·lèrgia clínica a ASP en una sèrie de pacients pediàtrics afectes de LLA tractats amb diferents formulacions d'ASP dins del mateix protocol.

### **Correlació de polimorfismes al gen *ASNS* i toxicitat**

En el primer treball no vam evidenciar correlació entre els polimorfismes estudiats en el gen *ASNS* i la incidència de pancreatitis o al·lèrgia en la nostra sèrie de pacients. En l'estudi publicat per Tanfous, es va detectar una associació significativa entre els haplotips de risc i protector i la incidència de pancreatitis i al·lèrgia en la cohort d'estudi ( $p=0,008$  i  $p<0,005$  respectivament). Tanmateix, aquesta associació, no es va mantenir en la cohort de validació. Els autors d'aquest estudi plantegen que l'absència de replicació en la cohort de validació podria ser degut a una baixa freqüència de l'haplotip de risc, un 3,5% en la cohort d'estudi; diferències en la gravetat dels episodis d'al·lèrgia entre els 2 grups; o la diferent localització geogràfica dels pacients dels 2 grups, tot i que tots ells eren d'ètnica caucàsica. Un altre factor que podria explicar l'absència de replicació en la cohort de validació seria el fet de que hi havia diferències entre els protocols de tractament rebuts per un i altre grup. De fet, quan es va limitar l'anàlisi del grup validació només als pacients que van rebre els mateixos protocols de tractament que el grup d'estudi, sí que es va mantenir l'associació entre pancreatitis i al·lèrgia i l'haplotip de risc

en la cohort de validació ( $p \leq 0,02$ )(154). En la nostra població d'estudi la incidència de l'haplotip de risc també fou baixa (1,9%). Vam estudiar si els diferents haplotips del gen *ASNS* (de risc, protector i altres) es distribuïen de forma uniforme entre totes les ètnies i vam evidenciar que, en la majoria d'ètnies, l'haplotip predominant era el protector. En canvi, en l'ètnia llatinoamericana, no predominaven l'haplotip protector si no els neutres (altres). Per tant, l'ètnia llatinoamericana estaria menys protegida enfront el risc de presentar al·lèrgia.

### **Variabls clíniques relacionades amb al·lèrgia**

En l'estudi de les variables clíniques relacionades amb el risc de presentar al·lèrgia, vam detectar que el grup de pacients tractat amb el protocol LAL/SHOP-2005 presentava significativament més incidència d'al·lèrgia que el grup tractat amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 ( $p=0,015$ ). Els factors que haurien pogut contribuir a que el grup LAL/SHOP 2005 presentés més al·lèrgia son els següents. En primer lloc, la formulació d'ASP utilitzada en aquest protocol era exclusivament *E. coli*-ASP nativa; en canvi, els pacients tractat amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013, van rebre únicament PEG-ASP o *E. coli*-ASP nativa combinada amb PEG-ASP. Per tant, donat el potencial augment d'immunogenicitat relacionat amb *E. coli*-ASP nativa, la major incidència d'al·lèrgia en el grup LAL/SHOP-2005 podria ser deguda a l'ús d'una formulació d'ASP més immunogènica. Una altra de les raons que podria explicar l'augment d'al·lèrgia en el grup LAL/SHOP-2005 podria ser el fet que hi havia significativament més població llatinoamericana en el grup LAL/SHOP-2005 que en el grup LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 ( $p=0,010$ ) donat que, en el nostre estudi, l'ètnia llatinoamericana es va associar amb el risc de presentar al·lèrgia ( $p=0,010$ ). Aquesta associació entre l'ètnia llatinoamericana i el risc augmentat d'al·lèrgia es podria explicar pel fet de que, en la nostra població d'estudi, la incidència de l'haplotip protector enfront al·lèrgia del gen *ASNS* va ser menor en població llatinoamericana que en població no llatinoamericana. Aquesta presència d'un nombre major de població llatinoamericana, amb menys haplotip protector enfront al·lèrgia, dins del grup LAL/SHOP-2005 podria explicar l'augment d'incidència d'al·lèrgia en els pacients tractats amb aquest protocol. El fet de que en el grup de pacients tractats amb LAL/SHOP-2005 hi hagués significativament més pacients llatinoamericans en comparació amb LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 ( $p=0,021$ ) podria ser degut a l'onada d'immigració llatinoamericana al nostre país que va succeir durant la dècada 2000-2010(172).

En el nostre estudi vam detectar també una altra associació entre una variable clínica i el risc d'al·lèrgia: el grup de risc. D'aquesta manera, en l'estudi global de tots els pacients, els pacients pertanyents al grup de molt alt risc de recaiguda van presentar més risc d'al·lèrgia que els pacients pertanyents als altres grups de risc ( $p=0,002$ ). En l'anàlisi del subgrup de pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005, també es va relacionar el grup de risc de recaiguda amb el risc de presentar al·lèrgia clínica. Aquesta associació entre rebre un protocol d'alt risc de recaiguda i l'augment d'incidència d'al·lèrgia també ha estat prèviament descrit en la literatura mèdica(171) i podria explicar-se pel major nombre de dosis i el major nombre de reexposicions a ASP que inclouen els protocols d'alt risc. Donat que en el nostre estudi es va detectar que els pacients d'ètnia llatinoamericana presentaven més risc d'al·lèrgia i aquest augment de risc s'ha relacionat amb el fet de rebre un protocol d'alt risc (augment de dosis d'ASP i de reexposicions a la mateixa), vam estudiar la distribució dels pacients llatinoamericans a través dels diversos grups de risc del protocol LAL/SHOP-2005. Es va confirmar que la representació de pacients llatinoamericans en els grups de tractament d'alt o molt alt risc va ser, de forma significativa, major a la dels pacients no llatinoamericans ( $p=0,0074$ ). Per tant, en el nostre estudi, es va detectar que els pacients d'ètnia llatinoamericans presentaven significativament més al·lèrgia a ASP i més factors de risc relacionats amb al·lèrgia: menys haplotip protector i major pertinença a grups d'alt risc. En contraposició als nostres resultats, en altres treballs publicats no es va evidenciar aquesta associació entre l'ètnia llatinoamericana i el risc augmentat d'al·lèrgia(171,173).

### **Variables clíniques relacionades amb pancreatitis**

En referència a la segona de les toxicitats estudiades, la pancreatitis, en l'estudi del grup global de pacients l'única variable clínica que es va relacionar amb el risc de presentar pancreatitis va ser l'edat, tant categòrica ( $\geq 10$  anys) com contínua ( $p=0,0087$  i  $p=0,014$  respectivament). A més a més, en el subgrup de pacients tractats amb el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013, el grup de risc de recaiguda (alt risc) també es va relacionar amb el risc de presentar pancreatitis ( $p=0,036$ ). Pot ser que aquesta associació entre pertànyer al grup d'alt risc de recaiguda i pancreatitis sigui deguda a que en el grup de pacients d'alt risc hi havia un nombre important de pacients majors de 10 anys (que també es va associar amb el risc de pancreatitis). Aquesta relació entre edat major de 10 anys i risc de pancreatitis també s'ha descrit en múltiples treballs anteriors(52,79,83,84,87,90–92,94–97), de la mateixa manera que la relació entre el fet de rebre

un protocol d'alt risc de recaiguda (major intensitat de tractament) i el risc de pancreatitis(88,90,92,98,99).

El nostre estudi té algunes limitacions, com es el relativament baix nombre de pacients analitzats sobretot a l'hora de detectar polimorfismes genètics amb baixa incidència poblacional. En la població estudiada no vam detectar una associació entre els polimorfismes del gen *ASNS* i el risc de presentar pancreatitis o al·lèrgia, tot i que això podria ser degut al nombre relativament petit de pacients inclosos. Tanmateix, els estudis posteriors realitzats mitjançant la tècnica GWAS i en un nombre molt major de pacients sí que han descrit associacions entre altres polimorfismes i el risc de presentar toxicitat, però cap d'ells ha confirmat l'associació entre els polimorfismes avaluats en el nostre estudi i el risc de presentar pancreatitis o al·lèrgia.

**En resum**, en la nostra població d'estudi composta per pacients tractats amb el protocol LAL/SHOP-2005 i LAL/SEHOP-PETHEMA 2013, no vam detectar associació entre polimorfismes del gen *ASNS* i el risc de presentar al·lèrgia o pancreatitis. El risc de presentar al·lèrgia a ASP es va associar tant amb el fet de rebre un protocol d'alt risc de recaiguda com el fet de pertànyer a l'ètnia llatinoamericana. El risc de presentar pancreatitis secundària a ASP es va associar amb el fet de tenir una edat major de 10 anys en el moment del diagnòstic.

### **Relació entre la formulació i forma d'administració de l'asparaginasa i la presència d'al·lèrgia clínica**

En el nostre estudi vam comparar la incidència d'al·lèrgia clínica a ASP en una sèrie de pacients pediàtrics afectes de LLA tractats amb diferents formulacions d'ASP dins del mateix protocol. Vam observar una incidència acumulada més alta d'al·lèrgia a ASP en pacients tractats amb *E. coli*-ASP nativa seguida d'una intensificació amb PEG-ASP, en comparació amb aquells pacients tractats només, ja d'entrada, amb la formulació pegilada. També vam corroborar que amb una dosi de PEG-ASP de 1.000 UI/m<sup>2</sup> s'assoleixen nivells adequats d'AAS per sobre de 100 UI/L en el 90% de les determinacions realitzades als 14 dies post administració de PEG-ASP im.

La incidència d'al·lèrgia clínica en protocols pediàtrics recents que inclouen l'administració de PEG-ASP de forma intensiva i prolongada és inferior a la descrita en controls històrics en els que s'utilitzava *E. coli*-ASP nativa(123,126,174,175). No obstant això, existeixen

pocs estudis que comparin de forma directa ambdues formulacions en pacients pediàtrics dins del mateix protocol, i aquests no van mostrar diferències significatives en la incidència d'al·lèrgia(114,115). El *Children Cancer Group* (CCG) va presentar els resultats d'un estudi comparatiu aleatoritzat sobre la incidència d'al·lèrgia clínica en pacients pediàtrics diagnosticats de LLA de risc estàndard tractats amb PEG-ASP im *versus* *E. coli*-ASP nativa im. No es van detectar diferències significatives en la incidència d'al·lèrgia clínica entre els 2 grups(115). Aquesta manca de diferències es podria relacionar amb la baixa incidència d'al·lèrgia en la població d'aquest estudi, descrita només en 2 de 118 pacients. Aquesta baixa incidència d'al·lèrgia pot ser secundària al fet de que el grup de pacients de risc estàndard rep un tractament amb ASP menys intensiu(174,175). En el protocol d'estudi DFCI 05-001 es realitzar una comparació aleatoritzada entre *E. coli*-ASP im *versus* PEG-ASP ev administrades post inducció. La incidència d'al·lèrgia clínica fou similar en ambdues branques (9 vs. 12%)(114).

En el nostre estudi vam agrupar els pacients segons la formulació d'ASP rebuda dins del mateix protocol. Els pacients que van rebre *E. coli*-ASP im en inducció i reinducció seguida d'una intensificació amb PEG-ASP im presentaven més episodis d'al·lèrgia clínica que aquells que van rebre PEG-ASP com a única formulació (25% vs. 4% respectivament,  $p=0,0085$ ). Un 25% dels pacients que van rebre PEG-ASP en primera línia encara no havien completat totes les dosis d'ASP pautades per protocol en el moment de l'estudi i, per tant, encara estaven a risc de presentar al·lèrgia. Per aquest motiu vam utilitzar com a mesura la incidència acumulada (IC). D'aquesta manera vam poder incloure tots els pacients i dividir-los en dos grups comparables. Els nostres resultats van en la mateixa línia que els obtinguts en el protocol DCOG ALL10, en el qual s'administrava de forma seqüencial *E. coli*-ASP nativa (5.000 UI/m<sup>2</sup> cada 3 dies) en inducció seguida de PEG-ASP (2.500 UI/m<sup>2</sup> cada dues setmanes) en post-inducció(110,140). Amb aquest esquema, es va observar una incidència d'al·lèrgia clínica elevada (22%). En el seu següent protocol, DCOG-ALL 11, en el què els pacients van rebre PEG-ASP en primera línia (1.500 UI/m<sup>2</sup> inicialment i dosi individualitzada posteriorment) la incidència d'al·lèrgia va disminuir fins al 10%. Analitzant els resultats d'ambdós protocols (DCOG-ALL 10 i DCOG-ALL 11), el grup DCOG descrigué una menor incidència d'al·lèrgia en els pacients que van rebre PEG-ASP en primera línia comparat amb els que van rebre un esquema seqüencial d'*E. coli*-ASP nativa seguida de PEG-ASP, tot i que aquesta no va ser estadísticament significativa ( $p=0,07$ )(110,123). Hem de destacar que en els estudis del grup DCOG es va determinar l'AAS per a confirmar els episodis d'al·lèrgia, descartant d'aquesta manera les reaccions pseudoal·lèrgiques. En el nostre estudi no totes les reaccions al·lèrgiques es van confirmar mitjançant l'AAS, només les que es van presentar després de gener de 2016 (3/15, 20% dels episodis d'al·lèrgia).

En el nostre estudi, la incidència d'al·lèrgia en els pacients que van rebre PEG-ASP en primera línia va ser del 4%. En el protocol del grup nòrdic NOPHO ALL2008, on tots els pacients van rebre PEG-ASP 1.000 UI/m<sup>2</sup> en primera línia, Henriksen i col·laboradors van descriure una incidència d'al·lèrgia superior, el 13,2%. Com que els corticoides podrien disminuir la incidència d'al·lèrgia, aquesta incidència més alta obtinguda pel grup NOPHO podria ser deguda a que en el protocol NOPHO ALL2008 el tractament amb ASP comença després de la inducció, quan els corticoides ja s'han reduït, i en el nostre protocol el tractament amb ASP s'inicia en la inducció amb l'administració concomitant de corticoides a dosis plenes(176). També, recentment, el grup AIEOP-BFM va reportar una menor incidència d'al·lèrgia clínica (7,6%) en pacients tractats amb PEG-ASP en primera línia en comparació amb la seva experiència històrica amb *E. coli*-ASP nativa(174). La reducció de la incidència d'al·lèrgia clínica observada en pacients tractats amb PEG-ASP podria estar relacionada amb la vida mitjana més llarga de PEG-ASP que condueix a una exposició més contínua.

Els nostres resultats en la diferent incidència d'al·lèrgia clínica en ambdós grups podien estar esbiaixats donat que, per atzar, hi havia de forma significativa un major nombre de pacients d'alt risc al grup que va rebre PEG-ASP en primera línia. En diverses ocasions, s'ha descrit en la literatura mèdica que el règim de quimioteràpia d'alt risc, donada la major exposició, intensitat i reexposició, és un factor de risc independent d'al·lèrgia(74,75,177). Malgrat aquest possible biaix, la incidència d'al·lèrgia va ser menor en el grup PEG-ASP en primera línia, que justament va ser el grup que incloïa més pacients d'alt risc. Davant d'aquest possible biaix, es va avaluar la incidència acumulada d'al·lèrgia clínica segons grups de risc i es va corroborar que en el grup de risc intermedi (RI), la incidència acumulada d'al·lèrgia també va ser major en els pacients que van rebre l'esquema seqüencial d' *E. coli*-ASP nativa en comparació amb els que van rebre únicament PEG-ASP ( $p=0,0034$ ). És important destacar l'alt nombre de pacients d'alt risc en ambdós grups. Aquests alts percentatges de pacients d'alt risc van en concordança amb els percentatges globals de tot el protocol LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 que mostren un proporció de pacients d'alt risc del 20%. Per contra, el nombre de pacients en risc estàndard, que rep un tractament amb ASP molt menys intensiu, és molt baix degut a que els criteris que defineixen el grup de risc estàndard son altament restrictius.

Una qüestió a plantejar és si la menor incidència d'al·lèrgia en el grup que va rebre PEG-ASP en primera línia podria ser deguda a la via d'administració intramuscular, enlloc de la via endovenosa que és actualment la via més habitual d'administració. En el protocol DFCI 05-001 s'administrava PEG-ASP ev en inducció i, en postinducció, els pacients s'aleatoritzaven a rebre *E. coli*-ASP nativa im o PEG-ASP ev. Els pacients que van rebre PEG-ASP ev post inducció van

presentar una incidència d'al·lèrgia del 12%. En el nostre estudi, la incidència d'al·lèrgia en els pacients que van rebre PEG-ASP im com a única formulació va ser del 4%. Aquesta incidència és menor que la dels pacients que van rebre aquest mateix tractament via ev en el protocol DFCI (12%)(114). En una metaanàlisi, Hasan va reportar una incidència d'al·lèrgia significativament major en PEG-ASP ev vs. PEG-ASP im(120). Per altra banda, l'estudi de Dholaria no va trobar diferències significatives, però s'ha de tenir en compte que no es va avaluar l'AAS, de manera que algunes reaccions al·lèrgiques relacionades amb l'administració ev es podrien interpretar erròniament com a al·lèrgies reals(121). Burke, sorprenentment, va descriure una major incidència d'al·lèrgia a PEG-ASP quan s'administrava via im. Tanmateix, en el subgrup de pacients d'alt risc, on es produeixen la majoria dels episodis d'al·lèrgia, no hi van haver diferències significatives entre la via im i la ev(116). En el protocol CCG-1962, els pacients de risc estàndard que rebien PEG-ASP en primera línia van presentar una incidència d'al·lèrgia del 3,4%(115). En aquest protocol PEG-ASP s'administrava via im, igual que en el nostre estudi. En el nostre estudi, la incidència d'al·lèrgia en els pacients de risc estàndard que van rebre PEG-ASP en primera línia fou menor. Així doncs, els resultats sobre si la via d'administració de l'ASP pot variar la incidència d'al·lèrgia no son concordants(114). La tendència actual en pediatria és a l'administració ev, donat que permet una millor qualitat de vida a l'evitar les punxades intramusculars.

Pel que fa al moment d'aparició de les reaccions d'hipersensibilitat, els nostres resultats son comparables als descrits anteriorment en la bibliografia mèdica. En inducció només es va presentar un episodi d'al·lèrgia (1/15 6,7%), després de l'administració de la primera dosi de PEG-ASP. Aquesta reacció al·lèrgica podria estar relacionada amb la presència d'anticossos contra la molècula PEG, ja que el pacient no havia estat exposat anteriorment a ASP. S'ha descrit en diversos estudis la presència d'anticossos específics contra la molècula PEG en pacients i individus sans(76). En el nostre estudi, la majoria de les reaccions al·lèrgiques es van produir durant la reexposició a ASP després de períodes lliures d'aquest quimioteràpic. La nostra experiència és similar a la descrita en el protocol DCOG-ALL10, en el que la majoria de reaccions al·lèrgiques es van produir durant la intensificació, després de la segona dosi de PEG-ASP(110). Nosaltres vam observar que la majoria de reaccions al·lèrgiques (8/15; 53,3%) es va produir després de la primera dosi d'ASP del manteniment, el moment en el qual s'havien produït la quantitat màxima de períodes lliures d'ASP. El risc de formació d'anticossos i aparició de reaccions al·lèrgiques augmenta amb l'exposició repetida a ASP alternada amb períodes lliures del fàrmac. De manera contrària, l'exposició contínua a ASP s'associa a una disminució del nivell d'anticossos(74). En la mateixa línia, Rizzari i col·laboradors van descriure que l'exposició



continua i prolongada a PEG-ASP redueix la probabilitat de presentar al·lèrgia clínica en pacients d'alt risc (AR) tractats amb el protocol AIEOP-BFM-2009(174).

Tot i que PEG-ASP sembla ser menys immunogènica, com ho confirmen els nostres resultats, els episodis d'al·lèrgia relacionats amb PEG-ASP en el nostre estudi van ser més greus que els relacionats amb *E. coli*-ASP nativa. Tot i que només 2 pacients del grup que va rebre PEG-ASP en primera línia van desenvolupar al·lèrgia, un d'ells va requerir tractament de suport a la unitat de cures intensives a causa d'una anafilaxi fluctuant. Aquesta clínica greu i fluctuant podria estar relacionada amb l'alliberament prolongat d'ASP a causa de la pegilació. Totes les al·lèrgies relacionades amb *E. coli*-ASP nativa van ser lleus. Previ a l'administració d'*E. coli*-ASP nativa es realitzava una prova de sensibilitat cutània i, en cas de prova cutània positiva, es canviava a *Erwinia*-ASP. Una hipòtesi que podria explicar la incidència de reaccions al·lèrgiques més greus amb PEG-ASP que amb *E. coli*-ASP nativa seria que la realització de la prova cutània podria haver seleccionat els pacients amb al·lèrgies potencialment més greus a *E. coli*-ASP nativa.

Dels 15 pacients que van presentar hipersensibilitat a ASP derivada d'*E. coli*, 15 (87%) van canviar a la formulació *Erwinia*-ASP; dos d'ells (15%) també van desenvolupar al·lèrgia a aquesta formulació. Aquesta incidència d'hipersensibilitat a *Erwinia*-ASP coincideix amb la descrita en la bibliografia (3-30%)(122).

### **Pancreatitis. Incidència similar de pancreatitis amb les dues formulacions d'asparaginasa**

En la nostra cohort de pacients, la incidència de pancreatitis secundària a ASP va ser del 7,9%, comparable a la incidència descrita anteriorment en altres estudis(75). No es van observar diferències significatives en la incidència de pancreatitis en funció de la formulació d'ASP utilitzada. Els pacients majors de 10 anys van presentar una major incidència de pancreatitis ( $p < 0,001$ ), l'edat major de 10 anys és un factor de risc conegut per a aquesta toxicitat relacionada amb l'ASP(79,83,98). La majoria dels episodis de pancreatitis van ser greus (8/10, 80%) i un 20% dels pacients amb pancreatitis van presentar seqüeles cròniques com diabetis mellitus i pseudoquistes pancreàtics. En l'estudi sobre pancreatitis del protocol NOPHO ALL2008, dins dels episodis de pancreatitis, la incidència de pancreatitis greu va ser del 85,1%, molt similar a la del nostre estudi. A diferència del nostre protocol, en el protocol NOPHO ALL2008 tots els pacients van rebre PEG-ASP com a única formulació i la nostra sèrie inclou pacients que van rebre l'esquema seqüencial de nativa seguida de pegilada i pacients que van rebre únicament PEG-ASP(83).

### Inactivació silent

En el nostre estudi descrivim la incidència d'IS en un esquema de tractament d'ASP intensiu i interromput. Vam monitoritzar de manera prospectiva l'AAS en 399 mostres d'una cohort de 68 pacients, la majoria (56/68) pertanyents al grup que va rebre PEG-ASP en primera línia. La nostra incidència de IS en pacients tractats amb PEG-ASP en primera línia fou baixa, 3,4%. Altres protocols que utilitzen PEG-ASP en primera línia descriuen incidències d'IS similars (0-3%)(108,114,128–131). Els resultats sobre incidència d'IS corresponents a la gran sèrie de pacients tractats amb el protocol AIEOP-BFM 2009 també van en la mateixa línia. En aquest estudi, es recollien de forma prospectiva les dades sobre AAS per a identificar els casos d'IS. Val la pena destacar, però, que aquestes dades no es facilitaven a l'investigador (cec) sinó que s'analitzaven retrospectivament un cop finalitzat l'estudi. Això va permetre observar que alguns pacients amb IS a qui s'havia continuat administrant la mateixa formulació d'ASP, després de diverses administracions recuperaven una activitat d'ASP correcta i es resolva la IS(138). Una troballa important del seu estudi va ser l'alta variabilitat entre i intra pacients. Es va observar que alguns pacients sense AAS en una de les fases de tractament podien assolir nivells terapèutics d'AAS després d'un període de tractament sense ASP. Això podria tenir conseqüències clíniques importants i podria permetre, sota monitorització d'AAS i vigilància estreta d'una possible aparició de reacció al·lèrgica, tornar a reexposar alguns pacients a PEG-ASP i reservar el tractament de segona línia amb *Erwinia*-ASP. En el nostre estudi vam observar que alguns pacients presentaven una AAS detectable però més baixa de 100 UI/L al dia 7 post administració i menor a 20 UI/L al dia 14 en dues mostres diferents. Alguns d'aquests casos podrien ser secundaris a una eliminació accelerada d'ASP i es podrien manejar amb un increment de la dosi o una reducció entre l'interval de dosis(178). En tot cas, la nostra taxa d'IS a PEG-ASP en pacients que van rebre un esquema seqüencial *E. coli*-ASP nativa seguida de PEG-ASP va ser més alta que la dels pacients que van rebre PEG-ASP en primera línia (16,7% vs. 3,4%). Tot i aquestes diferències, hem de tenir en compte el petit nombre de pacients en els que es va determinar l'AAS dins del grup que va rebre la formulació nativa seguida de la pegilada (12 pacients). En el protocol DCOG ALL-10, Tong va descriure una incidència del 8% de IS a PEG-ASP en pacients de risc intermedi que van rebre *E. coli*-ASP nativa seguida de PEG-ASP a dosis més altes (2.500 UI/m<sup>2</sup>)(110). En el nostre estudi, ja que tots els casos d'IS detectats es van presentar posteriorment a una administració de PEG-ASP en els dos grups (esquema seqüencial i PEG-ASP en primera línia), val la pena remarcar que no es va realitzar cap determinació d'AAS posterior a cap administració d'*E. coli*-ASP nativa. La justificació és que, quan es va iniciar la determinació d'AAS a la nostra institució, tots els pacients ja estaven rebent PEG-ASP d'entrada ja que ja

s'havia realitzat l'esmena al protocol. La realització d'aquesta esmena va ser motivada per la important incidència d'al·lèrgia clínica a *E. coli*-ASP nativa. Entre els pacients estudiats, no vam detectar cap cas de IS a *Erwinia*-ASP. En la mateixa línia, Nadeem també va descriure taxes baixes de IS a *Erwinia* ASP (3,8%)(119).

### **Determinació d'activitat d'asparaginasa i individualització de dosi**

Un altre avantatge de la monitorització de l'AAS és que permet confirmar que la dosi administrada d'ASP és suficient per a assolir una depleció d'asparagina en sèrum. La dosi de PEG-ASP indicada en fitxa tècnica és 2.500 UI/m<sup>2</sup>. El nostre estudi, una dosi més baixa de PEG-ASP (1.000 UI/m<sup>2</sup>) va ser suficient per aconseguir una AAS > 100 UI/L en més del 90% de les mostres, amb un nivell mitjà d'AAS els dies 7 i 14 de més de 400 UI/L, molt per sobre de les 100 UI/L, que és considerat el nivell mínim objectiu(122). En el nostre estudi, l'AAS mitjana després d'administrar PEG-ASP 1.000 UI/m<sup>2</sup> im va ser de 412,5 UI/L (rang 0-1.656) al dia 7 i 453,0 UI/L (rang 0-1.325) al dia 14. Val la pena destacar que, tant els nivells d'AAS al dia 7 com al dia 14, estaven en el mateix rang. En l'estudi de Tong et al., on PEG-ASP s'administrava via ev, els nivells d'AAS al dia 7 post administració eren més alts que els del dia 14(110). Per tant, la via d'administració sembla que podria influir en la cinètica de l'ASP. Aquests resultats suggereixen que l'administració im podria estar relacionada amb nivells d'AAS més estables(179). Les nostres troballes estan alineades amb els resultats del grup NOPHO en el que més del 95% de les mostres de pacients que reben PEG-ASP a una dosi de 1.000 UI/m<sup>2</sup> im tenen una activitat vall de  $\geq 100$  UI/L al dia 14 post administració(108). Altres estudis que han utilitzat dosis més altes d'ASP (2.500 UI/m<sup>2</sup>) presenten uns resultats similars. En l'assaig DFCI 05-001, Place i col·laboradors van descriure que en el 94-100% de les mostres es van assolir nivells d'AAS  $\geq 100$  UI/L(114). En la mateixa línia, en l'estudi de Silverman el 88% dels pacients presentaven una AAS > 100 UI/L(180).

Un altre ús de la monitorització d'AAS és la individualització de dosi d'ASP. El grup DCOG va utilitzar la monitorització d'AAS per individualitzar la dosi d'ASP en pacients inclosos en el seu protocol ALL-11. La dosi inicial va ser de 1.500 UI/m<sup>2</sup> i es va poder reduir la dosi en la majoria dels pacients amb una dosi mitjana tan baixa com 400 UI/m<sup>2</sup> (123). Tot i que la utilització d'AAS com a eina per a la individualització de dosi no era un objectiu del nostre estudi, la reducció de la dosi podria associar-se a una reducció de costos i a una possible disminució de la toxicitat. En un treball del grup DCOG es va descriure l'associació entre AAS i dislipèmia(140) i, en un estudi recent del grup NOPHO, una possible relació associació entre AAS i risc de pancreatitis(142).

### **Determinació d'activitat d'asparaginasa i pseudoal·lèrgia**

La monitorització d'AAS també és una eina útil per a diferenciar les al·lèrgies reals de les reaccions pseudoal·lèrgiques. La ràpida identificació d'aquests dos tipus de reaccions permet assegurar als pacients una exposició òptima a ASP. En el nostre estudi només vam trobar 2 casos de pseudoal·lèrgia entre els pacients amb símptomes clínics d'al·lèrgia post PEG-ASP i als quals vam determinar AAS. Això representa una incidència baixa de reaccions pseudoal·lèrgiques relacionades amb PEG-ASP im (2,9%, 1/68). Nadeem van presentar en el seu estudi una incidència de reaccions pseudoal·lèrgiques secundàries a PEG-ASP del 13%, força superior a la nostra. No està clar si la nostra menor incidència de reaccions pseudoal·lèrgiques podria estar relacionada amb la via d'administració im en lloc de ev, però en el mateix estudi, es va descriure una taxa similar de reaccions pseudoal·lèrgiques comparant *Erwinia*-ASP ev amb *Erwinia*-ASP im(119). De la mateixa manera, les conclusions sobre les diferències en la incidència d'al·lèrgia a PEG-ASP en funció de la via d'administració no són uniformes a la literatura mèdica(116,118,120,121).

### **Relació entre nivells d'activitat d'asparaginasa i toxicitat**

Degut al seu mecanisme d'acció i fisiològic, el tractament amb ASP s'ha relacionat amb un augment dels nivells d'amoni i triglicèrids i una disminució de l'albumina. En el nostre estudi vam realitzar una comparació directa quantitativa entre els nivells d'AAS, amoni, triglicèrids i albumina. Els resultats d'aquesta comparació van mostrar una associació significativa entre els nivells d'AAS i un increment dels nivells d'amoni sèric ( $p < 0,0001$ ), una disminució dels nivells d'albumina ( $p < 0,0001$ ), i un increment dels nivells de triglicèrids ( $p = 0,037$ ). La correlació que vam trobar entre l'AAS i el nivell de triglicèrids coincideix amb les conclusions de l'estudi de Tong amb PEG-ASP a  $2.500 \text{ UI/m}^2$  (140). No obstant això, la nostra incidència d'hipertrigliceridèmia important (grau 3-4 CTCAE 4.0) amb dosis més baixes de PEG-ASP ( $1.000 \text{ UI/m}^2$ ) va ser menor, un 14,6% (33/227). Aquests resultats estan probablement relacionats amb l'administració d'ASP a una dosi menor. En la població general, un nivell de triglicèrids  $> 1.000 \text{ mg/dL}$  s'ha associat amb un risc augmentat de pancreatitis, però diversos estudis no ho han confirmat en pacients amb LLA(140,181). Tanmateix, molt recentment, l'estudi de Lyngaard et al. sí que ha reportat una associació significativa entre els nivells d'AAS i el risc de pancreatitis en pacients pediàtrics afectes de LLA(142). En el nostre estudi no va ser possible comprovar la correlació entre els nivells d'AAS i la probabilitat de presentar pancreatitis. Això és degut a que només es van produir 2 episodis de pancreatitis i aquest és un nombre massa petit d'episodis per a poder extreure'n

conclusions. No obstant això, els dos pacients que van presentar pancreatitis no tenien nivells elevats d'AAS (216 UI/L i 148 UI/L respectivament) ni hipertriglicèridèmia (165 mg/dL i 78 mg/dL). Val la pena remarcar que en el subestudi que vam realitzar comparant només l'associació dels nivells vall d'AAS al dia 14 post administració amb els nivells de triglicèrids, albúmina i amoni, els resultats van ser parcialment diferents. Si bé els nivells d'AAS vall seguien associats de forma directa als nivells d'amoni ( $p=0,013$ ) i de forma indirecta als nivells d'albúmina ( $p<0,0001$ ), l'associació amb la xifra de triglicèrids no fou significativa, però sí que existia una tendència ( $p=0,084$ )(179). L'associació negativa entre els nivells d'AAS i d'albúmina que vam detectar en el nostre estudi concorda amb els resultats d'un estudi recent(175). Això podria explicar-se pel fet que l'ASP pot alterar la síntesi de proteïnes donant lloc a dèficits importants(182). En el nostre grup de pacients vam detectar nivells d'amoni més alts entre els pacients que van rebre *Erwinia*-ASP en comparació amb els que van rebre PEG-ASP amb nivells mitjans de 268 i 53  $\mu\text{mol/L}$ , respectivament. Aquestes diferències no estaven relacionades amb una AAS diferent, ja que les AAS eren molt similars: AAS mitjana amb *Erwinia*-ASP de 347 UI/L i AAS mitjana amb PEG-ASP de 435 UI/L. Aquests resultats estan en la mateixa línia que els presentats per Tong i es podrien explicar per la major activitat glutaminasa d'*Erwinia*-ASP(140).

Tot i haver detectat una associació entre els nivells d'amoni i l'AAS, això no significa que els nivells d'amoni siguin uns bons predictors d'AAS. Tal i com descriu Tong en el seu treball, els nivells d'amoni augmenten respecte els basals després de l'administració de PEG-ASP en pacients sense al·lèrgia ni IS. Tanmateix, un 50% d'aquests nivells, tot i augmentar respecte els basals, es mantenen dins dels límits de la normalitat(143). Per altra banda, fins dos terços dels pacients amb IS presenten un augment discret d'amoni respecte el basal, tot i mantenir-se dins dels límits de la normalitat. Tal i com ja va descriure Kloos en el seu treball, l'ús de la monitorització d'AAS i el seu potencial efecte en la reducció de la toxicitat associada a ASP és limitat(183).

En la literatura mèdica s'han avaluat altres marcadors com a possibles predictors d'AAS, com son els nivells d'antitrombina i fibrinogen. Els resultats de l'estudi de Merlen descriuen que un 92% dels pacients que mostren una activitat d'antitrombina  $< 0,73$  UI/ml i uns nivells de fibrinogen  $< 1,85$  g/L tindran una AAS major a 100 UI/L. Aquest estudi suggereix que la monitorització de l'activitat d'antitrombina combinada amb els nivells de fibrinogen durant el curs del tractament amb ASP podrien ser un indicador de AAS(175). Tanmateix, per a confirmar una activitat subterapèutica d'ASP, es requeriran proves addicionals com es l'avaluació directa de l'AAS.

El nostre estudi té algunes limitacions, com son el relativament baix nombre de pacients analitzats i la manca d'aleatorització d'ambdues formulacions. No obstant això, vam confirmar una diferència estadísticament significativa en la incidència d'al·lèrgia clínica entre els dos grups tractats amb diferents formulacions d'ASP dins del mateix protocol de tractament. Aquests resultats estan en concordança amb els de sèries més grans de pacients que comparen els resultats amb PEG-ASP en primera línia amb controls històrics tractats amb *E. coli*-ASP nativa(114,123,174).

**En resum**, en el nostre protocol de tractament, PEG-ASP a una dosi de 1.000 UI/m<sup>2</sup> im va ser eficaç per assolir una AAS suficient en més del 90% dels pacients. Els nostres resultats mostren que l'ús de PEG-ASP en primera línia en un protocol de tractament intensiu i prolongat amb ASP s'associa amb una menor incidència d'al·lèrgia clínica que l'observada en l'ús seqüencial d'*E. coli*-ASP nativa seguida de PEG-ASP.

### **Estudi de factors clínics i biològics associats a toxicitat per asparaginasa en el tractament de la LLA pediàtrica: beneficis i perspectives de futur**

Els **beneficis** d'aquests dos treballs d'investigació s'engloben dins del marc de les estratègies per a disminuir la toxicitat del tractament quimioteràpic per, d'aquesta manera, millorar el pronòstic dels nostres pacients. Actualment ens trobem en un context on, donades les altes taxes de supervivència en la LLA pediàtrica, aconseguir una millora en el pronòstic mitjançant la quimioteràpia convencional és tot un repte ja que una intensificació de la quimioteràpia convencional podria comportar una millora mínima en el pronòstic o fins i tot ser contraproductiu per l'augment de la mortalitat tòxica. Per tant, la investigació basada en la disminució de la toxicitat secundària al tractament és un camí potencial per a millorar tant la supervivència com la qualitat de vida.

En aquesta línia, els treballs que componen la tesi han contribuït a:

- Suggestir que els polimorfismes descrits com a haplotip de risc i protector del gen *ASNS* enfront al·lèrgia i pancreatitis, no tenen una relació clara amb l'aparició d'aquestes toxicitats en la nostra població.
- Descriure la relació entre el risc de presentar al·lèrgia a ASP i pertànyer a l'ètnia llatinoamericana.
- Descriure la relació entre el risc de presentar al·lèrgia a ASP i haver rebut un protocol d'alt risc de recaiguda.
- Confirmar l'associació entre el risc de presentar pancreatitis secundària a ASP amb el fet de tenir una edat major de 10 anys al diagnòstic.
- Confirmar que PEG-ASP és menys immunogènica que *E. coli* nativa-ASP.
- Confirmar que és possible identificar aquells pacients que presenten reaccions pseudoal·lèrgiques a ASP mitjançant la determinació d'activitat d'ASP. Això permet poder reservar altres formulacions d'ASP per a casos on, si no es realitza el canvi de formulació, el pronòstic pot empitjorar, com en la inactivació silenciosa, l'al·lèrgia real, o tractaments quimioteràpics de segona línia (protocols de recaiguda).
- Plantejar la pre-medicació, amb monitorització d'activitat d'ASP, com una eina segura per a disminuir la incidència de manifestacions clíniques d'al·lèrgia relacionades amb l'administració d'ASP i evitar els canvis de formulació innecessaris. En cas de presència d'anticossos inactivadors, encara que el pacient no presenti clínica d'al·lèrgia degut a la premedicació, gràcies a la monitorització d'activitat ASP es detectarà la inactivació del fàrmac.

Com a **perspectives de futur**, el treball de tesi presentat pot ser l'origen de noves línies d'investigació encaminades a la individualització del tractament amb l'objectiu de disminuir-ne la toxicitat. Centrant el focus en l'ASP en particular, això es podria traduir en la creació d'estratègies per a la individualització de dosis en funció de la l'activitat d'ASP i l'estudi de polimorfismes genètics relacionats amb toxicitat secundària a aquest quimioteràpic buscant com a fita una possible millora en l'eficàcia, i una reducció de la toxicitat i dels costos.

## IX. CONCLUSIONS





# CONCLUSIONS

- ❖ Els polimorfismes rs3757676 i rs3832526, descrits prèviament com a haplotip de risc i protector del gen de l'asparagin sintetasa enfront al·lèrgia i pancreatitis, no van tenir una relació clara amb l'aparició d'aquestes toxicitats en la nostra sèrie.
- ❖ El risc de presentar al·lèrgia a asparaginasa es va associar tant amb el fet de rebre un protocol d'alt risc de recaiguda com el fet de pertànyer a l'ètnia llatinoamericana.
- ❖ El risc de presentar pancreatitis secundària a asparaginasa es va associar amb el fet de tenir una edat major de 10 anys en el moment del diagnòstic.
- ❖ En el nostre protocol de tractament LAL/SEHOP-PETHEMA 2013 (*Leucemia aguda linfoblàstica / Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas - Protocolo para el Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas 2013*), l'ús d'asparaginasa d'*E. coli* pegilada en primera línia es va associar amb una menor incidència d'al·lèrgia clínica que l'observada en l'ús seqüencial d'asparaginasa d'*E. coli* nativa seguida d'asparaginasa d'*E. coli* pegilada.
- ❖ L'asparaginasa d'*E. coli* pegilada a una dosi de 1.000 UI/m<sup>2</sup> intramuscular va ser eficaç per assolir una activitat d'asparaginasa en sèrum suficient en més del 90% dels pacients.
- ❖ La incidència d'inactivació silent en els pacients tractats amb asparaginasa d'*E. coli* pegilada en primera línia va ser molt baixa en la nostra sèrie.
- ❖ Vam detectar una associació significativa entre els nivells d'activitat d'asparaginasa en sèrum i l'increment dels nivells d'amoni sèric, la disminució dels nivells d'albúmina, i l'increment dels nivells de triglicèrids.
- ❖ No es van observar diferències significatives en la incidència de pancreatitis en funció de la formulació d'asparaginasa utilitzada.



## X. BIBLIOGRAFIA



1. Inaba H, Pui C-H. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Med*. 2021;10(9):1926.
2. Orgel E, Alexander TB, Wood BL, Kahwash SB, Devidas M, Dai Y, et al. Mixed-phenotype acute leukemia: A cohort and consensus research strategy from the Children's Oncology Group Acute Leukemia of Ambiguous Lineage Task Force. *Cancer*. 2020;126(3):593–601.
3. Cañete Nieto A, Pardo Romaguera E, Muñoz López A, Valero Poveda S, Porta Cebolla S, Barreda Reines M, et al. Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2021. Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP). Valencia: Universitat de València, 2022 (Edición preliminar).
4. National cancer institute. Surveillance, Epidemiology, and End results program. SEER explorer. [internet]. US. 2022 [consulta el 30 de juny de 2022] Disponible a: [https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=92&data\\_type=1&gra](https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=92&data_type=1&gra).
5. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2020;105(11):2524–39.
6. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Progress through collaboration. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2938–48.
7. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. [internet]. Espanya. 2022 [consulta el 30 de juny de 2022] Disponible a: [https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2014/documentos/guias/LAL\\_SEHOP\\_PE\\_THEMA\\_2013.pdf](https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2014/documentos/guias/LAL_SEHOP_PE_THEMA_2013.pdf).
8. Pui C-H, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia without Cranial Irradiation. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2730–41.
9. Jeha S, Pei D, Choi J, Cheng C, Sandlund JT, Coustan-Smith E, et al. Improved CNS control of childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation: St Jude Total Therapy Study 16. *J Clin Oncol*. 2019;37(35):3377–91.
10. Harrison CJ. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:118–25.
11. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030–43.
12. Schafer ES, Hunger SP. Optimal therapy for acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(7):417–24.
13. Vega-García N, Perez-Jaume S, Esperanza-Cebollada E, Vicente-Garcés C, Torrebadell M, Jiménez-Velasco A, et al. Measurable Residual Disease Assessed by Flow-Cytometry Is a Stable Prognostic Factor for Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Consecutive SEHOP Protocols Whereas the Impact of Oncogenetics Depends on Treatment. *Front Pediatr*. 2021;8:614521.
14. Petit A, Trinquand A, Chevret S, Ballerini P, Cayuela JM, Grardel N, et al. Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018;131(3):289–300.
15. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic

leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2012;19(4):313–8.

16. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results in 3184 patients of the AIEOP-BFMALL 2000 study. *Blood.* 2010;115(16):3206–14.
17. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: Results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood.* 2011;118(8):2077–84.
18. Wood B, Wu D, Crossley B, Dai Y, Williamson D, Gawad C, et al. Measurable residual disease detection by high-throughput sequencing improves risk stratification for pediatric B-ALL. *Blood.* 2018;131(12):1350–9.
19. Buchmann S, Schrappe M, Baruchel A, Biondi A, Borowitz M, Campbell M, et al. Remission, treatment failure, and relapse in pediatric ALL: an international consensus of the Ponte-di-Legno Consortium. *Blood.* 2022;139(12):1785–93.
20. Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, Wall DA, Schultz KR, Bunin N, et al. IgH-V ( D ) J NGS-MRD measurement pre- and early post-allo transplant defines very low- and very high-risk ALL patients. *Blood.* 2015;125(22):3501–8.
21. Hay KA, Gauthier J, Hirayama A V., Voutsinas JM, Wu Q, Li D, et al. Factors associated with durable EFS in adult B-cell ALL patients achieving MRD-negative CR after CD19 CAR T-cell therapy. *Blood.* 2019;133(15):1652–63.
22. Pulsipher MA, Han X, Maude SL, Laetsch TW, Qayed M, Rives S, et al. Next-Generation Sequencing of Minimal Residual Disease for Predicting Relapse after Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood Cancer Discov.* 2022;3(1):66–81.
23. O'Connor D, Enshaei A, Bartram J, Hancock J, Harrison CJ, Hough R, et al. Genotype-Specific minimal residual disease interpretation improves stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2018;36(1):34–43.
24. Schrappe M, Hunger SP, Pui C-H, Saha V, Gaynon PS, Baruchel A, et al. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366(15):1371–81.
25. Larsen EC, Devidas M, Chen S, Salzer WL, Raetz EA, Loh ML, et al. Dexamethasone and high-dose methotrexate improve outcome for children and young adults with high-risk B-acute lymphoblastic leukemia: A report from children's oncology group study AALL0232. *J Clin Oncol.* 2016;34(20):2380–8.
26. Schrappe M, Bleckmann K, Zimmermann M, Biondi A, Möricke A, Locatelli F, et al. Reduced-Intensity delayed intensification in standard-Risk pediatric acute lymphoblastic leukemia defined by undetectable minimal residual disease: Results of an international randomized trial (AIEOP-BFM ALL 2000). *J Clin Oncol.* 2018;36(3):244–53.
27. Kato M, Ishimaru S, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, et al. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia.* 2017;31(3):580–4.
28. Bhatia S, Landier W, Hageman L, Chen Y, Kim H. Systemic Exposure to Thiopurines and Risk of Relapse in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study. *JAMA Oncol.* 2015;1(3):287–95.

29. Landier W, Hageman L, Chen Y, Kornegay N, Evans WE, Bostrom BC, et al. Mercaptopurine ingestion habits, red cell thioguanine nucleotide levels, and relapse risk in children with acute Lymphoblastic Leukemia: A report from the children's Oncology group study AALL03N1. *J Clin Oncol*. 2017;35(15):1730–6.
30. Vora A, Andreano A, Pui CH, Hunger SP, Schrappe M, Moericke A, et al. Influence of Cranial Radiotherapy on Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Contemporary Therapy. *J Clin Oncol*. 2016;34(9):919–26.
31. Winick N, Devidas M, Chen S, Maloney K, Larsen E, Mattano L, et al. Impact of initial CSF findings on outcome among patients with National Cancer Institute standard- and high-risk B-cell acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2017;35(22):2527–34.
32. Liu HC, Yeh TC, Hou JY, Chen KH, Huang TH, Chang CY, et al. Triple intrathecal therapy alone with omission of cranial radiation in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2014;32(17):1825–9.
33. Asociación Española de Pediatría. [internet]. Espanya. 2022 [consulta el 14 de març de 2022] Disponible a: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/>.
34. Peters C, Dalle JH, Locatelli F, Poetschger U, Sedlacek P, Buechner J, et al. Total body irradiation or chemotherapy conditioning in childhood all: A multinational, randomized, noninferiority phase III study. *J Clin Oncol*. 2021;39(4):295–307.
35. Fagioli F, Quarello P, Zecca M, Lanino E, Rognoni C, Balduzzi A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: A report from the AIEOP registry. *Haematologica*. 2013;98(8):1273–81.
36. Bader P, Kreyenberg H, Henze GHR, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. Prognostic value of Minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27(3):377–84.
37. Campana D, Leung W. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2013;162(2):147–61.
38. den Boer ML, Cario G, Moorman A V., Boer JM, de Groot-Kruseman HA, Fiocco M, et al. Outcomes of paediatric patients with B-cell acute lymphocytic leukaemia with ABL-class fusion in the pre-tyrosine-kinase inhibitor era: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Haematol*. 2021;8(1):e55–66.
39. Short NJ, Konopleva M, Kadia T, Kebriaei P, Daver N, Huang X, et al. An effective chemotherapy-free regimen of ponatinib plus venetoclax for relapsed/refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*. 2021;96(7):E229–32.
40. Place AE, Pikman Y, Stevenson KE, Harris MH, Pauly M, Sulis ML, et al. Phase I trial of the mTOR inhibitor everolimus in combination with multi-agent chemotherapy in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(7):1–10.
41. Daver N, Bumber Y, Kantarjian H, Ravandi F, Cortes J, Rytting ME, et al. A phase I/II study of the mTOR inhibitor everolimus in combination with hyperCVAD chemotherapy in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*.



2015;21(12):2704–14.

42. Vega-García N, Malatesta R, Estella C, Pérez-Jaume S, Esperanza-Cebollada E, Torrebadell M, et al. Paediatric patients with acute leukaemia and KMT2A (MLL) rearrangement show a distinctive expression pattern of histone deacetylases. *Br J Haematol.* 2018;182(4):542–53.
43. Brown PA, Ji L, Xu X, Devidas M, Hogan LE, Borowitz MJ, et al. Effect of Postreinduction Therapy Consolidation with Blinatumomab vs Chemotherapy on Disease-Free Survival in Children, Adolescents, and Young Adults with First Relapse of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2021;325(9):833–42.
44. Locatelli F, Zugmaier G, Rizzari C, Morris JD, Gruhn B, Klingebiel T, et al. Effect of Blinatumomab vs Chemotherapy on Event-Free Survival among Children with High-risk First-Relapse B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2021;325(9):843–54.
45. Te Winkel ML, Pieters R, Wind E-JD, Bessems JHJM, van den Heuvel-Eibrink MM. Management and treatment of osteonecrosis in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2014;99(3):430–6.
46. Brown P, Ji L, Xu X, Devidas M, Hogan L, Borowitz M, et al. A Randomized Phase 3 Trial of Blinatumomab Vs. Chemotherapy As Post-Reinduction Therapy in High and Intermediate Risk (HR/IR) First Relapse of B-Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) in Children and Adolescents/Young Adults (AYAs) Demonstrates Superior Eff. *Blood.* 2019;134(Supplement\_2).
47. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):439–48.
48. European Medicines Agency. [internet]. 2022 [consulta el 12 de gener de 2022] Disponible a: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_en.pdf).
49. Leahy AB, Newman H, Li Y, Liu H, Myers R, DiNofia A, et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for CNS relapsed or refractory acute lymphocytic leukaemia: a post-hoc analysis of pooled data from five clinical trials. *Lancet Haematol.* 2021;8(10):e711–22.
50. Rives S. CAR T cells in CNS-relapsed leukaemia: one step forward. *Lancet Haematol.* 2021;8(10):e675–6.
51. Brivio E, Locatelli F, Lopez-Yurda M, Malone A, Díaz-de-Heredia C, Bielorai B, et al. A phase 1 study of inotuzumab ozogamicin in pediatric relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ITCC-059 study). *Blood.* 2021;137(12):1582–90.
52. Albertsen BK, Grell K, Abrahamsson J, Lund B, Vettenranta K, Jónsson ÓG, et al. Intermittent versus continuous PEG-asparaginase to reduce asparaginase-associated toxicities: A NOPHO ALL2008 randomized study. *J Clin Oncol.* 2019;37(19):1638–46.
53. Gibson TM, Mostoufi-Moab S, Stratton KL, Leisenring WM, Barnea D, Chow EJ, et al. Temporal patterns in the risk of chronic health conditions in survivors of childhood cancer diagnosed 1970–99: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol.* 2018;19(12):1590–601.
54. Mattano LA, Devidas M, Nachman JB, Sather HN, Hunger SP, Steinherz PG, et al. Effect of

- alternate-week versus continuous dexamethasone scheduling on the risk of osteonecrosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: Results from the CCG-1961 randomised cohort trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):906–15.
55. Warris LT, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Aarsen FK, Pluijm SMF, Bierings MB, Van Bos C Den, et al. Hydrocortisone as an intervention for dexamethasone-induced adverse effects in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: results of a double-blind, randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 2016;34(19):2287–93.
  56. Diouf B, Crews KR, Lew G, Pei D, Cheng C, Bao J, et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2015;313(8):815–23.
  57. Goodenough CG, Diouf B, Yang W, Sapkota Y, Finch ER, Lu L, et al. Association between CEP72 genotype and persistent neuropathy in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2022;36(4):1160–3.
  58. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, et al. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2015;33(11):1235–42.
  59. Stanulla M, Schaeffeler E, Mörücke A, Buchmann S, Zimmermann M, Igel S, et al. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome and short-term application of 6-thioguanine in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2021;35(9):2650–7.
  60. Gardner RA, Ceppi F, Rivers J, Annesley C, Summers C, Taraseviciute A, et al. Preemptive mitigation of CD19 CAR T-cell cytokine release syndrome without attenuation of antileukemic efficacy. *Blood.* 2019;134(24):2149–58.
  61. Strati P, Ahmed S, Kebriaei P, Nastoupil LJ, Claussen CM, Watson G, et al. Clinical efficacy of anakinra to mitigate CAR T-cell therapy associated toxicity in large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2020;4(13):3123–7.
  62. Kreidieh FY, Moukadem HA, El Saghir NS. Overview, prevention and management of chemotherapy extravasation. *World J Clin Oncol.* 2016;7(1):87–97.
  63. Jain T, Litzow MR. Management of toxicities associated with novel immunotherapy agents in acute lymphoblastic leukemia. *Ther Adv Hematol.* 2020;11:1–13.
  64. Schmiegelow K, Attarbaschi A, Barzilai S, Escherich G, Frandsen TL, Halsey C, et al. Consensus definitions of 14 severe acute toxic effects for childhood lymphoblastic leukaemia treatment: a Delphi consensus. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):e231–9.
  65. Andrés-Jensen L, Attarbaschi A, Bardi E, Barzilai-Birenboim S, Bhojwani D, Hagleitner MM, et al. Severe toxicity free survival: physician-derived definitions of unacceptable long-term toxicities following acute lymphocytic leukaemia. *Lancet Haematol.* 2021;8(7):e513–23.
  66. Weldring T, Smith SMS. Article Commentary: Patient-Reported Outcomes (PROs) and Patient-Reported Outcome Measures (PROMs). *Heal Serv Insights.* 2013;6:61–8.
  67. Kawedia JD, Rytting ME. Asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2014;14 Suppl:S14–7.
  68. Clementi A. Presence of L-asparaginase in animals and its significance *Arch Int Physiol.* 1922;19:369–98.
  69. Kidd J. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea

- pig serum. II. Studies on the nature of the active serum constituent: histological mechanism of the regression: tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro. *J Exp Med*. 1953;98(6):583–606.
70. Broome J. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *J Exp Med*. 1963;118(1):99–120.
  71. Boyse E, Old L, Campbell H, Mashburn L. Suppression of murine leukemias by L-asparaginase. Incidence of sensitivity among leukemias of various types: comparative inhibitory activities of guinea pig serum L-asparaginase and *Escherichia coli* L-asparaginase. *J Exp Med*. 1967;125(1):17–31.
  72. Dolowy, W.C., Hemnson, D., Cornet, J., Sellin H. Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. Study of mice with lymphoma and normal monkeys and report on a child with leukemia. *Cancer*. 1966;19(12):1813–9.
  73. Hill J, Roberts J, Loeb E, Khan A, MacLellan A. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. Remission in human leukemia. *JAMA*. 1967;202(9):882–8.
  74. Hijiya N, Van Der Sluis IM. Asparaginase-Associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(4):748–57.
  75. Schmiegelow K, Müller K, Mogensen SS, Mogensen PR, Wolthers BO, Stoltze UK, et al. Non-infectious chemotherapy-associated acute toxicities during childhood acute lymphoblastic leukemia therapy. *F1000Research*. 2017;6(0):1–14.
  76. Burke MJ, Rheingold SR. Differentiating hypersensitivity versus infusion-related reactions in pediatric patients receiving intravenous asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(3):540–51.
  77. Pession A, Valsecchi MG, Masera G, Kamps WA, Magyarosy E, Rizzari C, et al. Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):7161–7.
  78. Amylon MD, Shuster J, Pullen J, Berard C, Link MP, Wharam M, et al. Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: A Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*. 1999;13(3):335–42.
  79. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: Results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*. 2001;97(5):1211–8.
  80. Sallan S, Hitchcock-Bryan S, Gelber R, Cassady J, Frei E 3rd, Nathan D. Influence of intensive asparaginase in the treatment of childhood non-T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 1983;43(11):5601–7.
  81. Sallan SE, Gelber RD, Kimball V, Donnelly M, Cohen HJ. More is better! Update of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital childhood acute lymphoblastic leukemia trials. *Haematol Blood Transfus*. 1990;33(May 1981):459–66.
  82. Salzer W, Bostrom B, Messinger Y, Perissinotti AJ, Marini B. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(8):1797–806.
  83. Rank CU, Wolthers BO, Grell K, Albertsen BK, Frandsen TL, Overgaard UM, et al.

- Asparaginase-associated pancreatitis in acute lymphoblastic leukemia: Results from the NOPHO ALL2008 treatment of patients 1-45 years of age. *J Clin Oncol*. 2020;38(2):145–54.
84. Wolthers BO, Frandsen TL, Baruchel A, Attarbaschi A, Barzilai S, Colombini A, et al. Asparaginase-associated pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: an observational Ponte di Legno Toxicity Working Group study. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1238–48.
  85. Wolthers BO, Frandsen TL, Baruchel A, Attarbaschi A, Barzilai S, Colombini A, et al. Asparaginase-Associated Pancreatitis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Ponte Di Legno Toxicity Working Group Report on Clinical Presentation and Outcome. *Blood*. 2016;128(22):585.
  86. Sakaguchi S, Higa T, Suzuki M, Fujimura J, Shimizu T. Prophylactic use of octreotide for asparaginase-induced acute pancreatitis. *Int J Hematol*. 2017;106(2):266–8.
  87. Kearney SL, Dahlberg SE, Levy DE, Voss SD, Sallan SE, Silverman LB. Clinical Course and Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia and Asparaginase-Associated Pancreatitis. *Pediatr blood cancer*. 2009;53(2):162–7.
  88. Samarasinghe S, Dhir S, Slack J, Iyer P, Wade R, Clack R, et al. Incidence and outcome of pancreatitis in children and young adults with acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol*. 2013;162(5):710–3.
  89. Kaya I, Cital M, Sozmen M, Karapehlivan M, Cigsar G. Investigation of Protective Effect of L-Carnitine on L-Asparaginase-Induced Acute Pancreatic Injury in Male Balb/c Mice. *Dig Dis Sci*. 2015;60(5):1290–6.
  90. Oparaji JA, Rose F, Okafor D, Howard A, Turner RL, Orabi AI, et al. Risk Factors for Asparaginase-associated Pancreatitis: A Systematic Review. *J Clin Gastroenterol*. 2017;51(10):907–13.
  91. Chen CB, Chang HH, Chou SW, Yang YL, Lu MY, Jou ST, et al. Acute pancreatitis in children with acute lymphoblastic leukemia correlates with L-asparaginase dose intensity. *Pediatr Res*. 2021;92(2):459-465.
  92. Liu C, Yang W, Devidas M, Cheng C, Pei D, Smith C, et al. Clinical and Genetic Risk Factors for Acute Pancreatitis in Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2016;34(18):2133-2140.
  93. Wolthers BO, Frandsen TL, Abrahamsson J, Albertsen BK, Helt LR, Heyman M, et al. Asparaginase-associated pancreatitis: A study on phenotype and genotype in the NOPHO ALL2008 protocol. *Leukemia*. 2017;31(2):325–32.
  94. Raja RA, Schmiegelow K, Albertsen BK, Prunsild K, Zeller B, Vaitkeviciene G, et al. Asparaginase-associated pancreatitis in children with acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO ALL2008 protocol. *Br J Haematol*. 2014;165:126–33.
  95. Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, Barr R, Clavell L, Hurwitz C, et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007;109(3):896–904.
  96. Toft N, Birgens H, Abrahamsson J, Griškevičius L, Hallböök H, Heyman M, et al. Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1-45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(3):606–15.

97. Wolthers BO, Frandsen TL, Patel CJ, Abaji R, Attarbaschi A, Barzilai S, et al. Trypsin-encoding PRSS1-PRSS2 variations influence the risk of asparaginase-associated pancreatitis in children with acute lymphoblastic leukemia: A ponte di legno toxicity working group report. *Haematologica*. 2019;104(3):556–63.
98. Treepongkaruna S, Thongpak N, Pakakasama S. Acute Pancreatitis in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia After Chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009;31(11):812–5.
99. Denton CC, Rawlins YA, Oberley MJ, Bhojwani D, Orgel E. Predictors of hepatotoxicity and pancreatitis in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated according to contemporary regimens. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(3):1–9.
100. Grimes AC, Chen Y, Bansal H, Aguilar C, Perez Prado L, Quezada G, et al. Genetic markers for treatment-related pancreatitis in a cohort of Hispanic children with acute lymphoblastic leukemia. *Support Care Cancer*. 2021;29(2):725–31.
101. Nowak-Göttl U, Kenet G, Mitchell LG. Thrombosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: epidemiology, aetiology, diagnosis, prevention and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(1):103–14.
102. Rank CU, Toft N, Tuckuviene R, Grell K, Nielsen OJ, Frandsen TL, et al. Thromboembolism in acute lymphoblastic leukemia: Results of NOPHO ALL2008 protocol treatment in patients aged 1 to 45 years. *Blood*. 2018;131(22):2475–84.
103. Mateos MK, Trahair TN, Mayoh C, Barbaro PM, Sutton R, Revesz T, et al. Risk factors for symptomatic venous thromboembolism during therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Res*. 2019;178:132–8.
104. Athale UH, Mizrahi T, Laverdière C, Naviager T, Delva YL, Foster G, et al. Impact of baseline clinical and laboratory features on the risk of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: A prospective evaluation. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(5):1–8.
105. Caruso V, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Storti S, Mariani G, De Gaetano G, et al. Thrombotic complications in childhood acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis of 17 prospective studies comprising 1752 pediatric patients. *Blood*. 2006;108(7):2216–22.
106. Mauz-Körholz C, Junker R, Göbel U, Nowak-Göttl U. Prothrombotic risk factors in children with acute lymphoblastic leukemia treated with delayed *E. coli* asparaginase (COALL-92 and 97 protocols). *Thromb Haemost*. 2000;83(6):840–3.
107. Ruiz-Llobet A, Gassiot S, Sarrate E, Zubicaray J, Dapena JL, Rives S, et al. Venous thromboembolism in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia under chemotherapy treatment. Risk factors and usefulness of thromboprophylaxis. Results of LAL-SEHOP-PETHEMA-2013. *J Thromb Haemost*. 2022;20(6):1390–9.
108. Tram Henriksen L, Gottschalk Højfeldt S, Schmiegelow K, Frandsen TL, Skov Wehner P, Schrøder H, et al. Prolonged first-line PEG-asparaginase treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL2008 protocol—Pharmacokinetics and antibody formation. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(12):1–8.
109. Ko RH, Jones TL, Radvinsky D, Robison N, Gaynon PS, Panosyan EH, et al. Allergic reactions and anti-asparaginase antibodies in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia: A children's oncology group report. *Cancer*. 2015;121(23):4205–11.
110. Tong WH, Pieters R, Kaspers GJL, Te Loo DMWM, Bierings MB, Van Den Bos C, et al. A

- prospective study on drug monitoring of PEGasparaginase and Erwinia asparaginase and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(13):2026–33.
111. Ribera JM, Morgades M, Montesinos P, Martino R, Barba P, Soria B, et al. Efficacy and safety of native versus pegylated Escherichia coli asparaginase for treatment of adults with high-risk, Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(7):1634–43.
  112. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2011;117(2):238–49.
  113. Kim HJ, Ock CY, Kim TM, Lee SH, Lee JY, Jung SH, et al. Comparison of native escherichia coli l-asparaginase versus pegylated asparaginase, in combination with ifosfamide, methotrexate, etoposide, and prednisolone, in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Cancer Res Treat*. 2018;50(3):670–80.
  114. Place AE, Stevenson KE, Vrooman LM, Harris MH, Hunt SK, O'Brien JE, et al. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native Escherichia coli L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): A randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1677–90.
  115. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, et al. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: A Children's Cancer Group study. *Blood*. 2002;99(6):1986–94.
  116. Burke MJ, Devidas M, Maloney K, Angiolillo A, Schore R, Dunsmore K, et al. pegaspargase hypersensitivity reaction rates (grade  $\geq 3$ ) with intravenous infusion vs. intramuscular injection: analysis of 54,280 doses administered to 16,534 patients on children's oncology group (COG) clinical trials. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(7):1624–33.
  117. Liu C, Kawedia JD, Cheng C, Pei D, Fernandez CA, Cai X, et al. Clinical utility and implications of asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(11):2303–9.
  118. Asselin B, Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(8):2273–80.
  119. Nadeem K, Colantonio D, Kircanski I, Naqvi A, Hitzler J, Whitlock JA, et al. Clinical decisions following implementation of asparaginase activity monitoring in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: Experience from a single-center study. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;(June 2019):1–7.
  120. Hasan H, Shaikh OM, Rassekh SR, Howard AF, Goddard K. Comparison of hypersensitivity rates to intravenous and intramuscular PEG-asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis and systematic review. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(1):81–8.
  121. Dholaria HG, Davies A, Kotecha RS, Gottardo NG, Walwyn T. Comment on: Comparison of hypersensitivity rates to intravenous and intramuscular PEG-asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis and systematic review. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(8):3–4.
  122. van der Sluis IM, Vrooman LM, Pieters R, Baruchel A, Escherich G, Goulden N, et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase

- hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica*. 2016;101(3):279–85.
123. Kloos RQH, Uyl-de Groot CA, van Litsenburg RRL, Kaspers GJL, Pieters R, van der Sluis IM. A cost analysis of individualized asparaginase treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(12).
  124. Vrooman L, Kirov I, Dreyer Z. Activity and Toxicity of Intravenous Erwinia Asparaginase Following Allergy to E. coli-Derived Asparaginase in Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr blood cancer*. 2016;63(2):228–33.
  125. Khalil A, Würthwein G, Golitsch J, Hempel G, Fobker M, Gerss J, et al. Pre-existing antibodies against polyethylene glycol reduce asparaginase activities on first administration of pegylated E. coli asparaginase in children with acute lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2022;107(1):49–57.
  126. Vrooman LM, Stevenson KE, Supko JG, O'Brien J, Dahlberg SE, Asselin BL, et al. Postinduction dexamethasone and individualized dosing of escherichia coli l-asparaginase each improve outcome of children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia: Results from a randomized study - Dana-Farber Cancer Institute ALL. *J Clin Oncol*. 2013;31(9):1202–10.
  127. Panosyan EH, Seibel NL, Martin-Aragon S, Gaynon PS, Avramis IA, Sather H, et al. Asparaginase Antibody and Asparaginase Activity in Children with Higher-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(4):217–26.
  128. Abbott LS, Zakova M, Shaikh F, Shewaramani N, Punnett A, Dupuis LL. Allergic Reactions Associated with Intravenous Versus Intramuscular Pegaspargase: A Retrospective Chart Review. *Pediatr Drugs*. 2015;17(4):315–21.
  129. MacDonald T, Kulkarni K, Bernstein M, Fernandez C V. Allergic reactions with intravenous compared with intramuscular pegaspargase in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia: A population-based study from the Maritimes, Canada. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2016;38(5):341–4.
  130. Kumar S, Pauly M, Travers CD. Absence of Silent Inactivation Using Intravenous Pegaspargase in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):100.
  131. Cooper SL, Young DJ, Bowen CJ, Arwood NM, Poggi SG, Brown PA. Universal premedication and therapeutic drug monitoring for asparaginase-based therapy prevents infusion-associated acute adverse events and drug substitutions. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;66(8).
  132. Rizzari C, Zucchetti M, Conter V. L-asparagine depletion and L-asparaginase activity in children with acute lymphoblastic leukemia receiving i.m. or i.v. Erwinia C. or E. coli L-asparaginase as first exposure. *Ann Oncol*. 2000;11(2):189–93.
  133. Rizzari C, Lanvers-Kaminsky C, Valsecchi MG, Ballerini A, Matteo C, Gerss J, et al. Asparagine levels in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia treated with pegylated-asparaginase in the induction phase of the AIEOP-BFM ALL 2009 study. *Haematologica*. 2019;104(9):1812–21.
  134. Angiolillo AL, Schore RJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Gastier-Foster JM, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of calaspargase pegol Escherichia coli L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia: Results from children's oncology group study AALL07P4. *J Clin Oncol*. 2014;32(34):3874–82.

135. Vrooman L, Kirov I, Dreyer Z. Preliminary Results Of a Pharmacokinetic Study Of Intravenous Asparaginase *Erwinia Chrysanthemi* Following Allergy To E Coli-Derived Asparaginase In Children, Adolescents, and Young Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia Or Lymphoblastic Lymphoma. *Blood*. 2013;122(21):3904.
136. Pinheiro JPV, Ahlke E, Nowak-Göttl U, Hempel G, Müller HJ, Lümckemann K, et al. Pharmacokinetic dose adjustment of *Erwinia asparaginase* in protocol II of the paediatric ALL/NHL-BFM treatment protocols. *Br J Haematol*. 1999;104(2):313–20.
137. Schrey D, Borghorst S, Lanvers-Kaminsky C. Therapeutic drug monitoring of asparaginase in the ALL-BFM 2000 protocol between 2000 and 2007. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(7):952–8.
138. Würthwein G, Lanvers-Kaminsky C, Gerss J, Möricke A, Zimmermann M, Stary J, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Asparaginase: Intra-individual Variability and Predictivity in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With PEG-Asparaginase in the AIEOP-BFM Acute Lymphoblastic Leukemia 2009 Study. *Ther Drug Monit*. 42(3):435–44.
139. Hempel G, Müller HJ, Lanvers-Kaminsky C, Würthwein G, Hoppe A, Boos J. A population pharmacokinetic model for pegylated-asparaginase in children. *Br J Haematol*. 2010;148(1):119–25.
140. Tong WH, Pieters R, de Groot-Kruseman HA, Hop WCJ, Boos J, Tissing WJE, et al. The toxicity of very prolonged courses of PEGasparaginase or *Erwinia asparaginase* in relation to asparaginase activity, with a special focus on dyslipidemia. *Haematologica*. 2014;99(11):1716–21.
141. Raja RA, Schmiegelow K, Sørensen DN, Frandsen TL. Asparaginase-associated pancreatitis is not predicted by hypertriglyceridemia or pancreatic enzyme levels in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(1):32–8.
142. Lynggaard LS, Rank CU, Hansen SN, Højfeldt SG, Henriksen LT, Jarvis KB, et al. Asparaginase enzyme activity levels and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a NOPHO ALL2008 study. *Blood Adv*. 2022;6(1):138–47.
143. Tong W, Pieters R, van der Sluis I. Ammonia Levels Should Not Be Used as a Surrogate Marker of Levels of Asparaginase Activity in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(3):564–5.
144. Baruchel A, Brown P, Rizzari C, Silverman L, Van Der Sluis I, Wolthers BO, et al. Increasing completion of asparaginase treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL): Summary of an expert panel discussion. *ESMO Open*. 2020;5(5):e000977.
145. Castells MC, Tennant NM, Sloane DE, Ida Hsu F, Barrett NA, Hong DI, et al. Hypersensitivity reactions to chemotherapy: Outcomes and safety of rapid desensitization in 413 cases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(3):574–80.
146. Verma A, Chen K, Bender C, Gorney N, Leonard W, Barnette P. PEGylated *E. coli* asparaginase desensitization: an effective and feasible option for pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia who have developed hypersensitivity to pegaspargase in the absence of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* availability. *Pediatr Hematol Oncol*. 2019;36(5):277–86.
147. August KJ, Farooki S, Fulbright JM, August A, Portnoy JM, Pommert L, et al. Desensitization to pegaspargase in children with acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2020;67(1):1–5.



148. Tong WH, Pieters R, Tissing WJ, van der Sluis IM. Desensitization protocol should not be used in acute lymphoblastic leukemia patients with silent inactivation of PEGasparaginase. *Haematol.* 2014;99:102–4.
149. Lynggaard LS, Gottschalk Højfeldt S, Moeller L, Vaitkeviciene GE, Langenskiöld C, Lehmann AK, et al. NOR-GRASPALL2016 (NCT03267030): Asparaginase Encapsulated in Erythrocytes (eryaspase) - a Promising Alternative to Peg-Asparaginase in Case of Hypersensitivity. *Blood.* 2020;136(Supplement 1):13–4.
150. Maese L, Rizzari C, Coleman R, Power A, van der Sluis I, Rau RE. Can recombinant technology address asparaginase *Erwinia chrysanthemi* shortages? *Pediatr Blood Cancer.* 2021;68(10):1–7.
151. Rau RE, Dreyer ZA, Choi MR, Liang W, Skowronski R, Allamneni KP, et al. Outcome of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma with hypersensitivity to pegaspargase treated with PEGylated *Erwinia* asparaginase, pegcrisantaspase: A report from the Children’s Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(3):1–7.
152. Kloos RQH, Pieters R, Escherich G, van der Sluis IM. Allergic-like reactions to asparaginase: Atypical allergies without asparaginase inactivation. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(11):1928–34.
153. Abaji R, Gagné V, Xu CJ, Spinella JF, Ceppi F, Laverdière C, et al. Whole-exome sequencing identified genetic risk factors for asparaginase-related complications in childhood ALL patients. *Oncotarget.* 2017;8(27):43752–67.
154. Tanfous M Ben, Sharif-askari B, Ceppi F, Laaribi H, Rousseau J, Labuda M, et al. Polymorphisms of Asparaginase Pathway and Asparaginase-Related Complications in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2015;21(2):329–35.
155. Gibson A, Hernandez C, Tejada FNH, Kawedia J, Rytting M, Cuglievan B. Asparaginase-Associated Pancreatitis in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Perspectives. *Pediatr Drugs.* 2021;23(5):457–63.
156. Fernandez CA, Smith C, Yang W, Dat M, Bashford D, Larsen E, et al. HLA-DRB1 \* 07 : 01 is associated with a higher risk of asparaginase allergies. *Blood.* 2014;124(8):1266–77.
157. Fernandez CA, Smith C, Yang W, Mullighan CG, Qu C, Larsen E, et al. Genome-wide analysis links NFATC2 with asparaginase hypersensitivity. *Blood.* 2015;126(1):69–75.
158. Højfeldt SG, Wolthers BO, Tulstrup M, Abrahamsson J, Gupta R, Harila-Saari A, et al. Genetic predisposition to PEG-asparaginase hypersensitivity in children treated according to NOPHO ALL2008. *Br J Haematol.* 2019;184(3):405–17.
159. Rajić V, Debeljak M, Goričar K, Jazbec J. Polymorphisms in GRIA1 gene are a risk factor for asparaginase hypersensitivity during the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(11):3103–8.
160. Chen S-H, Pei D, Yang W, Cheng C, Jeha S, Cox NJ, et al. Genetic variations in GRIA1 on chromosome 5q33 related to asparaginase hypersensitivity. Vol. 88, *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2010. p. 191–6.
161. Common Terminology Criteria for Adverse Events v 4.0 [Internet]. Consultat el 15 de juny de 2022. Disponible a: [https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03/Archive/CTCAE\\_4.0\\_2009-0529\\_QuickReference\\_8.5x11.pdf](https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03/Archive/CTCAE_4.0_2009-0529_QuickReference_8.5x11.pdf)

162. Primer3plus [Internet]. Consultat el 21 de juny de 2016. Disponible a: <https://www.primer3plus.com/>
163. Ensembl [Internet]. Consultat el 16 de juny de 2016. Disponible a: <https://www.ensembl.org/index.html>
164. Nucleotide blast [Internet]. Consultat el 23 de setembre de 2016. Disponible a: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
165. R v4.2.1 [Internet]. Consultat el 21 d'octubre de 2022. Disponible a: [www.R-project.org](http://www.R-project.org)
166. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. 2nd ed. Wiley, editor. Applied Logistic Regression. 2005.
167. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;(53):457–81.
168. Bland J, Altman D. The logrank test. *BMJ.* 2004;328(7447):1073.
169. Youden W. Index for rating diagnostic tests. *Cancer.* 1950;3(1):32–5.
170. Efron B, Tibshirani R. An Introduction to the Bootstrap. 1st ed. 1994.
171. Dharia P, Swartz MD, Bernhardt MB, Chen H, Gramatges MM, Lupo PJ, et al. Clinical and demographic factors contributing to asparaginase-associated toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2022;63(12):2948–54.
172. Ballesteros AG, Basco BJ, González ÁR. La inmigración latinoamericana en España en el siglo XXI. *Investig Geogr.* 2009;70:55–70.
173. Kahn JM, Cole PD, Blonquist TM, Stevenson K, Jin Z, Barrera S, et al. An investigation of toxicities and survival in Hispanic children and adolescents with ALL: Results from the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocol 05-001. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(3):1–11.
174. Rizzari C, Moericke A, Conter V, Valsecchi MG, Zimmermann M, Silvestri D, et al. Incidence of Hypersensitivity Reactions (HSR) to Peg-Asparaginase (PEG-ASP) in 6136 Patients Treated in the AIEOP-BFM ALL 2009 Study Protocol. *Blood.* 2019 Nov 13;134(Supplement\_1):2589–2589.
175. Merlen C, Bonnefoy A, Afeich C, Théorêt Y, Laverdière C, Leclerc JM, et al. Antithrombin and fibrinogen levels as predictors for plasma L-asparaginase activity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66(7):1–7.
176. Henriksen L, Harila-Saar A, Ruud E. PEG-asparaginase allergy in children with acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL2008 protocol. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(3):427–33.
177. Lanvers-Kaminsky C, Ruffer A, Würthwein G, Gerss J, Zucchetti M, Ballerini A, et al. Therapeutic drug monitoring of asparaginase activity - Method comparison of MAAT and AHA test used in the international AIEOP-BFM ALL 2009 trial. *Vol. Ther Drug Monit.* 2018; 40(1):93–102 p.
178. Abshire TC, Pollock BH, Billett AL, Bradley P, Buchanan GR. Weekly polyethylene glycol conjugated L-asparaginase compared with biweekly dosing produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: A pediatric oncology group study. *Blood.* 2000;96(5):1709–15.
179. Tong WH, Mesegué M, Dapena JL, Camós M, Rives S. Native *E. coli* asparaginase upfront

should be replaced by PEGasparaginase upfront in the treatment of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol.* 2022;40(4):809-811.

180. Silverman LB, Supko JG, Stevenson KE, Woodward C, Vrooman LM, Neuberg DS, et al. Intravenous PEG-asparaginase during remission induction in children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115(7):1351–3.
181. Finch ER, Smith CA, Yang W, Liu Y, Kornegay NM, Panetta JC, et al. Asparaginase formulation impacts hypertriglyceridemia during therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2020;67(1):e28040.
182. Miller HK, Salser JS, Balis ME. Amino Acid Levels following L-Asparagine Amidohydrolase (EC.3.5.1.1) Therapy. *Cancer Res.* 1969;29(1):183–7.
183. Kloos RQH, Pieters R, Jumelet FMV, De Groot-Kruseman HA, Van Den Bos C, Van Der Sluis IM. Individualized asparaginase dosing in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2020;38(7):715–24.

## XI. ANNEX



## PUBLICACIONES

Lower incidence of clinical allergy with PEG-asparaginase upfront versus the sequential use of native *E.coli* asparaginase followed by PEG-ASP in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia.

## ALTRES PUBLICACIONES

Native *E.coli* asparaginase upfront should be replaced by PEG-asparaginase upfront in the treatment of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia.



### **Lower incidence of clinical allergy with PEG-asparaginase upfront versus the sequential use of native *E.coli* asparaginase followed by PEG-ASP in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia**

Montserrat Mesegué, Anna Alonso-Saladrigues, Sara Pérez-Jaume, Ariadna Comes-Escoda, José Luís Dapena, Anna Faura, Nuria Conde, Albert Català, Anna Ruiz-Llobet, Edgar Zapico-Muñiz, Mireia Camós, Susana Rives.


---

Asparaginase (ASP) is an essential component for the acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment, but toxicities, such as allergy, frequently limit its use. Although the potentially lower PEG-ASP formulation immunogenicity, few studies with conflicting results have compared the allergy incidence between *Escherichia coli*-ASP and PEG-ASP in the same protocol. We aimed at comparing the allergy incidence in children receiving *native E.coli*-ASP versus PEG-ASP within the same clinical protocol (Spanish Society of Pediatric Hematology and Oncology ALL-SEHOP-PETHEMA 2013). One hundred and twenty-six children (1-19 years) diagnosed with ALL from 2013 to 2020 were included. Patients in group 1 received a sequential scheme of native *E.coli*-ASP 10,000 IU/m<sup>2</sup> intramuscularly (im) followed by PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> im. Patients in group 2 received PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> im upfront. Clinical allergy incidence was compared between both groups. Serum ASP activity (SAA) was measured in a subgroup of patients, and silent inactivation was recorded. The cumulative incidence of clinical allergy was significantly higher in group 1 (native followed by PEG-ASP) than in group 2 (PEG-ASP upfront), 24.7% versus 4.1% (p = 0.0085). Adequate ASP activity was achieved with PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> dose in most patients (median SAA 412.5 and 453.0 IU/L at days 7 and 14). The incidence of silent inactivation in PEG-ASP upfront patients was very low. PEG-ASP-used upfront was associated with a lower incidence of clinical allergy than that observed in the sequential use of native *E.coli*-ASP followed by PEG-ASP. PEG-ASP at 1000 IU/m<sup>2</sup> was effective in achieving enough ASP activity in most patients.





# Lower incidence of clinical allergy with PEG-asparaginase upfront versus the sequential use of native *E. coli* asparaginase followed by PEG-ASP in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia

Montserrat Mesegué<sup>1,2</sup>  | Anna Alonso-Saladrigues<sup>1,2</sup> | Sara Pérez-Jaume<sup>3</sup> | Ariadna Comes-Escoda<sup>4</sup> | José Luís Dapena<sup>1,2</sup> | Anna Faura<sup>1,2</sup> | Nuria Conde<sup>1,2</sup> | Albert Català<sup>1,2,5</sup> | Anna Ruiz-Llobet<sup>1,2</sup> | Edgar Zapico-Muñiz<sup>6</sup> | Mireia Camós<sup>2,3,7</sup> | Susana Rives<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Hematology and Oncology Departments, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Leukemia and other Pediatric Hemopathies, Developmental Tumor Biology Group, Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Developmental Tumor Biology Laboratory, Institut de Recerca Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Oncohematology Unit, Pharmacy Department, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>6</sup>Biochemistry Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## Correspondence

Montserrat Mesegué and Susana Rives, Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain.

Email: [mmesegue@sjdhospitalbarcelona.org](mailto:mmesegue@sjdhospitalbarcelona.org) and [srives@sjdhospitalbarcelona.org](mailto:srives@sjdhospitalbarcelona.org)

## Abstract

Asparaginase (ASP) is an essential component for the acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment, but toxicities, such as allergy, frequently limit its use. Although the potentially lower PEG-ASP formulation immunogenicity, few studies with conflicting results have compared the allergy incidence between *Escherichia coli*-ASP and PEG-ASP in the same protocol. We aimed at comparing the allergy incidence in children receiving native *E. coli*-ASP versus PEG-ASP within the same clinical protocol (Spanish Society of Pediatric Hematology and Oncology ALL-SEHOP-PETHEMA 2013). One hundred and twenty-six children (1–19 years) diagnosed with ALL from 2013 to 2020 were included. Patients in group 1 received a sequential scheme of native *E. coli*-ASP 10,000 IU/m<sup>2</sup> intramuscularly (IM) followed by PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> IM. Patients in group 2 received PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> IM upfront. Clinical allergy incidence was compared between both groups. Serum ASP activity (SAA) was measured in a subgroup of patients, and silent inactivation was recorded. The cumulative incidence of clinical allergy was significantly higher in group 1 (native followed by PEG-ASP) than in group 2 (PEG-ASP upfront), 24.7% versus 4.1% ( $p = 0.0085$ ). Adequate ASP activity was achieved with PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> dose in most patients (median SAA 412.5 and 453.0 IU/L at days 7 and 14). The incidence of silent inactivation in PEG-ASP upfront patients was very low. PEG-ASP-used upfront was associated with a lower incidence of clinical allergy than that observed in the sequential use of native *E. coli*-ASP followed by PEG-ASP. PEG-ASP at 1000 IU/m<sup>2</sup> was effective in achieving enough ASP activity in most patients.

## KEYWORDS

acute lymphoblastic leukemia, allergy, asparaginase, pediatrics, therapeutic drug monitoring, toxicity

## 1 | INTRODUCTION

The outcome of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) has dramatically improved with current multiagent chemotherapy regimens and the increased use of intensified asparaginase (ASP) therapy.<sup>1–3</sup> Three different formulations of ASP are currently available: native (native *Escherichia coli*-ASP) and pegylated *E. coli* ASP (PEG-ASP) are derived from *E. coli*, and *Erwinia* ASP (*Erwinia*-ASP) from *E. chrysanthemi*.<sup>4,5</sup> Their toxic profile is similar, except for the potential reduction of immunogenicity of PEG-ASP; however, this aspect is still unclear.<sup>5–8</sup>

Asparaginase treatment associates with frequent and sometimes severe toxicity such as allergy, pancreatitis, and thrombosis, which may lead to discontinuation of ASP therapy and increased risk of relapse.<sup>3,4,9,10</sup> Allergy to asparaginase is one of the most common reasons for its discontinuation.<sup>3–5,9,11</sup> Due to the development of neutralizing antibodies, allergies cause inactivation of the drug. Some patients develop neutralizing antibodies without clinical manifestations; this phenomenon, known as silent inactivation (SI), can be detected by measuring serum asparaginase activity (SAA). Patients presenting allergy or SI have poorer outcome unless they are switched to a non-cross-reacting formulation like *Erwinia*-ASP.<sup>5,8,9,12–14</sup> Recently, SAA allowed identifying some patients that develop symptomatic allergic reactions without neutralizing antibodies, presenting the so-called allergic-like reactions.<sup>15</sup>

Despite the potential reduction of immunogenicity of PEG-ASP, few studies have compared head-to-head the incidence of clinical allergy to native *E. coli*-ASP versus PEG-ASP within the same clinical protocol. In one study with adult patients and two randomized trials in children, no significant differences in allergy were observed.<sup>3,5–8,16,17</sup> Our study aims to compare the incidence of clinical allergy in pediatric patients with ALL receiving native *E. coli*-ASP versus PEG-ASP within the same clinical protocol (Spanish Society of Pediatric Hematology and Oncology ALL-SEHOP PETHEMA-2013).

## 2 | METHODS

### 2.1 | Patients and laboratory measurements

Children aged 1–19 years newly diagnosed with ALL in a single center from May 2013 to February 2020 were included.

In all patients, we prospectively monitored the complete blood cell count, creatinine, bilirubin, transaminases, ammonium, albumin, and triglycerides every 7 or 14 days after each PEG-ASP dose.

Since January 2016, SAA was measured by a validated assay (aspartic acid  $\beta$ -hydroxamate test)<sup>18</sup> with a 5 IU/L lower limit of quantification (LLQ). SAA was determined at days 7 and 14 after PEG-ASP (1000 IU/m<sup>2</sup> intramuscularly [IM]) and at day 2 or 3 after *Erwinia*-ASP (20,000 IU/m<sup>2</sup> IM) administration. Anti-ASP antibodies were not measured.

### 2.2 | Treatment

We stratified patients into three groups: high-risk (HR), intermediate-risk (IR), and standard-risk (SR) to guide therapy. The stratification criteria were based on clinical features, genetics, and treatment response (see Table S1). The response was assessed by morphology and measurable residual disease levels by flow cytometry.

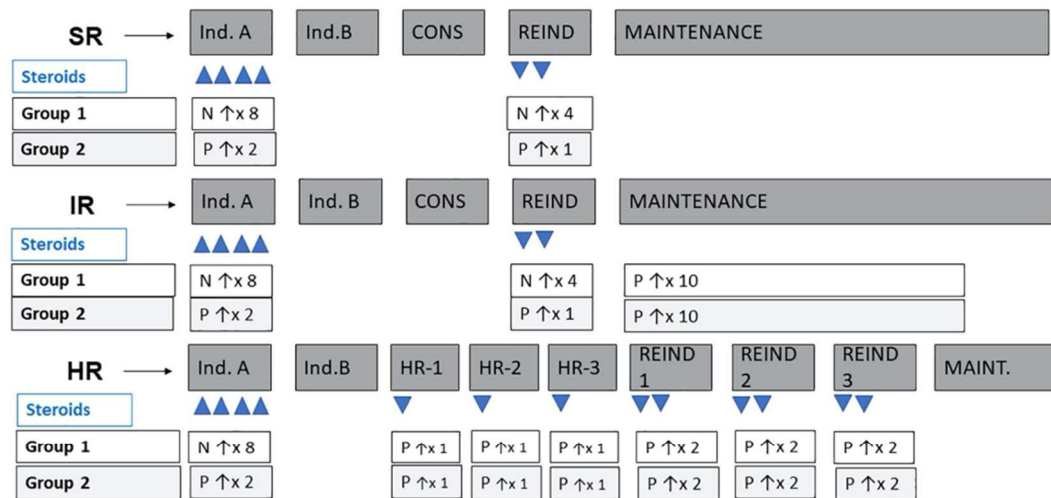
Protocol treatment is summarized in Figure 1. Treatment had a Berlin–Frankfurt–Münster regimen (BFM) backbone and consisted of a four-drug induction phase (IA), followed by induction IB, consolidation, reinduction, and maintenance in SR and IR patients. HR patients received three HR blocks, three reinduction cycles, and maintenance. The total duration of therapy was 2 years.

Regarding ASP therapy, in November 2016, there was a safety amendment in the protocol to use PEG-ASP upfront. This was decided due to high rates of clinical allergy to ASP, which was thought to be related to the sequential use of native *E. coli*-ASP followed by PEG-ASP. Before the amendment, patients received native *E. coli*-ASP 10,000 IU/m<sup>2</sup> IM/72 h with eight doses in induction and four in reinduction followed by an intensification with PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> IM in IR and HR patients. Steroids were given concomitantly with asparaginase except in the maintenance phase. After the amendment, all patients were to receive PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> IM upfront (Figure 1). Of note, before and after amendment, patients received the same chemotherapy backbone except for the formulation of ASP (native followed by PEG-ASP vs. PEG-ASP upfront) and a reduction of the dexamethasone from 3 to 2 weeks in the reinduction phase.

After an allergic event (local reaction, rash, or anaphylaxis) or after SI, patients receiving native *E. coli*-ASP or PEG-ASP were switched to *Erwinia*-ASP (Table 2). Asparaginase was temporarily withheld until resolution of thrombosis or mild pancreatitis (as defined in Ponte di Legno Toxicity Working Group [PTWG]) criteria<sup>19,20</sup>) but discontinued permanently in case of severe pancreatitis or allergy to *Erwinia*-ASP.

### 2.3 | Toxicity assessment

Clinical allergy was assessed according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 ([https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03/Archive/CTCAE\\_4.0\\_2009-05-29\\_QuickReference\\_8.5x11.pdf](https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03/Archive/CTCAE_4.0_2009-05-29_QuickReference_8.5x11.pdf)) and pancreatitis to PTWG definitions.<sup>19,20</sup> The following adverse events were collected: ASP-related clinical allergy (all grades), pancreatitis (all grades), and, from January 2016 onwards, also SI. SI was defined by SAA <100 IU/L on day 7 or <20 IU/L on day 14 after PEG-ASP, SAA <20 IU/L on day 2 after *Erwinia*-ASP, and SAA <5 IU/L on day 3 after native *E. coli*-ASP.<sup>21,22</sup> Two different samples were needed to confirm SI.



Group 1=sequential scheme native *E. coli*-asparaginase followed by PEG-asparaginase. Group 2=PEG-asparaginase upfront.  
 N=Native *E. coli*-asparaginase (10 000 IU/m<sup>2</sup>/72h intramuscular). P= polyethylene glycosylated *E. coli*-asparaginase (1000 IU/m<sup>2</sup>/15 days intramuscular).  
 ↑=Dose. Δ= Prednisone (1 week). ▽= Dexamethasone (1 week). SR=Standard risk. IR=Intermediate risk. HR=High risk. Ind.A=Induction A. Ind.B=Induction B. CONS=Consolidation. REIND=Reinduction. MAINT=Maintenance. HR-1=High risk block 1. HR-2=High risk block 2. HR-3=High risk block 3.

FIGURE 1 ALL-SEHOP-PETHEMA 2013 Protocol

## 2.4 | Statistical methods

Our primary objective was to assess the incidence of clinical allergy in patients who received native *E. coli*-ASP followed by PEG-ASP (group 1) and compared it with the incidence in those patients who received PEG-ASP upfront (group 2).

Secondary objectives were to assess (a) the incidence of pancreatitis in groups 1 and 2; (b) the incidence of SI after PEG-ASP (1000 IU/m<sup>2</sup> IM); (c) the SAA levels achieved with PEG-ASP IM administration (1000 IU/m<sup>2</sup>), and (d) the association between PEG-ASP activity level and albumin, triglycerides, and ammonium.

Statistical analyses were performed using R software v3.6.3 ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)),<sup>23</sup> considering *p*-values <0.05 to be statistically significant. We used X<sup>2</sup> or Fisher exact tests to compare qualitative variables among groups, and the Mann-Whitney *U* test for quantitative variables. Cumulative incidence (CI) of allergy and pancreatitis were estimated using the Kaplan-Meier estimator,<sup>24</sup> and compared using the log-rank test.<sup>25</sup> We censored the follow-up at the time of the event (allergy or pancreatitis) or shortly after the last ASP administration in patients without toxicity (3 days after the administration in case of native *E. coli*-ASP and 15 days after in case of PEG-ASP). Linear mixed models were used to assess the association between ASP activity and ammonium, albumin, and triglycerides to account for the correlation between the measurements from the same subjects.<sup>26</sup> We used the Youden index maximization method,<sup>27,28</sup> to estimate cutoffs for ammonium, triglycerides, and albumin that optimally discriminated between patients with low ASP

activity (<100 IU/L) and therapeutic ASP activity (≥100 IU/L). The corresponding 95% confidence intervals were calculated using bootstrap.<sup>29</sup>

## 2.5 | Ethics

The study was conducted in accordance with the ethical standards and the Declaration of Helsinki following the national and international guidelines, and was approved by the authors' Local Ethics Committee. All samples were stored in the legally competent Biobank of our institution and were used after informed consent was obtained either from patients or their legal guardians.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Patients characteristics

One hundred and twenty-six patients were included between May 2013 and February 2020. Sixty-nine patients received a sequential scheme of native *E. coli*-ASP followed by PEG-ASP (group 1), and 57 were treated with PEG-ASP upfront (group 2). Table 1 shows the patients' main characteristics. No significant differences between both groups were observed except for the higher number of patients in the high-risk arm in group 2. Among patients in group 1, 49/69 (71.0%) completed all the ASP planned doses, 12 switched to



TABLE 1 Clinical features at diagnosis of the 126 pediatric patients diagnosed with ALL included in the study

	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP scheme (n = 69) n (%)	PEG-ASP upfront scheme (n = 57) n (%)	p-value
Sex, girls	31 (44.9)	20 (35.1)	0.35
Age, years median (range)	5.0 (1.1–16.7)	6.3 (1.1–17.7)	0.39
<10 years	54 (78.3)	47 (82.5)	0.72
≥10 years	15 (21.7)	10 (17.5)	
BCP-ALL	58 (84.1)	45 (78.9)	0.61
T-ALL	11 (15.9)	12 (21.1)	
Standard risk	13 (18.8)	2 (3.5)	0.01
Intermediate risk	45 (65.2)	36 (63.2)	
High risk	11 (15.9)	19 (33.3)	

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; BCP, B-cell precursor; Native *E. coli*-ASP, native *E. coli*-asparaginase; PEG-ASP, polyethylene glycosylated *E. coli*-asparaginase.

*Erwinia*-ASP, and 8 discontinued ASP treatment due to pancreatitis. Among patients in group 2, 38/57 (66.7%), completed all the ASP planned doses. Two switched to *Erwinia*-ASP, 3 discontinued (due to pancreatitis in 2 cases and clinical allergy in 1 patient), and 14 were still under maintenance ASP therapy intensification at the moment of the cutoff analysis (Figure 2). Still, all of them received at least 80% of ASP planned doses. Complete remission rate was 97.7% with three patients refractory to induction therapy who belonged to group 2.

### 3.2 | Pancreatitis

Of the 126 patients, 10 developed pancreatitis (7.9%), being severe in 8 patients and associated with chronic sequelae (diabetes and pseudocyst) in two. Half of the pancreatitis occurred after native *E. coli*-ASP and a half after PEG-ASP.

Pancreatitis was significantly more frequent in patients older than 10 years, occurring in 7 out of 25 patients (28%) versus 3 out of 101 younger patients (3.0%) ( $p = 0.0005$ ).

Regarding the ASP formulation, we did not observe statistically significant differences in the incidence of pancreatitis in patients in group 1 versus group 2, with a 15-month CI of pancreatitis of 13.9% (CI 95% 4.3–22.6) and 4.6% (CI 95% 0–10.8) for groups 1 and 2, respectively ( $p = 0.094$ ) (Figure 3).

### 3.3 | Hypersensitivity

#### 3.3.1 | Clinical allergy

Symptomatic allergy was observed in 11.9% of patients (15/126). Table 2 shows the characteristics of allergic reactions. All the native *E. coli*-ASP related allergies were mild, but 8/11 (73%) after PEG-ASP

were severe, and 2 required intensive care management. Most of the allergic reactions occurred after a period of asparaginase interruption, with only one (1/15, 6.7%) occurring during induction, six (40%) during high-risk blocks or reinduction, and eight (53%) during maintenance, predominantly after the second or third PEG-ASP dose. Most patients presenting allergy (13/15, 87%) were switched to *Erwinia*-ASP, and two of them (15%) developed allergy to this formulation as well.

The CI of allergy was significantly higher in group 1 than in group 2 ( $p = 0.0085$ ), 24.7% versus 4.1% at 15 months (Figure 4). Although only two patients in the PEG upfront group developed allergy, one required intensive care support for fluctuating anaphylaxis.

### 3.4 | Silent inactivation

Asparaginase activity was determined in 399 samples in 68 patients, most of them belonging to group 2 (56/68). SI was found in 4/68 (5.9%) patients, with a non-significantly lower incidence in group 2 (2/56, 3.6%) versus group 1 (2/12, 16.7%) ( $p = 0.14$ ). Patients with SI were switched to *Erwinia*-ASP, and all achieved adequate SAA.

### 3.5 | Allergic-like reactions

Among the 68 patients in whom SAA was evaluated, only 3 presented clinical allergy to asparaginase. Two of them had SAA beneath the LLQ (<5 IU/L) after the allergic episode. One patient presented SAA levels higher than 100 IU/L both at days 5 and 14 after a moderate anaphylactic episode (skin rash and glans edema) following PEG-ASP administration. Due to the therapeutic ASP activity levels with clinical allergic symptoms, this episode was identified as an allergic-like reaction. However, the patient was switched to *Erwinia*-ASP due to the anaphylaxis symptomatology.

TABLE 2 Characteristics of the allergic reactions recorded after asparaginase administration

	Group	Risk group <sup>a</sup>	ASP formulation	Grade and type of reaction	Treatment phase	Switch to <i>Erwinia</i>	Allergy to <i>Erwinia</i>
Pt. 1	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	SR	Native <i>E. coli</i> -ASP	Allergy grade 1 (mild) cutaneous	I	Yes	No
Pt. 2	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	SR	Native <i>E. coli</i> -ASP	Allergy grade 2 (moderate) allergic reaction	Rel	Yes	No
Pt. 3	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	Native <i>E. coli</i> -ASP	Allergy grade 1 (mild) cutaneous	Rel	Yes	No
Pt. 4	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	Native <i>E. coli</i> -ASP	Allergy grade 1 (mild) cutaneous	Rel	Yes	No
Pt. 5	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP	Allergy grade 2 (moderate) urticarial rash	M	No	No
Pt. 6	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP	Anaphylaxis grade 4 (severe) ICU admission	M	Yes	No
Pt. 7	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP	Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	No
Pt. 8	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP	Allergy grade 2 (moderate) rash	M	Yes	No
Pt. 9	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP	Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	No
Pt. 10	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP	Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	Yes
Pt. 11	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	IR	PEG-ASP	Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	No
Pt. 12	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	HR	PEG-ASP	Anaphylaxis grade 3 (severe)	HR-block 2	Yes	Yes
Pt. 13	Native <i>E. coli</i> -ASP/PEG-ASP	HR	PEG-ASP	Allergy grade 2 (moderate) rash	HR-block 2	Yes	No
Pt. 14	PEG-ASP upfront	IR	PEG-ASP	Anaphylaxis grade 3 (severe)	M	Yes	No
Pt. 15	PEG-ASP upfront	HR	PEG-ASP	Anaphylaxis grade 4 (severe) ICU admission	HR-block 2	N	N

Note: Allergy was assessed using the Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0.

Abbreviations: HR, high risk; I, induction; ICU, intensive care unit; IR, intermediate risk; M, maintenance; Native *E. coli*-ASP, native *E. coli*-asparaginase; PEG-ASP, polyethylene glycosylated *E. coli*-asparaginase; Pt, patient; Rel, re-induction; SR, standard risk.

<sup>a</sup>Patients 12 and 15 were initially classified to IR and allocated in the HR due to poor minimal residual disease clearance (see Table S1).

### 3.6 | SAA levels and correlation with laboratory parameters

SAA was measured in 368 samples after IM 1000 IU/m<sup>2</sup> of PEG-ASP. At day 14, SAA was above 100 IU/L in 90.6% (259/286) of the samples. Median SAA after IM PEG-ASP 1000 IU/m<sup>2</sup> was 412.5 IU/L (range 0–1656) at day 7 and 453.0 IU/L (range 0–1325) at day 14 (Figure 5). Median SAA after IM *Erwinia*-ASP 20,000 IU/m<sup>2</sup> was 347.0 IU/L at 48 h and 198.5 IU/L at 72 h.

Due to its mechanism of action and physiology, ASP treatment has been linked to an increase in ammonium and triglycerides levels and a decrease in albumin. In our study, a direct comparison of quantitative data showed a significant association of SAA levels with higher serum ammonium ( $p < 0.0001$ ), lower albumin ( $p < 0.0001$ ), and higher triglycerides levels ( $p = 0.037$ ) (Figures S1–S4).

## 4 | DISCUSSION

In our study, we compared the incidence of clinical allergy to ASP in a series of pediatric patients with ALL treated with different ASP formulations within the same clinical protocol. We observed a higher CI of allergy to asparaginase in patients treated with native *E. coli*-ASP followed by an intensification with PEG-ASP, as compared to those patients treated upfront with the pegylated formulation. We also found that the dose of 1000 IU/m<sup>2</sup> of PEG-ASP achieved adequate levels of asparaginase activity over 100 IU/L in 90% of the samples analyzed 14 days after IM administration.

The incidence of clinical allergy in recent pediatric protocols with prolonged intensified PEG-ASP therapy is lower than that found in historical controls in which native *E. coli*-ASP was used.<sup>14,30–32</sup>

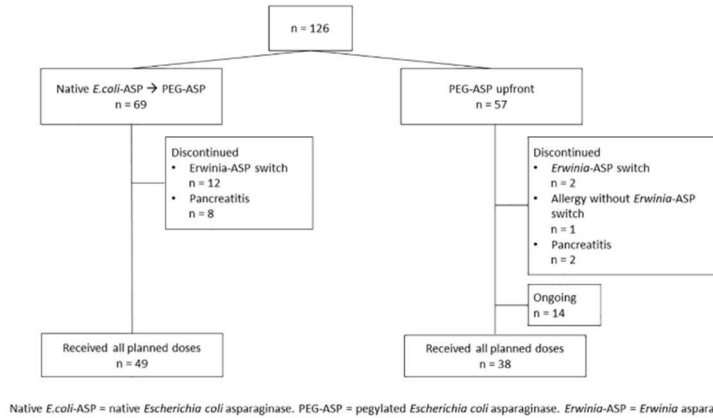


FIGURE 2 Patients' therapy flow chart

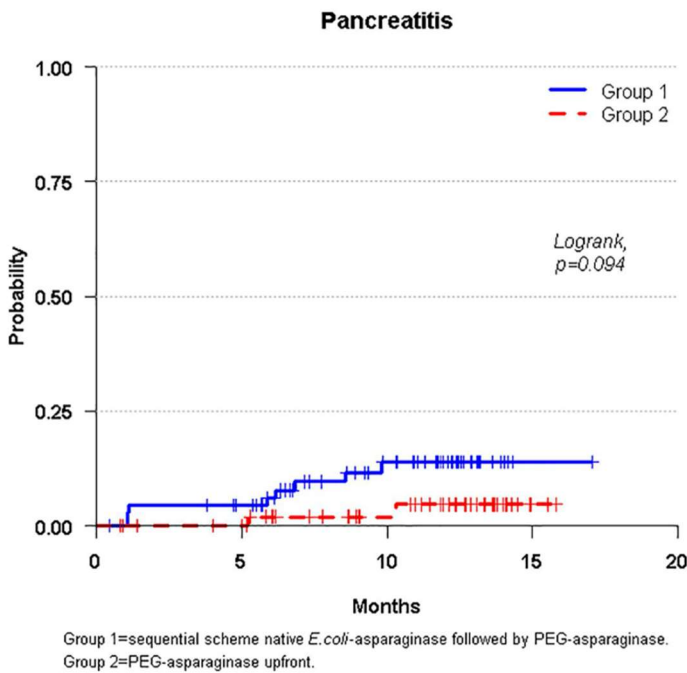
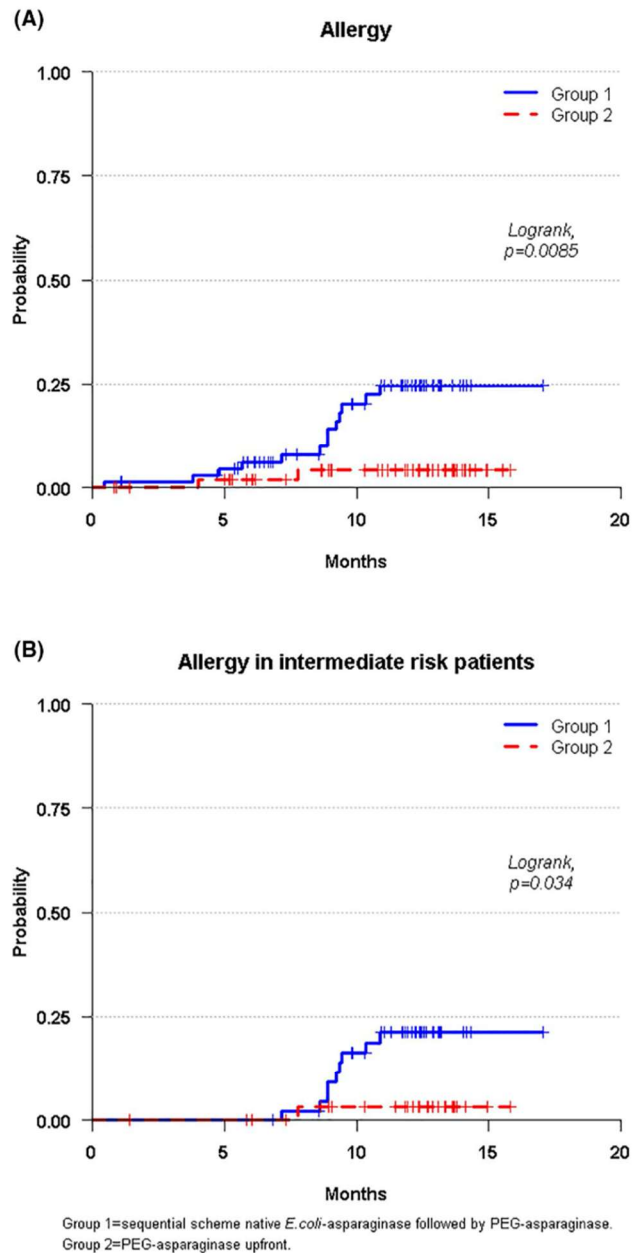


FIGURE 3 Cumulative incidence of pancreatitis in the 126 pediatric patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia included in the study

Nevertheless, there are few direct comparisons within the same protocol of both formulations in children, and these did not show significant differences in the allergy incidence.<sup>16,17</sup> The Children Cancer Group reported the results of a randomized comparison of PEG-ASP IM versus native *E. coli*-ASP IM given to children with standard-risk ALL, and the incidence of allergy did not differ.<sup>17</sup> The lack of differences might be related to the low incidence of allergy in this population, occurring in only 2 of 118 patients, which may be related to the less intensive asparaginase treatment received in the

patients analyzed.<sup>31,32</sup> In the Dana-Farber Cancer Institute protocol 05-001 a randomized comparison was made between IM native *E. coli*-ASP versus intravenous PEG-ASP given post-induction. The clinical allergy incidence in both arms was similar (9 vs. 12%).<sup>16</sup> In our study, we grouped patients according to the received ASP formulation within the same protocol. Patients who received IM native *E. coli*-ASP in induction and reinduction followed by an intensified IM PEG-ASP treatment, presented more allergic episodes than those receiving PEG-upfront (25% vs. 4% respectively,  $p = 0.0085$ ). Our

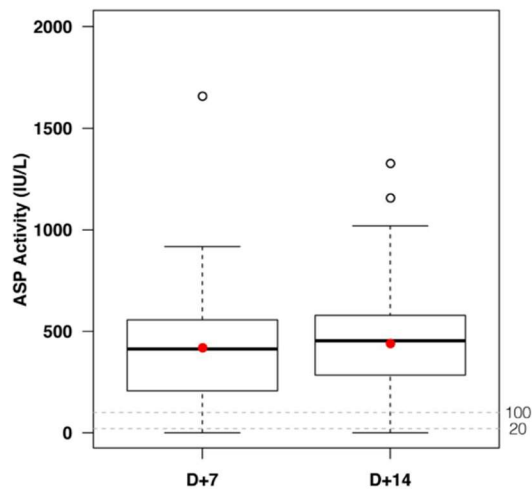
**FIGURE 4** (A) Cumulative incidence of allergy in the 126 pediatric patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL) included in the study. (B) Cumulative incidence of allergy in the 81 pediatric patients diagnosed with ALL included in the intermediate-risk group



results are in agreement with those found by the Dutch Childhood Oncology Group DCOG-ALL10 protocol, in which native *E. coli*-ASP in induction was followed by PEG-ASP in post-induction extended asparaginase treatment.<sup>22,33</sup> With this scheme, a high clinical allergy incidence (22%) was observed, but in their following protocol DCOG-ALL11, in which patients received PEG-ASP upfront, the allergy

incidence dropped to 10%.<sup>30</sup> Also, recently the AIEOP-BFM group reported a lower (7.6%) incidence of clinical allergy in patients treated with PEG-ASP upfront as compared to their historical experience with native *E. coli*-ASP.<sup>31</sup> The reduced incidence of clinical allergy seen in patients treated with PEG-ASP could be related to the longer half-life of PEG-ASP leading to a more continuous exposure.





**FIGURE 5** Serum asparaginase activity of all patients after polyethylene glycosylated *E. coli*-asparaginase (PEG-ASP) 1000 IU/m<sup>2</sup> intramuscularly at days 7 and 14 after PEG-asparaginase administration. Box plot representation: the three lines on the box represent the first, second, and third quartiles, respectively; the whiskers represent 1.5 times the interquartile range from the box; white dots represent outlier values and red dots represent the mean values

Our results in the different incidence of clinical allergy in both groups could be biased since, by chance, there was a significantly higher number of high-risk patients in the PEG upfront group, and high-risk chemotherapy regimen is an independent risk factor for allergy.<sup>4,10,18</sup> Despite this bias, the incidence of allergy was lower in the PEG-ASP upfront group, which was the group that included more high-risk patients. We assessed the CI of clinical allergy according to risk groups, and in the IR patients, the CI of allergy was higher in patients in group 1 compared to those in group 2.

Regarding when hypersensitivity reactions occurred, our results were comparable to those previously reported. Most of the allergic reactions occurred following ASP re-exposure after ASP-free periods, similar to the experience in the DCOG-ALL10 protocol, in which most of the allergies occurred during intensification, after the second PEG-ASP dose.<sup>22</sup> We observed that most allergic reactions (8/15, 53.3%) took place after the first ASP dose of maintenance, when more gaps in ASP treatment had occurred. The risk of antibody formation and allergic reactions increases with repeated exposure to asparaginase with free period gaps and continuous exposure is associated with a decline in antibody levels.<sup>4</sup> In the same line, Rizzari and colleagues,<sup>31</sup> described that continuous and prolonged exposures to PEG-ASP reduced the probability of developing clinical allergy in HR patients treated with the AIEOP-BFM-2009 protocol.

In our cohort of patients, the incidence of asparaginase related pancreatitis was 7.9%, comparable to previous reports.<sup>10</sup> No significant differences were observed according to the ASP formulation

used. Patients older than 10 years had a higher incidence of pancreatitis ( $p < 0.001$ ), which is a known risk factor for this ASP related toxicity.<sup>3,34,35</sup>

We prospectively monitored the SAA in 399 samples from a cohort of 68 patients, most of them (56/68) belonging to group 2. In these patients treated with PEG-upfront, SI was very low (3.6%), in concordance with the large series of patients treated with the AIEOP-BFM 2009 protocol.<sup>36</sup> An important finding of their study was the high variability inter- and intra-patient. They found that some patients with no ASP activity in one of the treatment phases could have therapeutic levels of ASP activity after a period of treatment without ASP. This might have significant clinical consequences and might allow, under SAA monitoring and careful watching of a possible allergic reaction, to re-expose some patients to PEG-ASP and spare the second-line treatment with Erwinia-ASP.

Another advantage of SAA monitoring is that it enables to confirm that the administered dose of asparaginase is adequate. In our study, a low dose of PEG-ASP (1000 IU/m<sup>2</sup>) was enough to achieve SAA >100 IU/L in 90% of samples, with a median SAA level at days 7 and 14 over 400 IU/L, entirely above 100 IU/L, which is considered the target trough level.<sup>21</sup> Our findings are in line with the results of the NOPHO group in patients receiving PEG-ASP at a dose of 1000 IU/m<sup>2</sup>.<sup>11</sup> It seems important to confirm that lower doses of the PEG-ASP label (2500 IU/m<sup>2</sup>) can achieve an adequate trough level in the vast majority of patients.<sup>16,37,38</sup> Moreover, the DCOG used SAA monitoring to individualize ASP dose in patients included in their ALL-11 protocol; the starting dose was 1500 IU/m<sup>2</sup>, and they were able to reduce the dose in most patients, with a median dose as low as 400 IU/m<sup>2</sup>.<sup>30</sup>

Our study has some limitations, as the low number of patients analyzed and the lack of randomization of both formulations. Nevertheless, we confirmed a statistically significant difference in the incidence of clinical allergy among the two groups treated with different ASP formulations. This is in concordance with the findings in larger series of patients that compare their results with PEG-ASP upfront with historical controls treated with native *E. coli*-ASP.<sup>16,30,31</sup>

In summary, in our treatment protocol, PEG-ASP at a dose of 1000 IU/m<sup>2</sup> was effective in achieving enough ASP activity in more than 90% of the patients. Our results show that PEG-ASP used upfront in an extended asparaginase treatment protocol is associated with a lower incidence of clinical allergy than the observed in a sequential use of native *E. coli*-ASP followed by PEG-ASP.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to patients and families. We are grateful to Obra Social from Hospital Sant Joan de Déu and "Força Miquel" projects for their support. We most sincerely thank all the nurses, physicians, advanced practice providers, and technicians who provided their care. We also wish to acknowledge "Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació", integrated into the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement.

**CONFLICT OF INTEREST**

Montserrat Mesegué reports speaker fees and travel and accommodation support from Shire/Servier. Anna Alonso-Saladrigues reports no conflict of interest. Sara Pérez-Jaume reports no conflict of interest. Albert Català reports travel and accommodation support from Jazz Pharma. José Luís Dapena reports advisory board honorarium, speaker fees, and travel and accommodation support from Jazz Pharma and Shire/Servier. Anna Faura reports no conflict of interest. Nuria Conde reports speaker fees from Shire/Servier. Ariadna Comes-Escoda reports no conflict of interest. Anna Ruiz-Llobet reports no conflict of interest. Edgar Zapico-Muñoz reports speaker fees from Shire/Servier. Mireia Camós reports speaker fees from Shire/Servier. Susana Rives reports advisory board honorarium, speaker fees, and travel and accommodation support from Jazz Pharma and Shire/Servier.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

All authors have performed the research and contributed significantly to the paper.

**DATA AVAILABILITY STATEMENT**

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

**ORCID**

Montserrat Mesegué  <https://orcid.org/0000-0002-8808-7918>

**TRANSPARENT PEER REVIEW**

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/hon.2914>.

**REFERENCES**

- Pession A, Valsecchi MG, Masera G, et al. Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):7161-7167.
- Amylon MD, Shuster J, Pullen J, et al. Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*. 1999;13(3):335-342.
- Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*. 2001;97(5):1211-1218.
- Hijjiya N, Van Der Sluis IM. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(4):748-757.
- Burke MJ, Rheingold SR. Differentiating hypersensitivity versus infusion-related reactions in pediatric patients receiving intravenous asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(3):540-551.
- Ribera JM, Morgades M, Montesinos P, et al. Efficacy and safety of native versus pegylated *Escherichia coli* asparaginase for treatment of adults with high-risk, Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(7):1634-1643.
- Pieters R, Hunger SP, Rizzari C, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. *Cancer*. 2011;117(2):238-249.
- Ko RH, Jones TL, Radvinsky D, et al. Allergic reactions and anti-asparaginase antibodies in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group report. *Cancer*. 2015;121(23):4205-4211.
- Salzer W, Bostrom B, Messinger Y, Perissinotti AJ, Marini B. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(8):1797-1806.
- Schmiegelow K, Müller K, Mogensen SS, et al. Non-infectious chemotherapy-associated acute toxicities during childhood acute lymphoblastic leukemia therapy. *F1000Res*. 2017;6(0):1-14.
- Tram Henriksen L, Gottschalk Højfeldt S, Schmiegelow K, et al. Prolonged first-line PEG-asparaginase treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL2008 protocol—pharmacokinetics and antibody formation. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(12):1-8.
- Dholaria HG, Davies A, Kotecha RS, Gottardo NG, Walwyn T. Comment on: comparison of hypersensitivity rates to intravenous and intramuscular PEG-asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis and systematic review. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(8):3-4.
- Hasan H, Shaikh OM, Rassekh SR, Howard AF, Goddard K. Comparison of hypersensitivity rates to intravenous and intramuscular PEG-asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis and systematic review. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(1):81-88.
- Vrooman LM, Stevenson KE, Supko JG, et al. Postinduction dexamethasone and individualized dosing of *Escherichia coli* L-asparaginase each improve outcome of children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia: results from a randomized study—Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 00-01. *J Clin Oncol*. 2013;31(9):1202-1210.
- Kloos RQH, Pieters R, Escherich G, van der Sluis IM. Allergic-like reactions to asparaginase: atypical allergies without asparaginase inactivation. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(11):1928-1934.
- Place AE, Stevenson KE, Vrooman LM, et al. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1677-1690.
- Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood*. 2002;99(6):1986-1994.
- Lanvers-Kaminsky C, Ruffer A, Würthwein G, et al. Therapeutic drug monitoring of asparaginase activity – method comparison of MAAT and AHA test used in the international AIEOP-BFM ALL 2009 trial. *Ther Drug Monit*. 2018;40(1):93-102.
- Wolthers BO, Frandsen TL, Baruchel A, et al. Asparaginase-associated pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: an observational Ponte di Legno Toxicity Working Group study. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1238-1248.
- Schmiegelow K, Attarbaschi A, Barzilai S, et al. Consensus definitions of 14 severe acute toxic effects for childhood lymphoblastic leukaemia treatment: a Delphi consensus. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):e231-e239.
- van der Sluis IM, Vrooman LM, Pieters R, et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica*. 2016;101(3):279-285.
- Tong WH, Pieters R, Kaspers GJL, et al. A prospective study on drug monitoring of PEG-asparaginase and *Erwinia* asparaginase and

- asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(13):2026-2033.
23. R Core Team R: *A Language and Environment for Statistical Computing*. 2019.
  24. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;(53):457-481.
  25. Greenwood M. The natural duration of cancer. *Rep Public Heal Med Subj*. 1926:1-26.
  26. Verbeke G, Molenberghs G. *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*. Springer-Verlag; 2000.
  27. Skaltsa K, Jover L, Carrasco JL. Estimation of the diagnostic threshold accounting for decision costs and sampling uncertainty. *Biometr J*. 2010;52(5):676-697.
  28. Perez-Jaume S, Pallarès N, Skaltsa K, Carrasco JL. ThresholdROC: optimum threshold estimation tools for continuous diagnostic tests in R. *J Stat Softw*. 2017;82(4).
  29. Efron B, Tibshirani R. *An Introduction to the Bootstrap*. 1st ed. Chapman & Hall; CRC Monographs on Statistics and Applied Probability; 1994.
  30. Kloos RQH, Uyl-de Groot CA, van Litsenburg RRL, Kaspers GJL, Pieters R, van der Sluis IM. A cost analysis of individualized asparaginase treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(12).
  31. Rizzari C, Moericke A, Conter V, et al. Incidence of hypersensitivity reactions (HSR) reactions (HSR) to peg-asparaginase (PEG-ASP) in 6136 patients treated in the AIEOP-BFM ALL 2009 study protocol. *Blood*. 2019;134(Suppl 1):2589-2589.
  32. Merlen C, Bonnefoy A, Afeich C, et al. Antithrombin and fibrinogen levels as predictors for plasma L-asparaginase activity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;66(7):1-7.
  33. Tong WH, Pieters R, de Groot-Kruseman HA, et al. The toxicity of very prolonged courses of PEGasparaginase or Erwinia asparaginase in relation to asparaginase activity, with a special focus on dyslipidemia. *Haematologica*. 2014;99(11):1716-1721.
  34. Treepongkaruna S, Thongpak N, Pakakasama S, Pienvichit P, Sirachainan N, Hongeng S. Acute pancreatitis in children with acute lymphoblastic leukemia after chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009;31(11):812-815.
  35. Rank CU, Wolthers BO, Grell K, et al. Asparaginase-associated pancreatitis in acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL2008 treatment of patients 1-45 years of age. *J Clin Oncol*. 2020;38(2):145-154.
  36. Würthwein G, Lanvers-Kaminsky C, Gerss J, et al. Therapeutic drug monitoring of asparaginase: intra-individual variability and predictivity in children with acute lymphoblastic leukemia treated with PEG-asparaginase in the AIEOP-BFM acute lymphoblastic leukemia 2009 study. *Ther Drug Monit*. 42(3):435-444.
  37. Rizzari C, Citterio M, Zucchetti M, et al. A pharmacological study on pegylated asparaginase used in front-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2006;91:24-31.
  38. Rizzari C, Lanvers-Kaminsky C, Valsecchi MG, et al. Asparagine levels in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia treated with pegylated-asparaginase in the induction phase of the AIEOP-BFM ALL 2009 study. *Haematologica*. 2019;104(9):1812-1821.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Mesegué M, Alonso-Saladrigues A, Pérez-Jaume S, et al. Lower incidence of clinical allergy with PEG-asparaginase upfront versus the sequential use of native *E. coli* asparaginase followed by PEG-ASP in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Hematological Oncology*. 2021;1-10. <https://doi.org/10.1002/hon.2914>

**SUPPORTING INFORMATION**

**Supporting table S1.** Criteria for risk group classification in protocol ALL-SEHOP-PETHEMA 2013.

**Supporting table S2.** Treatment protocol for standard-risk patients in ALL-SEHOP-PETHEMA 2013.

**Supporting table S3.** Treatment protocol for intermediate-risk patients in ALL-SEHOP-PETHEMA 2013.

**Supporting table S4.** Treatment protocol for high-risk patients in ALL-SEHOP-PETHEMA 2013.

**Supporting figure S1. (A)** Association between serum asparaginase activity (SAA) and ammonium. **(B)** Association between serum asparaginase activity (SAA) and albumin. **(C)** Association between serum asparaginase activity (SAA) and triglycerides.

**Supporting figure S2.** Serum asparaginase activity and ammonium.

**Supporting figure S3.** Serum asparaginase activity and triglycerides.

**Supporting figure S4.** Serum asparaginase activity and albumin.



**Supporting table S1.** Criteria for risk group classification in protocol ALL-SEHOP-PETHEMA 2013.

**STANDARD RISK:** The patient must meet each and every one of the following criteria:

- Age  $\geq 1$  and  $< 10$  years.
- Leukocytes  $< 20 \times 10^9/l$  at diagnosis.
- Non-T immunophenotype.
- Absence of CNS or testicular infiltration
- Good risk cytogenetics
  - o High hyperdiploidy (51-67 chromosomes), DNA index 1.10-1.44 (always confirmed by other cytogenetic techniques). or
  - o t(12;21) / ETV6-RUNX1 rearrangement
- Absence of t(1;19) /TCF3/PBX1 rearrangement.
- No MLL rearrangement.
- Good prednisone response ( $< 1,000$  blasts/mm<sup>3</sup> in peripheral blood on day +8 of Induction IA)
- Good early response ( $< 5\%$  de blasts and  $< 0.1\%$  MRD in bone marrow on day +15 of Induction and at the end of induction IA)

**HIGH RISK:** The existence of any of the following criteria determines the inclusion of the patient in this High-risk group:

- t(4;11) (MLL/AF4).
- Hypodiploidy  $< 44$  chromosomes or DNA index  $< 0.81$  (confirmation by other techniques is required).
- Poor prednisone response ( $> 1,000$  blasts in peripheral blood on day +8 of Induction,)
- M2 ( $> 25\%$  blasts) and  $> 10\%$  MRD on day +15 of Induction, in bone marrow.
- MRD  $> 1\%$  on day +33 of Induction, in bone marrow.
- MRD  $> 0.1\%$  before consolidation, in bone marrow.
- Patients with BCR-ABL1 rearrangement (Ph+ ALL).

**INTERMEDIATE RISK:** Those patients who do not meet the criteria for Standard Risk or High Risk.

**Supporting table S2.** Treatment protocol for standard-risk patients in ALL-SEHOP-PETHEMA 2013.

Treatment phase/drug	Single or daily dose	Days of application per phase <sup>a</sup>
<b><u>Induction</u></b>		
<b><i>IA</i></b>		
Prednisone/Prednisolone (PO/IV)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	1-28 <sup>c</sup>
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	8, 15, 22, 29
Daunorubicin (PI over 1 h)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	8, 15
L-Asparaginase (IM)	10 000 IU/m <sup>2</sup> /dose	12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1,12, 19, 26, 33 <sup>d,e</sup>
<b><i>IB</i></b>		
Cyclophosphamide (PI over 1 h)	1000 mg/m <sup>2</sup> /dose	36, 64
Cytarabine (PI over 1 h)	75 mg/m <sup>2</sup> /dose	38-41, 45-48, 52-55, 59-62
6-Mercaptopurine (PO)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	36-63
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	45, 59
<b><u>Consolidation</u></b>		
Methotrexate (PI over 24 h) <sup>f</sup>	5000 mg/m <sup>2</sup> /dose	8, 22, 36, 50
6-Mercaptopurine (PO)	25 mg/m <sup>2</sup> /d	1-56
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	8, 22, 36, 50
<b><u>Reinduction</u></b>		
Dexamethasone (PO/IV)	10 mg/m <sup>2</sup> /d	1-21 <sup>c</sup>
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	8, 15, 22, 29
Doxorubicin (PI over 1 h)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	8, 15, 22, 29
L-Asparaginase (IM)	10 000 IU/m <sup>2</sup> /dose	8, 11, 15, 18
Cyclophosphamide (PI over 1 h)	1000 mg/m <sup>2</sup> /dose	36
Cytarabine (IV)	75 mg/m <sup>2</sup> /dose	38-41, 45-48
6-Thioguanine (PO)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	36-49
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT) <sup>g</sup>	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1, 17, 38, 45
<b><u>Maintenance</u><sup>h</sup></b>		
Methotrexate (PO)	20 mg/m <sup>2</sup> /dose <sup>i</sup>	once a week
6-Mercaptopurine (PO)	50 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>i</sup>	daily
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	4x 12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	monthly

<sup>a</sup>Adjustments of schedule were allowed if clinical condition and bone marrow recovery were inadequate.

<sup>b</sup>Doses of IT drugs were adjusted for children <3 years of age.

<sup>c</sup>Steroids were tapered over 9 additional days.

<sup>\*\*\*</sup>Differences of induction treatment given after amendment on November 2016:

- Asparaginase given in induction is PEG-asparaginase IM at dose 1000 IU/m<sup>2</sup> on days 12 and 26.

<sup>d</sup>IT therapy on days 19 and 26 was only administered to patients with CNS-2 at diagnosis or T-ALL and > 100 000 leukocytes/mm<sup>3</sup> at diagnosis.

<sup>e</sup>Patients with CNS status CNS 3 received 5 weekly doses of IT therapy on days 1, 8, 15, 22, and 29 in Induction Protocol A.

<sup>f</sup>A loading dose of 10% was infused over 30 min, the remaining 90% over 23.5 h. Leucovorin rescue was given at hours 42, 48, and 54 (each 15 mg/m<sup>2</sup>). Doses of leucovorin rescue were adjusted, if MTX levels were > 1.0 µmol/l at hour 42 or later. If the MTX level at hour 54 was > 0.25 µmol/l, the rescue was continued at six-hour intervals until MTX levels were ≤ 0.25 µmol/l.

<sup>\*\*\*</sup>Differences of reinduction treatment given after amendment on November 2016:

- Asparaginase given in reinduction is PEG-asparaginase IM at dose 1000 IU/m<sup>2</sup> on day 1.
- Dexamethasone given from day 1 to 14.

<sup>g</sup>IT therapy on days 1 and 17 in reinduction was only administered to patients with CNS-2 or CNS-3 at diagnosis or T-ALL with > 100 000 leukocytes/mm<sup>3</sup> at diagnosis.

<sup>h</sup>Doses were adjusted to WBC (target range 2.0-3.0 x10<sup>9</sup>/L).

<sup>i</sup>Maintenance was given from the end of intensive chemotherapy until 104 weeks after diagnosis.

PO indicates orally; IV, intravenous push; PI, intravenous infusion; IT, intrathecal; IM intramuscular

**Supporting table S3.** Treatment protocol for intermediate-risk patients in ALL-SEHOP-PETHEMA 2013.

Treatment phase/drug	Single or daily dose	Days of application per phase <sup>a</sup>
<b><u>Induction</u></b>		
<b><i>IA</i></b>		
Prednisone/Prednisolone (PO/IV)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	1-28 <sup>c</sup>
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	8, 15, 22, 29
Daunorubicin (PI over 1 h)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	8, 15, 22, 29
L-Asparaginase (IM)	10 000 IU/m <sup>2</sup> /dose	12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1,12, 19, 26, 33 <sup>d,e</sup>
<b><i>IB</i></b>		
Cyclophosphamide (PI over 1 h)	1000 mg/m <sup>2</sup> /dose	36, 64
Cytarabine (PI over 1 h)	75 mg/m <sup>2</sup> /dose	38-41, 45-48, 52-55, 59-62
6-Mercaptopurine (PO)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	36-63
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	45, 59
<b><u>Consolidation</u></b>		
Methotrexate (PI over 24 h) <sup>f</sup>	5000 mg/m <sup>2</sup> /dose	8, 22, 36, 50
6-Mercaptopurine (PO)	25 mg/m <sup>2</sup> /d	1-56
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	8, 22, 36, 50
<b><u>Reinduction</u></b>		
Dexamethasone (PO/IV)	10 mg/m <sup>2</sup> /d	1-21 <sup>c</sup>
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	8, 15, 22, 29
Doxorubicin (PI over 1 h)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	8, 15, 22, 29
L-Asparaginase (IM)	10 000 IU/m <sup>2</sup> /dose	8, 11, 15, 18
Cyclophosphamide (PI over 1 h)	1000 mg/m <sup>2</sup> /dose	36
Cytarabine (IV)	75 mg/m <sup>2</sup> /dose	38-41, 45-48
6-Thioguanine (PO)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	36-49
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT) <sup>g</sup>	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1, 17, 38, 45
<b><u>Maintenance</u><sup>h</sup></b>		
Methotrexate (PO)	20 mg/m <sup>2</sup> /dose <sup>i</sup>	once a week
6-Mercaptopurine (PO)	50 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>i</sup>	daily
PEG-asparaginase (IM)	1000 IU/m <sup>2</sup>	biweekly
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	6x 12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	monthly



<sup>a</sup>Adjustments of schedule were allowed if clinical condition and bone marrow recovery were inadequate.

<sup>b</sup>Doses of IT drugs were adjusted for children <3 years of age.

<sup>c</sup>Steroids were tapered over 9 additional days.

<sup>\*\*\*</sup>Differences of induction treatment given after amendment on November 2016:

- Asparaginase given in induction is PEG-asparaginase IM at dose 1000 IU/m<sup>2</sup> on days 12 and 26.

<sup>d</sup>IT therapy on days 19 and 26 was only administered to patients with CNS-2 at diagnosis or T-ALL and > 100 000 leukocytes/mm<sup>3</sup> at diagnosis.

<sup>e</sup>Patients with CNS status CNS 3 received 5 weekly doses of IT therapy on days 1, 8, 15, 22, and 29 in Induction Protocol A.

<sup>f</sup>A loading dose of 10% was infused over 30 min, the remaining 90% over 23.5 h. Leucovorin rescue was given at hours 42, 48, and 54 (each 15 mg/m<sup>2</sup>). Doses of leucovorin rescue were adjusted, if MTX levels were > 1.0 µmol/l at hour 42 or later. If the MTX level at hour 54 was > 0.25 µmol/l, the rescue was continued at six-hour intervals until MTX levels were ≤ 0.25 µmol/l.

<sup>\*\*\*</sup>Differences of reinduction treatment given after amendment on November 2016:

- Asparaginase given in reinduction is PEG-asparaginase IM at dose 1000 IU/m<sup>2</sup> on day 1.
- Dexamethasone given from day 1 to 14.

<sup>g</sup>IT therapy on days 1 and 17 in reinduction was only administered to patients with CNS-2 or CNS-3 at diagnosis or T-ALL with > 100 000 leukocytes/mm<sup>3</sup> at diagnosis.

<sup>h</sup>Doses were adjusted to WBC (target range 2.0-3.0 x10<sup>9</sup>/L).

<sup>i</sup>Maintenance was given from the end of intensive chemotherapy until 104 weeks after diagnosis.

PO indicates orally; IV, intravenous push; PI, intravenous infusion; IT, intrathecal; IM intramuscular.

**Supporting table S4.** Treatment protocol for high-risk patients in ALL-SEHOP-PETHEMA 2013.

Treatment phase/drug	Single or daily dose	Days of application per phase <sup>a</sup>
<b><u>Induction</u></b>		
<b><i>IA</i></b>		
Prednisone/Prednisolone (PO/IV)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	1-28 <sup>c</sup>
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	8, 15, 22, 29
Daunorubicin (PI over 1 h)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	8, 15, 22, 29
L-Asparaginase (IM)	10 000 IU/m <sup>2</sup> /dose	12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1,12, 19, 26, 33 <sup>d,e</sup>
<b><i>IB</i></b>		
Cyclophosphamide (PI over 1 h) <sup>f</sup>	1000 mg/m <sup>2</sup> /dose	36, 64
Cytarabine (PI over 1 h)	75 mg/m <sup>2</sup> /dose	38-41, 45-48, 52-55, 59-62
6-Mercaptopurine (PO)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	36-63
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	45, 59
<b><u>Consolidation</u></b>		
<b><i>HR1'</i></b>		
Dexamethasone (PO/IV)	20 mg/m <sup>2</sup> /d	1-5
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	1, 6
Cytarabine (IV)	2x 2000 mg/m <sup>2</sup> /dose	5
Methotrexate (PI over 24 h) <sup>g</sup>	5000 mg/m <sup>2</sup> /dose	1
Cyclophosphamide (PI over 1 h)	5x 200 mg/m <sup>2</sup> /dose	2-4
PEG-Asparaginase (IM)	1000 IU/m <sup>2</sup> /dose	7
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1
<b><i>HR2'</i></b>		
Dexamethasone (PO/IV)	20 mg/m <sup>2</sup> /d	1-5
Vindesine (IV)	3.0 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 5 mg)	1, 6
Daunorubicin (IV)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	5
Methotrexate (PI over 24 h) <sup>g</sup>	5000 mg/m <sup>2</sup> /dose	1
Ifosfamide (PI over 1 h)	5x 800 mg/m <sup>2</sup> /dose	2-4
PEG-Asparaginase (IM)	1000 IU/m <sup>2</sup> /dose	7
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1
<b><i>HR3'</i></b>		
Dexamethasone (PO/IV)	20 mg/m <sup>2</sup> /d	1-5
Cytarabine (IV)	4x 2000 mg/m <sup>2</sup> /dose	1-3
Etoposide (IV)	5x 100 mg/m <sup>2</sup> /dose	3-5
PEG-Asparaginase (IM)	1000 IU/m <sup>2</sup> /dose	6
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	5

Treatment phase/drug	Single or daily dose	Days of application per phase <sup>a</sup>
<b><u>Delayed Intensification</u></b>		
<b><i>Reinduction 1</i></b> <sup>h</sup>		
Dexamethasone (PO/IV)	10 mg/m <sup>2</sup> /d	1-15 <sup>c</sup>
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	1, 8
Doxorubicin (PI over 1 h)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	1, 8
PEG-Asparaginase (IM)	1000 IU/m <sup>2</sup> /dose	1,15
Cyclophosphamide (PI over 1 h)	500 mg/m <sup>2</sup> /dose	15
Cytarabine (IV)	75 mg/m <sup>2</sup> /dose	17-20, 24-37
6-Thioguanine (PO)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	15-28
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1 <sup>i</sup> , 17, 24
<b><i>Reinduction 2</i></b>		
Dexamethasone (PO)	10 mg/m <sup>2</sup> /d	1-15 <sup>c</sup>
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	1, 8
Doxorubicin (PI over 1 h)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	1, 8
PEG-Asparaginase (IM)	1000 IU/m <sup>2</sup> /dose	1,15
Cyclophosphamide (PI over 1 h)	500 mg/m <sup>2</sup> /dose	15
Cytarabine (IV)	75 mg/m <sup>2</sup> /dose	17-20, 24-27
6-Thioguanine (PO)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	15-28
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1 <sup>i</sup> , 17, 24
<b><i>Reinduction 3</i></b>		
Dexamethasone (PO)	10 mg/m <sup>2</sup> /d	1-15 <sup>c</sup>
Vincristine (IV)	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dose (max. 2 mg)	1, 8
Doxorubicin (PI over 1 h)	30 mg/m <sup>2</sup> /dose	1, 8
PEG-Asparaginase (IM)	1000 IU/m <sup>2</sup> /dose	1,15
Cyclophosphamide (PI over 1 h)	500 mg/m <sup>2</sup> /dose	15
Cytarabine (IV)	75 mg/m <sup>2</sup> /dose	17-20, 24-27
6-Thioguanine (PO)	60 mg/m <sup>2</sup> /d	15-28
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	1 <sup>i</sup> , 17, 24
<b><i>Interim maintenance</i></b>		
Methotrexate (PO)	20 mg/m <sup>2</sup> /dose <sup>i</sup>	once a week
6-Mercaptopurine (PO)	50 mg/m <sup>2</sup> /dose <sup>i</sup>	daily
<b><u>Maintenance</u></b> <sup>k</sup>		
Methotrexate (PO)	20 mg/m <sup>2</sup> /dose <sup>i</sup>	once a week
6-Mercaptopurine (PO)	50 mg/m <sup>2</sup> /d <sup>i</sup>	daily
Methotrexate/ARA-C/Prednisone (IT)	6x 12/30/20 mg/dose <sup>b</sup>	monthly

## ANNEX

<sup>a</sup>Adjustments of schedule were allowed if clinical condition and bone marrow recovery were inadequate.

<sup>b</sup>Doses of IT drugs were adjusted for children <3 years of age.

<sup>c</sup>Steroids were tapered over 9 additional days.

<sup>\*\*\*</sup>Differences of treatment given after amendment on November 2016:

- Asparaginase given in induction is PEG-asparaginase IM at dose 1000 IU/m<sup>2</sup> on days 12 and 26,
- In induction, patients Ph+ only receive a single dose of 1000 IU/m<sup>2</sup> of PEG-asparaginase on day 12.

<sup>d</sup>IT therapy on days 19 and 26 was not administered to patients with BCP ALL who were included in the HR group only because of a poor prednisone response at day 8.

<sup>e</sup>Patients with CNS status CNS 3 received 5 weekly doses of IT therapy on days 1, 8, 15, 22, and 29 in Induction Protocol A.

<sup>f</sup>T-ALL patients with poor prednisone response at day 8 received one cyclophosphamide at dose 1000 mg/m<sup>2</sup> on day 10 in induction protocol A.

<sup>g</sup>A loading dose of 10% was infused over 30 min, the remaining 90% over 23.5 h. Leucovorin rescue was given at hours 42, 48, and 54 (each 15 mg/m<sup>2</sup>). Doses of leucovorin rescue were adjusted, if MTX levels were > 1.0 µmol/l at hour 42 or later. If the MTX level at hour 54 was > 0.25 µmol/l, the rescue was continued at six-hour intervals until MTX levels were ≤ 0.25 µmol/l.

<sup>h</sup>In T-ALL patients with CNS status CNS 3 and without HSCT indication, delayed intensification reinduction 2 was substituted by an additional HR1' and HR2'.

<sup>i</sup>IT therapy on day 1 in delayed intensification reinduction 1, 2, and 3 was not administered to patients with BCP ALL who were included in the HR group only because of a poor prednisone response at day 8 of induction.

<sup>j</sup>Doses were adjusted to WBC (target range 2.0-3.0 x10<sup>9</sup>/L).

<sup>k</sup>Maintenance was given from the end of intensive chemotherapy until 104 weeks after diagnosis.

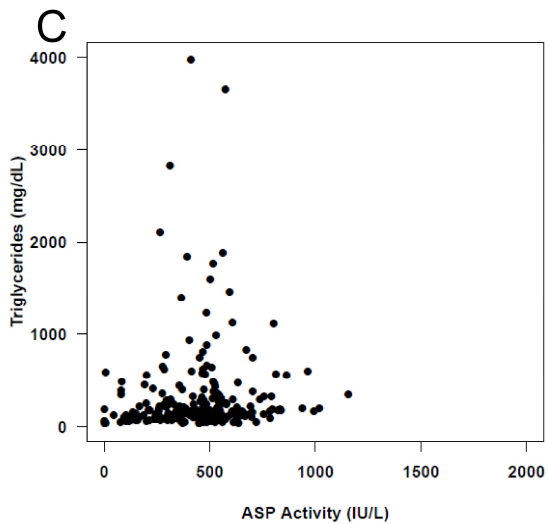
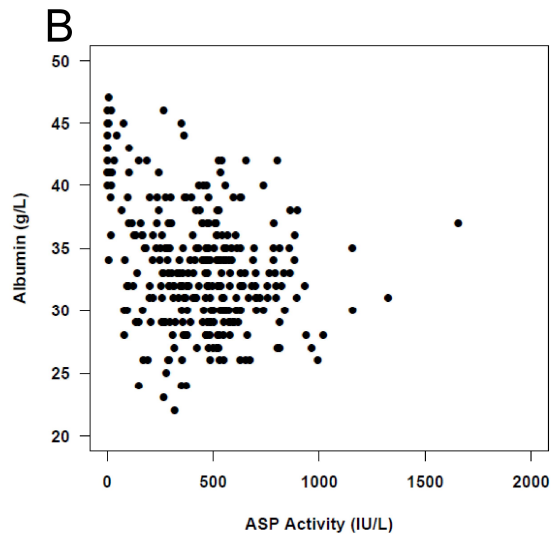
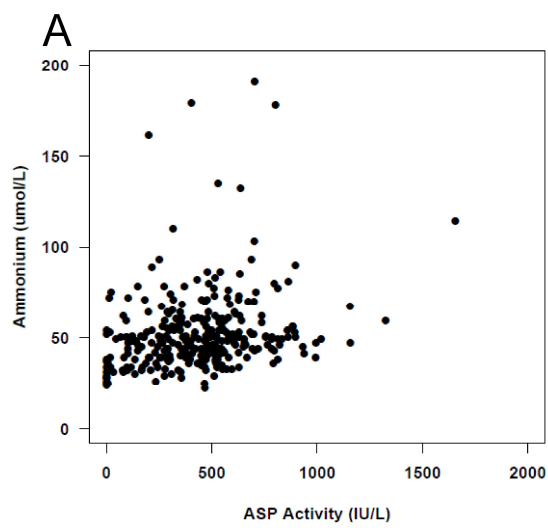
PO indicates orally; IV, intravenous push; PI, intravenous infusion; IT, intrathecal; IM intramuscular.

**Supporting figure S1.**

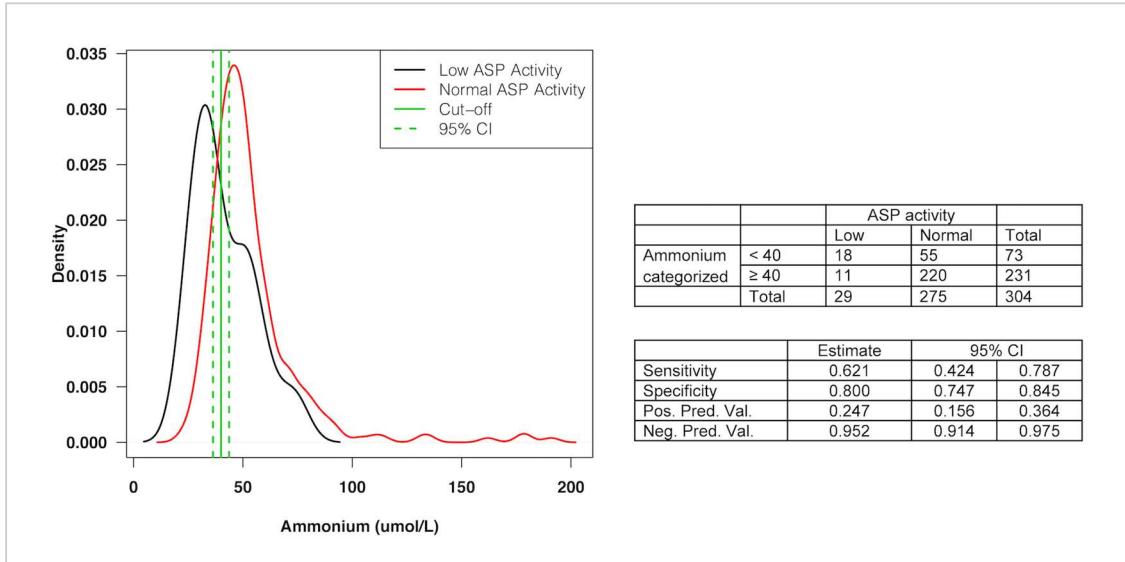
**A.** Association between serum asparaginase activity (SAA) and ammonium. If SAA increases 100 IU/L, ammonium increases 2.1 units (CI 95% 1.2-3.1) ( $p < 0.0001$ ).

**B.** Association between serum asparaginase activity (SAA) and albumin. If SAA increases 100 IU/L, albumin decreases 0.53 units (CI 95% 0.33-0.73) ( $p < 0.0001$ ).

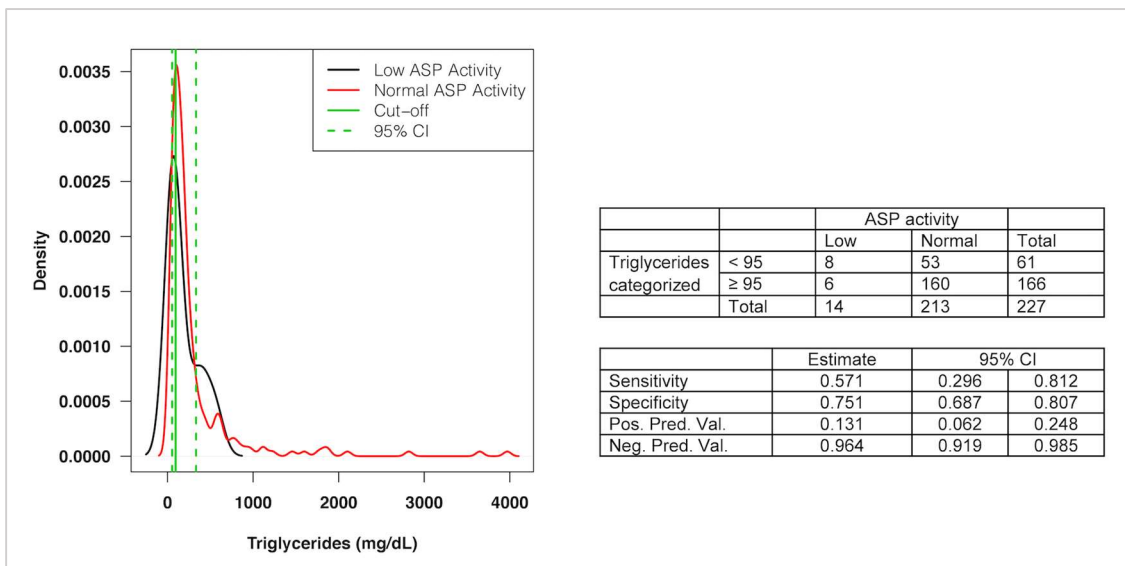
**C.** Association between serum asparaginase activity (SAA) and triglycerides. If SAA increases 100 IU/L, triglycerides increase 32.2 units (CI 95% 6.4-58.1) ( $p = 0.015$ ).



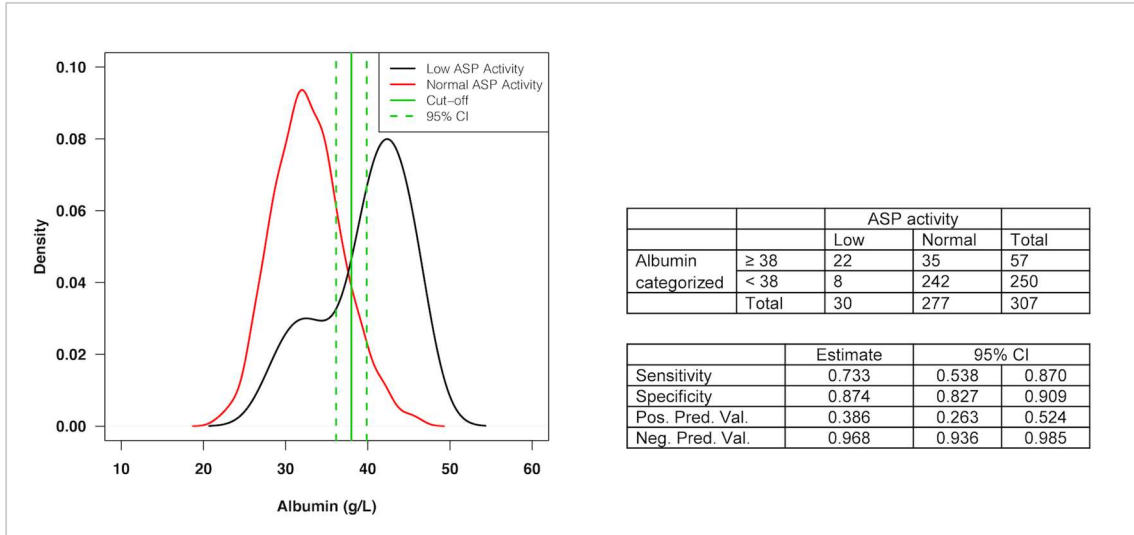
**Supporting figure S2.** Serum asparaginase activity and ammonium. The ammonium cut-off point that better differentiate both groups, normal asparaginase activity ( $\geq 100$  IU/L) and low asparaginase activity ( $< 100$  IU/L) is 40.0 (CI 95%: 36.3 – 43.7). Contingency table of categorized ammonium vs. asparaginase activity. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value for categorized ammonium as a diagnostic test of low or normal asparaginase activity.



**Supporting figure S3.** Serum asparaginase activity and triglycerides. The triglycerides cut-off point that better differentiate both groups, normal asparaginase activity ( $\geq 100$  IU/L) and low asparaginase activity ( $< 100$  IU/L) is 95.0 (CI 95%: 54 – 334). Contingency table of categorized triglycerides vs. asparaginase activity. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value for categorized triglycerides as a diagnostic test of low or normal asparaginase activity.



**Supporting figure S4.** Serum asparaginase activity and albumin. The albumin cut-off point that better differentiate both groups, normal asparaginase activity ( $\geq 100$  IU/L) and low asparaginase activity ( $< 100$  IU/L) is 38.0 (CI 95%: 36.1 – 39.9). Contingency table of categorized albumin vs. asparaginase activity. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value for categorized albumin as a diagnostic test of low or normal asparaginase activity.



**Native *E.coli* asparaginase upfront should be replaced by PEG-asparaginase upfront in the treatment of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia**

---

Wing H Tong, Montserrat Mesegué, José Luís Dapena, Mireia Camós, Susana Rives



## Native *E. coli* asparaginase upfront should be replaced by PEGasparaginase upfront in the treatment of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia

To the editor,

Pegylated *Escherichia coli* asparaginase (PEGasparaginase) is used more frequently upfront in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL).<sup>1-5</sup> Comparison studies between native *Escherichia coli* (*E. coli*) asparaginase upfront versus PEGasparaginase upfront have been conducted.<sup>6-8</sup> For instance, the recent study of the St. Jude Children's Research Hospital is of interest.<sup>9</sup> Liu *et al.* found that PEG, and not L-ASP, is the major antigen that causes allergic reactions.<sup>9</sup> This is an important conclusion as Mesegué *et al.* conducted a meaningful clinical study, and they concluded that PEGasparaginase used upfront was associated with a lower incidence of a clinical allergy to PEGasparaginase.<sup>10</sup> This is consistent with the recent results of Kloos *et al.*<sup>4</sup>

Mesegué *et al.* analyzed one hundred and twenty-six children (not including infants) who were diagnosed with ALL from 2013 to 2020.<sup>10</sup> This study is quite interesting and also a novel one as two different treatment regimens were compared within the same ALL protocol. A new kind of study approach and also a rare one as native *E. coli* asparaginase is not used any more upfront in most European countries and in the US.

To better understand this study, we should go a little back in time. The normal (and usual) PEGasparaginase dosage is 2500 IU/m<sup>2</sup>.<sup>6</sup> The frequently cited study from the Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) 91-01 showed that patients who tolerated 25 or fewer weeks of asparaginase had a significantly worse outcome than those who received at least 26 weeks of asparaginase.<sup>6</sup> Dutch researchers conducted in 2014 a prospective study with the same dosage regimen in the intensification phase of children treated for ALL.<sup>11</sup> Tong *et al.* concluded that patients who did not show a clinical allergy to or silent inactivation of PEGasparaginase, the serum levels were too high using a schedule of 2500 IU/m<sup>2</sup> every other week.<sup>11</sup> Based on this finding, the administered PEGasparaginase dose can be lowered to 1500 IU/m<sup>2</sup> which was studied recently.<sup>4</sup> In the study of Mesegué *et al.*, the levels of asparaginase activity were also high using 1000 IU/m<sup>2</sup> intramuscular (IM).

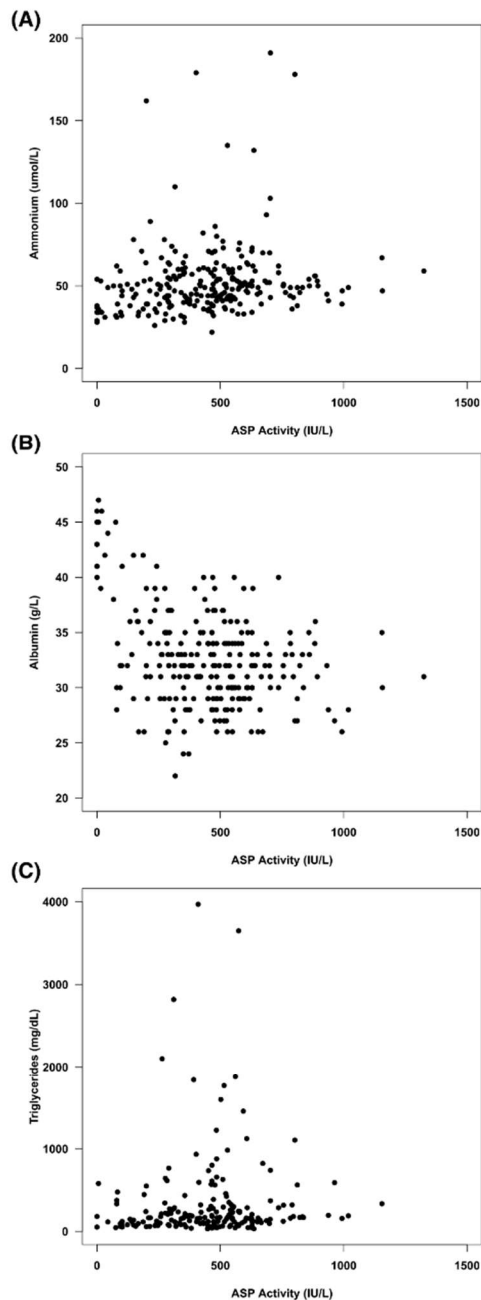
Remarkably, the peak levels of asparaginase activity in the study of Mesegué *et al.* were in the same range as the trough levels when using 1000 IU/m<sup>2</sup> PEGasparaginase IM.<sup>10</sup> Tong *et al.* found higher peak levels of asparaginase activity as compared to the trough levels.<sup>11</sup> It should be noted that the Dutch researchers used an

intravenous (IV) route of administration. So, the modus of administration seems to influence the asparaginase kinetics, suggesting that IM administration leads to stable asparaginase activity levels. Unfortunately, no in-depth pharmacokinetic (PK) research was conducted in the study of Mesegué *et al.*, so a pharmacological explanation for the stable activity levels administered intramuscularly remains unanswered.

A lower asparaginase dosage could lead to less toxicity,<sup>12</sup> this was already suggested by Tong *et al.* when using PEGasparaginase IV.<sup>13</sup> Mesegué *et al.*<sup>10</sup> performed linear mixed models, this is in general in line with the analysis of Tong *et al.*<sup>13</sup> In the original publication of Mesegué *et al.*, the toxicity data were published and associated with peak levels (7 days after each PEGasparaginase dose) and its trough levels. The following Figure (1A,B, and C) were created in R: A language and environment for statistical computing, version 4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, [www.R-project.org](http://www.R-project.org)) using the packages: *ggplot2* and *dplyr*. The R lme (linear mixed effects models) function of the nlme (nonlinear mixed effects models) package was used to perform statistical analysis on these data, <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>, R package version 3.1-152.

Ammonia (Figure 1A) and triglyceride levels (Figure 1B) were associated with the asparaginase activity levels, however for triglyceride this association was not significant ( $p = 0.084$ ) and significantly different for ammonia ( $p = 0.013$ ).<sup>14</sup> Also, we found a negative association between albumin (Figure 1C) and asparaginase activity levels ( $p < 0.0001$ ), which is in line with a recent report.<sup>15</sup> This could be explained by the fact that asparaginase can alter synthesis of proteins, leading to severe acquired deficiencies.<sup>16</sup> Kloos *et al.* found previously that using therapeutic drug monitoring (TDM) and its effect of the reduced asparaginase activity levels on the toxicity was limited.<sup>4</sup>

To conclude, Mesegué *et al.*<sup>10</sup> found similar results as Tong *et al.*<sup>11,13</sup> The added value of this study is that it shows that there is rationale to switch from native *E. coli* asparaginase to its pegylated form, also in the low-income countries. PEGasparaginase can be administered IV. When using IM, which is the normal usual way of asparaginase administration in Spain, this is associated with more anxiety in the patients.<sup>8</sup> In line with the previous reports using PEGasparaginase upfront in children with newly diagnosed ALL is also supported by the data of Mesegué *et al.*<sup>10</sup>



**FIGURE 1** (A) The ammonia levels in children with or without inactivation of pegylated *Escherichia coli* asparaginase (PEGasparaginase) are shown. Please note that on the X-axis the trough PEGasparaginase activity levels are included. R: A language and environment for statistical computing, version 4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)). We used the next packages: *ggplot2* and *dplyr* to create

all part figures (A, B, and C). The R lme (linear mixed effects models) function of the nlme (nonlinear mixed effects models) package was used to perform statistical analysis on these data, <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>, R package version 3.1-152. Linear mixed models were used to assess the association between asparaginase activity levels and ammonia levels to account for the correlation between the measurements from the same subjects. A two-sided  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant. The level of asparaginase activity of 100 U/L or greater is associated with complete asparagine depletion (lower level of quantification of 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ). The summary output is: for every 100 units of asparaginase activity level increase, ammonia increases 1.5 units ( $p = 0.013$ ). The percentage of variation absorbed by the correlation between the subjects can be quantified with the intraclass correlation coefficient (ICC) of this model. This ICC for the model including ammonia is 0.02 (calculated out of 1). (B) The albumin levels in children with or without inactivation of PEGasparaginase are shown. Linear mixed models were used to assess the association between asparaginase activity levels and albumin levels to account for the correlation between the measurements from the same subjects. The summary output is: for every 100 units of asparaginase activity level increase, albumin increases 0.67 units ( $p < 0.0001$ ). This ICC for the model including albumin is 0.21 (calculated out of 1). (C) The triglyceride levels in children with or without inactivation of PEGasparaginase are shown. Linear mixed models were used to assess the association between asparaginase activity levels and triglyceride levels to account for the correlation between the measurements from the same subjects. The summary output is: for every 100 units of asparaginase activity level increase, triglyceride increases 26.9 units ( $p = 0.084$ ). This ICC for the model including triglyceride is 0.60 (calculated out of 1)

#### KEYWORDS

albumin, allergy, ammonia, asparaginase activity levels, *Erwinia* asparaginase, pediatric acute lymphoblastic leukemia, PEGasparaginase, pharmacokinetics, triglyceride

#### CONFLICT OF INTEREST

Montserrat Mesegué reports speaker fees and travel and accommodation support from Shire/Servier. José Luis Dapena reports advisory board honorarium, speaker fees, and travel and accommodation support from Jazz Pharma and Shire/Servier. Mireia Camós reports speaker fees from Shire/Servier. Susana Rives reports advisory board honorarium, speaker fees, and travel and accommodation support from Jazz Pharma and Shire/Servier. Wing H. Tong, the corresponding author, reports no conflict of interest.

#### ETHICS STATEMENT

This letter to the editor did not require an ethical board approval because it did not contain human or animal trials.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have performed the research and contributed significantly to the paper. Wing H. Tong drafted this letter to the editor and revised it. All authors approved the submitted and final version.

Wing H. Tong<sup>1,2</sup>   
 Montserrat Mesegué<sup>3,4</sup>  
 José Luis Dapena<sup>3,4</sup>  
 Mireia Camós<sup>4,5,6</sup>  
 Susana Rives<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health and Primary Care (PHEG), Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

<sup>2</sup>Argos Zorggroep "DrieMaasStede", Center for Specialized Geriatric Care, Schiedam, The Netherlands

<sup>3</sup>Pediatric Hematology and Oncology Departments, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Leukemia and Other Pediatric Hemopathies, Developmental Tumor Biology Group, Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>6</sup>Hematology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain

#### Correspondence

Wing H. Tong, Department of Public Health and Primary Care (PHEG), Leiden University Medical Center (LUMC), Building 3, Hippocratespad 21, PO Box 9600, 2300 RC, Leiden, The Netherlands.  
 Email: [w.h.tong@lumc.nl](mailto:w.h.tong@lumc.nl)

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this letter to the editor are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

#### ORCID

Wing H. Tong  <https://orcid.org/0000-0002-5462-6012>

#### PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/hon.2960>.

#### REFERENCES

1. Albertsen BK, Grell K, Abrahamsson J, et al. Intermittent versus continuous PEG-asparaginase to reduce asparaginase-associated toxicities: a NOPHO ALL2008 randomized study. *J Clin Oncol*. 2019;37(19):1638-1646.
2. Jeha S, Pei D, Choi J, et al. Improved CNS control of childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation: St Jude total therapy study 16. *J Clin Oncol*. 2019;37(35):3377-3391.
3. Rizzari C, Lanvers-Kaminsky C, Valsecchi MG, et al. Asparagine levels in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia treated with pegylated-asparaginase in the induction phase of the AIEOP-BFM ALL 2009 study. *Haematologica*. 2019; 104(9):1812-1821.
4. Kloos RQH, Pieters R, Jumelet FMV, de Groot-Kruseman HA, van den Bos C, van der Sluis IM. Individualized asparaginase dosing in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2020;38(7): 715-724.
5. Vrooman LM, Blonquist TM, Stevenson KE, et al. Efficacy and toxicity of pegaspargase and calaspargase pegol in childhood acute lymphoblastic leukemia: results of DFCl 11-001. *J Clin Oncol*. 2021: Jco2003692.
6. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*. 2001;97(5): 1211-1218.
7. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood*. 2002;99(6):1986-1994.
8. Place AE, Stevenson KE, Vrooman LM, et al. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCl 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16(16):1677-1690.
9. Liu Y, Smith CA, Panetta JC, et al. Antibodies predict pegaspargase allergic reactions and failure of rechallenge. *J Clin Oncol*. 2019; 37(23):2051-2061.
10. Mesegué M, Alonso-Saladrigues A, Pérez-Jaume S, et al. Lower incidence of clinical allergy with PEG-asparaginase upfront versus the sequential use of native *E. coli* asparaginase followed by PEG-ASP in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol*. 2021;39(5):687-696. <https://doi.org/10.1002/hon.2914>
11. Tong WH, Pieters R, Kaspers GJ, et al. A prospective study on drug monitoring of PEGasparaginase and Erwinia asparaginase and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(13):2026-2033.
12. Chen CB, Chang HH, Chou SW, et al. Acute pancreatitis in children with acute lymphoblastic leukemia correlates with L-asparaginase dose intensity. *Pediatr Res*. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01796-w>
13. Tong WH, Pieters R, de Groot-Kruseman HA, et al. The toxicity of very prolonged courses of PEGasparaginase or Erwinia asparaginase in relation to asparaginase activity, with a special focus on dyslipidemia. *Haematologica*. 2014;99(11):1716-1721.
14. Tong WH, Pieters R, van der Sluis IM. Ammonia levels should not be used as a surrogate marker of levels of asparaginase activity in acute lymphoblastic leukemia patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(3): 564-565.
15. Merlen C, Bonnefoy A, Afeich C, et al. Antithrombin and fibrinogen levels as predictors for plasma L-asparaginase activity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;66(7): e27729.
16. Miller HK, Salser JS, Balis ME. Amino acid levels following L-asparagine amidohydrolase (EC.3.5.1.1) therapy. *Cancer Res* 1969; 29(1):183-187.