

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina DIMED

Direttore: Prof. Roberto Vettor

UOC di Ematologia e Immunologia Clinica

Direttore: Prof. Livio Trentin

TESI DI LAUREA

IL RUOLO DELLA MALATTIA RESIDUA MISURABILE NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: VALUTAZIONE CITOFUORIMETRICA DEI PAZIENTI AFFERENTI ALL'EMATOLOGIA DI PADOVA

Relatore: Dr. Andrea Visentin

Correlatore: Dr.ssa Valentina Trimarco

Laureando: Daniele Scaramuzzi

Anno Accademico 2022/2023

*Alla voce di mio padre e
all'odore di mia madre*

INDICE

GLOSSARIO	1
RIASSUNTO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUZIONE	11
1.1 DEFINIZIONE	11
1.2 EPIDEMIOLOGIA	11
1.3 ISTOPATOLOGIA	11
1.3.1 SANGUE PERIFERICO	11
1.3.2 MIDOLLO OSSEO	12
1.3.3 LINFONODI	13
1.4 EZIOLOGIA	13
1.5 PATOGENESI	14
1.5.1 CELLULA DI ORIGINE E LEUCEMOGENESI	14
1.5.2 IL SEGNALE DEL B CELL RECEPTOR (BCR)	16
1.5.3 GENETICA	18
1.5.4 INIBIZIONE DEI PATHWAY PRO-APOPTOTICI	19
1.5.5 MICROAMBIENTE TUMORALE	20
1.6 MANIFESTAZIONI CLINICHE	22
1.6.1 PRESENTAZIONE CLINICA	22
1.6.2 DISFUNZIONI IMMUNITARIE DELLA LLC	22
1.6.3 INFEZIONI	23
1.6.4 MANIFESTAZIONI AUTOIMMUNI	24
1.6.5 PROGRESSIONE PROLINFOCITICA	24

1.6.6 TRASFORMAZIONE DI RICHTER	24
1.7 DIAGNOSI E FATTORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI	25
1.7.1 DIAGNOSI	25
1.7.2 ANALISI AGGIUNTIVE	26
1.8 STADIAZIONE	28
1.9 TRATTAMENTO	30
1.9.1 INDICAZIONI AL TRATTAMENTO	30
1.9.2 PANORAMICA SULLE OPZIONI TERAPEUTICHE PER LA LLC	31
1.9.3 INIBITORI DI BTK	34
1.9.4 INIBITORI DELLA FOSFATIDILINOSITOLE-3-CHINASI (PI3K)	37
1.9.5 INIBITORI DI BCL-2	38
1.9.6 INQUADRAMENTO DEL PAZIENTE DA TRATTARE	39
1.9.7 TERAPIE DI PRIMA LINEA	40
1.9.8 TERAPIE DI SECONDA LINEA E LINEE SUCCESSIVE	41
1.9.9 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO	41
1.10 MALATTIA RESIDUA MISURABILE/MINIMA (MRD)	44
1.10.1 DEFINIZIONE	44
1.10.2 NOMENCLATURA	45
1.10.3 METODICHE DI QUANTIFICAZIONE DELLA MRD E TESSUTI	45
1.10.4 SIGNIFICATO DELLA MRD	48
1.10.5 TRATTAMENTO MRD-GUIDATO	51
1.10.6 MRD COME ENDPOINT DI STUDI CLINICI	52
1.10.7 LIMITAZIONI DELLA MRD	53
2 SCOPO DELLO STUDIO	55

3 MATERIALI E METODI	57
3.1 RACCOLTA DATI	57
3.2 ANALISI DELLO STATO MUTAZIONALE DI IGHV	57
3.3 CITOGENETICA CLASSICA	58
3.4 CITOGENETICA FISH (FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION)	58
3.5 ANALISI DELLO STATO MUTAZIONALE DI TP53	59
3.6 PROTOCOLLI DI TRATTAMENTO	59
3.6.1 FCR	59
3.6.2 BR	60
3.6.3 OBINUTUZUMAB + CLORAMBUCILE (G-CHL)	60
3.6.4 IBRUTINIB	60
3.6.5 IBRUTINIB + RITUXIMAB (I-R)	60
3.6.6 VENETOCLAX	61
3.6.7 R-VENETOCLAX	61
3.6.8 G-VENETOCLAX	61
3.6.9 IBRUTINIB + VENETOCLAX	62
3.6.10 R-IDELALISIB	62
3.7 VALUTAZIONE DELLA MALATTIA RESIDUA MISURABILE	62
3.7.1 PROCEDIMENTO	63
3.8 ANALISI STATISTICA	68
3.9.1 OUTCOME CLINICI	68
4 RISULTATI	69
4.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI	69
4.2 TASSI MRD e VARIABILI CHE INFLUENZANO LO STATUS MRD	72

4.3 CORRELAZIONE TRA MIGLIOR RISPOSTA iwCLL E MRD	73
4.4 PROFONDITÀ DELLA RISPOSTA	75
4.5 CONCORDANZA FRA RISULTATI OTTENUTI SU SANGUE MIDOLLARE E SANGUE PERIFERICO	76
4.6 SOPRAVVIVENZA	77
5 DISCUSSIONE	83
BIBLIOGRAFIA	91

GLOSSARIO

ADCC: Antibody-dependent cellular cytotoxicity/Citotossicità cellulare anticorpo-dipendente

AIHA: Autoimmune Hemolytic Anemia/Anemia Emolitica Autoimmune

ALC: Absolute lymphocyte count/Conta assoluta linfocitaria

APC: Alloficocianina

APC-Cy7: Alloficocianina coniugata alla cianina 7

APRIL: A Proliferation-inducing Ligand

ASO: Allele Specific Oligonucleotide

ATM: Ataxia-Teleangectasia Mutated

BAFF: B-cell Activating Factor

BCL-2: B-cell Lymphoma-2

BCR: B-cell Receptor

BH: Bcl-2 Homology

BM: Bone marrow/Midollo osseo

B-PLL: B-cell Prolymphocytic Leukemia/Leucemia Prolinfocitica B

BR: Bendamustina-Rituximab

BTK: Bruton's Tyrosine Kinase/Tirosina chinasi di Bruton

CAR-T: Chimeric Antigen Receptor T-cell

CDC: Complement-dependent cytotoxicity/Citotossicità complemento-dipendente

cDNA: complementary DNA/DNA complementare

CDR3: Complementarity-determining Region 3

CHD2: Chromodomain Helicase DNA-binding

CI: Confidence Interval/Intervallo di Confidenza

CIRI: Continuous Individualized Risk Index

CIRS: Cumulative Illness Rating Scale

CIT: Chemioimmunotherapy/Chemioimmunoterapia

CK: Complex karyotype/Cariotipo complesso

CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia

CLL-IPI: Chronic Lymphocytic Leukemia-International Prognostic Index

CR: Complete response/Risposta completa

CRi: Complete remission with incomplete marrow recovery/Remissione completa con incompleta ripresa midollare

ctDNA: circulating tumor DNA/DNA circolante tumorale

DFS: Disease-free survival/Sopravvivenza libera da malattia

DLBCL-RT: Diffuse Large B-cell Lymphoma-Richter Transformation

dMRD: detectable MRD

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EMA: European Medicines Agency

EOT: End of treatment/Termine del trattamento

ERIC: European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia

FA: Fibrillazione Atriale

FCR: Fludarabina-Ciclofosfamide-Rituximab

FDCs: Follicular dendritic cells/Cellule dendritiche follicolari

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

FITC: Isotiocianato di fluoresceina

G-Chl: Obinutuzumab-Clorambucile

GIVe: Obinutuzumab-Ibrutinib-Venetoclax

GVL: Graft Versus Leukemia

Hb: Hemoglobin/Emoglobina

HL-RT: Hodgkin lymphoma- Richter Transformation

HR: Hazard Ratio

HSCs: Hematopoietic stem cells/Cellule staminali ematopoietiche

HTS: High-Throughput Sequencing

IPS-E: International Prognostic Score for Early-stage CLL

I-R: Ibrutinib-Rituximab

ISC on CLL-MRD: International Steering Committee on Chronic Lymphocytic Leukemia-Measurable Residual Disease

ISCN2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2016

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs

ITP: Immune Trombocytopenia/Trombocitopenia Autoimmune

iwCLL: international workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia

LDH: Lactate dehydrogenase/Lattato deidrogenasi

LDT: Lymphocytes doubling time/Tempo di raddoppiamento linfocitario

LLC: Leucemia Linfatica Cronica

mAb: Anticorpi monoclonali.

MBL: Monoclonal B-cell Lymphocytosis/ Linfocitosi B Monoclonale

M-IGHV: Mutated-Immunoglobulin Heavy-chain Variable region/Regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline mutata

miRNA: microRNA

MRD: Measurable Residual Disease/Malattia Residua Misurabile

MSCs: Mesenchymal stromal cells/Cellule mesenchimali stromali

MYD88: Myeloid differentiation primary response 88

NF- κ B: Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells

NGS: Next Generation Sequencing

NK: Natural Killer

NLCs: Nurse-like cells

OR: Odds Ratio

ORR: Overall response rate/Tasso di risposta globale

OS: Overall survival/Sopravvivenza globale

PB: Peripheral blood/Sangue periferico

PD: Progressive disease/Malattia progressiva

PD-1: Programmed Cell Death Protein-1

PE: Ficoeritrina

PE-Cy7: Ficoeritrina coniugata alla cianina 7

PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein

PFS: Progression-free survival/Sopravvivenza libera da progressione

PI: Proteins Inhibitors/Inibitori delle proteine

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase

PKC- β II: Proteine Kinase C- β II

PLCG2: Phospholipase C gamma 2

PLT: Platelets/Piastrine

POT1: Protection of Telomeres 1

PR: Partial response/Risposta parziale

PRCA: Pure Red Cell Aplasia/Aplasia Eritroide Pura

R/R: Relapsed/Refractory/Recidivato/Refrattario

RFS: Relapse-free survival/Sopravvivenza libera da ricaduta

ROR1: Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1

RQ-PCR: Reverse-transcriptase Quantitative real-time Polimerase Chain Reaction

RT: Richter Transformation/Trasformazione di Ritchter

RT-qPCR: Reverse-transcriptase Quantitative real-time Polimerase Chain Reaction

SARS-CoV2: Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2

SD: Stable disease/Malattia stabile

SF3B1: Splicing Factor 3b Subunit 1

SLL: Small Lymphocytic Lymphoma/Linfoma a Piccoli Linfociti

SM: Sangue midollare

SNPs: Single nucleotide polymorphisms/Polimorfismi a singolo nucleotide

SP: Sangue periferico

SUV_{max}: Maximum standardized uptake value

Syk: Spleen tyrosine kinase

TAM: Tumor associated macrophages/Macrofagi associati al tumore

TME: Tumor microenvironment/Microambiente tumorale

U-IGHV: Unmutated-Immunoglobulin Heavy-chain Variable region/Regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline non mutata

uMRD: undetectable MRD

Ven: Venetoclax

Ven-Combo: Combinazioni di venetoclax

VenG: Venetoclax-Obinutuzumab

VenI: Venetoclax-Ibrutinib

VenR: Venetoclax-Rituximab

WHO: World Health Organization/Organizzazione Mondiale della Sanità

XPO1: Exportin 1

ZAP70: Zeta Chain of T-cell Receptor Associated Protein Kinase 70

ZMYM3: Zinc finger MYM-type containing 3

RIASSUNTO

PRESUPPOSTI DELLO STUDIO

La malattia residua misurabile (MRD) ha dimostrato di essere uno strumento efficace per predire l'esito dei pazienti affetti da leucemia linfatica cronica (LLC), ma secondo le linee guida internazionali essa viene impiegata solo come *endpoint* surrogato negli studi clinici.

SCOPO DELLO STUDIO

Questo studio si propone di valutare il ruolo della valutazione della MRD nella pratica clinica e di identificare i fattori correlati al raggiungimento della *undetectable*-MRD (uMRD).

MATERIALI E METODI

Abbiamo valutato 83 pazienti affetti da LLC trattati presso l'UOC di Ematologia e Immunologia clinica dell'Azienda Ospedale-Università Padova con chemioimmunoterapia (CIT) o con terapia mirata, che sono stati sottoposti a valutazione della MRD tra il 2012 e il 2023. La valutazione della MRD è stata eseguita nei laboratori dell'Ematologia mediante la citometria a flusso, con il test standardizzato a sei colori. La MRD è stata considerata non rilevabile (uMRD) quando il risultato era inferiore a 1 cellula di LLC ogni 10.000 leucociti (MRD4), nel sangue periferico e/o nel midollo osseo.

RISULTATI

L'età media dei pazienti era di 68 anni. All'inizio del trattamento, il 42% dei pazienti aveva un punteggio CIRS ≥ 6 . Il 60% dei pazienti era naïve al trattamento, mentre il 22% aveva ricevuto ≥ 2 trattamenti precedenti. Il 37% è stato trattato con CIT (fludarabina-ciclofosfamide-rituximab; bendamustina-rituximab; clorambucile-obinutuzumab), il 37% con una combinazione di venetoclax e il 25% con altre terapie mirate (venetoclax in monoterapia; ibrutinib in monoterapia o in combinazione; rituximab-idelalisib). Il 60% ha ottenuto una risposta completa (CR) e il 35% una risposta parziale (PR). Nel 52% dei pazienti è stato raggiunto uno status uMRD4. Dopo un *follow-up* mediano di 45 mesi, i pazienti con uMRD4 hanno mostrato una sopravvivenza libera da ricaduta (RFS) e una

sopravvivenza globale (OS) significativamente superiori rispetto a quelli con dMRD4 (RFS mediana: non raggiunta vs 53 mesi; RFS a 4 anni: 84% vs 57%; HR [95% CI]: 2,332 [1,111-4,896], $p=0,0297$; OS mediana: non raggiunta in nessuno dei due gruppi; OS a 4 anni 94% vs 68%; HR [95% CI]: 3,955 [1,712-9,138], $p=0,0054$). I pazienti che hanno ricevuto regimi di combinazione con CIT o venetoclax hanno raggiunto tassi significativamente più elevati di uMRD4 (68% e 58%, rispettivamente, con $p=0,0018$), ma non ci sono state differenze in termini di RFS e OS nei pazienti uMRD4 in relazione ai trattamenti utilizzati (RFS mediana non raggiunta in nessuno dei tre gruppi, con $p<0,0001$; OS mediana non raggiunta in nessuno dei tre gruppi, con $p=0,0008$). Tra i pazienti con dMRD4, quelli trattati con combinazioni di venetoclax hanno mostrato una RFS e una OS significativamente superiori rispetto a quelli trattati con CIT o altre terapie mirate (RFS mediana: 58, 25 e 32 mesi, rispettivamente, con $p<0,0001$; OS mediana: non raggiunta, 94 e 58 mesi, rispettivamente, con $p=0,0008$). Mutazione di *TP53*, del(17p), stato IGHV non mutato (U-IGHV), cariotipo complesso, CLL-IPI >4 e CIRS ≥ 6 sono state identificate variabili significativamente associate al raggiungimento di tassi più elevati di dMRD4 ($p=0,0133$; $p=0,0119$; $p=0,0064$; $p=0,0237$; $p=0,0079$; $p=0,0064$).

CONCLUSIONI

Sia la CIT che i regimi di combinazione con venetoclax sono associati a più alti tassi di uMRD4 e il raggiungimento dello status uMRD4 ha dimostrato di riflettere un forte controllo della malattia, indipendentemente dallo schema terapeutico impiegato. Pertanto, le nuove molecole come venetoclax, in virtù della loro migliore tollerabilità e della loro semplice gestione, si confermano un'ottima scelta terapeutica nei pazienti affetti da LLC, soprattutto se anziani o se presentanti importanti comorbidità.

ABSTRACT

BACKGROUND

Measurable residual disease (MRD) has shown to be a successful tool to predict the outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), but according to international guidelines, it is only used as a surrogate endpoint in clinical trials.

AIM

This study was aimed at evaluating the role of MRD assessment in clinical practice and at identifying factors related to undetectable-MRD (uMRD) achievement.

MATERIALS AND METHODS

We evaluated 83 patients with CLL treated in the Hematology and Clinical Immunology Unit of the University-Hospital of Padova with chemoimmunotherapy (CIT) or targeted therapy, who have undergone MRD assessment between 2012 and 2023. MRD evaluation was performed in the Hematology Unit laboratory using flow-cytometry assessment, with the standardized six-colour assay. MRD was considered undetectable (uMRD) when the result was less than 1 CLL cell per 10.0000 leucocytes (MRD4), in peripheral blood and/or bone marrow.

RESULTS

The median age of patients was 68 years. At the start of treatment 42% of patients had a CIRS score ≥ 6 . 60% of patients was treatment-naïve, while 22% had received ≥ 2 prior treatments. 37% was treated with CIT (fludarabine-cyclophosphamide-rituximab; bendamustine-rituximab; chlorambucil-obinutuzumab), 37% with venetoclax-based combination and 25% with other targeted therapies (venetoclax alone; ibrutinib alone or in combination; rituximab-idelalisib). 60% achieved a complete response (CR) and 35% a partial response (PR). uMRD4 was reported in 52% of patients. After a median follow-up of 45 months, patients with uMRD4 showed significantly superior relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) than those with dMRD4 (median RFS: not reached vs 53 months; 4 years-RFS: 84% vs 57%; HR [95% CI]: 2.332 [1.111-

4.896], $p=0.0297$; median OS: not reached in either group; 4 years-OS: 94% vs 68%; HR [95% CI]: 3.955 [1.712-9.138], $p=0.0054$). Patients who received CIT or venetoclax-combination regimens achieved significantly higher rates of uMRD4 (68% and 58%, respectively, $p=0.0018$), but there were no differences in terms of RFS and OS in uMRD4 patients with regard to the therapeutic scheme used (median RFS: not reached in any of the three groups, $p<0.0001$; median OS: not reached in any of the three groups, $p=0.0008$). Among dMRD4 patients, those treated with venetoclax-combination regimen showed significantly higher RFS and OS than those treated with CIT or other targeted therapies (median RFS: 58, 25 and 32 months, respectively, $p<0.0001$; median OS: not reached, 94 and 58 months, respectively, $p=0.0008$). *TP53* mutation, del(17p), unmutated IGHV (U-IGHV), complex karyotype, CLL-IPI >4 and CIRS ≥ 6 were identified as variables significantly associated with the achievement of higher rates of dMRD4 ($p=0.0133$; $p=0.0119$; $p=0.0064$; $p=0.0237$; $p=0.0079$; $p=0.0064$).

CONCLUSION

Both CIT and venetoclax-combination regimens were associated with high rates of uMRD4 and the achievement of uMRD4 has shown to reflect a strong control of the disease, regardless of the therapeutic scheme chosen. Therefore, the new molecules such as venetoclax, given their better tolerance and their easier management, are confirmed to be an excellent therapeutic choice in patients with CLL, especially if old or comorbid.

1 INTRODUZIONE

1.1 DEFINIZIONE

La leucemia linfatica cronica (LLC) è un disordine linfoproliferativo delle cellule B a carattere neoplastico, distinguibile dal linfoma a piccoli linfociti (SLL, *Small Lymphocytic Lymphoma*) solo per il suo comportamento leucemico. Nella quinta edizione della Classificazione WHO (*World Health Organization*) (1), essa è annoverata fra le neoplasie linfoidi a cellule B mature, in una categoria definita “Proliferazioni pre-neoplastiche e neoplastiche a piccoli linfociti”, assieme alla Linfocitosi B Monoclonale (MBL).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Visto il suo esordio spesso indolente e considerato che molti pazienti mostrano una lunga sopravvivenza, la LLC ha un’alta prevalenza, tale da renderla la più frequente leucemia dell’adulto nei paesi occidentali.

L’incidenza della LLC in Occidente è di circa 4.9 per 100.000 abitanti/anno, con un rapporto fra maschi e femmine di 1.9:1 (2). Nei paesi orientali, l’incidenza è nettamente inferiore, ammontando a meno di 1 caso per 100.000 abitanti/anno (3). L’età media alla diagnosi è di 70 anni e solo nel 9% dei casi esordisce prima dei 45 anni.

In Italia, si stima un numero medio annuo di nuovi casi di circa 1.600 fra gli uomini e 1.150 fra le donne.

1.3 ISTOPATOLOGIA

La LLC è caratterizzata dall’accumulo di linfociti B maturi con uno specifico pattern immunofenotipico nel sangue periferico, nel midollo osseo, nei linfonodi, nella milza e, più raramente, in sedi extralinfatiche.

1.3.1 SANGUE PERIFERICO

All’analisi morfologica del sangue periferico, le cellule leucemiche appaiono classicamente come piccoli linfociti maturi, alcuni di questi indistinguibili dai

linfociti sani, aventi un alto rapporto nucleo/citoplasma, un nucleo denso, senza nucleoli e con cromatina parzialmente condensata. Alcune cellule possono frammentarsi nell'allestimento dello striscio di sangue, dando i tipici reperti delle *smudge cells* o *ombre nucleari di Gumprecht* (figura 1), probabilmente a causa della minor espressione della vimentina e della diversa composizione dei lipidi della membrana delle cellule leucemiche.

Una quota di pazienti può presentare una morfologia atipica, caratterizzata dalla presenza in misura maggiore del 10% di prolinfociti (figura 1), più grandi dei classici linfociti leucemici, oppure dalla presenza di cellule linfoplasmocitiche e *cleaved cells*. La presenza di prolinfociti rappresenta un fattore prognostico negativo e spesso si associa alla mutazione di *NOTCH1* o ad aberrazioni di *TP53* (4).

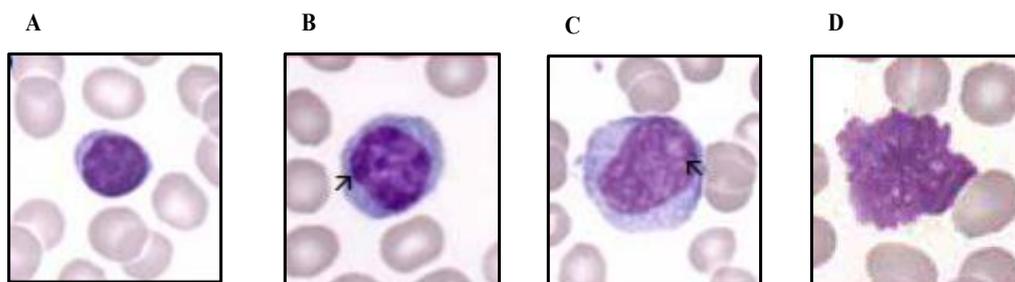


Figura 1. Striscio di sangue periferico. *A*: linfocita normale; *B*: linfocita di LLC; *C*: prolinfocita; *D*: ombre di Gumprecht.

Un campione di sangue contenente più del 55% di prolinfociti favorisce la diagnosi di progressione prolinfocitica di una LLC, secondo l'ultima edizione della classificazione WHO (1), o di Leucemia Prolinfocitica B (B-PLL), secondo la sua precedente edizione (5).

1.3.2 MIDOLLO OSSEO

Al contrario del SLL, per la cui diagnosi è imperativo eseguire l'analisi istopatologica di un linfonodo, lo studio midollare con evidenza dell'infiltrazione linfocitaria (più del 30% dei linfociti su tutte le cellule nucleate) non è più richiesto per la diagnosi di LLC; sebbene alcuni reperti anatomopatologici (6) costituiscano vecchi fattori prognostici della malattia, l'analisi del midollo osseo viene utilizzata nella valutazione del paziente nel contesto di *trial* clinici o per indagare altre patologie.

La morfologia dei linfociti leucemici nel midollo osseo è la stessa di quella nel sangue periferico. I tre principali pattern di interessamento midollare includono il *nodulare* (aggregati discreti di linfociti che talvolta possono formare centri proliferativi o centri di crescita pseudofollicolare), l'*interstiziale* (linfociti che si alternano alle cellule ematopoietiche sane senza dare una disorganizzazione architetturale) e il *diffuso* (i linfociti infiltrano diffusamente il midollo, cancellandone l'architettura), che possono presentarsi in maniera dominante o combinarsi fra loro. Più recentemente è stato descritto un pattern *interfollicolare*, più evidente nella malattia nodale, in cui sono evidenti centri germinativi paratrabecolari ed interstiziali privi della zona del mantello.

I primi due pattern sono solitamente associati ad una normale funzionalità ematopoietica, mentre diversi studi dimostrano come il pattern diffuso sia associato ad una sopravvivenza inferiore (7) (8). Il pattern diffuso è inoltre correlato all'espressione di ZAP-70 e ad uno stato IGVH non mutato (9).

1.3.3 LINFONODI

I linfonodi sono frequentemente infiltrati dai linfociti neoplastici. In alcuni casi, l'interessamento nodale non avviene contestualmente ad una fase leucemica e a detta entità a carattere linfofomatoso viene dato il nome di SLL. Questo rimane localizzato ai tessuti nodali in circa il 60% dei casi (6), mentre nei restanti invade il sangue periferico. Le due entità, pertanto, vengono considerate come un'unica malattia con una differente espressione tissutale (LLC/SLL).

Le cellule patologiche sono rappresentate da piccoli linfociti maturi, prolinfociti e paraimmunoblasti; gli ultimi due istotipi sono organizzati a formare centri proliferativi, anche detti centri di crescita pseudofollicolari. Raramente, le cellule possono avviare una differenziazione in senso plasmocitoide ed essere associati ad una paraproteinemica IgM, oppure essere accompagnate da cellule con un aspetto Reed-Sternberg-Hodgkin-like.

1.4 EZIOLOGIA

L'eziologia della LLC è tutt'oggi poco chiarita. Fra i fattori ambientali, l'esposizione ad alcuni agenti chimici, in particolar modo fitoterapici, sembra aumentare il rischio di LLC: l'associazione più solida è quella con l'Agente

Arancio, un fitoterapico utilizzato durante la Guerra del Vietnam. Il ruolo giocato dalle radiazioni ionizzanti resta, invece, controverso. Non c'è evidenza che fattori dietetici o le abitudini voluttuarie quali alcol o fumo di sigaretta aumentino il rischio di LLC (10).

Un importante ruolo nell'eziologia della LLC viene ricoperto dalla predisposizione genetica. Si stima, infatti, che circa il 9% dei pazienti con LLC abbia una storia familiare positiva per la stessa patologia; in particolare, i parenti di primo grado dei pazienti affetti hanno un rischio aumentato di 8.5 volte di sviluppare la patologia. Complessivamente, sono stati identificati numerosi polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) in più di 30 loci del DNA associati alla LLC familiare, fra cui varianti di ATM (11).

Seguono altri fattori di rischio o di protezione fino ad ora identificati: la storia di atopica (OR 0.86), la sierologia positiva per HCV (OR 2.08), l'intensa esposizione solare (OR 0.75), la familiarità per qualunque neoplasia ematologica (OR 2.17), il vivere o lavorare in una fattoria (OR 1.21), la professione di parrucchiere (OR 1.77) (12).

1.5 PATOGENESI

1.5.1 CELLULA DI ORIGINE E LEUCEMOGENESI

Il processo di leucemogenesi nella LLC non è stato completamente chiarito. L'esistenza di più cloni in alcuni pazienti con LLC/MBL suggerisce che il primo evento oncogenetico avvenga a livello delle cellule precursori o delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs). A riprova di ciò, alcuni esperimenti (13) hanno dimostrato come cellule HSCs prelevate da donatori affetti da LLC e xenotrapiantate in topi immunodepressi potessero ricreare nel modello animale un'espansione clonale di cellule B mature CD5+, condizione simile alla MBL/LLC. Inoltre, studi di NGS hanno confermato che cellule CD34+/CD19- di pazienti con LLC condividono alcune mutazioni somatiche con le cellule leucemiche mature; fra queste figurano le mutazioni di NOTCH1, SF3B1, BRAF, TP53, XPO1, MED12, NFKBIE e EGR2 (14), (15), (16). In particolare, per il *pathway* di Notch, è da segnalare che esso risulta essere iperattivo nelle HSCs dei pazienti con LLC indipendentemente dalla mutazione del gene stesso, suggerendo

che sia uno dei primi sistemi di *signaling* ad essere coinvolto nella trasformazione leucemica (16). Queste mutazioni precoci, seppur riconosciute come importanti driver di patologia, non sono tuttavia sufficienti a giustificare il complesso panorama patogenetico della LLC, ma possono costituire la base del processo che, partendo da cellule staminali pre-leucemiche e procedendo a step, darà origine alla LLC stessa (figura 2).

È possibile che pazienti con LLC vadano incontro a regressione spontanea di malattia, con una probabilità di circa 0.2%-1%. Questa evenienza è più frequente nei pazienti con malattia a basso rischio biologico, come in caso di stadi precoci Rai o Binet, normali livelli di beta2-microglobulina o LDH, bassa conta linfocitaria, negatività a CD38/CD49d, *TP53 wild-type*, stato IGHV mutato (M-IGHV) o FISH favorevole, nonostante siano stati riportati dei casi di regressione spontanea anche in contesti di malattia ad alto rischio (17).

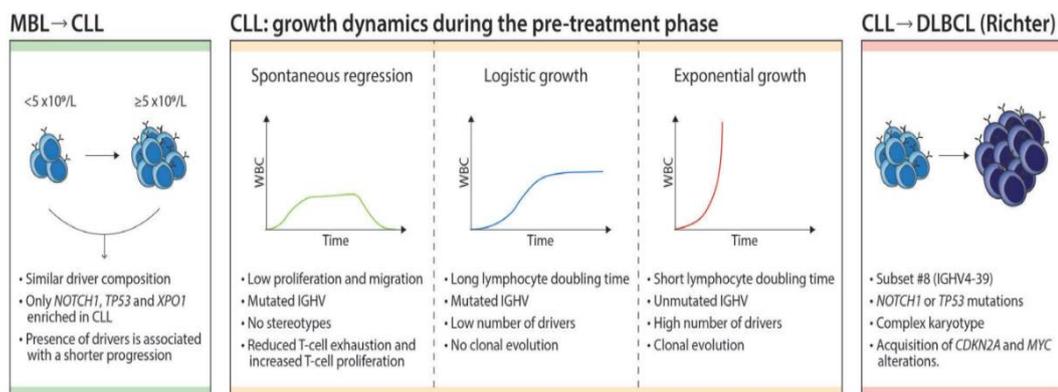


Figura 2. Progressione multi-step della LLC. Tracciando l'origine della LLC, è stato dimostrato come questa non sia sempre monoclonale. Inoltre, studi di coorte hanno dimostrato che quasi tutti i pazienti affetti presentavano una pregressa MBL, configurando quindi un quadro di progressione multi-step. Adattata da Delgado et al. (18).

MBL: Linfocitosi B monoclonale, CLL: *Chronic Lymphocytic Leukemia*, DLBCL: *Diffuse Large B-cell Lymphoma*.

In circa il 50% dei casi il clone leucemico presenta una percentuale maggiore del 2% rispetto al gene germline di mutazioni nella sequenza dei geni che codificano per la porzione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline (IGHV) (19). Tale maturazione anticorpale avviene fisiologicamente durante la maturazione delle cellule B nel centro germinativo (CG) in risposta ad antigeni T-dipendenti e prende il nome di ipermutazione somatica. Dal punto di vista prognostico, le

forme di M-LLC hanno frequentemente un andamento clinico meno aggressivo rispetto alle forme U-LLC (20). Storicamente, i primi studi sulla LLC hanno proposto un'origine differente per i due tipi di LLC: la forma senza ipermutazione somatica (*unmutated-IGHV* o U-IGHV) originante da linfociti B naïve pre-GC e quella con ipermutazione somatica (*mutated-IGHV* o M-IGHV) originante da cellule B post-GC che erano state esposte ad un antigene, includendo anche le cellule B della memoria. Tuttavia, dal momento che entrambi i tipi di LLC sembrano avere un fenotipo cronicamente attivato basandosi su dati immunologici di membrana, sulla lunghezza dei telomeri e sull'espressione genica, attualmente si ritiene che il precursore sia in entrambi i casi una cellula *antigen-experienced* (21). Infatti, esperimenti (22,23) sul BCR hanno dimostrato che le cellule di ambedue le forme di LLC riconoscono antigeni *self* e *non-self* e suggeriscono che i linfociti leucemici originino da cellule B reattive senza distinzione di stato mutazionale di IGHV; inoltre, tali studi hanno gettato le basi alla teoria secondo cui alcuni antigeni self giochino un ruolo fondamentale nel mediare l'espansione clonale delle cellule leucemiche.

La scoperta che anche le cellule della memoria CD27⁺ normali possono esprimere o meno catene pesanti mutate ha portato a ritenere che la LLC derivi da una cellula B della memoria che abbia incontrato l'antigene in una reazione T-dipendente all'interno del CG, nel caso delle M-LLC; viceversa, che una cellula B della memoria o una cellula CD27⁻ abbia subito uno stimolo esterno al centro germinativo, T-indipendente e incapace di fungere da *trigger* per l'ipermutazione somatica nelle forme di U-LLC (23–26).

Gli eventi che mediano la trasformazione neoplastica, oltre all'alterazione a carico delle HSCs, comprendono l'attivazione anomala del B Cell Receptor (BCR), l'acquisizione di altre modifiche genetiche, l'inibizione di *pathway* pro-apoptotici e le interazioni con il microambiente tumorale.

1.5.2 IL SEGNALE DEL B CELL RECEPTOR (BCR)

Il BCR (figura 3) è un complesso recettoriale fondamentale per le cellule B che è composto da un'immunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) transmembrana legante l'antigene e da un eterodimero con funzione di *signaling* Iga-Igβ (CD79A-CD79B). Nel caso della LLC, solitamente le cellule co-esprimono IgD e

IgM a bassi livelli, ma in alcuni casi le immunoglobuline di superficie vanno incontro al processo di *switch* isotipico, permettendo così alle cellule maligne di esprimere IgG.

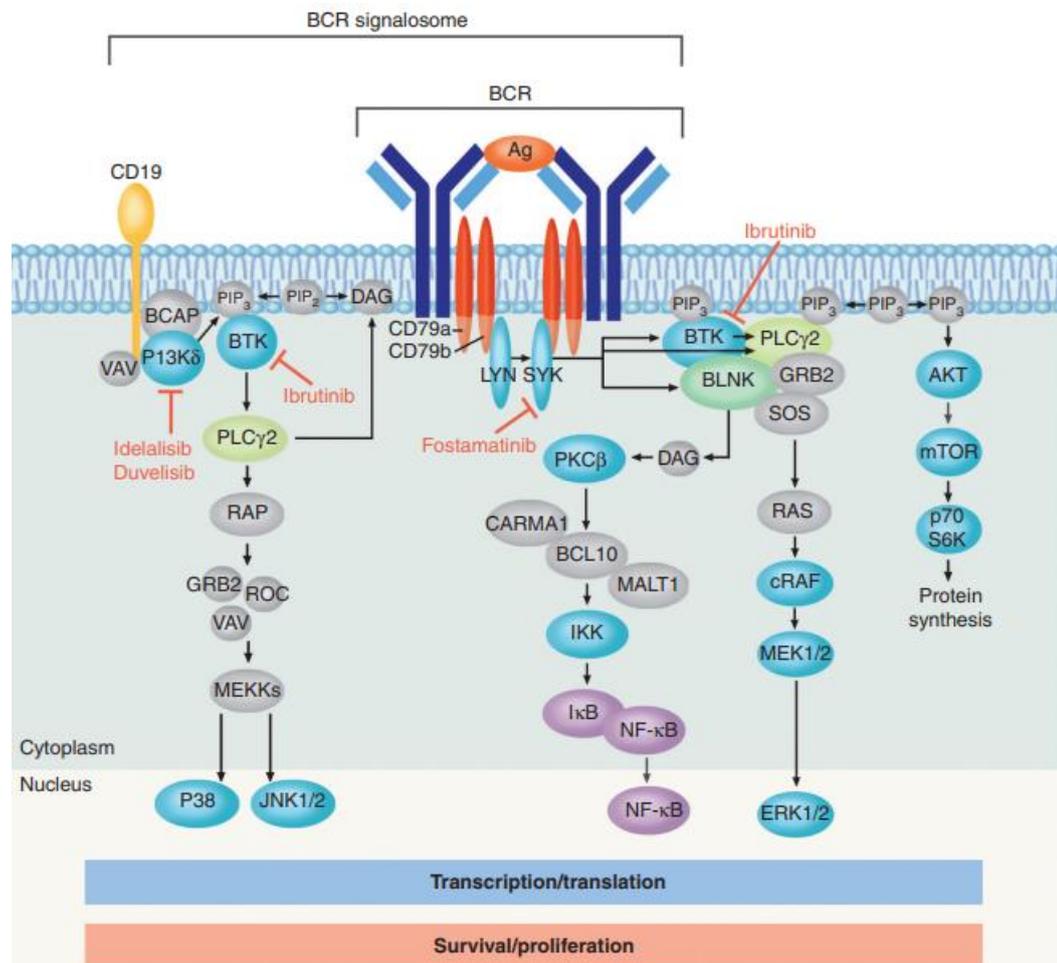


Figura 3. Segnalamento del BCR. Le molecole dell'eterodimero CD79 contengono dei motivi ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) che, in seguito al legame dell'antigene, sono soggetti a fosforilazione da parte delle tirosin-chinasi della famiglia Src, di cui fa parte Lyn. Essa dà inizio alla cascata di trasduzione e agisce creando siti di legame per i domini SH2 di alcune chinasi effettrici: SYK (*Spleen Tyrosin Kinase*), BTK (*Bruton's Tyrosin Kinase*) e PI3K (fosfatidilinositolo 3-chinasi), che a loro volta fosforilano diversi trasduttori a valle, tra cui AKT, ERK, JNK, p38 MAPK, NF-AT, NF-κB e proteine leganti il citoscheletro (27). Adattata da Chiorazzi et al. (21). BCR: B-cell Receptor.

L'attivazione cronica del BCR è una caratteristica essenziale dell'espansione dei cloni della LLC e gli effetti del *signaling* variano dall'attivazione, sopravvivenza, proliferazione e crescita cellulare all'anergia. Sembra che questa profonda differenza dipenda in larga parte dallo stato mutazionale del BCR stesso (28).

Le cause dell'attivazione funzionale del BCR nella LLC non risiedono tanto nella presenza di mutazioni nei geni codificanti per il recettore o per le molecole che trasducono il segnale, quanto nella presenza di interazioni fra il recettore e altre molecole. In particolare, è stato descritto un meccanismo di attivazione del BCR antigene-dipendente e uno antigene-indipendente.

Il primo meccanismo prevede che il BCR delle cellule leucemiche venga cronicamente stimolato sia da antigeni *non-self*, sia da antigeni *self*, come la catena pesante della miosina IIA (29), il β -(1,6)-glucano (30) o il Fattore Reumatoide (31). La stretta dipendenza delle cellule leucemiche dalla stimolazione antigenica cronica con epitopi comuni trova conferma nel fatto che in circa il 30% dei casi le cellule leucemiche esprimono dei BCR presentanti la regione che lega l'antigene (HCDR3 o *Heavy-Chain Complementarity-Determining Region*) con sequenze amminoacidiche pressoché identiche, definite stereotipi (32). Sono state descritte centinaia di stereotipi e alcuni di questi rivestono anche un valore prognostico (33), (34); ad esempio, il tipo 2 caratterizza una malattia aggressiva, mentre il tipo 8 è un fattore di rischio per la trasformazione di Richter. La presenza di BCR stereotipati è più frequente nella forma U-LLC.

Il meccanismo antigene-indipendente, descritto più recentemente, viene garantito dall'autoreattività dei BCR e dell'abilità che gli stessi hanno di omodimerizzare tra loro (35), senza la necessità di legarsi ad epitopi esterni (36), grazie all'interazione fra la regione HCDR3 ed epitopi interni del BCR.

1.5.3 GENETICA

Le più importanti lesioni genetiche riscontrate nelle cellule LLC includono aberrazioni cromosomiche, mutazioni somatiche, alterazioni nell'espressione dei miRNA e modificazioni epigenetiche.

L'80% dei pazienti con LLC presenta almeno una tra le seguenti aberrazioni cromosomiche, elencate con frequenza decrescente:

- Del(13q). A livello di questa regione è presente un cluster di microRNA (miR15a/16b) che regolano l'espressione di proteine che inibiscono l'apoptosi agendo su BCL-2 o che controllano la progressione del ciclo cellulare.

- Trisomia 12.
- Del(11q). Comporta la perdita del gene ATM, che è coinvolto nella riparazione del DNA.
- Del(17p): presente nell'8% dei casi alla diagnosi, determina la perdita di *TP53*. Nell'80% dei casi con del(17p), inoltre, è presente una mutazione sul rimanente allele (37,38).

La ricerca a fine prognostico di dette anomalie è ormai pratica consolidata nella clinica e verrà descritta successivamente, in un paragrafo apposito.

Le principali mutazioni somatiche del DNA nella LLC riguardano geni che intervengono nella riparazione del DNA e nel controllo del ciclo cellulare (*TP53*, *ATM*, *POT1*), nel processamento dell'mRNA (*SF3B1* e *XPO1*), nel rimodellamento della cromatina (*CHD2*, *ZMYM3*, *HIST1H1E*), nel *pathway* di WNT o di NOTCH e nelle vie pro-infiammatorie (*MYD88*). È da notare come alcune mutazioni somatiche tendano a segregare con specifici subset del BCR e con specifiche aberrazioni cromosomiche (21).

1.5.4 INIBIZIONE DEI PATHWAY PRO-APOPTOTICI

L'apoptosi è una forma di morte cellulare programmata regolata dalle proteine della famiglia BCL-2. Tutte le proteine della famiglia di BCL-2 condividono il dominio di omologia a Bcl-2 (*Bcl-2 Homology* o *BH*) e comprendono sia proteine a ruolo anti-apoptotico con 4 domini BH (*BCL-2*, *BCL-XL*, *MCL-1*, *BCLW*, *BFL-1*), sia proteine a ruolo pro-apoptotico, che si possono dividere in due gruppi: proteine effettrici con 3 domini BH (*BAX*, *BAK*, *BOK*) e proteine BH3-only con un solo dominio BH (*BIM*, *BAD*, *NOXA*, *PUMA*, *BID*, *BIK*, *HRK*).

La LLC è considerata un paradigma di neoplasia nella quale l'apoptosi è deregolata, dal momento che la maggior parte delle cellule circolanti non sono proliferanti e sono arrestate in fase G0/G1 del ciclo cellulare (39). In molti casi di LLC è stata riscontrata una sovraespressione di proteine antiapoptotiche quali *Bcl-2* e *Mcl-1*, con conseguente sbilanciamento del rapporto *Bcl-2/Bax* a favore della prima (40).

Sono stati descritti innumerevoli meccanismi e segnali di sopravvivenza che mediano la deregolazione della morte cellulare programmata nella LLC, alcuni dei quali intrinseci alla cellula leucemica, altri provenienti dal *pabulum* neoplastico

(40,41). La sovraespressione di Bcl-2 è favorita dalla perdita della repressione trascrizionale svolta dai miRNA-15a/16b (42) localizzati nel cromosoma 13q, che è spesso deletato. Altri fattori intrinseci critici per il controllo dell'apoptosi sono i segnali deregolati di *TP53*, ATM, PI3K, NF- κ B e del BCR cronicamente attivo (40,43). In ultimo, è da considerare l'importanza del microambiente tumorale nel mediare un aumento dei livelli delle proteine anti-apoptotiche: se poste isolatamente in coltura, le cellule di LLC vanno infatti rapidamente incontro ad apoptosi (44); la coltura combinata di cellule di LLC e di cellule stromali mesenchimali è invece in grado di incrementare l'espressione di molecole anti-apoptotiche, suggerendo che il vantaggio di sopravvivenza delle cellule B non sia da attribuire solo a difetti intrinseci di apoptosi, ma anche a segnali emessi da cellule accessorie (45).

L'importanza di questo sistema per l'integrità della cellula LLC è testimoniata dall'efficacia terapeutica di venetoclax, un BH3 mimetico che, inibendo selettivamente Bcl-2, ristabilisce il rapporto Bcl-2/Bax.

1.5.5 MICROAMBIENTE TUMORALE

Le cellule B neoplastiche, nei siti di attività di malattia, risiedono in stretto contatto con diversi istotipi cellulari, come linfociti T, cellule di derivazione monocito/macrofagica, cellule stromali mesenchimali (MSCs), cellule endoteliali e cellule dendritiche follicolari (FDCs), che complessivamente costituiscono il microambiente tumorale (TME). Le interazioni fra queste componenti e le cellule leucemiche includono sia contatti diretti cellula-cellula, che interscambi di mediatori solubili come citochine e chemochine. La letteratura scientifica è ormai unanime nell'attribuire al microambiente tumorale un ruolo essenziale nei processi di sopravvivenza, proliferazione, stimolazione antigenica, *trafficking* e *homing* dei linfociti neoplastici, di resistenza alla chemioterapia tradizionale e ai nuovi farmaci (46,47).

Il compartimento T nella LLC ha una funzione duplice, dal momento che può esercitare sia un'azione pro-tumorale, che un'azione citotossica anti-LLC. Generalmente, i pazienti sperimentano un aumento del valore assoluto dei linfociti T, con un rapporto CD4⁺/CD8⁺ che si sposta in favore dei secondi e anche un aumento dei linfociti Treg (47). Il ruolo delle cellule T nella patogenesi della LLC

è legato soprattutto alla produzione di citochine, in particolare CD40L, IL-21, IFN- γ , TNF- α e IL-4. Inoltre, i linfociti T nella LLC mostrano un'aumentata espressione di *marker* di attivazione cronica e di *exhaustion*, come la proteina PD-1 (*programmed cell death protein 1*) (48).

Le cellule nurse-like (NLCs) sono cellule derivanti dai monociti che si ritrovano negli organi linfoidi dei pazienti con LLC. Tali cellule hanno un pattern di espressione genica e una funzione immunosoppressoria simile a quella dei macrofagi M2 e dei TAM (*Tumor Associated Macrophages*). L'interazione tra le cellule B leucemiche e le NLCs attiva i segnali del BCR e di NF- κ B (49). In aggiunta, queste cellule secernono CXCL12, una citochina che attrae le cellule B esprimenti il recettore CXCR4 e producono diverse molecole in grado di stimolare la proliferazione delle cellule leucemiche e di inibirne l'apoptosi, sia spontanea, sia farmaco-indotta (50,51). Tra le molecole prodotte figurano BAFF (*B-cell activating factor*), APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) (50) e CD31, il ligando di CD38.

Le cellule mesenchimali stromali (MSCs) sono cellule che svolgono un ruolo di supporto per le cellule ematopoietiche e un ruolo strutturale nel midollo osseo. Esse sono presenti anche negli organi linfoidi di pazienti con LLC, dove costituiscono l'istotipo cellulare prevalente del microambiente tumorale (52) e contraggono stretti rapporti con le cellule B mediante interazione cellulare diretta e attraverso la secrezione di citochine e chemochine (45), con un *cross-talk* bidirezionale. L'interazione diretta con le cellule leucemiche induce l'attivazione delle MSCs attraverso la via PKC (AKT)- β II/NF- κ B (53). Inoltre, la letteratura descrive anche un fenomeno di rilascio da parte delle cellule LLC di microvescicole che contengono molecole attivanti la stessa via di trasduzione nelle MSCs (54).

Le MSCs proteggono le cellule di LLC dall'apoptosi spontanea e farmaco-indotta (55), modificano la composizione dei fluidi extracellulari peritumorali e modificano l'espressione di membrana delle cellule leucemiche. Esse stimolano l'espressione di marcatori di malattia aggressiva come ZAP-70 e CD38, mentre downregolano CXCR4 e CD20, conferendo resistenza al trattamento con anticorpi anti-CD20. Un lavoro basato su *assay* citochinici (45) ha dimostrato come la co-

coltura di cellule B con MSCs induca un incremento di diversi mediatori, tra cui IL-8, CXCL10, CCL4 e CCL11. Lo stesso studio ha dimostrato come le cellule MSCs abbiano la capacità di proteggere *in vivo* dall'apoptosi le cellule leucemiche quando sottoposte a regimi di fludarabina o ciclofosfamide, mentre ciò non si verifica quando le stesse sono sottoposte ad inibitori delle chinasi come ibrutinib e bafetinib.

In conclusione, il microambiente tumorale rappresenta una variabile che è ormai necessario considerare nello studio della farmacodinamica di terapie chemio-immunoterapiche e nello sviluppo di resistenza alle stesse; d'altra parte, esso offre nuove opportunità per lo sviluppo di terapie target (56).

1.6 MANIFESTAZIONI CLINICHE

1.6.1 PRESENTAZIONE CLINICA

La modalità di presentazione più comune della LLC è il riscontro casuale di una linfocitosi asintomatica; nonostante ciò, alcuni pazienti potrebbero lamentare linfadenopatie o organomegalie sintomatiche, sintomi B (febbre con temperatura $\geq 38^\circ$ senza evidenza di infezione, sudorazioni notturne o perdita di peso non intenzionale maggiore del 10% in sei mesi), astenia o sintomi correlati alle citopenie configurando, in quest'ultimo caso, quadri avanzati di malattia.

La LLC è gravata da diverse complicanze che aumentano notevolmente il carico di morbidità dei pazienti affetti e che spesso sono responsabili degli esiti più infausti della malattia. In generale, le complicanze più frequenti includono le infezioni, le manifestazioni autoimmuni, la progressione prolinfocitica, la sindrome di Richter e il rischio di seconde neoplasie, soprattutto di tumori cutanei di tipo non-melanoma.

1.6.2 DISFUNZIONI IMMUNITARIE DELLA LLC

La LLC è caratterizzata da un'importante e progressiva disfunzione del sistema immunitario, che coinvolge diverse cellule ed effettori.

I deficit dell'immunità innata includono la ridotta produzione e funzionalità delle proteine del complemento, deficit qualitativi o quantitativi dei granulociti neutrofili e delle cellule NK (57).

L'immunità adattativa è compromessa sia nella sua branca cellulo-mediata che in quella umorale; in particolare, i linfociti T CD4⁺ mostrano delle caratteristiche di *exhaustion* (58) e nel corso della malattia tendono a subire uno shift della polarizzazione verso un fenotipo Th2, contribuendo alla produzione di citochine a significato immunosoppressorio che si somma alla concomitante espansione dei linfociti T regolatori (59). Sono note anche anomalie morfologiche e citoscheletriche (60) delle cellule T, che rendono ragione di una minor efficienza nello stabilirsi della sinapsi immunologica. Di converso, la ridotta quantità di cellule B normali e l'ipogammaglobulinemia che ne consegue giustificano la minor efficienza della risposta anticorpo-mediata. L'ipogammaglobulinemia è riscontrata in circa il 25% dei pazienti alla diagnosi ed è associata a stadi avanzati di malattia, coinvolge tutte le classi anticorpali e la sua frequenza aumenta progressivamente nel corso della malattia stessa e in seguito a trattamenti chemioimmunoterapici (61). Analoghe considerazioni valgono anche per eventuali paraproteinemie IgM o IgG (62).

Queste premesse giustificano l'associazione della LLC con alcune delle complicanze di più frequente riscontro nella pratica clinica, quali le infezioni e i disordini autoimmunitari.

1.6.3 INFEZIONI

Il rischio di infezione aumenta con la progressione di malattia e può essere magnificato anche dall'effetto immunosoppressivo degli analoghi purinici, degli anticorpi monoclonali o degli inibitori delle chinasi.

Le infezioni più frequenti sono ad eziologia batterica e coinvolgono preferenzialmente l'apparato respiratorio. Lo spettro di patogeni è molto vasto e comprende sia germi comuni (*S. Aureus*, *S. Pneumoniae*, *H. Influenzae*, *E. Coli*, *K. Pneumoniae*, *P. Aeruginosa*), sia patogeni opportunisti, spesso secondari al trattamento, come *Listeria*, *Mycobacterium spp.*, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*. Fra i virus figurano soprattutto Herpesvirus e riattivazioni di HBV. I pazienti con LLC infettati da SARS-CoV2 hanno dimostrato una mortalità più elevata rispetto alla popolazione generale (63).

Per concludere, è necessario sottolineare che il paziente con LLC mostra anche una ridotta risposta alle vaccinazioni (contro *S. Pneumoniae*, Influenza, SARS-CoV2, Varicella-Zoster e vaccini ricombinanti) e che i vaccini vivi dovrebbero essere evitati a causa del rischio, seppur limitato, di riattivazione virale (64–66).

1.6.4 MANIFESTAZIONI AUTOIMMUNI

Le più note complicanze autoimmuni in corso di LLC sono le citopenie autoimmuni; fra queste, le più frequenti sono l'anemia emolitica autoimmune (AIHA, fino a più del 10% dei pazienti, specie se in stadio avanzato) e la piastrinopenia autoimmune (ITP, fino al 2% dei pazienti) (10). Molto più rare invece sono l'aplasia eritroide pura (PRCA) e la granulocitopenia autoimmune.

Altre manifestazioni descritte, ma significativamente meno comuni, includono: emofilia acquisita, malattia di von Willebrand acquisita, angioedema, pemfigoide bolloso, pemfigo paraneoplastico, tiroidite autoimmune, glomerulonefriti ad estrinsecazione prettamente nefrosica, polineuropatie, sindrome di Sjögren, Lupus Eritematoso Sistemico, fenomeno di Raynaud e vasculiti.

1.6.5 PROGRESSIONE PROLINFOCITICA

La progressione prolinfocitica è una condizione che interessa meno dell'1% dei pazienti. Essa si manifesta generalmente con un'organomegalia sintomatica, citopenie, aumento dell'LDH sierico e aumento delle cellule leucemiche nel sangue, di cui il 55% mostra caratteristiche morfologiche prolinfocitiche. La prognosi è usualmente infausta.

1.6.6 TRASFORMAZIONE DI RICHTER

La trasformazione o sindrome di Richter (RT), secondo la definizione della WHO (1), rappresenta la trasformazione della LLC o del SLL in linfoma aggressivo. La condizione interessa il 2-10% dei pazienti, con un tasso di incidenza per anno di circa lo 0.7% (67).

Le principali varianti di RT sono la variante Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL-RT), che rappresenta più del 90% dei casi, e la variante Linfoma di Hodgkin (HL-RT). Fattori di rischio per lo sviluppo di RT sottotipo DLBCL sono le mutazioni di NOTCH1 o *TP53*, un cariotipo complesso e lo stereotipo 8 del BCR (68).

Le cellule trasformate differiscono morfologicamente dalle cellule della LLC e nella maggior parte dei casi sono negative dal punto di vista immunofenotipico al CD5 o al CD23, che invece sono quasi sempre espresse dai linfociti della LLC. Contrariamente, il riarrangiamento DJ delle catene pesanti delle immunoglobuline montate dalle cellule del DLBCL-RT è spesso lo stesso del clone originario di LLC (69). Pertanto, le cellule linfomatose potrebbero esprimere catene pesanti non mutate, al contrario del *de novo* DLBCL. La sindrome di Richter sembra differire dal *de novo* DLBCL anche per il *background* genetico (70).

La trasformazione di Richter si caratterizza per un importante aggravamento delle condizioni cliniche, comparsa di sintomi B in pazienti precedentemente asintomatici, linfadenopatie rapidamente evolutive, sviluppo di malattia extranodale, aumento dell'LDH, ipercalcemia e ipercaptazione alla FDG PET-TC con $SUV_{max} \geq 10$. Le più recenti indicazioni sembrano raccomandare l'esecuzione di una valutazione istopatologica previa biopsia linfonodale nei pazienti con sospetta trasformazione di Richter e $SUV_{max} \geq 5$ (71).

La prognosi è generalmente infausta a causa della fitness dei pazienti, dell'età avanzata, delle comorbidità, dei precedenti trattamenti ed è migliore per i casi in cui le cellule trasformate non sono clonalmente correlate alla sottostante LLC, configurando quadri a prognosi simile a quella di un *de novo* DLBCL (OS di 62.5 mesi contro i 9-12 mesi delle forme clonalmente correlate alla LLC) (72,73).

1.7 DIAGNOSI E FATTORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI

1.7.1 DIAGNOSI

L'*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* (iwCLL) del 2018 (74) fornisce i criteri diagnostici per la patologia, che devono essere ricercati mediante esame obiettivo ematologico, esame emocromocitometrico con formula leucocitaria, esame morfologico su striscio di sangue periferico e analisi immunofenotipica con metodiche citofluorimetriche.

È importante eseguire un'accurata diagnostica differenziale che includa sia altre malattie linfoproliferative (Leucemia a cellule capellute, Linfoma mantellare leucemizzato, Linfoma splenico della zona marginale, Linfoma follicolare), sia cause secondarie di linfocitosi.

La diagnosi di LLC richiede la presenza di almeno $5 \times 10^9/L$ linfociti B nel sangue periferico sostenuta per almeno tre mesi, di cui è necessario dimostrarne la clonalità attraverso la citofluorimetria, che stabilirà la restrizione κ o λ delle catene leggere delle immunoglobuline. Contestualmente, è richiesta la presenza di uno specifico pattern immunofenotipico: le cellule neoplastiche esprimono l'antigene di superficie CD5 assieme agli antigeni CD19, CD20, CD23 e CD200. I livelli di immunoglobuline di superficie, di CD20 e di CD79b sono tipicamente a bassa intensità. Nei casi più complessi, la positività di CD43, CD81, CD10 o ROR1 può rafforzare la diagnosi. In ogni caso, la presenza di citopenia causata da un tipico infiltrato midollare documentato è diagnostica per LLC indipendentemente dal numero di linfociti B periferici.

Per MBL, invece, si intende la presenza di una linfocitosi B clonale con un conteggio di linfociti B nel sangue periferico inferiore a $5 \times 10^9/L$, in assenza di linfadenopatie, organomegalie, di sintomi *disease-related* e di citopenie. La MBL riconosce tre diverse entità nosologiche, secondo la classificazione WHO (1): due di queste hanno un profilo immunofenotipico sovrapponibile alla LLC e sono definite *Low-count MBL* e *High-count CLL/SLL-type MBL* e sono contraddistinte da un numero di linfociti B clonali inferiori o superiori a $0.5 \times 10^9/L$, rispettivamente; una terza categoria racchiude tutte le espansioni clonali delle cellule B che non possono essere ricondotte dal punto di vista immunofenotipico, sintomatologico e istopatologico a nessuna neoplasia B clonale. La MBL ad alto conteggio progredisce in LLC franca in circa l'1-2% pazienti/anno (75).

La diagnosi di SLL richiede la presenza di linfadenopatia e l'assenza di citopenie causate da infiltrazione midollare, oltre che un numero di linfociti B nel sangue periferico minore di $5 \times 10^9/L$. La diagnosi dovrebbe essere sempre sostenuta dalla valutazione istopatologica di un linfonodo affetto.

1.7.2 ANALISI AGGIUNTIVE

Nell'inquadramento della patologia è utile eseguire alcuni test che, pur non essendo necessari per la diagnosi, consentono di effettuare una stratificazione del rischio, di valutare il *burden* tumorale e anche di effettuare considerazioni riguardo la scelta del trattamento più adeguato, nonostante questi stessi fattori non

determinino di per sé la necessità di intraprendere un trattamento. Le principali analisi raccomandate dalle linee guida iwCLL (74) sono:

- Citogenetica mediante FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) in interfase, nella quale le alterazioni più frequentemente riscontrate sono: la delezione nel cromosoma 13q14.3 (del(13q)), sede di alcuni miRNA che regolano l'espressione di proteine coinvolte nell'apoptosi e nel ciclo cellulare e unica alterazione a valore prognostico positivo, se riscontrata isolatamente; la delezione del cromosoma 11 (del(11q)), sede del gene ATM e che solitamente è associata ad una malattia rapidamente progressiva, con linfadenopatia *bulky* e ridotta sopravvivenza; la delezione del cromosoma 17, quasi sempre nella banda 17p13 (del(17p)), sede del gene *TP53* e che possiede sia valore prognostico, essendo associata ad una malattia più aggressiva a scarsa prognosi, sia valore predittivo, riguardante la scarsa risposta agli agenti alchilanti e agli analoghi delle purine; la trisomia del cromosoma 12 (+12), che contiene geni con funzione ignota e che è associata ad una prognosi intermedia (2);
- Citogenetica mediante cariotipo in metafase dopo stimolazione con CpG (DNA batterico non metilato) e IL-2, che può mostrare, oltre alle alterazioni soprariportate, aberrazioni cromosomiche aggiuntive; in particolare, si definisce clone con cariotipo complesso (CK) il clone leucemico che presenta almeno tre alterazioni del cariotipo e tale condizione assume un valore prognostico negativo (76).
- Ricerca delle mutazioni di *TP53* negli esoni dal 2 al 11 tramite sequenziamento Sanger. Tali alterazioni possiedono un valore analogo a quello della delezione del cromosoma 17 (*TP53 dysfunction/disruption*).
- Ricerca delle mutazioni di NOTCH1, associato ad aumentato rischio trasformativo in sindrome di Richter (77).
- Analisi dello stato mutazionale delle regioni variabili delle catene pesanti immunoglobuliniche (IGHV) e, laddove questo permanga non mutato, la malattia tenderà ad avere un andamento più aggressivo (78);
- Valutazione citofluorimetrica dell'espressione di ZAP-70, CD38 e di CD49d. La positività ai primi due *marker* correla con il montaggio di catene pesanti immunoglobuliniche non mutate e con una prognosi peggiore (74). CD49d

è invece una catena integrinica coinvolta nelle interazioni con il microambiente tumorale e la sua iperespressione rappresenta il più solido fattore prognostico citofluorimetrico che condiziona negativamente l'*overall survival* e la *treatment-free survival* (74).

- Dosaggio di β 2-microglobulina e di LDH;
- Come già discusso, la biopsia o l'aspirato midollare non sono necessari per la diagnosi di LLC. Sono invece indagini indicate in caso di citopenie, potendo chiarire se queste siano correlate o meno a un processo infiltrativo midollare, mielodisplastico o autoimmune. Inoltre, l'entità e il tipo di infiltrazione midollare possono correlare con il *burden* tumorale (79).
- Studi di radiologia convenzionale come TC, RM o ecografie addominali non sono in genere raccomandati alla diagnosi; essi rappresentano in ogni caso importanti *tool* nel contesto di *trial* clinici che richiedono di avere un valore baseline e la loro esecuzione nella pratica clinica rimane comunque a discrezione dell'ematologo.
- Studi di medicina nucleare come la ^{18}F FDG PET-TC sono raccomandati qualora ci sia la necessità escludere altre patologie linfoproliferative metabolicamente più attive o nella valutazione della Sindrome di Richter.

1.8 STADIAZIONE

I sistemi di stadiazione più utilizzati e consigliati dalle linee guida sono il *Rai Staging System for CLL* (80) e il *Binet Staging System for CLL* (81) (tabella I). Entrambi i sistemi si basano solamente sull'obiettività e sugli esami di laboratorio. La stadiazione di Rai è stata modificata in modo da ridurre la stratificazione dei pazienti da cinque (0, I, II, III, IV) a tre gruppi prognostici (*Low*, *Intermediate* e *High Risk*), così da uniformarli ai gruppi della stadiazione di Binet (82).

La stadiazione di Binet consiste nella valutazione della presenza di anemia, trombocitopenia, organomegalia (milza e/o fegato palpabili) e del numero di stazioni linfoidi coinvolte, definite da linfonodi con un diametro \geq di 1 cm. Le aree considerate sono:

- linfonodi di testa e collo, incluso l'anello del Waldayer;

- linfonodi ascellari, il cui coinvolgimento bilaterale conta comunque come singola area;
- linfonodi inguinali, il cui coinvolgimento bilaterale conta comunque come singola area.

Tabella I. Sistemi stadiativi della LLC e sopravvivenza globale.

	STADIO	PARAMETRI CONSIDERATI	SOPRAVVIVENZA (anni)
RAI STAGING SYSTEM			
<i>Low risk</i>	0	Linfocitosi periferica ($\geq 15.000/\mu\text{L}$) e/o midollare (linfociti $\geq 40\%$)	14,5
<i>Intermediate risk</i>	I	Linfocitosi periferica ($\geq 15.000/\mu\text{L}$) e/o midollare (linfociti $\geq 40\%$) e linfadenopatie in qualunque stazione linfonodale	7,5
	II	Linfocitosi periferica ($\geq 15.000/\mu\text{L}$) e/o midollare (linfociti $\geq 40\%$) ed epato/splenomegalia	
<i>High risk</i>	III	Linfocitosi periferica ($\geq 15.000/\mu\text{L}$) e/o midollare (linfociti $\geq 30\%$) e Hb < 11g/dL correlata alla malattia	2,5
	IV	Linfocitosi periferica ($\geq 15.000/\mu\text{L}$) e/o midollare (linfociti $\geq 40\%$) e PLT < 100.000/ μL correlata alla malattia	
BINET STAGING SYSTEM			
<i>Low risk</i>	A	Hb > 10 g/dL, PLT > 100.000/ μL e fino a due aree linfonodali coinvolte	14
<i>Intermediate risk</i>	B	Hb > 10 g/dL, PLT > 100.000/ μL e tre o più aree linfonodali coinvolte	5
<i>High risk</i>	C	Hb < 10g/dl e/o PLT < 100.000/ μL	2,5

Hb: Emoglobina, PLT: piastrine.

Considerata l'evoluzione della letteratura scientifica riguardante la biologia della LLC, sono emerse sottocategorie di pazienti che godono di buona prognosi nonostante l'appartenenza a classi avanzate delle stadiazioni di Rai e Binet. Pertanto, recentemente, queste stadiazioni sono state integrate con altre informazioni, quali lo stato mutazionale IGHV, i livelli sierici di β 2-microglobulina e la presenza di delezione del cromosoma 17 e/o mutazioni a carico di *TP53*. Questi nuovi parametri sono stati combinati in uno score prognostico, il CLL-IPI (*CLL-International Prognostic Index*) (83) (tabella II).

Tabella II. CLL-IPI e overall survival (OS) a cinque anni.

PARAMETRO	CUT-OFF	PUNTEGGIO
Età	>65 anni	1
Stadio clinico	Binet B-C o Rai I-IV	1
del(17p) e/o mutazione <i>TP53</i>	Deleto e/o mutato	4
Stato mutazionale IGHV	Non mutato	2
β 2-microglobulina	>3,5 mg/L	2
PUNTEGGIO	CATEGORIA DI RISCHIO	OS (95% CI)
0-1	Basso	93,2% (90,5-96,0)
2-3	Intermedio	79,3% (75,5-83,2)
4-6	Elevato	63,3% (57,9-68,8)
7-10	Molto elevato	23,3% (12,5-34,1)

del(17p): delezione del braccio corto del cromosoma 17, OS: Overall survival, CI: Intervallo di confidenza.

1.9 TRATTAMENTO

1.9.1 INDICAZIONI AL TRATTAMENTO

Considerata l'eterogeneità clinica e biologica della LLC, non tutti i pazienti affetti necessitano di trattamento. Una metanalisi di diversi importanti *trial* (84), infatti, ha dimostrato come il trattamento dei pazienti con malattia in fase iniziale non modifichi la sopravvivenza dei pazienti, nonostante ne riduca lievemente il tasso

di progressione, rispetto ad un approccio di tipo “*watch and wait*”. Risulta quindi inappropriato esporre il paziente asintomatico e in stadio iniziale secondo Rai e Binet alle complicanze del trattamento, senza che questo possa esitare in un effettivo vantaggio per lo stesso, a fronte di una probabilità di rimanere asintomatici e con malattia stabile con la sola osservazione per anni.

Per questo motivo, le linee guida iwCLL (74) suggeriscono di intraprendere un trattamento solo quando la malattia si presenti attiva, sintomatica o in progressione, secondo i criteri che figurano in tabella III.

Tabella III. Definizione di malattia attiva o sintomatica secondo le linee guida iwCLL.

Malattia attiva o sintomatica	Hb < 10g/dL o PLT < 100x10 ⁹ /L per insufficienza midollare
	Splenomegalia massiva (sporgenza ≥6 cm dal margine costale di sinistra), progressiva o sintomatica
	Linfoadenomegalie massive (≥10 cm), progressive o sintomatiche
	Linfocitosi progressiva con aumento ≥50% in due mesi o un tempo di raddoppiamento linfocitario (LDT) inferiore a sei mesi
	AIHA o ITP resistenti ai corticosteroidi
	Coinvolgimento extranodale sintomatico o funzionale (cute, rene, polmone, colonna, etc.)
	Sintomi B o fatigue

È importante sottolineare che il numero assoluto di linfociti (a differenza del loro aumento progressivo) non costituisce un’indicazione al trattamento, dal momento che la leucostasi è un evento raro in pazienti con LLC (74).

Hb: Emoglobina, PLT: Piastrine, LDT: Tempo di raddoppiamento linfocitario, AIHA: Anemia Emolitica Autoimmune, ITP: Trombocitopenia Autoimmune.

È stato elaborato un algoritmo, l’*International Prognostic Score for Early-stage CLL* (IPS-E), (85) per predire il tempo di primo trattamento nei pazienti con LLC in stadio iniziale e asintomatici; esso considera tre parametri (lo stato U-IGHV, la presenza di linfonodi palpabili e il valore linfocitario assoluto >15x10⁹/L) e genera un rischio cumulativo a 5 anni di iniziare il trattamento per diverse categorie di pazienti.

1.9.2 PANORAMICA SULLE OPZIONI TERAPEUTICHE PER LA LLC

Il numero di opzioni terapeutiche disponibili nel trattamento della LLC è incredibilmente aumentato negli ultimi decenni, dal momento che alla

chemioterapia tradizionale si sono affiancati dapprima l'immunoterapia, gli agenti immunomodulanti e, successivamente, gli inibitori del *signaling* (anti-BTK, anti-PI3K) e i farmaci anti-BCL2.

La monoterapia con clorambucile, agente alchilante, ha rappresentato lo standard di cura per molti anni, in virtù della scarsa tossicità ad esso associata e della possibilità di assunzione per via orale. La principale criticità del farmaco consiste, però, nella limitatissima capacità che questo ha di indurre remissioni complete; l'utilizzo attuale è quindi riservato solamente a pazienti *frail*, che necessitano di una terapia palliativa e a scarsa tossicità (2).

In passato, la monoterapia con analoghi purinici (fludarabina, pentostatina o cladribina) ha dimostrato maggior efficacia rispetto agli agenti alchilanti nell'ottenere remissioni complete, senza però tradursi in un vantaggio di sopravvivenza (86).

Migliori risultati sono invece stati ottenuti utilizzando agenti alchilanti e analoghi purinici in combinazione; in particolare, il regime fludarabina+ciclofosfamide (FC) si è rivelato più efficace della sola fludarabina nell'ottenere una risposta e nel migliorare la OS (87–89).

La bendamustina è un chemioterapico con azione alchilante e con capacità di agire da analogo purinico. *Trial* clinici hanno dimostrato la capacità del farmaco di ottenere una maggior quota di risposta e una migliore PFS rispetto al clorambucile, a scapito di una maggior tossicità (90).

Lo sviluppo di anticorpi monoclonali anti-CD20 (proteina di superficie espressa dai linfociti B maturi a funziona ignota (91)), che hanno come capostipite rituximab, ha rappresentato un'importante svolta nella terapia della LLC, specie quando questi vengono utilizzati in combinazione ad altri farmaci. Protocolli di chemioimmunoterapia costituiti da rituximab combinato ad agenti chemioterapici riescono ad ottenere una maggior quota di risposte totali e una miglior sopravvivenza globale rispetto alla sola chemioterapia, lasciando supporre un effetto sinergico fra chemio- e immunoterapia (2). In particolare, nel *trial* clinico CLL8 (92) si è valutata l'efficacia della combinazione di rituximab e FC (FCR) rispetto alla sola FC, dimostrando come l'aggiunta di rituximab consenta di ottenere una maggior quota di risposte globali (92,8% contro 85,4%), di risposte

complete (44,5% contro 22,9%), di uMRD e un miglioramento della PFS. Altra combinazione chemioimmunoterapica che veniva utilizzata è bendamustina+rituximab (BR), che è stata rapportata a FCR nel *trial* clinico CLL10 (93,94). La combinazione si è mostrata meno efficace nell'ottenere remissioni complete, ma ha anche presentato una minor tossicità, diventando così una solida alternativa per il trattamento di pazienti incapaci di tollerare FCR.

Dopo rituximab sono stati introdotti altre molecole anti-CD20: ofatumumab possiede maggior affinità di legame, una simile capacità di indurre citotossicità mediata da anticorpi (ADCC) e una maggiore citotossicità complemento-dipendente (CDC); obinutuzumab è un anticorpo glico-ingegnerizzato di tipo 2 che, rispetto a rituximab, mostra maggior affinità al CD20, un'aumentata attività ADCC, una minore attività CDC e una maggior capacità di indurre direttamente morte cellulare (95).

Alemtuzumab è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro CD52, glicoproteina di membrana espressa dai linfociti maturi, che si è dimostrato efficace anche nel trattamento di pazienti con malattia recidivata o con aberrazioni di *TP53* (96,97). Il farmaco è stato ritirato nel 2012 a causa dei gravi effetti collaterali.

La lenalidomide è un farmaco ad azione immunomodulante utilizzato per diverse emopatie. Essa è capace di aumentare l'immunogenicità delle cellule leucemiche, di inibire l'angiogenesi e più in generale di modulare il microambiente tumorale e ha mostrato una discreta efficacia nel trattamento della LLC ad alto rischio, soprattutto come mantenimento. Nel 58% dei pazienti con LLC la lenalidomide causa la cosiddetta "*tumor flare reaction*", cioè una sensazione di calore e bruciore nelle stazioni linfonodali (98).

L'allograft di cellule staminali ematopoietiche resta l'unico approccio con una dimostrata, benché minima, possibilità curativa. Il trapianto è da riservare a pazienti selezionati, in buone condizioni generali e con malattia ad alto rischio biologico, dopo il fallimento dei nuovi farmaci (2).

La terapia con cellule T con recettore chimerico (CAR-T) dirette contro il CD19 espresso dai linfociti B è ancora in corso di studio, nel contesto della malattia recidivata/refrattaria. I risultati (99) sembrano essere promettenti, nonostante la

terapia cellulare sia associata a diverse complicanze severe, come la sindrome da rilascio citochinico ed eventi neurologici.

1.9.3 INIBITORI DI BTK

Gli inibitori di BTK si dividono in irreversibili o covalenti (ibrutinib, acalabrutinib e zanubrutinib) e reversibili o non covalenti (pirtobrutinib).

Ibrutinib è stato il primo inibitore di BTK ad essere introdotto. Dopo la somministrazione del principio attivo si verifica una rapida riduzione volumetrica delle linfadenopatie e delle organomegalie e una linfocitosi da mobilitazione, che si risolve con il prosieguo della terapia.

La terapia continuativa con ibrutinib fino a intolleranza o progressione ha mostrato una PFS a 7 anni del 59% quando utilizzato in prima linea nel *trial* RESONATE-2 (100) condotto in pazienti senza del(17p); nel *follow-up*, i risultati di ibrutinib sono stati nettamente superiori se comparati a quelli del clorambucile e il beneficio atteso sulla PFS è stato ottenuto in tutti i sottogruppi di malattia ad alto rischio biologico considerati, spiccatamente nei pazienti con del(11q).

In uno studio clinico (101) condotto su pazienti con aberrazioni di *TP53*, ibrutinib in prima linea si è dimostrato in grado di indurre risposte durevoli, nonostante i tassi di uMRD siano stati molto rari.

Nell'ambito della malattia recidivata/refrattaria, ibrutinib è stato comparato ad ofatumumab nel *trial* RESONATE (102). Con un *follow-up* globale di 74 mesi, lo studio ha evidenziato come il braccio ibrutinib abbia raggiunto risultati significativamente migliori rispetto al braccio trattato con ofatumumab (PFS 44,1 mesi e 8,1 mesi, rispettivamente). La superiorità di ibrutinib è risultata evidente anche nei pazienti con malattia ad alto rischio genetico, compresi coloro con aberrazioni di *TP53*.

Per quanto riguarda le terapie di combinazione, lo studio iLLUMINATE (103) ha comparato l'utilizzo di ibrutinib+obinutuzumab rispetto a clorambucile+obinutuzumab in prima linea: con un tempo mediano di *follow-up* di 45 mesi, lo studio ha mostrato una PFS a 42 mesi per il gruppo trattato con ibrutinib+obinutuzumab del 74% e una PFS a 42 mesi per il gruppo trattato con clorambucile+obinutuzumab del 33%; la PFS mediana non è stata raggiunta nel primo gruppo, mentre nel secondo è stata di 22 mesi e i tassi di uMRD sono stati

sensibilmente più elevati nel primo gruppo (38%) rispetto al secondo (25%). I risultati nel braccio ibrutinib+obinutuzumab sono stati eccellenti anche in pazienti con malattia ad alto rischio genetico.

Il *trial* Alliance A041202 (104) ha comparato regimi contenenti ibrutinib (in monoterapia o in associazione a rituximab) rispetto alla combinazione chemioimmunoterapica bendamustina+rituximab (BR) in pazienti naïve. Il *trial* è stato decisivo soprattutto per valutare quale fosse l'effetto dell'aggiunta di rituximab ad ibrutinib in monoterapia: a 2 anni, le PFS nel braccio ibrutinib (87%) e nel braccio ibrutinib+rituximab (88%) sono apparse sovrapponibili e superiori a quelle ottenute con BR, così come le OS. Nonostante questo, i regimi *chemo-free* hanno registrato un limitato tasso di uMRD, supportando l'idea che per mantenere dei benefici sul controllo di malattia il trattamento con ibrutinib debba essere continuativo.

Gli effetti avversi più comuni della terapia con ibrutinib sono in genere lievi e transitori, ma sono un'importante causa di sospensione della terapia:

- Sanguinamenti. Il farmaco, per effetti *off-target*, (105) inibisce l'aggregazione piastrinica e l'adesione mediata dal fattore di Von Willebrand, causando sanguinamenti lievi (petecchie o ecchimosi) in circa la metà dei pazienti, mentre sanguinamenti più severi sono generalmente associati all'uso concomitante di anticoagulanti/antiaggreganti e sono più rari. In ogni caso, per questi motivi, è necessario prestare attenzione nel somministrare ibrutinib a pazienti in terapia antiaggregante/anticoagulante ed è consigliato interrompere la somministrazione del principio attivo in vista di manovre che possono aumentare il rischio di sanguinamento.
- Fibrillazione atriale (FA). Una metanalisi ha evidenziato un'incidenza di FA di qualsiasi grado di quasi nove volte superiore rispetto alle altre terapie e oltre tre volte superiore per quelle di grado elevato (106). Dato che la FA da ibrutinib tipicamente si presenta nei primi due anni di trattamento, è consigliabile effettuare ECG di controllo mensili o bimestrali per i primi sei mesi di terapia e semestrali a seguire (107). Tra gli anticoagulanti per il trattamento della FA sono da preferire i nuovi anticoagulanti orali, avendo particolare riguardo verso le interazioni

farmacocinetiche con ibrutinib (108). Nel prescrivere un eventuale presidio antiaritmico bisogna considerare che amiodarone, propafenone, verapamil e diltiazem sono metabolizzati dal CYP3A4, lo stesso citocromo che metabolizza Ibrutinib e gli anticoagulanti: ciò può causare un aumento della loro concentrazione plasmatica, con il rischio di peggiorare la FA o il rischio di sanguinamento (108).

- Ipertensione.
- Infezioni.
- Diarrea.
- Artralgie.
- Rash.
- Citopenie.

Circa il 40% dei pazienti interrompe il trattamento con ibrutinib: di questi, circa il 50-60% per tossicità, più del 20% per progressione di malattia e il resto per eventi non correlati alla stessa (109). L'interruzione per tossicità sembra manifestarsi nelle fasi iniziali della terapia, mentre quella per progressione interessa fasi più avanzate di trattamento, per lo sviluppo di mutazioni che conferiscono farmacoresistenza, come quelle di BTK o di PLCG2 (fosfolipasi C gamma 2) (110).

Acalabrutinib è un inibitore di BTK di seconda generazione che si è dimostrato non inferiore rispetto ad ibrutinib nello studio di fase III ELEVATE R/R (111), dove ha registrato anche una minore incidenza di fibrillazione/flutter atriale, ipertensione ed emorragie, lasciando supporre che il nuovo farmaco abbia un profilo di tossicità migliore rispetto ad ibrutinib. La riduzione del rischio emorragico sembra essere dovuta alla maggior specificità di legame del farmaco, che permette di evitare che questo legghi altre molecole, fra cui la TEC-chinasi, che coadiuva l'aggregazione piastrinica (112).

Zanubrutinib è un inibitore di BTK di seconda generazione che è stato sviluppato in modo da possedere maggior specificità e maggior tempo di legame alla chinasi rispetto ad ibrutinib, così da ottenere meno collateralità *off-target* e un effetto più sostenuto. Il principio attivo è stato comparato ad ibrutinib nella malattia recidivata/refrattaria nello studio multicentrico di fase III ALPINE (113), dove

zanubrutinib ha mostrato migliori tassi di risposta globale (83,5% contro 74,2%), di PFS a 24 mesi (78,4% contro 65,9%) e anche un miglior profilo di sicurezza rispetto al controllo.

Pirtobrutinib è un inibitore altamente selettivo e non covalente di BTK valutato anche su 121 pazienti che avevano interrotto il trattamento con un altro inibitore di BTK per intolleranza o per insorgenza di resistenza al farmaco (114). Il tasso di risposta globale ottenuto è stato del 62% e questo suggerisce come gli inibitori reversibili di BTK potrebbero rappresentare, in futuro, delle preziose armi da utilizzare in pazienti costretti a sospendere il trattamento con altri BTK-inibitori per tossicità o per sviluppo di mutazioni farmaco-resistenti. Infatti, la resistenza a pirtobrutinib si sviluppa per mutazioni di PLCG2 o per mutazioni non-C481S di BTK (115).

1.9.4 INIBITORI DELLA FOSFATIDILINOSITOLO-3-CHINASI (PI3K)

Idelalisib è stato il primo farmaco orale inibitore dell'isoforma δ (espressa selettivamente dalle cellule della filiera ematopoietica) di PI3K ad essere sviluppato: esso è in grado di inibire il segnale del BCR, di modulare le interazioni con il microambiente tumorale e di indurre l'apoptosi delle cellule leucemiche (116). Il farmaco è stato testato in un *trial* clinico (117) includente 54 pazienti con LLC recidivata/refrattaria e caratteristiche sfavorevoli (con linfadenopatia *bulky*, pesantemente pretrattati o con biologia sfavorevole); la risposta globale è stata del 72% e la PFS mediana di 15,8 mesi. Il principio attivo è stato testato anche in combinazione con rituximab nel *trial* Study 116 (118), che ha mostrato la superiorità della combinazione nell'ottenere una risposta terapeutica rispetto al solo rituximab (81% contro 13%) e un tasso di OS migliore (92% contro 80% a un anno), nonostante sia stata registrata una maggior incidenza di effetti avversi gravi. Tale studio ha portato all'approvazione di idelalisib per la LLC refrattaria/recidivata.

Idelalisib è associato ad alcuni effetti collaterali, talvolta severi, quali coliti, polmoniti non infettive e transaminiti (aumenti di ALT e AST solitamente reversibili). A queste reazioni sembra sottendere una genesi immuno-mediata, come supportato dalla presenza di un infiltrato di linfociti citotossici nei tessuti colpiti e dai benefici ottenibili con la sospensione del trattamento e con l'utilizzo

di corticosteroidi (119). Il trattamento con idelalisib è inoltre comunemente associato a infezioni, in particolare polmoniti, anche da germi inusuali, come *Pneumocystis jirovecii* e riattivazioni di CMV.

Duvelisib è un inibitore di PI3K che agisce sia su PI3K δ che su PI3K γ ed è approvato per il trattamento della LLC pretrattata almeno per due volte. Lo studio che ne ha permesso l'approvazione è il *trial* DUO (120): svolto su 319 pazienti con malattia recidivata/refrattaria, lo studio ha comparato duvelisib con ofatumumab, mostrando un profilo di rischio simile a quello di idelalisib e una maggior efficacia in termini di PFS mediana rispetto al controllo (13,3 mesi contro 9).

Umbralisib è un doppio inibitore di PI3K δ e CK1 ϵ che sembra mostrare effetti collaterali simili ai farmaci presentati precedentemente, ma una minor insorgenza di coliti e di transaminiti (121).

1.9.5 INIBITORI DI BCL-2

Venetoclax è un principio attivo somministrabile per via orale che, fungendo da BH3-mimetico, inibisce BCL-2, proteina anti-apoptotica iperespressa nelle cellule leucemiche.

Venetoclax è in grado di indurre un elevato tasso di risposte globali (122) in pazienti refrattari/recidivati, anche in presenza di fattori di rischio genetici. Infatti, in uno studio (123) condotto su 107 pazienti con malattia recidivata/refrattaria e del(17p), il tasso di risposta è stato del 79,4% dei pazienti ad un anno.

Anche le combinazioni di venetoclax con altri principi attivi hanno mostrato ottimi tassi di risposta e di sopravvivenza; ad esempio, venetoclax+rituximab (R-Ven) è stato comparato a rituximab+bendamustina (BR) nel *trial* clinico MURANO in pazienti con malattia recidivata/refrattaria (124). Nell'update del *follow-up* a 5 anni, la prima combinazione si è dimostrata più efficace della seconda dal punto di vista della PFS mediana (53,6 mesi contro 17), della OS (82,1% contro 62,2%) e del tasso di uMRD in tutti i sottogruppi biologici di malattia analizzati. I dati della PFS sono stati i più alti mai registrati per una chemioimmunoterapia nella malattia recidivata/refrattaria. I dati mostrano che una volta raggiunta la uMRD, tale stato possa mantenersi a lungo anche dopo la sospensione del trattamento: ciò rappresenterebbe una differenza considerevole

rispetto ad altri agenti selettivi che impongono, invece, l'utilizzo di una terapia continuativa.

CLL14 (125) è un *trial* clinico di fase tre che ha comparato la combinazione venetoclax-obinutuzumab (Ven-G) a clorambucile-obinutuzumab (G-Chl). Dopo un *follow-up* mediano di 65,4 mesi, la PFS è risultata significativamente superiore nel braccio Ven-G (62.6%) rispetto al braccio G-Chl (27%). Il beneficio è stato osservato anche in pazienti con delezione e/o mutazione di *TP53* e in pazienti con U-IGHV. Nello stesso *trial* è emerso anche che la combinazione Ven-G è in grado di indurre risposte profonde e più durature dal punto di vista della MRD rispetto alla combinazione G-Chl.

I principali effetti collaterali descritti in letteratura sono le citopenie, di cui soprattutto neutropenie di grado anche severo, infezioni, nausea, diarrea e sindrome da lisi tumorale, che colpisce soprattutto pazienti con importante *burden* tumorale e funzionalità renale compromessa; la prevenzione di quest'ultima condizione viene effettuata con adeguata idratazione, farmaci ipouricemizzanti e attuando una graduale *dose-escalation* sino a giungere alla dose di 400 mg/die.

La comparsa di resistenza al farmaco sembra essere causata dalla comparsa di mutazioni a carico di BCL-2, in particolare dalla sostituzione della glicina in posizione 101 con una valina, che riduce l'affinità del farmaco alla proteina (126).

1.9.6 INQUADRAMENTO DEL PAZIENTE DA TRATTARE

Gli aspetti che bisogna considerare nell'impostare la terapia di un paziente con LLC sono diversi:

- l'età (>/< 65-70 anni) e le condizioni cliniche generali del paziente. A tal fine sono stati sviluppati indici di stima delle comorbidità del paziente, come il CIRS (*Cumulative Illness Rating Scale*) (127,128). Particolare attenzione deve essere posta alla funzionalità renale e, qualora la clearance della creatinina risulti <70mL/min, è importante essere cauti nell'utilizzo dei chemioterapici. Pazienti con funzione renale normale e CIRS minore o uguale a 6 vengono definiti "*fit*", altrimenti "*unfit*" (129);
- le caratteristiche biologiche della malattia. È stato dimostrato che in presenza di aberrazioni di *TP53* gli approcci chemioimmunoterapici sono poco efficaci (88,130), mentre gli stessi possono indurre lunghi intervalli di remissione

in altri sottogruppi biologici di malattia, come in pazienti con stato M-IGHV;

- la linea di trattamento;
- gli effetti collaterali di classe dei vari presidi terapeutici;
- la preferenza del paziente verso regimi a durata fissa o continuativi;
- la finalità del trattamento. Ad esempio, in pazienti anziani e fragili, il trattamento non deve mirare all'eradicazione della malattia, ma all'induzione di una remissione stabile e quindi a una buona qualità di vita (127).

1.9.7 TERAPIE DI PRIMA LINEA

Fino a qualche anno fa, il paziente con CIRS minore di 6 e funzionalità renale conservata era candidato a 6 cicli di FCR (BR se >65 anni), potendo la chemioimmunoterapia ottenere una PFS di oltre 10 anni nei pazienti con stato M-IGHV e in assenza di anomalie di *TP53* o delezione 11q (131). In ogni caso, la terapia con farmaci biologici, come quella continuativa con inibitori di BTK (132) o quella a durata fissa con venetoclax-obinutuzumab (133) o venetoclax-ibrutinib (134) è risultata superiore alla chemioimmunoterapia con FCR/G-Chl. Nei pazienti con del(13q) e/o M-IGHV è da favorire la terapia a durata fissa.

I pazienti con anomalie di *TP53* solitamente rispondono in maniera limitata a regimi chemioimmunoterapici (130). In virtù di questo, trattamenti a base di inibitori covalenti di BTK (ibrutinib/acalabrutinib) in monoterapia o di venetoclax in continuativo sono indicati in prima linea in tutti i pazienti con anomalie di *TP53*, indipendentemente dalla fitness e dallo stato mutazionale IGHV.

La figura 4 fornisce indicazioni circa l'approccio suggerito da adottare nella scelta della terapia di prima linea della LLC.

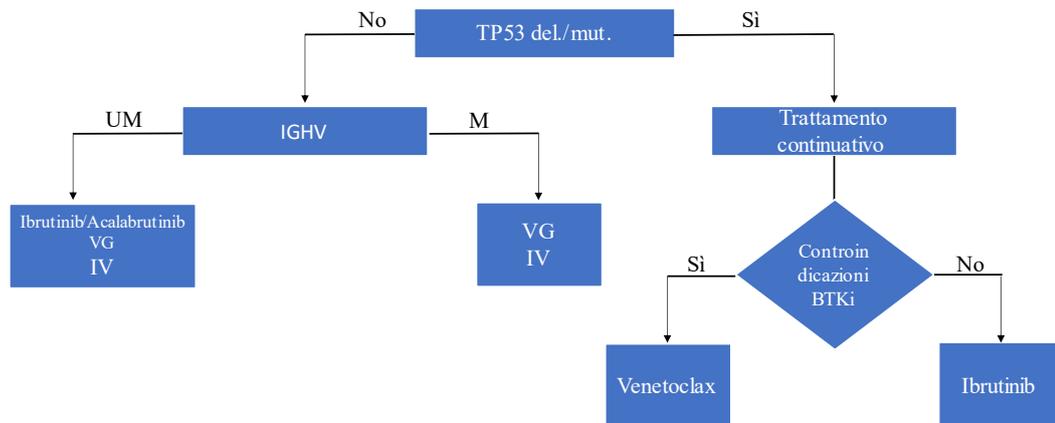


Figura 4. Algoritmo terapeutico per il trattamento di prima linea della LLC.

del/mut: deleto/mutato, IGHV: Regione variabile delle catene pesante delle immunoglobuline, UM: non mutata, M: mutata.

VG: Venetoclax-obinutuzumab, IV: Ibrutinib-venetoclax, BTKi: inibitori della tirosina chinasi di Bruton.

1.9.8 TERAPIE DI SECONDA LINEA E LINEE SUCCESSIVE

Nel contesto di malattia recidivata o refrattaria è fondamentale la rivalutazione della biologia della malattia attraverso FISH, cariotipo e stato mutazionale di *TP53*. Come regola generale, la terapia di prima linea potrebbe essere riproposta se il *time-to-retreatment* è superiore alla durata della stessa. L'uso ripetuto della chemioimmunoterapia non è raccomandato.

In questo contesto sono particolarmente indicati gli inibitori del *signaling* del BCR o venetoclax, in monoterapia o in associazione a rituximab, considerando quale terapia è stata intrapresa in prima linea.

Pazienti con meno di 65-70 anni in buone condizioni generali e con malattia biologicamente aggressiva o refrattaria dovrebbero essere studiati per valutare un percorso trapiantologico dopo il fallimento di terapie target (135), nel momento in cui la LLC è in remissione parziale o completa.

1.9.9 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO

Le linee guida dell'iwCLL (74) forniscono indicazioni circa le indagini consigliate da effettuare per la valutazione della risposta al trattamento (tabella IV).

Il timing della valutazione per le terapie con una durata definita, come quelle chemioimmunoterapiche, dovrebbe essere almeno due mesi dopo il completamento delle stesse. Per le terapie continuative o con una fase di

mantenimento, la valutazione dovrebbe avvenire almeno due mesi dopo che il paziente raggiunga la sua massima risposta, definita come la fase del trattamento in cui per due mesi non si evidenzia più alcun miglioramento, o a *timepoint* terapia-specifici. Per quanto riguarda i *trial* clinici, chiaramente, le indicazioni saranno dettate dal disegno dei singoli studi.

Tabella IV. Indagini raccomandate per la valutazione della risposta alla terapia.

Valutazione	Pratica clinica	Trial clinico
Obiettività	Sempre	Sempre
Emocromo con formula leucocitaria	Sempre	Sempre
Aspirato/biopsia midollare	Se sussiste citopenia da inquadrare	Se sussiste citopenia da inquadrare o alla CR
Valutazione MRD	Non generalmente indicata	Desiderabile
Ecografia addominale	Possibile	Non generalmente indicata
TC di torace, addome, pelvi	Non generalmente indicata	Raccomandata se precedentemente anormale oppure alla CR/PR

MRD: Malattia residua misurabile, TC: Tomografia computerizzata, CR: Risposta completa, PR: Risposta parziale.

Verranno analizzati due gruppi di parametri (tabella V): i parametri del gruppo A valutano lo status del tessuto linfoide e i sintomi costituzionali, mentre i parametri del gruppo B valutano lo status del tessuto emopoietico, potendo così definire la profondità della risposta.

Tabella V. Definizione della risposta al trattamento.

Gruppo	Parametro	CR	PR	PD	SD
A	Linfonodi	Nessuno $\geq 1,5$ cm	Riduzione di più del 50% dal <i>baseline</i> *	Incremento di più del 50% dal <i>baseline</i> o dall'ultima risposta	Modifiche dal -49% al +49%
	Dimensione di fegato e milza	Milza < 13 cm; Fegato di normali dimensioni	Riduzione di più del 50% dal <i>baseline</i>	Incremento di più del 50% dal <i>baseline</i> o dall'ultima risposta	Modifiche dal -49% al +49%
	Sintomi costituzionali	Nessuno	Qualunque	Qualunque	Qualunque
	Conteggio linfociti circolanti	Normale	Riduzione di più del 50% dal <i>baseline</i>	Incremento di più del 50% dal <i>baseline</i> con almeno $5 \times 10^9/L$ linfociti B	Modifiche dal -49% al +49%
B	PLT	$\geq 100 \times 10^9/L$	$\geq 100 \times 10^9/L$ o incremento di più del 50% dal <i>baseline</i>	Riduzione di più del 50% dal <i>baseline</i> per la LLC	Modifiche dal -49% al +49%
	Hb	>11 g/dL senza supporti	>11 g/dL o incremento di più del 50% dal <i>baseline</i>	Riduzione di più di 2 g/dL dal <i>baseline</i> per la LLC	Hb in aumento ma <11 g/dL o di meno del 50% dal <i>baseline</i> o decremento < 2 g/dL
	Midollo osseo**	Normocellulato, senza cellule di	Presenza di cellule LLC o	Incremento delle cellule	Nessun cambiamento

		LLC o noduli linfoidi	noduli linfoidi o mancata esecuzione dell'esame in <i>trial</i> clinico	LLC di più del 50%	nell'infiltrato midollare
--	--	-----------------------	---	--------------------	---------------------------

CR: Remissione/Risposta completa (devono essere verificati tutti i criteri); **PR: Remissione/Risposta parziale** (almeno due criteri del gruppo A e un criterio del gruppo B devono migliorare, se precedentemente anormali. Se solo un parametro per gruppo era anormale, è necessario che migliori solamente uno dei due); **PD: Malattia progressiva** (almeno un criterio del gruppo A o del gruppo B, esclusi i sintomi costituzionali isolati. Anche la trasformazione di Richter è considerata PD); **SD: Malattia stabile** (tutti i criteri). *somma dei prodotti dei linfonodi selezionati al baseline e somma dei diametri maggiori dei linfonodi selezionati al baseline. **La valutazione midollare nella pratica clinica è a discrezione del clinico.

Hb: Emoglobina, PLT: Piastrine, LLC: Leucemia linfatica cronica.

Qualsiasi risposta che non sia una CR o una PR (SD, PD, non risposta, morte per qualunque causa) viene definita fallimento terapeutico (*treatment failure*).

Si definisce malattia recidivata la condizione in cui viene documentata evidenza di progressione di malattia in un paziente che aveva mantenuto una CR o una PR per almeno sei mesi; al contrario, la malattia refrattaria viene definita come fallimento terapeutico o progressione entro sei mesi dall'ultima dose di farmaco assunta.

1.10 MALATTIA RESIDUA MISURABILE/MINIMA (MRD)

1.10.1 DEFINIZIONE

La Malattia Residua Misurabile, prima definita "Malattia Minima Residua" (136) o MRD è una misura oggettiva del carico di malattia e della profondità della risposta al trattamento ad un livello cellulare o molecolare. Essa è definita dal numero di cloni leucemici rimanenti nel sangue periferico o nel midollo osseo, durante e/o alla fine del regime terapeutico intrapreso. Lo status MRD è da distinguersi dallo status della risposta clinica discusso nel paragrafo precedente, essendo la prima estremamente più accurata nel descrivere il *burden* tumorale.

La misurazione della MRD è ormai pratica consolidata nelle leucemie acute e in altre condizioni in cui il trattamento ha un intento curativo. Diversamente, nella LLC, il ruolo della MRD è cambiato nel corso degli anni, fino a riacquisire rilevanza scientifica con l'introduzione di terapie target che sono capaci di indurre una profonda risposta molecolare, come gli inibitori di Bcl-2.

1.10.2 NOMENCLATURA

Seguono le raccomandazioni dell'ISC (*International Steering Committee*) on *CLL-MRD* (136) per quanto riguarda la nomenclatura da utilizzare (tabella VI e VII).

Tabella VI. Nomenclatura suggerita dall'ISC on CLL-MRD.

<i>Detectable</i> -MRD (dMRD)	Indica che il residuo di malattia è al di sopra del <i>cut-off</i> prestabilito.
<i>Undetectable</i> -MRD (uMRD)	È un termine generale che rimpiazza il termine MRD- o MRD negativa nel descrivere l'inabilità di ritrovare malattia residua al di sotto di uno specifico <i>cut-off</i> .

Attualmente, le linee guida iwCLL e ERIC raccomandano di utilizzare l'MRD4 come *cut-off* di riferimento per definire l'uMRD.

dMRD: *detectable* MRD, uMRD: *undetectable* MRD, MRD: Malattia residua misurabile.

Tabella VII. Categorie uMRD.

Categorie uMRD	
MRD4	Valore MRD <0,01% cellule leucemiche o <1 cellula su 10 ⁴ .
MRD5	Valore MRD <0,001% cellule leucemiche o <1 cellula su 10 ⁵ .
MRD6	Valore MRD <0,0001% cellule leucemiche o <1 cellula su 10 ⁶ .

Le categorie uMRD specificano il limite superiore (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, etc.) utilizzato come *threshold* di detezione. Si parla, inoltre, di dMRD entro una specifica categoria MRD qualora il valore di malattia residua sia inferiore alla soglia prestabilita, ma superiore al successivo (es. dMRD4: < 0,01%/10⁻⁴, ma ≥0,001%/10⁻⁵). Si definisce, invece, uMRD, la condizione nella quale il valore MRD è sotto il *threshold* e il limite di detezione della metodica non ne permette la detezione ad una soglia successiva (es. uMRD4: < 0,01%, con una metodica che ha un limite di detezione che non raggiunge 0,001%/10⁻⁵).

1.10.3 METODICHE DI QUANTIFICAZIONE DELLA MRD E TESSUTI

Fra le metodiche utilizzabili per la valutazione della MRD si ricordano la Citofluorimetria a flusso multiparametrica, la RQ-PCR (*reverse-transcriptase quantitative real-time PCR* o RT-qPCR) e la NGS (*Next Generation Sequencing*).

Tali tecnologie sono state validate e standardizzate nel corso degli anni (137).

La citofluorimetria a flusso multiparametrica/multicolore permette di quantificare le cellule di LLC residue attraverso marcature immunofenotipiche ottenute dalla

combinazione di 4, 6, 8 o addirittura 10 anticorpi leganti dei fluorocromi. Le raccomandazioni ERIC (137) suggeriscono di utilizzare un pannello a sei marcatori (CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b e CD81).

La ASO (*Allele Specific Oligonucleotide*) è una metodica di RQ-PCR che utilizza un primer per una regione germ-line del gene IgH e una sequenza antisenso paziente-specifica per amplificare una regione target del DNA del clone cellulare ricercato. L'identificazione di quest'ultimo è resa possibile dal fatto che le cellule leucemiche clonali possiedono dei riarrangiamenti unici all'interno delle regioni ipervariabili dei geni codificanti per le immunoglobuline.

Metodiche di NGS o HTS (*High-Throughput Sequencing*) permettono di identificare le cellule residue amplificando tutta la sequenza VDJ del gene delle immunoglobuline di un campione di DNA e ricercando successivamente i campioni con una sequenza specifica per ogni clone della regione CDR3 (*Complementarity-Determining Region 3*).

Le principali caratteristiche delle metodiche sopra descritte sono riassunte nella tabella VIII.

Tabella VIII. Metodiche per la valutazione della MRD.

Metodica	Sensibilità	Vantaggi	Svantaggi
<i>4 colors-4/5 tubes</i>	MRD4	<ul style="list-style-type: none"> • Più economica e semplice • Rapida • Strumentazione più diffusa • Maggior quantità di dati pubblicati • Meglio standardizzata 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessità di utilizzare campioni prelevati da meno di 48h • Poco sensibile nel caso di fenotipi atipici, che richiederebbero il campionamento o pretrattamento
<i>6 colors-2 tubes</i>	MRD5	<ul style="list-style-type: none"> • La <i>6/8 colors-1 tube</i> è una metodica indipendente dai reagenti e dalle macchine utilizzate, permettendo di eliminare la variabilità inter-laboratorio 	
<i>6/8 colors-1 tube</i>	MRD5		

<i>Allele Specific Oligonucleotide (ASO)</i>	MRD4-MRD5	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilità di lavorare su campioni congelati 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Primer</i> paziente-specifici • Dipendente dalla quantità di DNA • Richiede laboratori di biologia molecolare
<i>High Throughput Sequencing (HTS o NGS)</i>	MRD6	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilità di lavorare su campioni congelati • Alta sensibilità • Può riconoscere più clonotipi contemporaneamente, permettendo lo studio di popolazioni subclonali. 	<ul style="list-style-type: none"> • Costosa • Richiede la conoscenza pre-trattamento della sequenza di DNA del CDR3. • Ancora poco standardizzata • Richiede laboratori specializzati

MRD4: Malattia residua misurabile considerando una soglia di 10^{-4} come soglia di rilevazione, MRD5: Malattia residua misurabile considerando una soglia di 10^{-5} come soglia di rilevazione, MRD6: Malattia residua misurabile considerando una soglia di 10^{-6} come soglia di rilevazione.

ASO: *Allele Specific Oligonucleotide*, HTS: *High Throughput Sequencing*, NGS: *Next Generation Sequencing*, CDR3: *Complementarity-Determining Region 3*.

La multicompartimentalità della LLC potrebbe generare risultati MRD discordanti fra sangue periferico (SP) e sangue midollare (SM). La concordanza fra i due tessuti è stimata essere di circa 85% a una soglia di 10^{-4} (136), ma è stato dimostrato anche che certi tipi di trattamento possono, per un effetto compartimentalizzante la malattia, aumentare la discrepanza fra SP e SM; ad esempio, il trattamento con Alemtuzumab ha una concordanza stimata del 48.6% (138), mentre il trattamento con Rituximab del 79% (139), con valori nel SP inferiori di 0.7 log rispetto ai valori midollari.

Fatte queste premesse, la letteratura è concorde nell'affermare che il solo risultato del SP risulta essere accurato nello stimare il *burden* tumorale nella maggior parte delle situazioni, ad eccezione di alcune terapie con anticorpi monoclonali, per cui è richiesta una conferma midollare. In ogni caso, nei *trial* clinici volti

all'eradicazione della malattia, sarebbe raccomandabile quantificare la MRD in entrambi i tessuti.

1.10.4 SIGNIFICATO DELLA MRD

Il ruolo che la quantificazione della MRD gioca nella pratica clinica è ciò che giustifica l'interesse in materia da parte della comunità scientifica.

I primi studi clinici (140,141) che contemplavano la valutazione MRD hanno evidenziato come il raggiungimento della uMRD correlasse, in regimi chemio-immunoterapici, con una migliore PFS e in alcuni casi anche con una migliore OS, suggerendo che essa fosse un'importante predittrice di sopravvivenza, oltre che un nuovo *goal* di trattamento. È stato dimostrato che la valutazione MRD è più accurata nello stabilire la prognosi dei pazienti rispetto alla valutazione standard della risposta come da linee guida iwCLL (142). Infatti, i pazienti che raggiungono la uMRD in risposta parziale (PR) hanno una PFS più lunga rispetto a pazienti in risposta completa (CR) ma con MRD ancora rilevabile. Inoltre, in letteratura è stato evidenziato che non è importante solo il raggiungimento della uMRD secondo la soglia di 10^{-4} , ma che anche la profondità dei valori MRD al di sotto di tale soglia risulta essere prognostica (143).

Attraverso la citofluorimetria su SP sono stati registrati tassi di uMRD in pazienti naïve trattati con FCR e BR del 56% e del 57,8%, rispettivamente (144,145). Boettcher et al. hanno invece analizzato i dati del *trial* CLL8, in cui i pazienti sono stati divisi sulla base dei risultati ottenuti su SP durante la terapia e al termine della stessa in MRD_{low/undetectable} ($<10^{-4}$), MRD_{intermediate} (10^{-4} - 10^{-2}) e MRD_{high} ($>10^{-2}$), e per tali sottogruppi è stata stimata una PFS mediana di 68,7%, 40,5% e 15,4%, rispettivamente (140).

Con l'introduzione dei BTK-inibitori, in grado di controllare la LLC in maniera eccellente, ma non di azzerare il carico di malattia in termini di MRD, il ruolo della stessa venne progressivamente ridimensionato. Numerosi studi hanno infatti mostrato che le terapie con ibrutinib mostrano bassi tassi di uMRD, specialmente in monoterapia (10.2%) (146).

Il valore della MRD è stato poi evidenziato nuovamente dall'immissione in clinica degli inibitori di Bcl-2, che sono in grado di indurre risposte profonde, sia in regimi di monoterapia, sia di terapia combinata. I risultati di una analisi *pooled*

(147) di pazienti arruolati in diversi *trial* clinici (figura 5) includenti *venetoclax* hanno mostrato un tasso globale di uMRD del 42% raggiunta con una mediana di 18 mesi ed è stato rilevato come lo status di *TP53* correlasse con la probabilità di ottenere una uMRD (123,148–151).

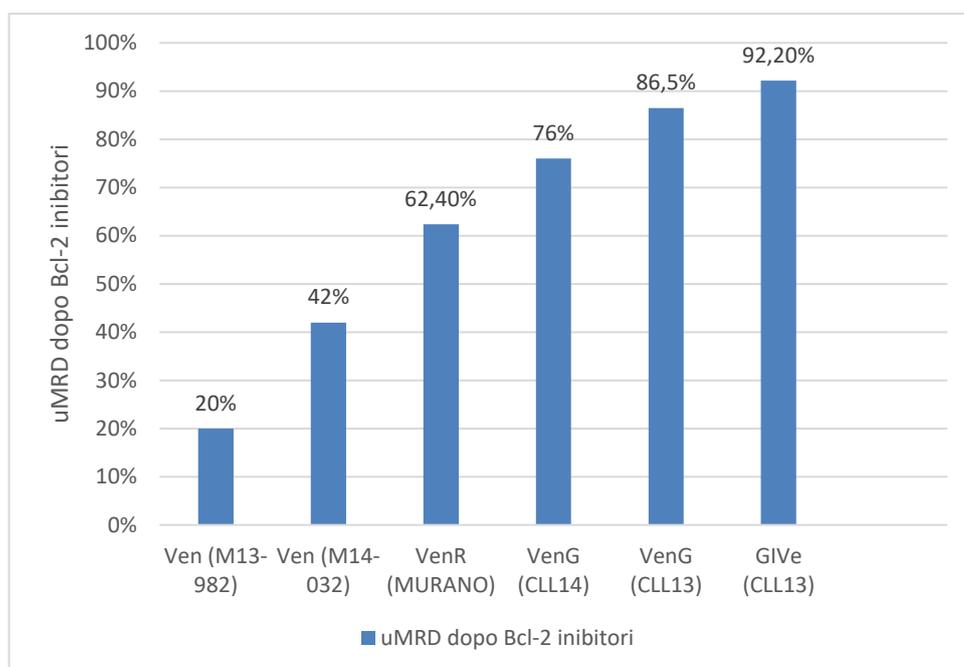


Figura 5. Tassi di uMRD in diversi trial includenti inibitori di Bcl-2. Il grafico esprime i tassi di uMRD riportati da vari *trial* clinici includenti Venetoclax. uMRD: Malattia residua misurabile *undetectable*, Ven: venetoclax, VenR: venetoclax-rituximab, VenG: venetoclax-obinutuzumab, GIVe: obinutuzumab-ibrutinib-venetoclax.

L'impatto del raggiungimento dello stato uMRD sulla sopravvivenza anche in terapie *chemo-free* è stato confermato da diversi *trial*, tra cui un'estensione del *follow-up* a 3 anni dal termine del trattamento (EOT) del protocollo MURANO (124), che ha valutato anche sottogruppi di pazienti con *marker* di malattia aggressiva e la cinetica della MRD a vari *time-point*. In questo *trial*, condotto in un setting di malattia recidivata/refrattaria, i pazienti del braccio VenR che avevano raggiunto la uMRD all'EOT hanno mostrato una PFS a 3 anni dopo l'EOT del 61,3%, superiore rispetto a quella del 40,7% raggiunta dai pazienti dMRD_{low} (10^{-4} - 10^{-2}), mentre tutti i pazienti con dMRD_{high} ($\geq 10^{-2}$) tranne uno hanno sviluppato una PD entro due anni dall'EOT. I dati riguardanti l'OS a 3 anni post-EOT sono stati concordi ai precedenti, con tassi di 95,3%, 91,3% e 72,9% nei

pazienti uMRD, dMRD_{low} e dMRD_{high}, rispettivamente. Dei pazienti uMRD, il 56,6% ha registrato una *MRD conversion* (definita come due rilevazioni MRD successive con valore $\geq 10^{-4}$ o evidenza di PD) con un tempo mediano di conversione dall'EOT di 19,4 mesi, mentre il 4,8% ha sviluppato una PD senza registrare precedentemente una conversione MRD; dei pazienti andati incontro a conversione, il 40,4% ha successivamente sviluppato una PD clinicamente evidente, con un tempo mediano dalla conversione alla PD di 25,2 mesi (figura 6), suggerendo come la recidiva MRD possa fungere da segnale anticipatore la recidiva clinica di malattia. I fattori di rischio di conversione MRD e di successiva PD sono risultati essere lo stato U-IGHV, la presenza di del(17p) o di un cariotipo complesso, mentre i pazienti privi di *biomarker* di malattia aggressiva sembrano avere più probabilità di mantenere lo status uMRD o di andare incontro a conversione senza che poi questa si traduca in un'effettiva PD.

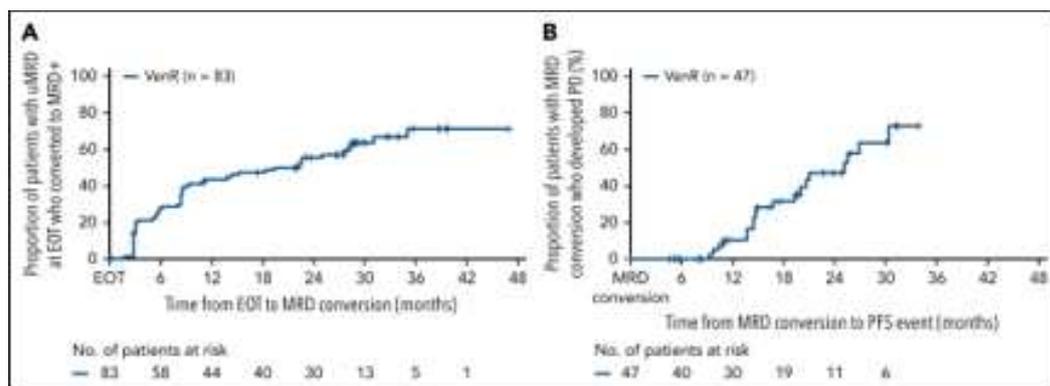


Figura 6. Curve Kaplan-Meier del braccio VenR nel *trial* MURANO rappresentanti le cinetiche della MRD. La curva Kaplan-Meier mostra il tempo dall'EOT alla *MRD conversion* (A) e dalla *MRD conversion* alla malattia progressiva (PD) (B). Adattata da John F. Seymour et al. (124)

Un approccio che è stato recentemente validato per predire la PFS e la OS dei pazienti con LLC in terapia è il CIRI (*Continuous Individualized Risk Index*), che combina il tipo di trattamento, il CLL-IPI e i valori MRD di fine trattamento e/o *ad interim* (152); questo, oltre ad aver dimostrato una migliore accuratezza prognostica rispetto al solo CLL-IPI, ha messo in luce come lo status MRD possa rappresentare un fattore dinamico che può modificare longitudinalmente la prognosi di pazienti in trattamento.

Infine, nonostante nella LLC il ruolo del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche sia limitato, è stato dimostrato che in questo contesto lo status MRD sia un importante determinante della prognosi e dell'attività di GVL (*Graft-Versus Leukemia*) (153).

1.10.5 TRATTAMENTO MRD-GUIDATO

La capacità che la quantificazione MRD ha di fungere da surrogato di recidiva biologica di malattia e di identificare sottogruppi di pazienti con malattia che potrebbe mantenersi stabile a lungo, specie se combinata alla valutazione di altri parametri, ha portato all'idea che essa possa indirizzare il management terapeutico dei pazienti con LLC, secondo quello che in letteratura viene definito *MRD-guided treatment*. Nonostante quest'approccio sia ancora agli albori e necessiti di più dati per essere validato, il *trial* CAPTIVATE (154) ne fornisce un valido esempio. Nel *trial* è stata valutata l'interruzione del trattamento con ibrutinib+venetoclax in pazienti naïve che venivano successivamente randomizzati a placebo o ibrutinib qualora raggiungessero la uMRD dopo 12 cicli di trattamento combinato. L'*endpoint* primario è stata la valutazione della sopravvivenza libera da malattia o DFS (*Disease Free Survival*, definita dall'assenza di recidiva MRD, PD o morte) a un anno, che è risultata essere simile (figura 7) fra il braccio placebo e il braccio ibrutinib, suggerendo il potenziale di questa terapia di prima linea a durata fissa, orale, *chemo-free* in pazienti con uMRD al termine del trattamento.

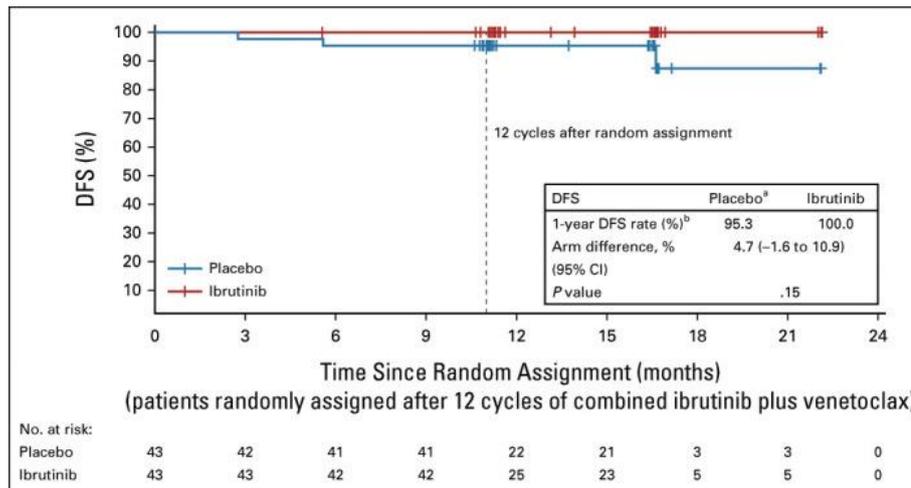


Figura 7. Curva Kaplan-Meier del *trial* CAPTIVATE. DFS nel *trial* CAPTIVATE di pazienti uMRD all'EOT successivamente randomizzati a ibrutinib o placebo. Adattata da G. Wierda et al. (154).

Sempre nello stesso ambito, alcuni studi di farmacologia (155) si sono concentrati sullo sviluppo di modelli meccanicistici che predicono i valori di MRD e le cinetiche della stessa su sangue periferico e midollare di pazienti sottoposti a trattamenti a base di venetoclax a durata variabile + rituximab. Così, questi modelli permettono di stabilire quale sia la durata più consona della terapia in termini di profondità e stabilità della risposta e quale invece sia il punto in cui il beneficio della stessa viene superato dalla sua tossicità. In futuro, questi *tool* potrebbero guidare il clinico nell'intraprendere scelte terapeutiche *tailor-made* per il paziente, una volta validati e integrati con altre variabili ad oggi ancora poco note.

1.10.6 MRD COME ENDPOINT DI STUDI CLINICI

Con l'introduzione nella pratica clinica di farmaci in grado di indurre risposte stabili per lungo periodo, il confronto tra principi attivi sulla base degli *endpoint* standard (PFS e OS) impiegati negli studi clinici è diventato più difficoltoso, dal momento che il calcolo di tali parametri impone lunghi *follow-up*. Questo limite influenza la velocità di approvazione di nuovi farmaci e, di conseguenza, l'ampliamento dell'armamentario terapeutico per la LLC. Per questi motivi, vista la correlazione della MRD con la PFS e la OS, essa è stata approvata dall'EMA (*European Medicines Agency*) come *endpoint* surrogato della PFS e come *endpoint* intermedio di *trial* clinici volti a valutare l'efficacia di un trattamento, in

modo da velocizzare il confronto o l'approvazione di nuovi farmaci. I parametri che possono essere valutati in tal senso sono diversi: i tassi di uMRD raggiunti con uno specifico trattamento, la profondità della risposta MRD o lo studio delle cinetiche di ricrescita MRD (ad esempio in termini di *MRD-doubling time*). Diversi studi clinici hanno già adottato questo tipo di approccio (124,150).

1.10.7 LIMITAZIONI DELLA MRD

Nonostante i numerosi vantaggi illustrati precedentemente, la valutazione della MRD è ancora uno strumento che presenta diverse criticità:

- La metodica è ancora limitata a contesti accademici e non è ancora approdata nella pratica clinica quotidiana;
- la varietà di tecniche disponibili per effettuare la misurazione MRD rende poco omogeneo il confronto fra diversi studi clinici. Inoltre, la soglia stabilita per definire la uMRD (attualmente di 10^{-4}) è ancora oggetto di dibattito;
- il ruolo della MRD è limitato nella monoterapia con gli inibitori del BTK, che rappresentano un'importante arma nella LLC. Gli stessi farmaci, inoltre, possono indurre delle false recidive della MRD su sangue periferico, causate dall'effetto mobilizzante i linfociti della terapia;
- non è noto quale sia l'approccio migliore da seguire per l'utilizzo della MRD in regimi di terapia continuativa e non di durata fissa;
- i dati riguardanti le differenze in termini di MRD in sottogruppi biologici di malattia sono ancora immaturi e non è ancora chiaro in che misura dette differenze possano modificare la prognosi dei pazienti;
- se i risultati che hanno valutato la MRD in trattamenti chemio-immunoterapici sono più solidi, quelli riguardanti i nuovi farmaci sono meno completi e richiedono *follow-up* più lunghi e ulteriori studi;
- come già riportato, i trattamenti che includono anticorpi monoclonali generano un'importante discordanza dei dati MRD fra sangue periferico e midollare, per un effetto di compartimento;
- la quantificazione della MRD con le metodiche tradizionali sembra essere incapace di riflettere il *burden* tumorale in tutti i compartimenti di malattia, specie quello linfonodale (156), dove risiedono più spesso i centri

proliferativi della LLC: questo può tradursi in una mancata identificazione di cloni leucemici che potrebbero successivamente generare una recidiva in pazienti con una malattia a prevalente estrinsecazione nodale. In letteratura sono presenti studi (157) che propongono studi di quantificazione MRD alternativi, come quello basato sulla rilevazione del ctDNA (*circulating tumor DNA*), che potrebbe essere utilizzato in maniera complementare alle metodiche convenzionali, soprattutto in quelle situazioni in cui sono stati registrati i massimi tassi di discordanza (figura 8). Inoltre, la metodica del DNA circolante sembra mostrare delle performance migliori anche nei pazienti che seguono trattamenti comprendenti un BTK inibitore, venendo questa meno influenzata dall'effetto compartimentalizzante noto per questi farmaci.

Fürstenau et al.

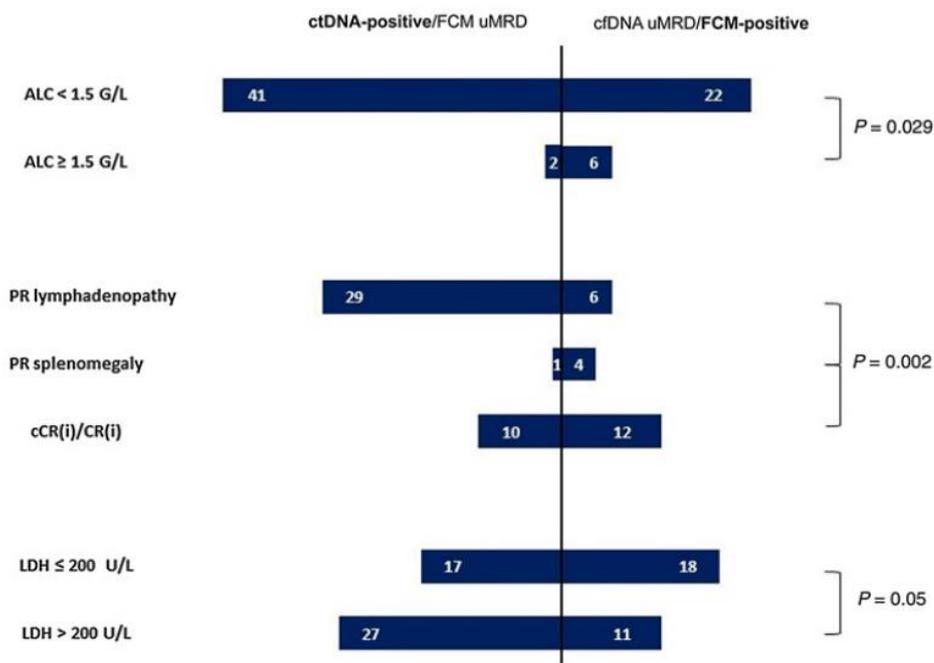


Figura 8. Confronto tra risultati discordanti in termini di MRD valutata con ctDNA e con citometria a flusso. Il diagramma tornado in figura mostra la distribuzione dei risultati discordanti fra la MRD misurata attraverso ctDNA e attraverso citofluorimetria secondo diverse variabili analizzate.

ctDNA: DNA circolante, FCM: Flow cytometry, ALC: Conta linfocitaria assoluta, cCR(i)/CR(i): risposta completa clinica e risposta clinica completa con recupero incompleto del midollo, *PR lymphadenopathy*: risposta parziale con linfadenopatia, *PR splenomegaly*, risposta parziale con splenomegalia ma senza malattia nodale. Adattata da M. Fürstenau et al. (157).

2 SCOPO DELLO STUDIO

Dal 1992, anno della sua introduzione in letteratura grazie agli studi di Robertson *et al.* (158), la malattia residua misurabile (MRD) ha acquisito una rilevanza crescente nel contesto della leucemia linfatica cronica (LLC), specialmente nell'era delle terapie *target*. Le numerose evidenze di come essa correli con i principali indici di sopravvivenza e di come possa fungere da indicatore di risposta al trattamento in maniera più solida rispetto ai criteri clinici iwCLL (142) hanno portato la MRD ad essere oggetto di valutazione in numerosi *trial* clinici, accanto agli *end-point* tradizionali. Nonostante ciò, l'applicabilità della valutazione della MRD alla sfera extra-sperimentale è ancora *in nuce*, come evidenziato dalla mancata presenza di questa fra le indagini raccomandate dalle attuali linee guida per la pratica clinica. I motivi di ciò sono probabilmente da ascrivere al fatto che non è ancora noto il modo più opportuno di interpretare i risultati della MRD in relazione ai diversi trattamenti utilizzati e alle informazioni biologiche di cui disponiamo. Inoltre, le metodiche impiegate per la valutazione della MRD e le soglie di rilevabilità oggi considerate sono esse stesse in fase di valutazione.

Lo scopo di questa tesi è stato di analizzare l'impatto e le caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti con LLC che presentavano una MRD non misurabile (uMRD) rispetto a quelli con MRD misurabile (dMRD). I pazienti in studio afferiscono all'UOC di Ematologia e Immunologia Clinica (direttore Prof. Livio Trentin) dell'Azienda Ospedale-Università Padova e sono stati sottoposti a diversi regimi terapeutici.

L'obiettivo primario dello studio è stato di calcolare i tassi di uMRD e di dMRD in relazione ai trattamenti somministrati.

Obiettivi secondari sono stati di valutare la relazione fra lo status MRD e i principali indicatori *time-to-event* (OS, PFS, RFS), misurare la profondità della risposta MRD (MRD2, MRD3, MRD4, MRD5), valutare la correlazione tra risposta clinica (CR, PR) secondo iwCLL (74) e MRD, evidenziare eventuali variabili clinico-biologiche di malattia che potessero influenzare lo status MRD e

stimare la concordanza fra i dati ottenuti su sangue periferico e sangue midollare.

3 MATERIALI E METODI

3.1 RACCOLTA DATI

Nello studio retrospettivo condotto, sono stati raccolti i dati di 83 pazienti con LLC afferenti all'UOC di Ematologia e Immunologia Clinica (direttore Prof. Livio Trentin) dell'Azienda Ospedale-Università Padova nel periodo 2012-2023. I soggetti idonei ad essere inclusi nello studio sono stati quelli con malattia attiva, tale da richiedere un trattamento secondo iwCLL (74). I dati sono stati raccolti dalle cartelle cliniche e sono stati unificati in un *database* informatizzato. Fra questi figurano:

- Generalità quali data di nascita, età, sesso biologico, ECOG (159) e CIRS (160), data di diagnosi di malattia.
- Conta dei globuli bianchi e linfocitaria, delle piastrine, concentrazione di emoglobina, β 2-microglobulina e LDH prima dell'inizio della terapia.
- Età, stadio secondo Rai e Binet e CLL-IPI prima dell'inizio della terapia.
- Valutazione obiettiva di linfadenopatie o sintomi B prima dell'inizio della terapia.
- Caratterizzazione biologica della malattia all'inizio del trattamento (stato mutazionale IGHV e TP53, citogenetica classica e FISH).
- Data di inizio della terapia oggetto di studio, numero e tipo di terapie precedenti alla stessa.
- Valutazione della miglior risposta secondo iwCLL (74).
- Eventuale progressione di malattia (includendo anche sindrome di Richter, come da indicazioni iwCLL (74)) e nuova terapia intrapresa.
- Data dell'ultimo *follow-up* clinico e status di vita o di morte con causa correlata o meno alla malattia ematologica.

3.2 ANALISI DELLO STATO MUTAZIONALE DI IGHV

Per l'analisi dello status IGHV è stato estratto l'RNA di circa 2×10^6 cellule B impiegando il kit RNeasy™ Total RNA (Qiagen) e ne è stato sintetizzato il cDNA

(DNA complementare) mediante SuperScript™ Preamplification (Life Technologies, Inc.). Il *cluster* dei geni codificanti per la porzione variabile della catena pesante per le immunoglobuline (VH) è stato isolato impiegando delle sonde senso specifiche per la regione *framework* associate a sonde anti-senso per la regione costante delle catene pesanti delle immunoglobuline. Le sequenze dei geni codificanti per VH sono state ottenute mediante amplificazione con PCR del cDNA; i prodotti di amplificazione sono stati quindi sottoposti a purificazione con Wizar PCR preps (Promega, Madison, WI) e poi a sequenziamento mediante 3130 ABI Applied Biosystems. Le stringhe ottenute sono state analizzate utilizzando i programmi IMGT/VQUEST e BLAST in modo tale da identificare i riarrangiamenti VDJ. Sequenze con omologia $\leq 98\%$ rispetto al *germ-line* sono state definite mutate (M-IGHV), mentre quelle con omologia al di sopra di tale soglia sono state definite non mutate (U-IGHV).

3.3 CITOGENETICA CLASSICA

L'analisi citogenetica è stata condotta utilizzando cellule prelevate da sangue periferico ed esposte per 72 ore all'agente mitogeno CpG ODN DSP30 (Roche, Risch, CH) 500 μ M e a IL-2 (Roche) 20 U/mL. Successivamente, le colture sono state trattate per una notte con colcemide (Gibco® Karyomax Colcemid, ThermoFisher, Waltham, MA USA) 0,1 μ g/mL, per arrestare le cellule in metafase.

Il software IKAROS (MetasYstems, Altlhusseim, Germany) ha permesso la valutazione di 25 metafasi o più, in accordo con le linee guida ISCN2016 (161).

Il cariotipo complesso (CK), in linea con la letteratura (162), è stato definito dalla presenza di almeno tre aberrazioni cromosomiche identificate tramite citogenetica stimolata all'interno di uno stesso clone.

3.4 CITOGENETICA FISH (FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION)

La FISH è stata attuata su cellule B di sangue periferico impiegando le sonde LSI p53/LSI ATM and LSI D13S319/LSI 13q34/ CEP12 (Vysis-Abbott, Des Plaines, IL, USA) e analizzando circa 300 interfasi.

I *cut-off* di riferimento utilizzati, intesi come valore medio di soggetti sani ± 3 deviazioni standard, sono stati del 4% per la trisomia del cromosoma 12 e del 10% per le restanti anomalie cromosomiche ricercate (delezione 11q22.3, 13q14.3 e 17p13.1).

3.5 ANALISI DELLO STATO MUTAZIONALE DI TP53

Il sequenziamento di *TP53* e la valutazione degli esoni 4-10 sono stati eseguiti in ottemperanza alle linee guida ERIC (163).

3.6 PROTOCOLLI DI TRATTAMENTO

I trattamenti che sono stati oggetto di studio per la valutazione della MRD sono stati i regimi chemio-immunoterapici FCR, BR e G-Chl e le terapie con farmaci molecolari contenenti ibrutinib (monoterapia, ibrutinib-venetoclax, rituximab-ibrutinib), venetoclax (monoterapia, rituximab-venetoclax, obinutuzumab-venetoclax, ibrutinib-venetoclax) e idelalisib (rituximab-idelalisib). Ai fini dell'analisi, i trattamenti sono stati così raggruppati:

- CIT (chemio-immunoterapia): FCR, BR, G-Chl.
- PI (*Protein Inhibitors*): I \pm anti-CD20, R-Idelalisib, venetoclax in monoterapia.
- Venetoclax-combo= VenR, VenG, VenI.

Tali regimi sono stati somministrati secondo le modalità sotto riportate.

3.6.1 FCR

Il regime FCR viene somministrato ogni 4 settimane per 6 cicli. Il ciclo 1 consiste in quanto segue:

- Rituximab 375 mg/m² per via endovenosa (iniziando ad una velocità di infusione di 50 mg/h e aumentando di 50 mg/h ogni 30 minuti fino al raggiungimento della dose target di 400 mg/h) nel giorno 1.
- Ciclofosfamide 250 mg/m² per via endovenosa in 10-30 minuti nei giorni 1-3.
- Fludarabina 25 mg/m² per via endovenosa in 20-30 minuti nei giorni 1-3.

I cicli 2-6 differiscono dal ciclo 1 solo per l'aumento della dose di rituximab da

375 mg/m² a 500 mg/m².

3.6.2 BR

Il regime BR viene somministrato ogni 28 giorni per 6 cicli. Il ciclo 1 consiste in quanto segue:

- Rituximab 375 mg/m² per via endovenosa nel giorno 1.
- Bendamustina 90 mg/m² per via endovenosa nei giorni 1-2.

I cicli 2-6 differiscono dal ciclo 1 solo per l'aumento della dose di rituximab da 375 mg/m² a 500 mg/m².

3.6.3 OBINUTUZUMAB + CLORAMBUCILE (G-CHL)

Il regime G-Chl viene somministrato per sei cicli di trattamento, ognuno di 28 giorni. Il ciclo 1 consiste in quanto segue:

- Giorno 1 - obinutuzumab 100 mg per via endovenosa più clorambucile 0,5 mg/kg *per os*.
- Giorno 2 - obinutuzumab 900 mg per via endovenosa.
- Giorno 8 - obinutuzumab 1000 mg per via endovenosa.
- Giorno 15 - obinutuzumab 1000 mg per via endovenosa più clorambucile 0,5 mg/kg *per os*.

I cicli 2-6 consistono in quanto segue:

- Giorno 1 - obinutuzumab 1000 mg per via endovenosa più clorambucile 0,5 mg/kg *per os*.
- Giorno 15 - clorambucile 0,5 mg/kg *per os*.

3.6.4 IBRUTINIB

Ibrutinib viene somministrato a dosaggio di 420 mg (tre capsule da 140 mg o una compressa da 420 mg) *per os* una volta al giorno fino a progressione di malattia a tossicità inaccettabile.

3.6.5 IBRUTINIB + RITUXIMAB (I-R)

Il regime I-R viene somministrato ogni 28 giorni per 6 cicli. Ibrutinib viene somministrato a una dose di 420 mg una volta al giorno fino a progressione di malattia o a tossicità inaccettabile. La somministrazione per via endovenosa di rituximab inizia dopo 28 giorni di ibrutinib, con una dose di 325 mg/m² al giorno 1 del secondo ciclo, per un totale di 8 cicli.

3.6.6 VENETOCLAX

Venetoclax viene somministrato con uno schema di incremento settimanale (*ramp-up*) che inizia con 20 mg *per os* una volta al giorno e aumenta a 50 mg, 100 mg, 200 mg e infine 400 mg al giorno raggiunti in quinta settimana. La somministrazione è continuativa, fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile.

3.6.7 R-VENETOCLAX

Il regime venetoclax + rituximab viene somministrato ogni 28 giorni per un massimo di sei cicli, come segue:

- Venetoclax: completare il *ramp-up* di 5 settimane per raggiungere 400 mg *per os* una volta al giorno; continuare con questa dose per 24 mesi dal giorno 1 del ciclo 1 di rituximab.
- Rituximab: iniziare con 375 mg/m² per via endovenosa dopo che il paziente ha ricevuto venetoclax 400 mg/die per 7 giorni (questo sarà il giorno 1 del ciclo 1). Dopo di che, somministrare 500 mg/m² per via endovenosa nel giorno 1 per i cicli 2-6.

3.6.8 G-VENETOCLAX

Il regime venetoclax + obinutuzumab viene somministrato ogni 28 giorni per un massimo di 21 cicli. Il ciclo 1 consiste in quanto segue:

- Giorno 1: obinutuzumab 100 mg per via endovenosa.
- Giorno 2: obinutuzumab 900 mg per via endovenosa.
- Giorni 8 e 15: obinutuzumab 1000 mg per via endovenosa.
- Giorno 22: inizio di venetoclax secondo classico *ramp-up* di 5 settimane.

Il ciclo 2 consiste in quanto segue:

- Giorno 1: obinutuzumab 1000 mg per via endovenosa.
- Completare la fase di *ramp-up* di venetoclax (giorno 28 del ciclo 2).

I cicli 3-6 consistono in quanto segue:

- Giorno 1: obinutuzumab 1000 mg per via endovenosa.
- Giorni 1-28: venetoclax 400 mg *per os* una volta al giorno.

I cicli 7-12 consistono in quanto segue:

- Giorni 1-28: continuare a somministrare venetoclax 400 mg *per os* una volta al giorno.

3.6.9 IBRUTINIB + VENETOCLAX

Il regime ibrutinib + venetoclax viene somministrato in cicli di 28 giorni. Vengono somministrati 420 mg di ibrutinib *per os* per i primi 3 cicli, seguiti dal trattamento di combinazione di ibrutinib (420 mg) più venetoclax (*per os*, dopo opportuno *ramp-up* di 5 settimane fino alla dose di 400 mg, una volta al giorno) per 12 cicli, fino a progressione di malattia o a tossicità inaccettabile.

3.6.10 R-IDELALISIB

Idelalisib viene somministrato *per os* in 150 mg due volte al giorno fino a progressione di malattia o a tossicità inaccettabile. Quando somministrato con idelalisib, il dosaggio di rituximab sarà di 375 mg/m² il giorno 1 del primo ciclo, seguito da 500 mg/m² ogni 2 settimane per 4 dosi e poi ogni 4 settimane per 3 dosi, per un totale di 8 infusioni.

3.7 VALUTAZIONE DELLA MALATTIA RESIDUA MISURABILE

Sono stati raccolti campioni di sangue periferico e/o midollare di pazienti al termine del trattamento (*end of treatment MRD*, EOT MRD) e, per alcuni, anche in corso di trattamento (*ad interim MRD*). Sono stati studiati sia pazienti naïve ai trattamenti, sia pazienti R/R.

La quantificazione della MRD è stata condotta impiegando la metodica standardizzata di citofluorimetria multiparametrica a sei colori (*six-colour flow cytometry assay*) (137), presso la divisione di citofluorimetria del Laboratorio di Ematologia e Immunologia Clinica (responsabile Prof.ssa Monica Facco). Contestualmente, nella maggior parte dei casi, è stato anche eseguito un immunofenotipo base sugli stessi campioni.

La soglia considerata per definire la mancata rilevabilità della MRD (uMRD) è stata di 1 cellula leucemica per 10.000 leucociti (MRD4), come suggerito dagli attuali standard internazionali (136). Il tasso di uMRD (*uMRD rate*) è stato definito come rapporto fra il numero di pazienti con valore MRD <10⁻⁴ e il totale dei pazienti trattati.

3.7.1 PROCEDIMENTO

Prima di procedere alla valutazione, è stato necessario conoscere l'espressione immunofenotipica da parte delle cellule B neoplastiche di CD38 e verificare la clonalità delle catene leggere κ o λ delle immunoglobuline, dal momento che queste informazioni sono fondamentali nell'intraprendere la strategia di *gating* appropriata.

Per la processazione dei campioni prelevati dai pazienti, si è proceduto secondo un protocollo di *bulk lysis* (*EuroFlow SOP for Bulk lysis for MRD panels Version 1.3*) che ha previsto i seguenti passaggi:

1. trasferire il campione contenente almeno 10×10^6 cellule nucleate in una provetta Falcon a fondo conico. Utilizzare 4 mL di sangue periferico o 2 mL di sangue midollare per 30 mL di soluzione lisante;
2. riempire la provetta con cloruro di ammonio (NH_4Cl) preparato *in-house* fino a raggiungere un volume di 30 mL;
3. mescolare la soluzione ottenuta e incubarla per 15 minuti in un agitatore;
4. centrifugare a 800 g per 5 minuti e rimuovere il sopranatante usando una pipetta Pasteur;
5. aggiungere 2 mL di buffer di lavaggio e risospendere il pellet di cellule, agitando vigorosamente;
6. centrifugare a 800 g per 5 minuti e rimuovere il sopranatante usando una pipetta Pasteur;
7. risospendere il pellet di cellule in 2 mL di buffer di lavaggio. Mescolare e trasferire questo volume in una provetta Falcon a fondo tondo (*FACS tube*).

La procedura di valutazione della MRD ha contemplato l'allestimento di tre provette (tabella IX):

Tabella IX. Fluorocromi e anticorpi monoclonali utilizzati nelle varie provette.

N	Fluorocromi	FITC	PE	PerCP	PE-CY7	APC	APC-CY7
1	mAb	CD81 (20 µL)	CD5 (20 µL)	CD20 (20µL)	CD19 (5 µL)	CD43 (20 µL)	CD45 (5µL)
2	mAb	CD5 (20 µL)	CD38 (20 µL)	CD20 (20µL)	CD19 (5 µL)	CD3 (5 µL)	CD45 (5µL)
3	mAb	κ ο λ (20 µL)	κ ο λ (20 µL)	CD20 (20µL)	CD5 (5 µL)	CD19 (5 µL)	CD3 (5µL)

Le fluorescenze vengono evocate sfruttando fluorocromi legati ad anticorpi monoclonali (mAb).

FITC: isotiocianato di fluoresceina, PE: ficoeritrina, PerCP: *Peridinin-Chlorophyll-Protein*, PE-Cy7: ficoeritrina coniugata alla cianina 7, APC: alloficocianina, APC-Cy7: alloficocianina coniugata alla cianina 7, mAb: Anticorpi monoclonali.

Lo strumento utilizzato nello studio è stato l'analizzatore FACS Canto A e i dati sono stati processati usando il programma FACS Diva 7 (Becton Dickinson Biosciences; Milano, Italia).

L'analisi è stata condotta su almeno 2.000.000 eventi acquisiti secondo le seguenti modalità:

- Provetta 1

Dot plot FSC/SSC per definire i leucociti (figura 9).

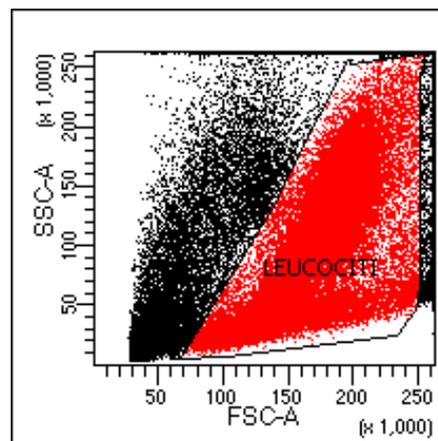


Figura 9. Dot plot FSC/SSC.

FSC: *forward scatter*, SSC: *side scatter*

Dot plot CD19/SSC: la popolazione studiata è costituita da cellule nucleate.

Attraverso questo *gating* si selezionano le cellule CD19+ (figura 10).

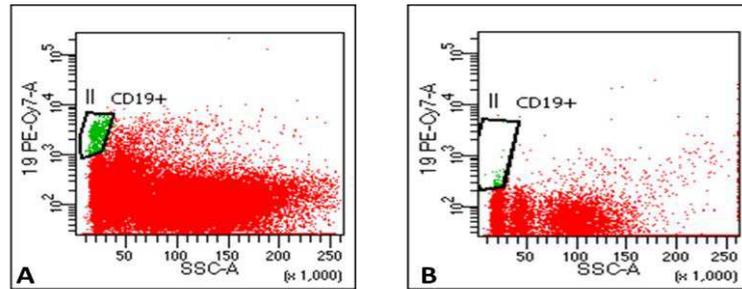


Figura 10. Dot plot CD19/SSC. **A.** Esempio di paziente con presenza di cellule CD19+. **B.** Esempio di paziente con assenza di cellule CD19+.

SSC: *Side scatter*, PE-Cy7: ficoeritrina coniugata alla cianina 7.

Dot plot CD5/CD43: l'analisi è stata eseguita sulle cellule CD19+. Questo consente di evidenziare la popolazione CD43+CD5+ (figura 11A1-2).

Dot plot CD5/CD19: l'analisi è stata eseguita sulle cellule CD19+. Questo consente di evidenziare la popolazione CD19+CD5+ (figura 11B1-2).

Dot plot CD81/CD19: l'analisi è eseguita sulle cellule CD19+. Questo consente di evidenziare la popolazione CD19+CD81_{low} (figura 11C1-2).

Le cellule patologiche residue esprimono i marcatori CD43, CD19, CD5, CD81_{low}. La percentuale di cellule patologiche viene calcolata sul totale dei leucociti.

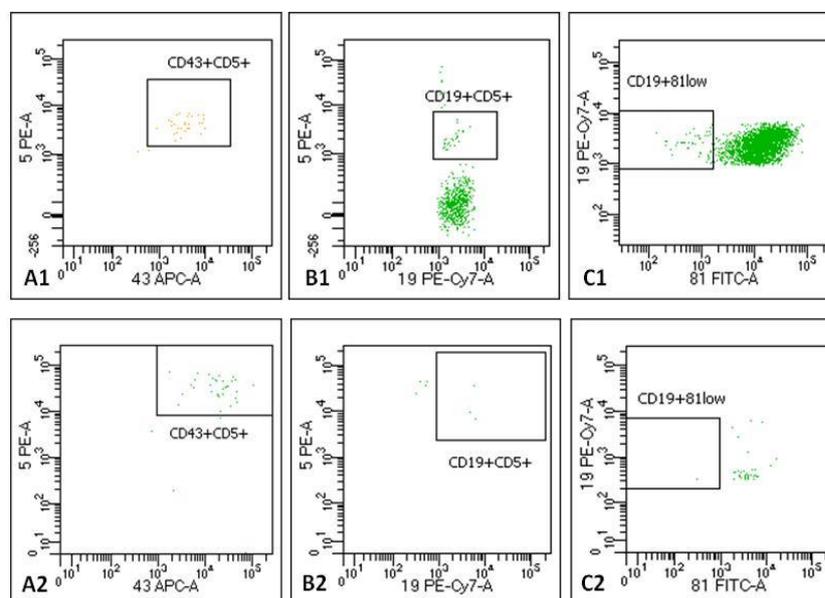


Figura 11. A. Dot plot CD5/CD43: nel gate le cellule CD43+CD5+ (**A1** esempio di paziente con dMRD. **A2** esempio di paziente con uMRD). **B. Dot plot CD5/CD19**: nel gate le cellule CD5+CD19+ (**B1** esempio di paziente con dMRD. **B2** esempio di paziente con uMRD). **C. Dot plot CD19/CD81**: nel gate le cellule CD19+CD81_{low} (**C1** esempio di paziente con dMRD. **C2** esempio di paziente con uMRD).

APC: allofococianina, PE-Cy7: ficoeritrina coniugata alla cianina 7, FITC: isotiocianato di fluoresceina.

- Provetta 2

Dot plot CD5/CD19: l'analisi è stata eseguita sulle cellule CD19+. Questo consente di evidenziare la popolazione CD19+CD5+ (figura 12A1-2).

Dot plot CD38/CD19: l'analisi è stata eseguita sulle cellule CD19+. Questo consente di evidenziare la popolazione CD19+CD38-, nel caso di pazienti CD38- alla diagnosi, oppure la popolazione CD19+CD38+, nel caso di pazienti CD38+ alla diagnosi (figura 12B1-2).

Dot plot CD20/CD5: l'analisi è stata eseguita sulle cellule CD19+. Questo consente di evidenziare la popolazione CD20_{low}CD5+ (figura 12C1-2).

Le cellule patologiche residue esprimono i marcatori CD5, CD19, CD38+/-, CD20_{low}. La percentuale di cellule patologiche è calcolata sul totale dei leucociti.

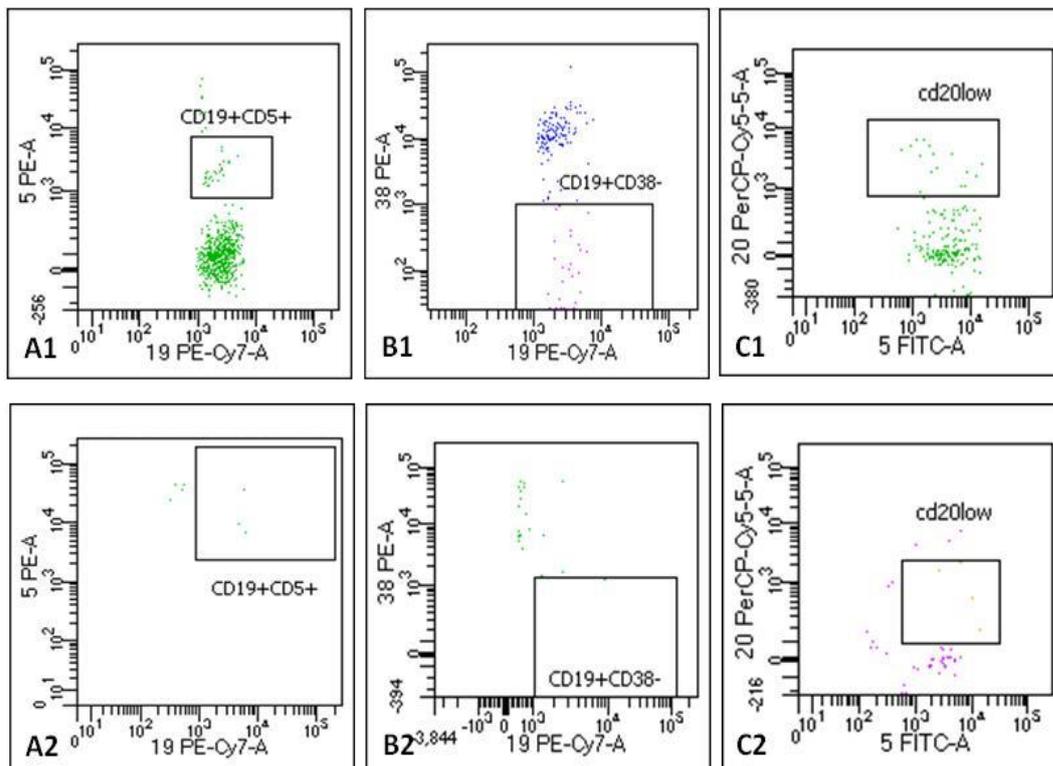


Figura 12. **A.** *Dot plot* CD5/CD19: nel gate le cellule CD5+CD19+ (**A1** esempio di paziente con dMRD. **A2** esempio di paziente con uMRD). **B.** *Dot plot* CD38/CD19: nel gate le cellule CD38-CD19+ (**B1** esempio di paziente con dMRD. **B2** esempio di paziente con uMRD). **C.** *Dot plot* CD20/CD5: nel gate le cellule CD5+CD20_{low} (**C1** esempio di paziente con dMRD. **C2** esempio di paziente con uMRD).

PE: ficoeritrina, PE-Cy7: ficoeritrina coniugata alla cianina 7, PerCP: *Peridinin-Chlorophyll-Protein*, FITC: isotiocianato di fluoresceina.

- Provetta 3

Dot plot CD19/CD5: l'analisi è stata eseguita sulle cellule CD19+. Questo consente di evidenziare la popolazione CD19+CD5+ (figura 13A1-2).

Dot plot CD3/CD19: l'analisi è stata eseguita sulle cellule CD19+. Questo consente di evidenziare la popolazione CD19+CD3- (figura 13B1-2).

Dot plot κ/λ : l'analisi è stata eseguita sulle cellule CD19+CD5+CD3-. Questo consente di evidenziare i linfociti B clonali (figura 13C1-2).

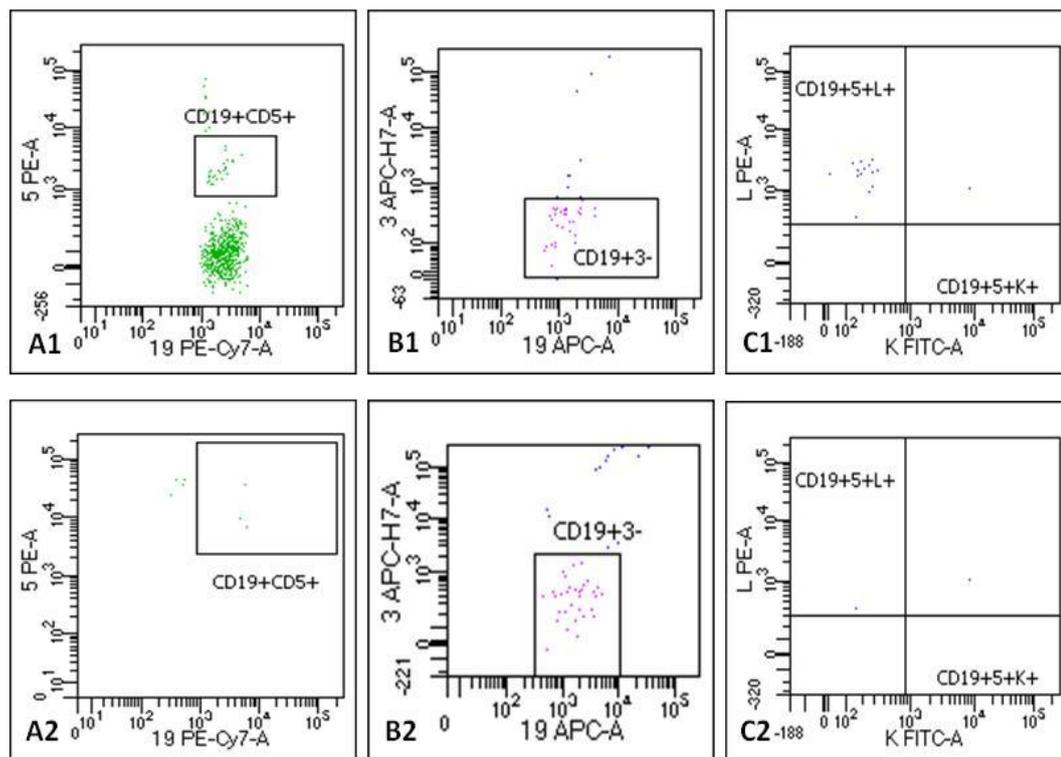


Figura 13. A. *Dot plot* CD19/CD5: nel gate le cellule CD5+CD19+ (A1 esempio di paziente con dMRD. A2 esempio di paziente con uMRD). **B. *Dot plot* CD3/CD19:** nel gate le cellule CD3-CD19+ (B1 esempio di paziente con dMRD. B2 esempio di paziente con uMRD). **C. *Dot plot* κ/λ sulle cellule CD19+CD5+CD3- (C1 esempio di paziente con dMRD. C2 esempio di paziente con uMRD).**

PE: ficoeritrina, PE-Cy7: ficoeritrina coniugata alla cianina 7, APC: alloficocianina, APC-Cy7: alloficocianina coniugata alla cianina 7, FITC: isotiocianato di fluoresceina.

Il valore di MRD, espresso come percentuale o come valore assoluto, è stato ricavato dai risultati ottenuti nelle provette 1 e 2 ed è stato calcolato come rapporto di cellule patologiche sul totale dei leucociti presenti. La provetta 3 è servita a confermare il dato.

È stato stabilito un *cut-off* di rilevabilità pari allo 0,01% degli eventi acquisiti (1 cellula leucemica su 10.000 eventi acquisiti), con almeno 25-30 eventi distribuiti in *cluster*.

3.8 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta includendo tutti i pazienti con le informazioni disponibili per le analisi corrispondenti. Le variabili quantitative sono state riportate come media, accompagnate dal campo di variazione. Le variabili categoriali o rese categoriali (CIRS ≥ 6 , stadio Rai e Binet, tipo di terapia, numero di terapie precedenti, $\beta 2$ -microglobulina e LDH elevati, status *TP53* e IGHV, CLL-IPI, FISH, cariotipo complesso, CR, PR, MRD2, MRD3, uMRD, dMRD) sono state riportate come frequenze e percentuali.

Le variabili categoriali sono state confrontate con il test Chi-quadro e con il test esatto di Fisher.

La concordanza fra i risultati della MRD su sangue periferico e sangue midollare è stata stimata calcolando la concordanza complessiva e il Kappa di Cohen.

3.9.1 OUTCOME CLINICI

La sopravvivenza libera da ricaduta (RFS, *relapse-free survival*) è stata calcolata come tempo trascorso dall'inizio del trattamento a progressione di malattia o alla data dell'ultimo controllo clinico (censurato).

La sopravvivenza libera da progressione (PFS, *progression-free survival*) è stata calcolata come tempo trascorso dall'inizio del trattamento a progressione di malattia, morte per qualsiasi causa o alla data dell'ultimo controllo clinico (censurato).

La sopravvivenza globale (OS, *overall survival*) è stata calcolata come tempo trascorso dall'inizio del trattamento a morte per qualsiasi causa o alla data dell'ultimo controllo clinico (censurato).

Per analizzare i dati *time-to-event* è stato utilizzato il metodo Kaplan-Meier. È stato utilizzato il test Log-rank per confrontare le curve di sopravvivenza. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati significativi.

4 RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Le caratteristiche dei pazienti inclusi nello studio sono riassunte nella tabella X.

Tabella X. Caratteristiche dei pazienti.

Caratteristiche dei pazienti	N (% o range)
Numero pazienti	83
Età media alla terapia (anni, range)	68,6 (40-86)
Sesso M/F	52 (62,6) /31 (37,3)
Pazienti naïve ai trattamenti	50 (60,2)
Numero medio terapie precedenti in pazienti R/R (numero, range)	2,45 (1-7)
Pazienti sottoposti a ≥ 2 terapie	18 (21,7)
ECOG 1-2	47 (56,6)
CIRS ≥ 6	35 (42,2)
Stadio Rai III-IV	51 (61,4)
Stadio Binet B-C	80 (96,4)
CLL-IPI basso rischio	1 (1,2)
CLL-IPI rischio intermedio	18 (21,7)
CLL-IPI alto rischio	27 (32,5)
CLL-IPI altissimo rischio	23 (27,7)
$\beta 2$ microglobulina > 3,5 mg/dL	37 (44,6)
LDH > 250 U/L	36 (43,4)
Anemia (Hb <11 g/dL)	32 (38,6)
Trombocitopenia (PLT <100.000/ μ L)	29 (34,9)
Sintomi B	13 (15,7)
del(11q)	12 (14,5)
trisomia 12	15 (18,1)
del(13q)	39 (47)
del(17p)	22 (26,5)
Mutazione TP53	17 (20,5)
Aberrazione TP53	27 (32,5)
Cariotipo complesso	29 (34,9)
U-IGHV	51 (61,4)

M: Maschi, F: Femmine, R/R: Recidivati/Refrattari, ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*, CIRS: *Cumulative Illness Rating Scale*, CLL-IPI: *International Prognostic Index* della leucemia linfatica cronica, LDH: Lattato deidrogenasi, Hb: Emoglobina, PLT: Piastrine, del(11q): delezione del braccio lungo del cromosoma 11, del(13q): delezione del braccio lungo del cromosoma 13, del(17p): delezione del braccio corto del cromosoma 17, U-IGHV: Regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline non mutata.

Sono stati arruolati 83 pazienti con una età media di 68,6 anni (*range* 40-86), di cui 52 (62,6%) di sesso maschile e 31 (37,3%) di sesso femminile.

I pazienti studiati in prima linea di trattamento sono stati 50 (60,2%), mentre la restante parte (39,8%) era stata precedentemente sottoposta ad almeno una linea terapeutica; il numero medio di terapie precedenti in questo sottogruppo di pazienti era di 2,4 (*range* 1-7) e i pazienti sottoposti a più di due trattamenti erano 18 (21,7%). I pazienti con *ECOG Performance Status Scale* di 1-2 erano 47 (56,6%) e quelli con *CIRS (Cumulative Illness Rating Scale)* ≥ 6 erano 35 (42,2%).

All'inizio del trattamento, i pazienti in stadio avanzato Rai (III-IV) o Binet (B-C) erano 51 (61,4%) e 80 (96,4%), rispettivamente. La stratificazione prognostica secondo CLL-IPI era così distribuita: un paziente (1,2%) a basso rischio, 18 (21,7%) a rischio intermedio, 27 (32,5%) ad alto rischio, 23 (27,7%) ad altissimo rischio. I pazienti che presentavano un valore di $\beta 2$ -microglobulina sierica $>3,5$ mg/dL erano 37 (44,6%), 36 (43,4%) presentavano un valore di LDH che eccedeva il limite superiore considerato (250 U/L), 32 (38,6%) presentavano anemia, 29 (34,9%) presentavano trombocitopenia e 13 (15,7%) lamentavano sintomi B.

Per quel che concerne la biologia di malattia, le analisi citogenetiche e molecolari hanno dimostrato che 12 pazienti (14,5%) presentavano del(11q), 15 (18,1%) trisomia 12, 39 (47%) del(13q), 27 (32,5%) del(17p) e/o mutazioni di *TP53*, di cui 22 (26,5%) con sola del(17p) e 17 (20,5%) con sola mutazione di *TP53*. Inoltre, 29 pazienti (34,9%) esibivano un cariotipo complesso e 51 (61,4%) presentavano uno stato IGHV non mutato.

Le tipologie di trattamento a cui sono stati sottoposti i pazienti inclusi nello studio sono riassunte in tabella XI, assieme alle migliori risposte ottenute secondo i criteri iwCLL (74).

Tabella XI. Tipologie di trattamento e miglior risposta iwCLL ottenuta.

Tipo di trattamento	n (%)
FCR	11 (13,3)
BR	7 (8,4)
G-Chl	13 (15,7)
VenR	21 (25,3)
VenI	9 (10,8)
VenG	1 (1,2)
Venetoclax	15 (18,1)
R-Ibrutinib	2 (2,4)
Ibrutinib	2 (2,4)
R-Idelalisib	2 (2,4)
Raggruppamento delle terapie	n (%)
CIT	31 (37,35)
VEN-combo	31 (37,35)
Altre terapie target (PI)	21 (25,3)
Miglior risposta	n (%)
CR	50 (60,2)
PR	29 (35,0)
SD	3 (3,6)
PD	1 (1,2)

FCR: fludarabina-ciclofosfamide-rituximab, BR: bendamustina-rituximab, G-Chl: clorambucile-obinutuzumab, VenR: venetoclax-rituximab, VenI: venetoclax-ibrutinib, VenG: venetoclax-obinutuzumab, R-Ibrutinib: rituximab-ibrutinib, R-Idelalisib: rituximab-idelalisib.

CIT: Chemioimmunoterapia, VEN-combo: Combinazioni di venetoclax, PI: Inibitori di proteine.

CR: Risposta completa, PR: Risposta parziale, SD: Malattia stabile, PD: Malattia progressiva.

I pazienti trattati con chemio-immunoterapia (CIT) sono stati 31 (37,35%), così distribuiti: 11 (13,3%) trattati con FCR, 7 (8,4%) trattati con BR, 13 (15,7%) trattati con G-Chl.

I pazienti trattati con combinazioni di venetoclax sono stati 31 (37,35%), così distribuiti: 21 (25,3%) trattati con R-Venetoclax, 9 (10,8%) trattati con Ibrutinib-Venetoclax e 1 (1,2%) trattato con G-Venetoclax.

I pazienti trattati con altre terapie target quali inibitori delle proteine (PI) sono stati 21 (25,3%), così distribuiti: 15 (18,1%) trattati con Venetoclax in monoterapia, 2 (2,4%) trattati con R-Ibrutinib, 2 (2,4%) trattati con Ibrutinib in monoterapia, 2 (2,4%) trattati con R-Idelalisib.

Globalmente, sono state ottenute 50 (60,2%) risposte complete, 29 (35,0%) risposte parziali, 3 (3,6%) malattie stabili e 1 (1,2%) malattia progressiva.

4.2 TASSI MRD e VARIABILI CHE INFLUENZANO LO STATUS MRD

Il tasso di uMRD4 su sangue periferico e/o midollare registrato è stato di 51,8% (43 pazienti), mentre il tasso di dMRD4 è stato di 48,2% (40 pazienti).

Fra i pazienti trattati in prima linea, 22 (44%) hanno ottenuto una dMRD4 e 28 (56%) una uMRD4. Fra i pazienti R/R trattati con una linea terapeutica precedente, 6 (40%) hanno ottenuto una dMRD4 e 9 (60%) una uMRD4, mentre fra i pazienti R/R trattati con almeno due linee terapeutiche precedenti, 12 (67%) hanno ottenuto una dMRD4 e 6 (33%) hanno ottenuto una uMRD4. Le differenze fra linee di trattamento, in ogni caso, non si sono dimostrate statisticamente significative ($p=0,2003$).

I tassi di uMRD4 ottenuti diversificando per le tre tipologie di trattamento (CIT, PI o combinazioni di venetoclax) sono riportati nella figura 14. I trattamenti associati a tassi più elevati sono stati i regimi chemio-immunoterapici e le combinazioni di venetoclax ($p=0,0018$).

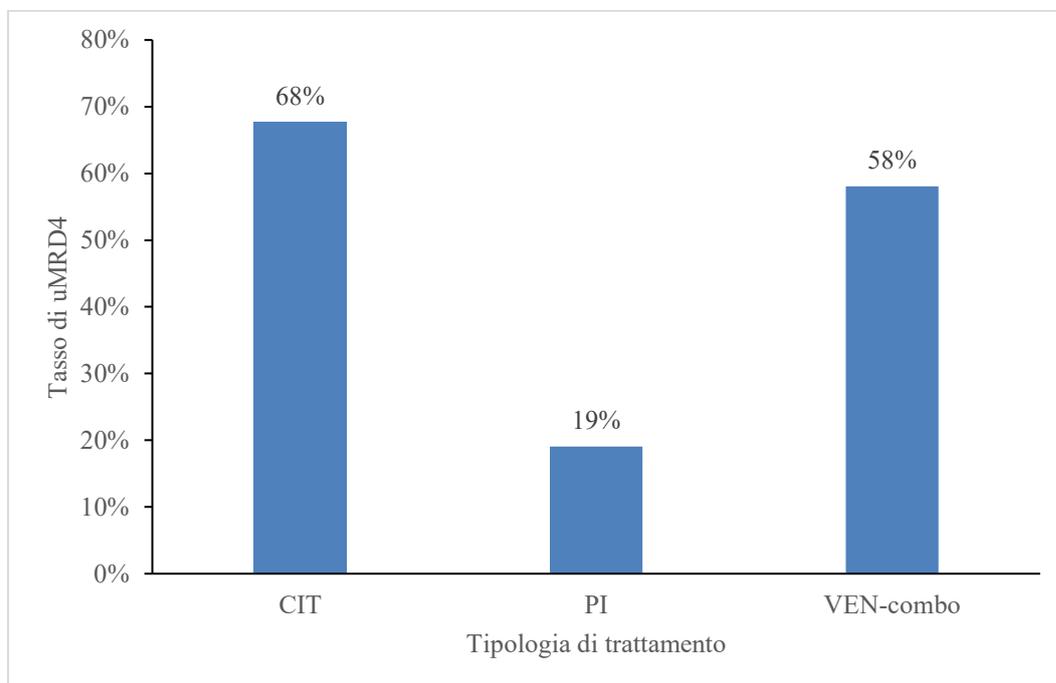


Figura 14. Tassi di uMRD4 raggruppati per tipologia di trattamento. Tra i pazienti sottoposti a CIT (31), quelli che hanno ottenuto una dMRD4 e una uMRD4 sono stati 10 (32%) e 21 (68%), rispettivamente. Tra i pazienti sottoposti a PI (21), quelli che hanno ottenuto una dMRD4 e una uMRD4 sono stati 17 (81%) e 4 (19%), rispettivamente. Tra i

pazienti sottoposti a combinazioni di venetoclax (31), quelli che hanno ottenuto una dMRD4 e una uMRD4 sono stati 13 (42%) e 18 (58%), rispettivamente.

CIT: Chemioimmunoterapia, PI: Inibitori di proteine, VEN-combo: combinazioni di venetoclax.

uMRD4: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-4} .

Le variabili che sono analizzate per valutare eventuali associazioni con lo status MRD sono riassunte nella tabella XII. In particolare, la presenza di CLL-IPI >4, CIRS ≥ 6 , del(17p) o mutazione di *TP53*, lo status U-IGHV e il cariotipo complesso sono risultati essere associati a tassi di uMRD4 inferiori ($p=0,0079$, $p=0,0064$, $p=0,0119$, $p=0,0133$, $p=0,0064$, $p=0,0237$, rispettivamente).

Tabella XII. Fattori prognostici di malattia analizzati in relazione allo status MRD.

FATTORE PROGNOSTICO	n	MIGLIOR MRD dMRD4 n=43	MIGLIOR MRD uMRD4 n=40	<i>p value</i>
CLL-IPI >4	36	26 (72,2%)	10 (27,8%)	0,0079
CIRS ≥ 6	35	12 (34,3%)	23 (65,7%)	0,0064
del(17p)	22	16 (72,7%)	6 (27,3%)	0,0119
Mutazioni <i>TP53</i>	17	13 (76,5%)	4 (23,5%)	0,0133
U-IGHV	51	31 (60,8%)	20 (39,2%)	0,0064
Cariotipo complesso	29	19 (65,5%)	10 (34,5%)	0,0237
del(11q)	13	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,7662
trisomia 12	15	5 (33,3%)	10 (66,7%)	0,2591
del(13q)	39	15 (38,5%)	24 (61,5%)	0,1245

CLL-IPI: *International Prognostic Index* della leucemia linfatica cronica, CIRS: *Cumulative Illness Rating Scale*, del(17p): delezione del braccio corto del cromosoma 17, U-IGHV: Regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline non mutata, del(11q): delezione del braccio lungo del cromosoma 11, del(13q): delezione del braccio lungo del cromosoma 13.

4.3 CORRELAZIONE TRA MIGLIOR RISPOSTA iwCLL E

MRD

Dividendo gli 83 pazienti studiati secondo quanto riportato in tabella XIII, sono stati ottenuti i seguenti risultati: 16 pazienti (32%) erano in CR con dMRD4, 34 (68%) in CR con uMRD4, 20 (69%) in PR con dMRD4, 9 (31%) in PR con uMRD4, 4 (100%) in SD/PD con dMRD4 e 0 in SD/PD e uMRD4. La

correlazione fra miglior risposta secondo iwCLL (74) e status MRD raggiunto è risultata essere statisticamente significativa, con $p=0,0007$.

Tabella XIII. Correlazione fra miglior risposta iwCLL e status MRD.

Miglior risposta	n (%)	MIGLIOR MRD4	n (%)
CR	50 (60,2)	dMRD	16 (32)
		uMRD	34 (68)
PR	29 (35,0)	dMRD	20 (69)
		uMRD	9 (31)
SD/PD	4 (4,8)	dMRD	4 (100)
		uMRD	0

CR: Risposta completa, PR: Risposta parziale, SD/PD: Malattia stabile/Malattia progressiva.

MRD4: Malattia residua misurabile considerando una soglia di 10^{-4} come soglia di rilevazione, dMRD: Malattia residua misurabile *detectable*, uMRD: Malattia residua misurabile *undetectable*.

Nel periodo di *follow-up*, i pazienti che sono andati incontro a progressione di malattia sono stati 5 (31,2%) nel gruppo CR dMRD4 e 6 (17,6%) nel gruppo CR uMRD4. Analogamente, i pazienti PR dMRD4 andati incontro a progressione di malattia sono stati 12 (60%), mentre i pazienti PR uMRD4 andati incontro a progressione sono stati 2 (22,2%). I dati sono riassunti nella figura 15.

I tassi di progressione dei pazienti con uMRD4 sono quindi risultati essere inferiori rispetto a quelli dei pazienti con MRD4 ancora rilevabile ($p=0,01237$).

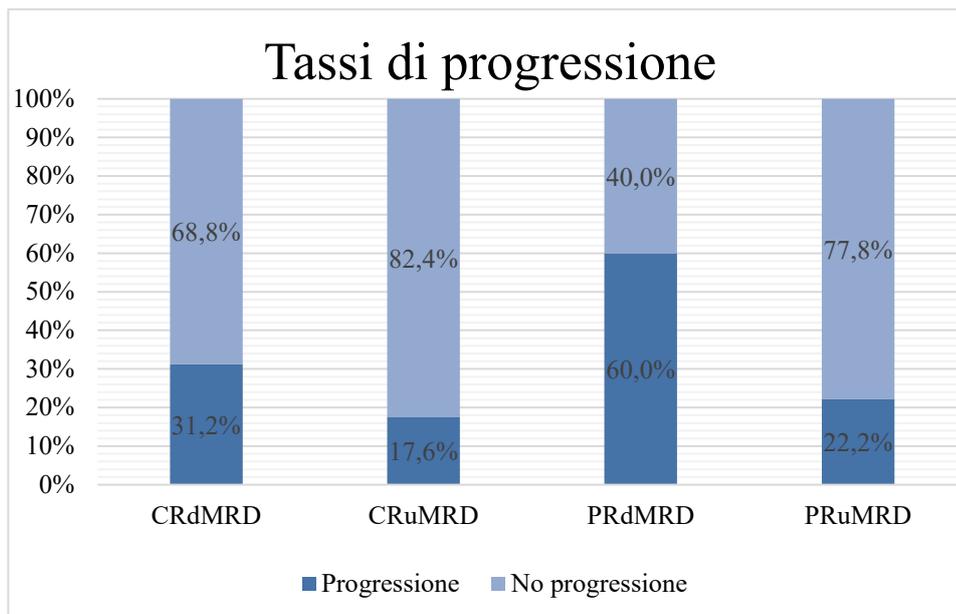


Figura 15. Istogramma rappresentante i tassi di progressione in pazienti CR dMRD, CR uMRD, PR dMRD e PR uMRD valutati con miglior risposta MRD4.

CR dMRD: Risposta completa con malattia residua misurabile *detectable*, CR uMRD: Risposta completa con malattia residua misurabile *undetectable*, PR dMRD: Risposta parziale con malattia residua misurabile *detectable*, PR uMRD: Risposta parziale con malattia residua misurabile *undetectable*.

4.4 PROFONDITÀ DELLA RISPOSTA

Sono stati analizzati i valori percentuali MRD misurati su sangue midollare (41 pazienti) e sangue periferico (59 pazienti).

Su sangue midollare, gli status uMRD5, uMRD4, uMRD3, uMRD2 e dMRD2 sono stati raggiunti da 8 (19,5%), 5 (12,2%), 7 (17,1%), 8 (19,5%) e 13 (31,7%) pazienti, rispettivamente. Su sangue periferico, gli status uMRD5, uMRD4, uMRD3, uMRD2 e dMRD2 sono stati raggiunti da 19 (32,2%), 14 (23,7%), 12 (20,3%), 7 (11,9%) e 7 (11,9%) pazienti, rispettivamente.

I risultati diversificati per trattamento su sangue midollare ($p=0,05451$) e periferico ($p=0,0852$) sono riassunti nella tabella XIV.

Tabella XIV. Profondità della risposta MRD su sangue midollare e periferico diversificata in base al trattamento (CIT, PI, VEN-combo).

Sangue midollare (n=41)			
Profondità della risposta	CIT n (%)	PI n (%)	VEN-combo n (%)
uMRD5 n=8	4 (50,0)	0	4 (50,0)
uMRD4 n=5	2 (40,0)	0	3 (60,0)
uMRD3 n=7	0	1 (14,3)	6 (85,7)
uMRD2 n=8	5 (62,5)	2 (25,0)	1 (12,5)
dMRD2 n=13	3 (23,0)	5 (38,5)	5 (38,5)
Sangue periferico (n=59)			
Profondità della risposta	CIT n (%)	PI n (%)	VEN-combo n (%)
uMRD5 n=19	6 (31,6)	2 (10,5)	11 (57,9)
uMRD4 n=14	3 (21,4)	4 (28,6)	7 (50,0)
uMRD3 n=12	5 (41,7)	2 (16,6)	5 (41,7)
uMRD2 n=7	0	4 (57,1)	3 (42,9)
dMRD2 n=7	0	4 (57,1)	3 (42,9)

CIT: Chemioimmunoterapia, PI: Inibitori di proteine, VEN-combo: Combinazioni di venetoclax.

uMRD5: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-5} , uMRD4: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-4} , uMRD3: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-3} , uMRD2: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-2} , dMRD2: Malattia residua misurabile *detectable* ad una soglia di 10^{-2} .

4.5 CONCORDANZA FRA RISULTATI OTTENUTI SU SANGUE MIDOLLARE E SANGUE PERIFERICO

I pazienti su cui è stato possibile eseguire l'analisi MRD sia su sangue periferico che su sangue midollare sono stati 45. La concordanza complessiva stimata tra i risultati ottenuti su questi due diversi campioni è stata di 82,2%. L'indice Kappa di Cohen è risultato essere 0,647 (buona concordanza). Si sottolinea che dei 15

(33,3%) pazienti con uMRD4 su sangue midollare, nessuno presentava dMRD4 su sangue periferico. La discrepanza ottenuta riguardava 8 (17,7%) pazienti con uMRD4 su sangue periferico e dMRD4 su sangue midollare.

I valori della MRD riportati in percentuale ottenuti su sangue periferico e sangue midollare sono riportati nella figura 16.

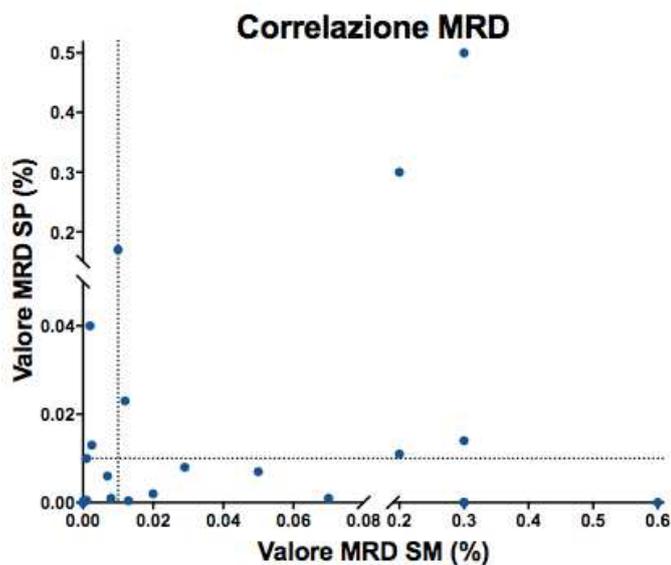


Figura 16. Correlazione tra valori percentuali di MRD riscontrati su sangue midollare (ascisse) e sangue periferico (ordinate) dei pazienti per cui è stato possibile eseguire entrambe le valutazioni. La linea tratteggiata indica la soglia di rilevabilità della MRD, posta a 10^{-4} (0,01%) come secondo le attuali indicazioni.

MRD: Malattia residua misurabile, SM: Sangue midollare, SP: Sangue periferico.

4.6 SOPRAVVIVENZA

Dopo un *follow-up* globale medio di 45 mesi, i pazienti con uMRD4 hanno mostrato una RFS (figura 17) significativamente maggiore rispetto ai pazienti con dMRD4, con $p=0,02976$ e $HR=2,3$ (95% CI, 1,111-4,896). La RFS mediana non è stata raggiunta nel gruppo uMRD4, mentre è stata di 53 mesi nel gruppo dMRD4. La RFS a 4 anni è stata dell'84% e del 57% nei gruppi dMRD4 e dMRD4, rispettivamente.

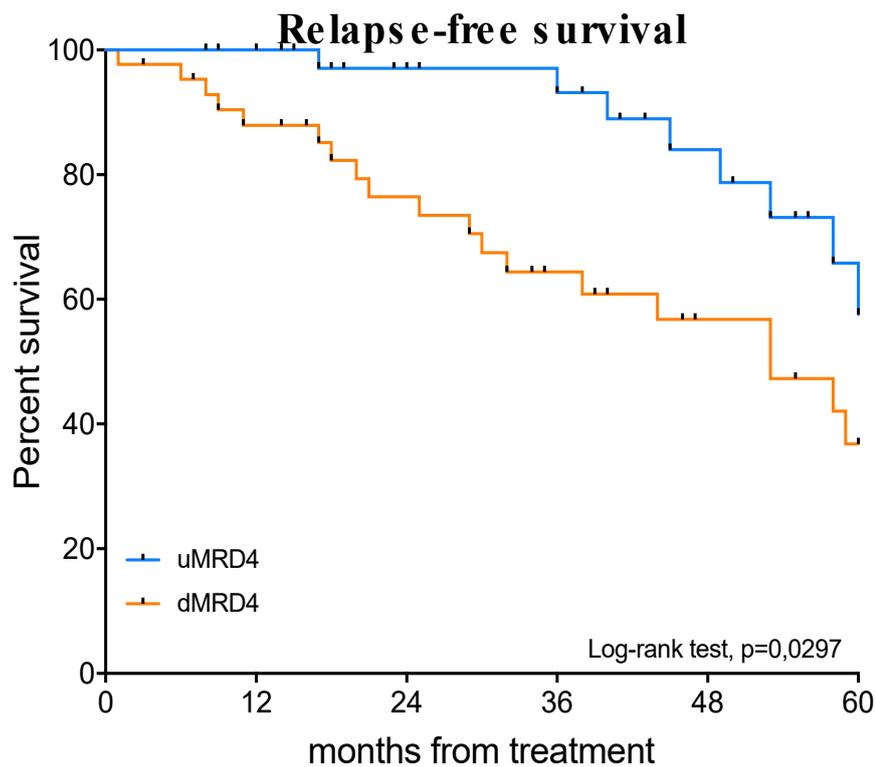


Figura 17. *Relapse-free survival* (RFS) in pazienti dMRD4 (arancione) e uMRD4 (azzurro).

uMRD4: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-4} , dMRD4: Malattia residua misurabile *detectable* ad una soglia di 10^{-4} .

Dopo lo stesso tempo di *follow-up*, i pazienti con uMRD4 hanno mostrato una OS (figura 18) significativamente maggiore rispetto ai pazienti con dMRD4, con $p=0,0054$ e con un rischio di morte circa 4 volte inferiore $HR=3,95$ (95% CI, 1,712-9,138). La OS mediana non è stata raggiunta in nessuno dei due gruppi, mentre la OS a 4 anni è stata del 94% nel gruppo uMRD4 e del 68% nel gruppo dMRD4.

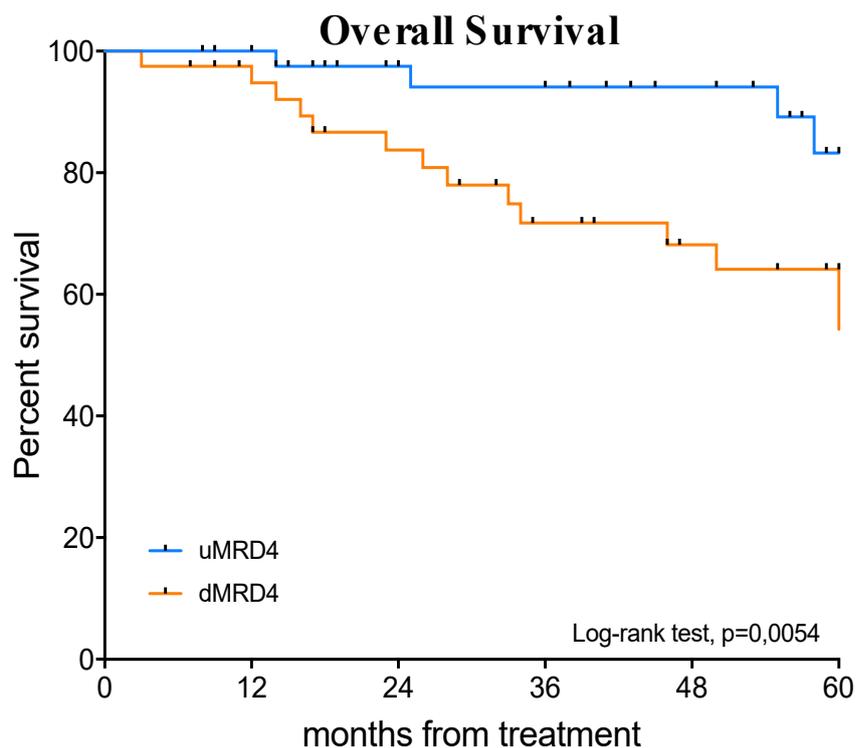


Figura 18. Overall survival (OS) in pazienti dMRD4 (arancione) e uMRD4 (azzurro). uMRD4: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-4} , dMRD4: Malattia residua misurabile *detectable* ad una soglia di 10^{-4} .

Tra i pazienti uMRD4 non sono state rilevate differenze statisticamente significative sulla RFS (figura 19) in relazione al trattamento utilizzato (CIT, PI o combinazioni di venetoclax), dal momento che la RFS mediana non è stata raggiunta in nessuno dei tre gruppi di pazienti. Fra i pazienti dMRD4, invece, quelli trattati con combinazioni di venetoclax hanno mostrato una RFS significativamente maggiore rispetto ai pazienti trattati con CIT o PI; infatti, la RFS mediana in questi gruppi di pazienti è stata di 58, 25 e 32 mesi, rispettivamente, con $p < 0,0001$.

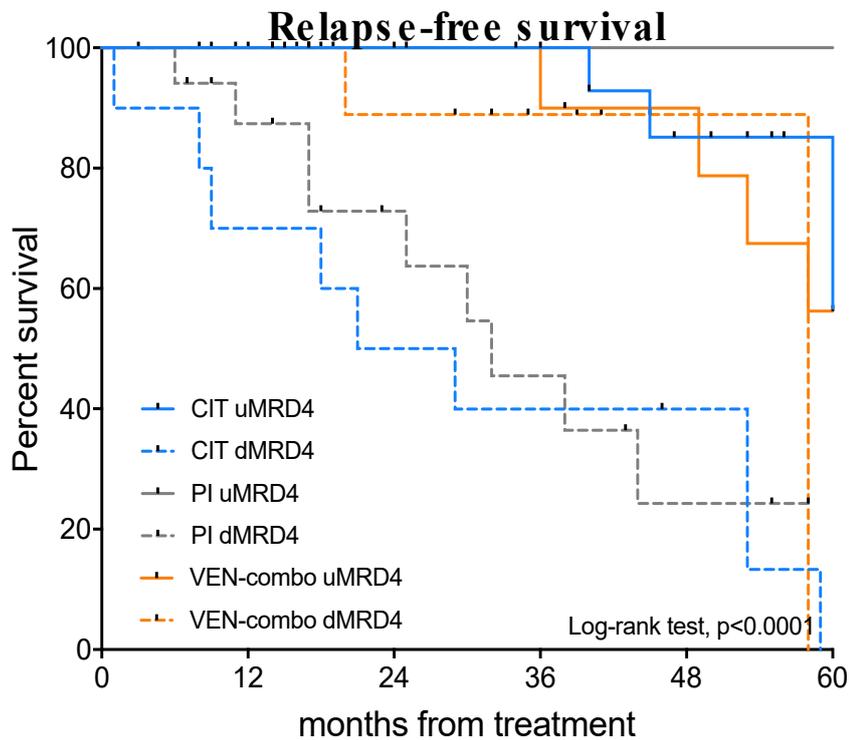


Figura 19. *Relapse-free survival* (RFS) diversificata per status MRD (dMRD4 e uMRD4) e trattamenti (CIT, PI, VEN-combo).

uMRD4: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-4} , dMRD4: Malattia residua misurabile *detectable* ad una soglia di 10^{-4} .

CIT: Chemioimmunoterapia, PI: Inibitori di proteine, VEN-combo: combinazioni di venetoclax.

Anche per la OS (figura 20) non sono state rilevate differenze statisticamente significative nei pazienti uMRD4 in relazione al trattamento utilizzato (CIT, PI o combinazioni di venetoclax), dal momento che la OS mediana non è stata raggiunta in nessuno dei tre gruppi di pazienti. Fra i pazienti dMRD4, invece, quelli trattati con combinazioni di venetoclax non hanno raggiunto la OS mediana, mentre nei pazienti trattati con CIT o PI tale valore è stato di 94 e 58 mesi, rispettivamente, con $p=0,0008$.

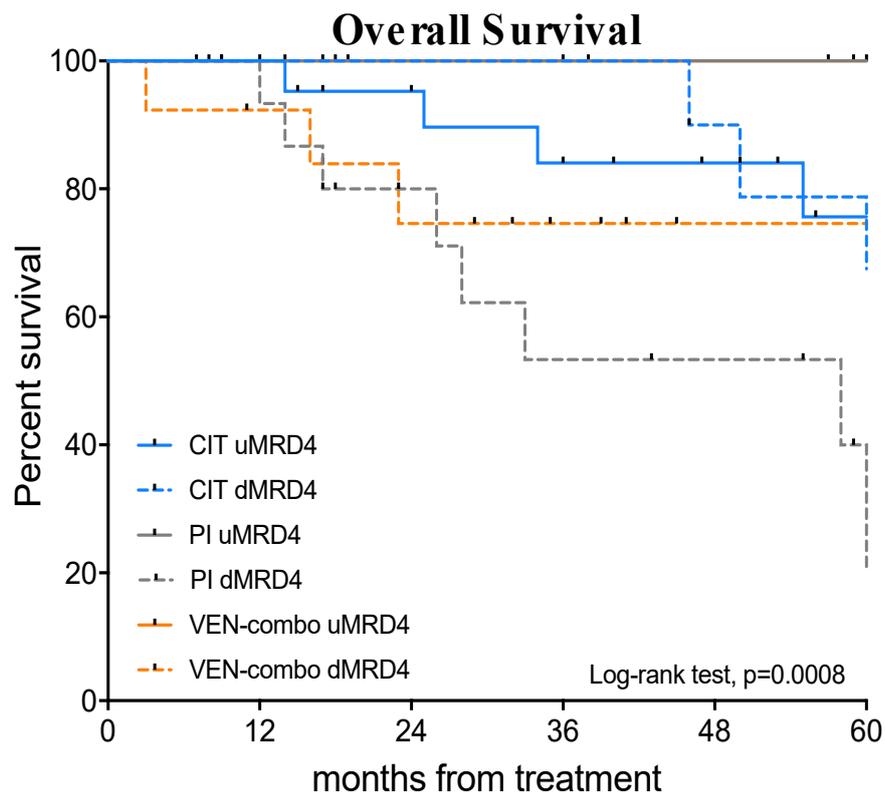


Figura 20. Overall survival (OS) diversificata per status MRD (dMRD4 e uMRD4) e trattamenti (CIT, PI, VEN-combo).

uMRD4: Malattia residua misurabile *undetectable* ad una soglia di 10^{-4} , dMRD4: Malattia residua misurabile *detectable* ad una soglia di 10^{-4} .

CIT: Chemioimmunoterapia, PI: Inibitori di proteine, VEN-combo: Combinazioni di venetoclax.

5 DISCUSSIONE

La MRD è un potente strumento attualmente approvato come indicatore surrogato per prevedere gli *outcome* e valutare l'efficacia del trattamento nei pazienti affetti da LLC nei *trial* clinici, prima che possano essere disponibili i dati relativi alle sopravvivenze. Nonostante le evidenze a suo favore siano ormai numerose, ad oggi nella pratica clinica la MRD non rientra in alcun algoritmo decisionale suggerito dalle linee guida. Le potenziali implicazioni cliniche della MRD nel guidare il trattamento dei pazienti con LLC sono allettanti, tanto che è probabile che questa farà il proprio ingresso nella pratica clinica nel prossimo futuro per una gestione personalizzata dei pazienti con LLC. Tuttavia, la validità degli approcci sopra menzionati è ancora argomento di dibattito in ambito ematologico e necessita di studi dedicati per essere completamente definita.

In questo studio retrospettivo monocentrico su 83 pazienti condotto all'interno della UOC di Ematologia e Immunologia Clinica (direttore Prof. Livio Trentin) dell'Azienda Ospedale-Università Padova è stata analizzata una popolazione relativamente anziana, con un'età media alla terapia di 68,6 anni, un rapporto M/F di 1,7, di cui oltre il 40% con importanti comorbidità. Il 60% dei pazienti era naïve ai trattamenti, mentre i restanti erano pazienti con LLC R/R con una media di 2,5 terapie precedenti. La maggior parte dei pazienti (61,4% e 96,4%) era in stadio avanzato Rai (III-IV) o Binet (B-C) e presentava un rischio secondo CLL-IPI intermedio nel 21,7% dei casi, alto nel 32,5% o altissimo nel 27,7%. Più di un terzo dei pazienti presentava aberrazioni di *TP53* o cariotipo complesso, mentre oltre il 60% degli stessi presentava uno stato IGHV non mutato. I pazienti sono stati trattati con combinazioni chemioimmunoterapiche (CIT, 37,3%), terapie target con inibitori di proteine (PI, 25,3%) o combinazioni di venetoclax (37,3%), ottenendo globalmente il 60% di CR, il 35% di PR e il 5% di SD/PD come miglior risposta secondo criteri clinico-radiologici (74). La quantificazione della MRD è stata condotta impiegando la metodica standardizzata di citofluorimetria multiparametrica a sei colori, presso la divisione di citofluorimetria del Laboratorio di Ematologia e Immunologia Clinica (responsabile Prof.ssa Monica

Facco).

Valutando la miglior risposta MRD tra sangue periferico e midollare al termine del trattamento, il tasso di uMRD4 è stato di 51,8%. Il *trend* di tassi uMRD4 registrato ha mostrato un incostante decremento considerando i pazienti trattati in prima linea e i pazienti R/R, ma le differenze per linea di trattamento non si sono dimostrate statisticamente significative ($p=0,2003$). Tale dato è da ascrivere *in primis* alla relativa esiguità del campione, ma anche alla scarsa comparabilità dei gruppi di pazienti, probabilmente per via della diversa prevalenza di marcatori biologici di malattia ad alto rischio fra pazienti naïve ai trattamenti e pazienti R/R: infatti, la quota di pazienti trattati con CIT era del 54% nei pazienti naïve e del 12% nei pazienti R/R; la quota di pazienti trattati con PI era del 18% nei pazienti naïve ed era più che raddoppiata nei pazienti R/R (36,3%); la quota di pazienti trattati con combinazioni di venetoclax era del 28% nei pazienti naïve e del 52% nei pazienti R/R. Come evidenziato da numerosi lavori pubblicati e confermato anche nel nostro, in effetti, la tipologia di trattamento influenza profondamente la possibilità di ottenere una MRD *undetectable* (147). D'altra parte, i dati presenti in letteratura circa le differenze in termini di tassi di uMRD4 fra pazienti naïve ai trattamenti e pazienti R/R sono difficilmente comparabili fra loro, anche se tassi più elevati sembrano essere stati raggiunti in pazienti alla prima linea di trattamento (164).

I tassi di uMRD4 stratificati per tipologia di trattamento sono stati del 68% per la CIT, del 19% per i trattamenti con PI e del 58% per le combinazioni di venetoclax. Come anticipato, è stata riscontrata una significatività statistica ($p=0,0018$) circa la capacità della CIT e delle combinazioni di venetoclax di indurre risposte profonde e *undetectable*. Il dato appare conforme alla letteratura, nonostante nella maggior parte dei lavori pubblicati i tassi più elevati di uMRD4 siano stati raggiunti con le combinazioni di venetoclax (149–151) e non con la CIT.

Sono stati individuati, fra i noti fattori prognostici della LLC, quelli in grado di correlare in maniera sfavorevole con il tasso di uMRD4. La presenza di CLL-IPI >4, CIRS ≥ 6 , del(17p) o mutazione di TP53, status U-IGHV ed il cariotipo complesso sono stati quelli per cui si è raggiunta la significatività statistica

($p=0,0079$, $p=0,0064$, $p=0,0119$, $p=0,0133$, $p=0,0064$, $p=0,0237$, rispettivamente). Le altre anomalie citogenetiche, quali del(11q), trisomia 12 e del(13q), invece, non si sono rivelate altrettanto impattanti in tal senso.

Per quanto riguarda la correlazione con *TP53 disruption*, una analisi *pooled* (147) di diversi *trial* sembra indicare che i dati che abbiamo ottenuto siano in linea con i risultati presenti in letteratura, almeno relativamente ai regimi a base di venetoclax. Analizzando i dati provenienti dallo studio CAPTIVATE FD (134), in cui i pazienti naïve sono stati trattati con ibrutinib e venetoclax, non sono emerse differenze in termini di MRD fra le coorti *TP53* mutate e le coorti *TP53 wild-type*. Nel *trial* MURANO (124), invece, nei pazienti R/R i tassi di uMRD4 ottenuti nel braccio VenR e nel braccio BR sono risultati correlati alla presenza di aberrazioni di *TP53* e cariotipo complesso, nonostante alcune differenze relative al disegno dello studio e alla tempistica di misurazione della MRD. Lo stesso *trial* ha evidenziato che gli stessi fattori biologici di rischio sono in grado non solo di influenzare il tasso di uMRD, ma anche di accelerare la velocità di ricrescita della MRD dopo il termine del trattamento.

I dati in letteratura circa la correlazione fra stato mutazionale IGHV e tassi di uMRD4 non sembrano fornire conclusioni univoche, nonostante la correlazione fra i due parametri possa apparire lapalissiana e i nostri dati altrettanto solidi. Infatti, uno studio retrospettivo (165) che aveva analizzato i tassi di uMRD4 al termine di trattamenti chemioterapici e chemioimmunoterapici non aveva rilevato associazioni fra status MRD e stato mutazionale IGHV, ma ciò potrebbe essere imputabile all'utilizzo di metodiche antiquate e ancora non standardizzate (essendo il lavoro stato pubblicato nel 2014) o all'utilizzo di terapie ormai obsolete. Un *trial* (166) del 2014 ha evidenziato, invece, come i tassi di uMRD4 al termine del trattamento con FCR fossero più elevati nella coorte M-IGHV. Risultati simili sono stati documentati nel braccio G-Chl del più recente *trial* GLOW (167). Al contrario, i bracci ibrutinib+venetoclax dei *trial* GLOW (167) e FLAIR (168) hanno riscontrato un tasso di uMRD4 più elevato nelle coorti U-IGHV. In questi ultimi due studi emerge come i pazienti U-IGHV riescano a raggiungere in una quota maggiore la uMRD, ma anche che la conversione a dMRD sia più rapida, così come il tempo alla recidiva clinica.

Per quel che riguarda le altre anomalie citogenetiche, quali del(11q), trisomia 12 e del(13q), la mancata relazione che intercorre fra queste e lo status MRD ottenuta nel nostro studio potrebbe essere frutto dell'esiguità del campione, ma anche spia del fatto che dette alterazioni, seppur conservando un solido valore predittivo di sopravvivenza, non siano in grado di modificare sensibilmente il *burden* tumorale ad un livello molecolare. Essendo scarsamente influenzata da questi parametri, la MRD potrebbe dimostrarsi poco sensibile nell'intercettare le più fini differenze prognostiche di malattia, che verrebbero invece identificate più accuratamente attraverso gli indicatori *time-to-event* comunemente impiegati in ematologia: ciò giustifica l'introduzione nei *trial* clinici dello status MRD come surrogato di detti *end-point*, e non come sostituto degli stessi.

Chiarire il ruolo che la MRD riveste di fronte a differenti biologie di malattia e a differenti trattamenti risulta essere estremamente complesso, dal momento che stratificare i pazienti secondo specifici trattamenti, sottogruppi e classi genetiche imporrebbe la necessità di disporre di coorti di pazienti molto ampie per mantenere la significatività statistica. Tuttavia, questo investimento potrebbe permettere, in futuro, di definire in maniera più accurata rispetto allo stato dell'arte quali siano le tempistiche più adeguate da adottare per il *follow-up* personalizzato di un paziente in remissione di malattia e potrebbe altresì orientare il clinico su quale sia la durata di trattamento necessaria affinché un paziente in fase di malattia attiva sia condotto ad una remissione duratura, secondo un approccio MRD-guidato. Quest'ultimo concetto rappresenta un *hot topic* della letteratura sulla LLC (154), dal momento che la validazione della MRD in tal senso potrebbe stravolgere l'attuale paradigma di trattamento della LLC: avere la possibilità di guidare l'interruzione o il mantenimento di una terapia sulla base di un dato facilmente accessibile attraverso un prelievo di sangue periferico avrebbe diversi vantaggi, tra cui il miglioramento dell'*outcome* per i pazienti e una notevole riduzione dei costi sanitari.

È stata registrata una correlazione statisticamente significativa ($p=0,0007$) fra status MRD e tipo di risposta ottenuta secondo iwCLL (74). In particolare, dei 50 pazienti in CR i tassi di dMRD4 e uMRD4 sono stati 32% e 68%, rispettivamente, mentre dei 29 pazienti in PR i tassi di dMRD4 e uMRD4 sono stati 69% e 31%,

rispettivamente. Nessun paziente in SD/PD ha ottenuto una uMRD4 e in effetti un *consensus* di esperti riguardante la MRD consiglia di riservare l'esecuzione di tale valutazione solo a pazienti in risposta completa o parziale (136). A parità di risposta CR o PR, i tassi di progressione sono risultati essere inferiori nei pazienti con uMRD4 rispetto ai pazienti con dMRD4 e i dati hanno raggiunto la significatività statistica ($p=0,01237$). La migliore capacità prognostica della MRD, se confrontata alla valutazione isolata della risposta secondo criteri clinico-radiologici, era stata già messa in luce da parte del *German Group* (142). In futuro, proseguendo su questa strada, l'introduzione della valutazione MRD nella pratica clinica potrebbe permettere al medico ematologo di ricorrere meno frequentemente alle classiche rivalutazioni strumentali, così da limitare sia i costi sanitari, sia i rischi per i pazienti ad esse associati. Al contempo, la stessa cadenza delle rivalutazioni potrebbe essere orientata e personalizzata sulla base dei risultati MRD.

La capacità preferenziale di alcuni trattamenti di indurre delle risposte profonde è stata suggerita anche dallo studio dei valori assoluti di MRD in relazione a regimi di CIT, PI o combinazioni di venetoclax, per cui si è registrato un *trend* verso la significatività statistica sia su sangue periferico ($p=0,0852$), sia su sangue midollare ($p=0,05451$). In particolare, le remissioni citofluorimetriche più profonde (uMRD5, uMRD4) si sono ottenute con la CIT o con le combinazioni di venetoclax, fornendo un *pattern* analogo a quello ottenuto quando sono stati studiati i vari trattamenti in relazione ai tassi di uMRD secondo la sua attuale definizione (MRD4). In aggiunta, dallo stesso studio sembra emergere anche che il numero di pazienti con uMRD5 sia addirittura superiore al numero di pazienti con uMRD4, sia su sangue periferico (19 e 14, rispettivamente), sia su sangue midollare (8 e 5, rispettivamente). Questa osservazione dovrebbe far orientare l'attenzione su quale sia la soglia più adeguata da impiegare per definire la *undetectability* del campione, soprattutto nell'era di terapie a bersaglio molecolare capaci di indurre risposte estremamente profonde e sostenute. Nonostante ciò, l'esiguità dei dati quantitativi di cui si disponeva probabilmente non permette di porre le debite conclusioni in merito.

Il tasso di concordanza ottenuto comparando la valutazione simultanea della MRD

su campioni di sangue periferico e sangue midollare è stato di 82,2%, con un indice Kappa di Cohen stimante una buona concordanza. Dei 15 pazienti con uMRD4 su sangue midollare, nessuno ha presentato dMRD4 su sangue periferico e questo potrebbe essere dipeso dall'utilizzo di un campione di sangue midollare eccessivamente diluito o dallo studio di pazienti con malattia in remissione midollare, ma con linfadenopatie residue. Le discrepanze maggiori sono state invece registrate per i pazienti con uMRD4 su sangue periferico e dMRD4 su sangue midollare. I risultati ottenuti sono in linea con i dati presenti in letteratura (136) e sembrano indicare che la sola valutazione eseguita su sangue periferico possa essere un indicatore affidabile e sufficiente a stimare il *burden* tumorale complessivo dei pazienti con LLC. Questo potrebbe tradursi in un prezioso vantaggio per i pazienti, vista l'invasività della procedura di prelievo di sangue midollare, e potrebbe limitare lo studio MRD su quest'ultimo campione solo a rare circostanze (74,142,156), privilegiando invece per l'analisi di routine il campione di sangue periferico.

Nel nostro studio, i dati *time-to-event* di sopravvivenza sono stati ottenuti dopo un *follow-up* medio globale di 45 mesi. I pazienti che alla fine della terapia avevano raggiunto lo status uMRD4 hanno mostrato una RFS significativamente maggiore rispetto ai pazienti con dMRD4, con un rischio di progressione di malattia per questi ultimi più che raddoppiato (HR=2,3 95% CI, 1,111-4,896, p=0,0297). La RFS mediana non è stata raggiunta nel gruppo uMRD4, mentre è stata di 53 mesi nel gruppo dMRD4. La RFS a 4 anni è stata dell'84% e del 57% nei gruppi dMRD4 e dMRD4, rispettivamente. Non sono state osservate differenze in termini di RFS stratificando per tipologia di trattamento impiegato (CIT, PI o combinazioni di venetoclax) tra i pazienti uMRD4, poiché non è stata raggiunta la RFS mediana in nessuna delle tre coorti. Fra i pazienti dMRD4, invece, quelli trattati con combinazioni di venetoclax hanno mostrato una RFS significativamente maggiore rispetto ai pazienti trattati con CIT o PI; infatti, la RFS mediana in questi gruppi di pazienti è stata di 58, 25 e 32 mesi, rispettivamente, con p<0,0001.

Dopo lo stesso tempo di *follow-up*, i pazienti con uMRD4 alla fine della terapia hanno mostrato una OS significativamente maggiore rispetto ai pazienti con

dMRD4, con un rischio di morte circa 4 volte superiore per questi ultimi (HR=3,95 95% CI, 1,712-9,138, p=0,0054). La OS mediana non è stata raggiunta in nessuna delle due coorti, mentre la OS a 4 anni è stata del 94% nella coorte uMRD4 e del 68% nella coorte dMRD4. Anche per la OS non sono state rilevate differenze significative nei pazienti uMRD4 in relazione al trattamento utilizzato (CIT, PI o combinazioni di venetoclax), dal momento che la OS mediana non è stata raggiunta in nessuno dei tre gruppi di pazienti. Fra i pazienti dMRD4, invece, la OS mediana non è stata raggiunta nella coorte trattata con combinazioni di venetoclax, mentre è stata di 94 e 58 mesi nelle coorti trattate con CIT e PI, rispettivamente, con p=0,0008.

Dai dati di sopravvivenza emersi dal nostro studio emergono diverse considerazioni. *In primis*, aver registrato delle differenze importanti in termini di RFS e OS fra coorti uMRD4 e dMRD4 al termine del trattamento e contemporaneamente non aver ottenuto differenze statisticamente significative considerando gli stessi indicatori quando l'analisi è stata ristretta ai pazienti con uMRD e diversificando per trattamento, evidenzia che i pazienti condotti a remissione molecolare di malattia mostrano degli *outcome* di sopravvivenza sensibilmente superiori di quelli che non riescono a raggiungere una malattia residua misurabile *undetectable*, a prescindere dal trattamento utilizzato. In quest'ottica, lo status uMRD si configura come un solido indicatore di controllo di malattia e come un importante obiettivo terapeutico da perseguire in pazienti nei quali si intende mirare all'ottenere remissioni durature di malattia o, addirittura, alla guarigione dalla stessa, nonostante la LLC si configuri come un disordine ematologico cronico incurabile con i mezzi di attuale impiego. D'altra parte, l'aver dimostrato un'intima correlazione tra la MRD e i dati di sopravvivenza giustifica l'impiego della valutazione MRD nel contesto di *trial* clinici come *end-point* surrogato degli indicatori *time-to-event*, in modo da fornire uno strumento che permetta un immediato confronto tra coorti di pazienti, senza la necessità di dover attendere la maturazione dei dati di sopravvivenza, imponendo questi ultimi tempi di *follow-up* più lunghi.

Un altro dato che emerge dal nostro studio è che fra i pazienti dMRD4, le combinazioni a base di venetoclax sembrano offrire un ottimo controllo di

malattia, con tassi di RFS e OS nettamente superiori rispetto alla CIT o alla terapia con PI. Questi nuovi farmaci si dimostrano estremamente utili specialmente laddove la risposta alle terapie sia sub-ottimale o in un contesto in cui il fine ultimo del trattamento non sia tanto l'eradicazione di malattia, quanto un controllo di malattia a scopo palliativo, come negli anziani, popolazione che tollera in maniera soddisfacente queste molecole.

I limiti di questo studio sono innanzitutto collegati alla sua natura retrospettiva. Questo ha invariabilmente influito sulla raccolta dei dati dei pazienti, che peraltro talvolta afferivano all'UOC di Ematologia e Immunologia Clinica (direttore Prof. Livio Trentin) dell'Azienda Ospedale-Università Padova per terapie di salvataggio, dopo essere stati pretrattati in altri centri; inoltre, non sempre un paziente era seguito in tutto il percorso terapeutico dallo stesso specialista. Ulteriore limite di questo studio è rappresentato dalla scarsità campionaria e dall'impatto che la malattia da Sars-CoV2 ha avuto nei contesti sanitari. La pandemia, in effetti, potrebbe aver introdotto alcuni *bias* negli *outcome* di sopravvivenza dei pazienti affetti da LLC, essendo questi considerati soggetti a rischio. Nello studio si è cercato di porre rimedio a questa problematica scegliendo un dato di sopravvivenza, la RFS, che si presta meglio a descrivere l'andamento del disordine ematologico oggetto di studio rispetto alla PFS, che è influenzata in maniera più vigorosa da eventi esterni alla sfera neoplastica. In ultimo, per via degli elevati costi che ne sarebbero derivati, nello studio non è stato possibile impiegare delle metodiche complementari alla citofluorimetria, come l'analisi molecolare o la rilevazione del *circulating tumor DNA* (ctDNA), al fine di studiare l'accuratezza della citofluorimetria a sei colori nell'intercettare la malattia soprattutto quando questa assume un fenotipo prevalentemente linfonodale (157).

In conclusione, in questo studio di tesi emergono chiaramente i determinanti biologici e terapeutici che influenzano lo status MRD e i presupposti a favore dell'introduzione della valutazione MRD, una volta raggiunto un *consensus* concernente la sua standardizzazione, nelle indagini raccomandate dalle future linee guida sulla LLC per la pratica clinica, che attualmente si riservano di consigliarne l'utilizzo solo per fini accademici.

BIBLIOGRAFIA

1. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. luglio 2022;36(7):1703–19.
2. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*. 2021;96(12):1679–705.
3. Yang S, Varghese AM, Sood N, Chiattonne C, Akinola NO, Huang X, et al. Ethnic and geographic diversity of chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. febbraio 2021;35(2):433–9.
4. Oscier D, Else M, Matutes E, Morilla R, Strefford JC, Catovsky D. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol*. settembre 2016;174(5):767–75.
5. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer, curatori. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. ed. Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer; 2008. 439 p. (World Health Organization Classification of Tumours).
6. Inamdar KV, Bueso-Ramos CE. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Ann Diagn Pathol*. ottobre 2007;11(5):363–89.
7. Gray JL, Jacobs A, Block M. Bone marrow and peripheral blood lymphocytosis in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. aprile 1974;33(4):1169–78.
8. Han T, Barcos M, Emrich L, Ozer H, Gajera R, Gomez GA, et al. Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *J Clin Oncol*. giugno 1984;2(6):562–70.
9. Schade U, Bock O, Vornhusen S, Jäger A, Büsche G, Lehmann U, et al. Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status and expression of 70-kd zeta-associated protein (ZAP-70). *Hum Pathol*. settembre 2006;37(9):1153–61.

10. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 19 gennaio 2017;3:16096.
11. Lampson BL, Gupta A, Tyekucheva S, Mashima K, Petráčková A, Wang Z, et al. Rare Germline ATM Variants Influence the Development of Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 10 febbraio 2023;41(5):1116–28.
12. Slager SL, Benavente Y, Blair A, Vermeulen R, Cerhan JR, Costantini AS, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr*. agosto 2014;2014(48):41–51.
13. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 16 agosto 2011;20(2):246–59.
14. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. settembre 2014;4(9):1088–101.
15. Quijada-Álamo M, Hernández-Sánchez M, Robledo C, Hernández-Sánchez JM, Benito R, Montaña A, et al. Next-generation sequencing and FISH studies reveal the appearance of gene mutations and chromosomal abnormalities in hematopoietic progenitors in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*. 11 aprile 2017;10(1):83.
16. Di Ianni M, Baldoni S, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, De Falco F, et al. NOTCH1 Is Aberrantly Activated in Chronic Lymphocytic Leukemia Hematopoietic Stem Cells. *Front Oncol*. 20 aprile 2018;8:105.
17. Del Giudice I, Cappelli LV, Delgado J, Niemann CU, Andersen MA, Rotbain EHC, et al. Spontaneous regression in chronic lymphocytic leukaemia. Clinical features of 50 cases from the ERIC registry and review of the literature. *British Journal of Haematology*. 2023;201(2):353–6.
18. Delgado J, Nadeu F, Colomer D, Campo E. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*. 2 luglio 2020;105(9):2205–17.
19. Schroeder HW, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunology Today*. 1 giugno 1994;15(6):288–94.

20. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 15 settembre 1999;94(6):1840–7.
21. Chiorazzi N, Chen SS, Rai KR. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 febbraio 2021;11(2):a035220.
22. Hervé M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest*. giugno 2005;115(6):1636–43.
23. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of Gene Expression Phenotype to Immunoglobulin Mutation Genotype in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Exp Med*. 3 dicembre 2001;194(11):1639–48.
24. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 22 ottobre 2015;526(7574):525–30.
25. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 3 dicembre 2001;194(11):1625–38.
26. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*. 2 novembre 1998;188(9):1679–89.
27. Slupsky JR. Does B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia cells differ from that in other B cell types? *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014:208928.
28. Packham G, Krysov S, Allen A, Savelyeva N, Steele AJ, Forconi F, et al. The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica*. luglio 2014;99(7):1138–48.
29. Chu CC, Catera R, Hatzi K, Yan XJ, Zhang L, Wang XB, et al. Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood*. 15 dicembre 2008;112(13):5122–9.
30. Hoogeboom R, van Kessel KPM, Hochstenbach F, Wormhoudt TA, Reinten RJA, Wagner K, et al. A mutated B cell chronic lymphocytic leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *J Exp Med*. 14 gennaio 2013;210(1):59–70.

31. Hoogeboom R, Wormhoudt TA, Schipperus MR, Langerak AW, Dunn-Walters DK, Guikema JEJ, et al. A novel chronic lymphocytic leukemia subset expressing mutated IGHV3-7-encoded rheumatoid factor B-cell receptors that are functionally proficient. *Leukemia*. marzo 2013;27(3):738–40.
32. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 16 agosto 2004;200(4):519–25.
33. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 1 gennaio 2007;109(1):259–70.
34. Rossi D, Gaidano G. Biological and clinical significance of stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. dicembre 2010;95(12):1992–5.
35. Minici C, Gounari M, Übelhart R, Scarfò L, Dühren-von Minden M, Schneider D, et al. Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 9 giugno 2017;8(1):15746.
36. Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 13 settembre 2012;489(7415):309–12.
37. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 15 ottobre 2008;112(8):3322–9.
38. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 1 giugno 2011;29(16):2223–9.
39. Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. aprile 2005;114(4):441–9.
40. Wickremasinghe RG, Prentice AG, Steele AJ. Aberrantly activated anti-apoptotic signalling mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia cells: clues to the identification of novel therapeutic targets. *Br J Haematol*. giugno 2011;153(5):545–56.

41. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol.* gennaio 1996;92(1):97–103.
42. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 settembre 2005;102(39):13944–9.
43. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res.* 2000;79:157–73.
44. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol.* marzo 1989;71(3):343–50.
45. Trimarco V, Ave E, Facco M, Chiodin G, Frezzato F, Martini V, et al. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival. *Oncotarget.* 8 dicembre 2015;6(39):42130–49.
46. van Attekum MH, Eldering E, Kater AP. Chronic lymphocytic leukemia cells are active participants in microenvironmental cross-talk. *Haematologica.* settembre 2017;102(9):1469–76.
47. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta.* marzo 2016;1863(3):401–13.
48. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood.* 28 febbraio 2013;121(9):1612–21.
49. Fiorcari S, Maffei R, Atene CG, Potenza L, Luppi M, Marasca R. Nurse-Like Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells: A Mutualistic Crosstalk inside Tissue Microenvironments. *Cells.* 22 gennaio 2021;10(2):217.
50. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 α . *Blood.* 1 agosto 2005;106(3):1012–20.
51. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells

- from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 15 ottobre 2000;96(8):2655–63.
52. Ruan J, Hyjek E, Kermani P, Christos PJ, Hooper AT, Coleman M, et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 1 ottobre 2006;12(19):5622–31.
53. Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Supprian M, Rudelius M, Klein-Hitpass L, Finch AJ, et al. Protein Kinase C- β -Dependent Activation of NF- κ B in Stromal Cells Is Indispensable for the Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells In Vivo. *Cancer Cell*. 14 gennaio 2013;23(1):77–92.
54. Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood*. 4 marzo 2010;115(9):1755–64.
55. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*. 12 novembre 2009;114(20):4441–50.
56. Svanberg R, Janum S, Patten PEM, Ramsay AG, Niemann CU. Targeting the tumor microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 1 settembre 2021;106(9):2312–24.
57. Arruga F, Gyau BB, Iannello A, Vitale N, Vaisitti T, Deaglio S. Immune Response Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia: Dissecting Molecular Mechanisms and Microenvironmental Conditions. *Int J Mol Sci*. 6 marzo 2020;21(5):1825.
58. Riches JC, Gribben JG. Immunomodulation and immune reconstitution in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*. luglio 2014;51(3):228–34.
59. D'Arena G, Rossi G, Vannata B, Deaglio S, Mansueto G, D'Auria F, et al. Regulatory T-cells in chronic lymphocytic leukemia and autoimmune diseases. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012053.
60. Kabanova A, Sanseviero F, Candi V, Gamberucci A, Gozzetti A, Campoccia G, et al. Human Cytotoxic T Lymphocytes Form Dysfunctional Immune Synapses with B Cells Characterized by Non-Polarized Lytic Granule Release. *Cell Reports*. 5 aprile 2016;15(1):9–18.
61. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*. 30 luglio 2015;126(5):573–81.

62. Smolej L. Incidence and prognostic significance of serum immunoglobulins and paraproteins in patients with chronic lymphocytic leukaemia: another valuable piece of the puzzle. *British Journal of Haematology*. 2020;190(6):815–6.
63. Šimkovič M, Turcsányi P, Špaček M, Mihályová J, Ryznerová P, Maco M, et al. COVID-19 in patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter analysis by the Czech CLL study group. *Ann Hematol*. 2023;102(4):811–7.
64. Herzog Tzarfati K, Gutwein O, Apel A, Rahimi-Levene N, Sadovnik M, Harel L, et al. BNT162b2 COVID-19 vaccine is significantly less effective in patients with hematologic malignancies. *Am J Hematol*. 1 ottobre 2021;96(10):1195–203.
65. Sun C, Wiestner A. Can We Restore Immunocompetence in CLL? *Hematol Oncol Clin North Am*. agosto 2021;35(4):827–45.
66. Alexander KE, Tong PL, Macartney K, Beresford R, Sheppard V, Gupta M. Live zoster vaccination in an immunocompromised patient leading to death secondary to disseminated varicella zoster virus infection. *Vaccine*. 22 giugno 2018;36(27):3890–3.
67. Elnair R, Ellithi M, Kallam A, Shostrom V, Bociek RG. Outcomes of Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): an analysis of the SEER database. *Ann Hematol*. ottobre 2021;100(10):2513–9.
68. Condoluci A, Rossi D. Richter Syndrome. *Curr Oncol Rep*. 12 febbraio 2021;23(3):26.
69. Cherepakhin V, Baird SM, Meisenholder GW, Kipps TJ. Common clonal origin of chronic lymphocytic leukemia and high-grade lymphoma of Richter's syndrome. *Blood*. 15 novembre 1993;82(10):3141–7.
70. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I, Rossi D, Rancoita PMV, Strefford JC, et al. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*. 10 ottobre 2013;122(15):2673–82.
71. Wang Y, Rabe KG, Bold MS, Shi M, Hanson CA, Schwager SM, et al. The role of 18F-FDG-PET in detecting Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia in patients receiving therapy with a B-cell receptor inhibitor. *Haematologica*. 1 novembre 2020;105(11):2675–8.
72. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood*. 24 marzo 2011;117(12):3391–401.

73. Abrisqueta P, Delgado J, Alcoceba M, Oliveira AC, Loscertales J, Hernández-Rivas JA, et al. Clinical outcome and prognostic factors of patients with Richter syndrome: real-world study of the Spanish Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group (GELLC). *Br J Haematol.* settembre 2020;190(6):854–63.
74. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 21 giugno 2018;131(25):2745–60.
75. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, et al. Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 7 agosto 2008;359(6):575–83.
76. Chatzikonstantinou T, Demosthenous C, Baliakas P. Biology and Treatment of High-Risk CLL: Significance of Complex Karyotype. *Front Oncol.* 2021;11:788761.
77. Mouhssine S, Gaidano G. Richter Syndrome: From Molecular Pathogenesis to Druggable Targets. *Cancers (Basel).* 24 settembre 2022;14(19):4644.
78. Crombie J, Davids MS. IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* dicembre 2017;92(12):1393–7.
79. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM, Ayats R, Vallespí T, Parody R, et al. Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood.* settembre 1984;64(3):642–8.
80. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* agosto 1975;46(2):219–34.
81. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1 luglio 1981;48(1):198–206.
82. K R. A critical analysis of staging in CLL. *Chronic Lymphocytic Leukemia, Recent Progress and Future Directions.* 1987;253–64.
83. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* giugno 2016;17(6):779–90.
84. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst.* 19 maggio 1999;91(10):861–8.

85. Condoluci A, Terzi di Bergamo L, Langerbeins P, Hoehstetter MA, Herling CD, De Paoli L, et al. International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 21 maggio 2020;135(21):1859–69.
86. Steurer M, Pall G, Richards S, Schwarzer G, Bohlius J, Greil R. Purine antagonists for chronic lymphocytic leukaemia. *Cochrane Database Syst Rev*. 19 luglio 2006;2006(3):CD004270.
87. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer M, Bezares RF, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 21 luglio 2007;370(9583):230–9.
88. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1 febbraio 2006;107(3):885–91.
89. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, Dewald GW, Bennett JM, Paietta EM, et al. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol*. 1 marzo 2007;25(7):793–8.
90. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, Liberati A, Loscertales J, Herbrecht R, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 10 settembre 2009;27(26):4378–84.
91. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*. 2005;8:140–74.
92. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 14 gennaio 2016;127(2):208–15.
93. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *The Lancet Oncology*. 1 luglio 2016;17(7):928–42.

94. Kutsch N, Bahlo J, Robrecht S, Franklin J, Zhang C, Maurer C, et al. Long Term Follow-up Data and Health-Related Quality of Life in Frontline Therapy of Fit Patients Treated With FCR Versus BR (CLL10 Trial of the GCLLSG). *Hemasphere*. 27 gennaio 2020;4(1):e336.
95. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 3 giugno 2010;115(22):4393–402.
96. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, et al. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO*. aprile 1997;15(4):1567–74.
97. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*. 1 maggio 2004;103(9):3278–81.
98. Moutouh-de Parseval LA, Weiss L, DeLap RJ, Knight RD, Zeldis JB. Tumor Lysis Syndrome/Tumor Flare Reaction in Lenalidomide-Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO*. novembre 2007;25(31):5047–5047.
99. Turtle CJ, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Cherian S, Chen X, et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *JCO*. 10 settembre 2017;35(26):3010–20.
100. Barr PM, Owen C, Robak T, Tedeschi A, Bairey O, Burger JA, et al. Up to 8-year follow-up from RESONATE-2: first-line ibrutinib treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood Advances*. 8 giugno 2022;6(11):3440–50.
101. Ahn IE, Tian X, Wiestner A. Ibrutinib for Chronic Lymphocytic Leukemia with TP53 Alterations. *N Engl J Med*. 30 luglio 2020;383(5):498–500.
102. Munir T, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Barr PM, Reddy NM, et al. Final analysis from RESONATE: Up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol*. dicembre 2019;94(12):1353–63.
103. Moreno C, Greil R, Demirkan F, Tedeschi A, Anz B, Larratt L, et al. First-line treatment of chronic lymphocytic leukemia with ibrutinib plus obinutuzumab *versus* chlorambucil plus obinutuzumab: final analysis of the randomized, phase III iLLUMINATE trial. *Haematologica*. 13 gennaio 2022;107(9):2108–20.

104. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, Zhao W, Booth AM, Ding W, et al. Ibrutinib Regimens versus Chemoimmunotherapy in Older Patients with Untreated CLL. *New England Journal of Medicine*. 27 dicembre 2018;379(26):2517–28.
105. Shatzel JJ, Olson SR, Tao DL, McCarty OJT, Danilov AV, DeLoughery TG. Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk reduction strategies. *J Thromb Haemost*. maggio 2017;15(5):835–47.
106. Yun S, Vincelette ND, Acharya U, Abraham I. Risk of Atrial Fibrillation and Bleeding Diathesis Associated With Ibrutinib Treatment: A Systematic Review and Pooled Analysis of Four Randomized Controlled Trials. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 1 gennaio 2017;17(1):31-37.e13.
107. Vrontikis A, Carey J, Gilreath JA, Halwani A, Stephens DM, Sweetenham JW. Proposed Algorithm for Managing Ibrutinib-Related Atrial Fibrillation. *Oncology (Williston Park)*. 15 novembre 2016;30(11):970–4, 980–1, C3.
108. Boriani G, Corradini P, Cuneo A, Falanga A, Foà R, Gaidano G, et al. Practical management of ibrutinib in the real life: Focus on atrial fibrillation and bleeding. *Hematological Oncology*. 2018;36(4):624–32.
109. Mato AR, Nabhan C, Thompson MC, Lamanna N, Brander DM, Hill B, et al. Toxicities and outcomes of 616 ibrutinib-treated patients in the United States: a real-world analysis. *Haematologica*. 1 maggio 2018;103(5):874–9.
110. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, Heerema NA, Zhao W, Abruzzo L, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncology*. 1 aprile 2015;1(1):80–7.
111. Byrd JC, Hillmen P, Ghia P, Kater AP, Chanan-Khan A, Furman RR, et al. Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial. *JCO*. novembre 2021;39(31):3441–52.
112. Atkinson BT, Ellmeier W, Watson SP. Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk. *Blood*. 15 novembre 2003;102(10):3592–9.
113. Brown JR, Eichhorst B, Hillmen P, Jurczak W, Kaźmierczak M, Lamanna N, et al. Zanubrutinib or Ibrutinib in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 26 gennaio 2023;388(4):319–32.
114. Mato AR, Shah NN, Jurczak W, Cheah CY, Pagel JM, Woyach JA, et al. Pirtobrutinib in relapsed or refractory B-cell malignancies (BRUIN): a phase 1/2 study. *The Lancet*. 6 marzo 2021;397(10277):892–901.

115. Wang E, Mi X, Thompson MC, Montoya S, Notti RQ, Afaghani J, et al. Mechanisms of Resistance to Noncovalent Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors. *N Engl J Med*. 24 febbraio 2022;386(8):735–43.
116. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 29 settembre 2011;118(13):3603–12.
117. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 29 maggio 2014;123(22):3390–7.
118. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 13 marzo 2014;370(11):997–1007.
119. Mauro FR, Caputo MD, Rosati S, Pepe S, De Benedittis D, De Luca ML, et al. Balancing efficacy and toxicity of targeted agents currently used for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Expert Review of Hematology*. 3 agosto 2018;11(8):601–11.
120. Flinn IW, Hillmen P, Montillo M, Nagy Z, Illés Á, Etienne G, et al. The phase 3 DUO trial: duvelisib vs ofatumumab in relapsed and refractory CLL/SLL. *Blood*. 6 dicembre 2018;132(23):2446–55.
121. Davids MS, Kim HT, Nicotra A, Savell A, Francoeur K, Hellman JM, et al. Umbralisib in combination with ibrutinib in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia or mantle cell lymphoma: a multicentre phase 1–1b study. *The Lancet Haematology*. 1 gennaio 2019;6(1):e38–47.
122. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 28 gennaio 2016;374(4):311–22.
123. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 1 giugno 2016;17(6):768–78.
124. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst BF, D'Rozario J, Owen CJ, Assouline S, et al. Enduring undetectable MRD and updated outcomes in relapsed/refractory CLL after fixed-duration venetoclax-rituximab. *Blood*. 25 agosto 2022;140(8):839–50.

125. Al-Sawaf O, Zhang C, Jin HY, Robrecht S, Choi Y, Balasubramanian S, et al. Transcriptomic profiles and 5-year results from the randomized CLL14 study of venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun.* 18 aprile 2023;14(1):2147.
126. Blombery P, Anderson MA, Gong J nan, Thijssen R, Birkinshaw RW, Thompson ER, et al. Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discovery.* 1 marzo 2019;9(3):342–53.
127. Stauder R, Eichhorst B, Hamaker ME, Kaplanov K, Morrison VA, Österborg A, et al. Management of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the elderly: a position paper from an international Society of Geriatric Oncology (SIOG) Task Force. *Ann Oncol.* 1 febbraio 2017;28(2):218–27.
128. Parmelee PA, Thuras PD, Katz IR, Lawton MP. Validation of the Cumulative Illness Rating Scale in a geriatric residential population. *J Am Geriatr Soc.* febbraio 1995;43(2):130–7.
129. Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 1 agosto 2016;104:169–82.
130. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2 ottobre 2010;376(9747):1164–74.
131. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 21 gennaio 2016;127(3):303–9.
132. Herishanu Y, Levi S, Goldschmidt N, Morabito F, Bairey O, Del Poeta G, et al. Efficacy of Front-Line Ibrutinib Versus Fludarabine, Cyclophosphamide and Rituximab (FCR) in Patients with CLL. a Multicenter “Real-World” Study. *Blood.* 23 novembre 2021;138:2641.
133. Eichhorst B, Niemann CU, Kater AP, Fürstenau M, von Tresckow J, Zhang C, et al. First-Line Venetoclax Combinations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 11 maggio 2023;388(19):1739–54.
134. Tam CS, Allan JN, Siddiqi T, Kipps TJ, Jacobs R, Opat S, et al. Fixed-duration ibrutinib plus venetoclax for first-line treatment of CLL: primary analysis of the CAPTIVATE FD cohort. *Blood.* 2 giugno 2022;139(22):3278–89.

135. Burger JA, O'Brien S. Evolution of CLL treatment - from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* agosto 2018;15(8):510–27.
136. Wierda WG, Rawstron A, Cymbalista F, Badoux X, Rossi D, Brown JR, et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations. *Leukemia.* novembre 2021;35(11):3059–72.
137. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia.* aprile 2016;30(4):929–36.
138. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* maggio 2007;21(5):956–64.
139. Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, González-Barca E, González M, Ferrà C, et al. Rituximab maintenance after first-line therapy with rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) for chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 5 dicembre 2013;122(24):3951–9.
140. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol.* 20 marzo 2012;30(9):980–8.
141. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 20 marzo 2014;370(12):1101–10.
142. Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, Bahlo J, Cramer P, von Tresckow J, et al. Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *JCO.* novembre 2016;34(31):3758–65.
143. Letestu R, Dahmani A, Boubaya M, Baseggio L, Campos L, Chatelain B, et al. Prognostic value of high-sensitivity measurable residual disease assessment after front-line chemoimmunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* giugno 2021;35(6):1597–609.
144. Lamanna N, Jurcic JG, Noy A, Maslak P, Gencarelli AN, Panageas KS, et al. Sequential therapy with fludarabine, high-dose cyclophosphamide, and rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia

- produces high-quality responses: molecular remissions predict for durable complete responses. *J Clin Oncol.* 1 febbraio 2009;27(4):491–7.
145. Fischer K, Cramer P, Busch R, Böttcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol.* 10 settembre 2012;30(26):3209–16.
146. Ahn IE, Farooqui MZH, Tian X, Valdez J, Sun C, Soto S, et al. Depth and durability of response to ibrutinib in CLL: 5-year follow-up of a phase 2 study. *Blood.* 24 maggio 2018;131(21):2357–66.
147. Benintende G, Pozzo F, Innocenti I, Autore F, Fresa A, D’Arena G, et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Front Oncol.* 14 febbraio 2023;13:1112616.
148. Jones JA, Mato AR, Wierda WG, Davids MS, Choi M, Cheson BD, et al. Venetoclax for chronic lymphocytic leukaemia progressing after ibrutinib: an interim analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* gennaio 2018;19(1):65–75.
149. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D’Rozario J, Assouline S, et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 22 marzo 2018;378(12):1107–20.
150. Al-Sawaf O, Zhang C, Tandon M, Sinha A, Fink AM, Robrecht S, et al. Venetoclax plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL14): follow-up results from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* settembre 2020;21(9):1188–200.
151. Eichhorst B, Niemann C, Kater AP, Fürstenau M, Von Tresckow J, Zhang C, et al. A Randomized Phase III Study of Venetoclax-Based Time-Limited Combination Treatments (R_{Ve}, G_{Ve}, G_{IVe}) Vs Standard Chemoimmunotherapy (CIT: FCR/BR) in Frontline Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) of Fit Patients: First Co-Primary Endpoint Analysis of the International Intergroup GAIA (CLL13) Trial: Ash Annual Meeting & Exposition. *Blood.* 1 novembre 2021;138(Suppl. 1).
152. Kurtz DM, Esfahani MS, Scherer F, Soo J, Jin MC, Liu CL, et al. Dynamic Risk Profiling Using Serial Tumor Biomarkers for Personalized Outcome Prediction. *Cell.* 25 luglio 2019;178(3):699-713.e19.
153. Esteve J, Villamor N, Colomer D, Cervantes F, Campo E, Carreras E, et al. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: different outcome after autologous and allogeneic transplantation and correlation with minimal residual disease status. *Leukemia.* 1 marzo 2001;15(3):445–51.

154. Wierda WG, Allan JN, Siddiqi T, Kipps TJ, Opat S, Tedeschi A, et al. Ibrutinib Plus Venetoclax for First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: Primary Analysis Results From the Minimal Residual Disease Cohort of the Randomized Phase II CAPTIVATE Study. *J Clin Oncol.* 1 dicembre 2021;39(34):3853–65.
155. Gopalakrishnan S, Wierda W, Chyla B, Menon R, Miles D, Humerickhouse R, et al. Integrated Mechanistic Model of Minimal Residual Disease Kinetics With Venetoclax Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* febbraio 2021;109(2):424–32.
156. Fürstenau M, Bahlo J, Fink AM, Lange E, Dreger P, Dreyling M, et al. Residual abdominal lymphadenopathy after intensive frontline chemoimmunotherapy is associated with inferior outcome independently of minimal residual disease status in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* marzo 2020;34(3):924–8.
157. Fürstenau M, Weiss J, Giza A, Franzen F, Robrecht S, Fink AM, et al. Circulating Tumor DNA-Based MRD Assessment in Patients with CLL Treated with Obinutuzumab, Acalabrutinib, and Venetoclax. *Clin Cancer Res.* 3 ottobre 2022;28(19):4203–11.
158. Robertson LE, Huh YO, Butler JJ, Pugh WC, Hirsch-Ginsberg C, Stass S, et al. Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis. *Blood.* 1 luglio 1992;80(1):29–36.
159. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* dicembre 1982;5(6):649–55.
160. Miller MD, Paradis CF, Houck PR, Mazumdar S, Stack JA, Rifai AH, et al. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research: application of the Cumulative Illness Rating Scale. *Psychiatry Res.* marzo 1992;41(3):237–48.
161. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, Schmid M, curatori. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature including new sequence-based cytogenomic nomenclature. Freiburg im Breisgau s.l: Karger, S; 2016. 139 p. (ISCN).
162. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: A systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American Journal of Hematology.* 2014;89(3):249–55.

163. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*. 2018;32(5):1070–80.
164. Fisher A, Goradia H, Martinez-Calle N, Patten PEM, Munir T. The evolving use of measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia clinical trials. *Front Oncol*. 22 febbraio 2023;13:1130617.
165. Santacruz R, Villamor N, Aymerich M, Martínez-Trillos A, López C, Navarro A, et al. The prognostic impact of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia requiring first-line therapy. *Haematologica*. 1 maggio 2014;99(5):873–80.
166. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, Burger J, Ferrajoli A, Jain N, et al. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood*. 12 giugno 2014;123(24):3727–32.
167. Munir T, Moreno C, Owen C, Follows G, Benjamini O, Janssens A, et al. Impact of Minimal Residual Disease on Progression-Free Survival Outcomes After Fixed-Duration Ibrutinib-Venetoclax Versus Chlorambucil-Obinutuzumab in the GLOW Study. *JCO*. 6 giugno 2023;JCO.22.02283.
168. Munir T, Pitchford A, Bloor A, Pettitt A, Patten PEM, Forconi F, et al. Combination of Ibrutinib Plus Venetoclax with MRD-Driven Duration of Treatment Results in a Higher Rate of MRD Negativity in IGHV Unmutated Than Mutated CLL: Updated Interim Analysis of FLAIR Study. *Blood*. 15 novembre 2022;140(Supplement 1):231–3.