



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

**Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e
Scienze per la Salute**

**Dottorato in Medicina Molecolare
XXIX Ciclo**

Anni accademici: 2014-2017

Valutazione molecolare della Malattia Minima Residua e analisi dell'impatto clinico nello studio di fase III FIL MCL0208

LUIGIA MONITILLO

Referente: Dott. SIMONE FERRERO

Coordinatore: Prof. FRANCESCO NOVELLI

Indice

Il Linfoma Mantellare.....	5
Origine della cellula e struttura del linfonodo.....	5
Patogenesi molecolare.....	7
Epidemiologia	11
Presentazione Clinica.....	11
Diagnosi.....	12
Fattori prognostici.....	14
Approccio terapeutico	17
Watch and wait	17
Prima linea: pazienti <65 anni e <i>fit</i>	18
Prima linea: pazienti >65 anni <i>fit</i>	19
Prima linea: pazienti <i>frail</i>	20
Seconda linea: pazienti in recidiva o refrattari	21
Farmaci a bersaglio molecolare	21
Terapia di mantenimento	25
Valutazione della risposta.....	25
La malattia minima residua.....	27
Reazione Polimerasica a Catena (PCR).....	28
I geni delle immunoglobuline	29
Marcatori molecolari del MCL: IGH e BCL1.....	32
Approccio MRD paziente-specifico basato su PCR qualitativa (Nested PCR)	33
Approccio MRD paziente-specifico basato su PCR quantitativa (RQ-PCR)	33
Nuovi approcci metodologici per lo studio della MRD	35
La malattia minima residua nel MCL.....	37

Metodi per l'analisi MRD	37
Citofluorimetria.....	37
RQ-PCR.....	38
High-throughput sequencing (HTS).....	39
MRD durante e dopo il trattamento di induzione	40
MRD prima del consolidamento ad alte dosi.....	41
MRD dopo il consolidamento ad alte dosi.....	42
MRD nella remissione clinica dopo il trattamento	43
Fonte di materiale per la valutazione MRD	44
Nuovi concetti per la valutazione della risposta clinica nel MCL.....	45
Strategie di trattamento MRD-driven.....	46
Razionale dello studio	47
Pazienti, materiali e metodi	49
Disegno dello studio clinico MCL0208	49
Fase di screening.....	49
Fase di trattamento	49
Fase di randomizzazione e mantenimento	50
Fase di follow-up.....	50
MRD nel protocollo MCL0208.....	50
Processazione dei campioni ed estrazione degli acidi nucleici	51
Ricerca del marcatore molecolare e monitoraggio della MRD.....	52
Nested-PCR	52
Real-Time PCR.....	53
Droplet Digital PCR.....	54
Analisi statistiche	54
Risultati	55
Sintesi dei risultati clinici.....	55

Caratteristiche dei pazienti arruolati	55
Fattibilità clinica dello studio e workflow dei pazienti	56
Risposta clinica	57
Risultati molecolari	59
Fattibilità dello studio molecolare e analisi dei marcatori al baseline	59
Analisi delle discordanze fra marcatori al baseline: IGH vs BCL1	60
Analisi delle discordanze fra tessuti al baseline: BM vs PB.....	61
Analisi della MRD in PCR qualitativa (Nested PCR)	62
Analisi discordanze fra tessuti nell'analisi MRD: BM vs PB.....	63
Analisi discordanze fra marcatori nell'analisi MRD: IGH vs BCL1	66
Impatto clinico della valutazione MRD in Nested PCR.....	70
Analisi della MRD in PCR quantitativa (RQ-PCR).....	74
Analisi delle discordanze fra metodiche nell'analisi MRD: Nested PCR vs RQ-PCR.....	76
Correlazione quantitativa dei valori MRD nei due tessuti BM e PB.....	79
Impatto clinico della valutazione MRD in RQ-PCR.....	80
Valutazione cinetica della MRD	83
Cinetica della MRD in base al suo andamento temporale.....	83
Cinetica della MRD in base all'accumulo di MRD positività.....	86
Discussione.....	89
Bibliografia	95

Il Linfoma Mantellare

Origine della cellula e struttura del linfonodo

Il linfoma mantellare (MCL) è un tumore della linea B cellulare, che dal 1994 è stato considerato, per le sue peculiarità biologiche, genetiche, istologiche, immunofenotipiche e cliniche come entità distinta nella classificazione REAL (Revised European-American Lymphoma), dal 2008 incorporata nella classificazione della WHO¹.

Viene definito "mantellare" perché i linfociti B si localizzano inizialmente in una particolare zona del linfonodo chiamata appunto "zona del mantello".

Il linfonodo, in qualità di organo pieno, presenta una capsula, uno stroma reticolare e un parenchima formato sostanzialmente da tessuto linfoide. Sia dal punto di vista funzionale sia istologico si distinguono tre diverse zone che, dall'esterno all'interno, sono: zona corticale ricca di linfociti B, una zona paracorticale ricca di linfociti T, una zona midollare, ricca di plasmacellule. Queste tre zone sono connesse da un sistema di seni linfatici. La zona corticale, più periferica, è situata subito al di sotto della capsula connettivale ed è costituita da numerose formazioni ovalari dette follicoli. Quando i follicoli presentano una morfologia costante e un colore uniforme sono detti follicoli primari non attivati, quando invece, presentano una parte centrale più chiara (il centro germinativo del Fleming) circondata da una zona più scura (il mantello) vengono detti follicoli secondari attivati. Centralmente al linfonodo è situata la zona midollare, meno colorata della corticale a causa della forte presenza di vasi e tessuto connettivale. Qui i linfociti sono aggregati intorno ai cordoni midollari, ramificati e tendenti ad anastomizzarsi fra di loro.

I linfociti ricircolano continuamente tra il sangue e la linfa, per questo quando la patologia neoplastica è di origine linfatica, si intende solitamente una patologia sistemica^{2,3}.

I follicoli linfoidi primari e la zona mantellare di quelli secondari contengono linfociti B vergini, che non hanno ancora incontrato l'antigene, e fino agli anni '90 si pensava che la cellula di origine del MCL fosse la cellula B vergine, non ancora transitata nel centro germinativo⁴. Questa ipotesi era suffragata dalle caratteristiche immunofenotipiche simili a queste cellule.

Una tecnica fondamentale per lo studio delle caratteristiche della cellula è la Citometria a flusso associata all'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con uno specifico fluorocromo. Questa tecnica consente di valutare la struttura e le dimensioni della cellula, insieme all'espressione di antigeni di membrana o intracitoplasmatici che prendono il nome di "cluster of differentiation", il cui acronimo CD è seguito da un numero per identificare in modo inequivocabile l'antigene riconosciuto. In tal modo, la caratterizzazione dell'espressione di questi marcatori specifici delle varie linee differenziative ci consente di discriminare tra le varie linee ematopoietiche e di identificare l'origine di cellule patologiche⁵.

Nella cellula del MCL possiamo ritrovare la caratteristica coespressione dell'antigene T-cellulare CD5 insieme al tipico immunofenotipo B-cellulare: CD10–, CD19+, CD20+, CD22+, CD43+, CD79a+ ma (a differenza della leucemia linfatica cronica (CLL) è usualmente negativo per CD23 e CD200⁶.

Diversi studi sul recettore immunoglobulinico hanno in parte smentito l'ipotesi che la cellula del linfoma origini da cellule B vergini, evidenziando come un'ampia porzione dei casi derivi da cellule B che hanno incontrato l'antigene. Questo consegue all'osservazione che circa un quarto dei pazienti presenta un recettore immunoglobulinico con più del 2% di mutazioni somatiche^{7,8}, risultato del processo di ipermutazione somatica.

Nei casi non ipermutati è verosimile che, per la maggior parte di essi, l'origine istopatogenetica risieda in cellule B memoria che hanno avuto l'incontro con l'antigene, seppur non nel contesto del centro germinativo (*Figura 1*). Nonostante ciò, il ruolo ricoperto dalla stimolazione antigenica nel MCL è ancora ben lungi dall'essere definito⁹.

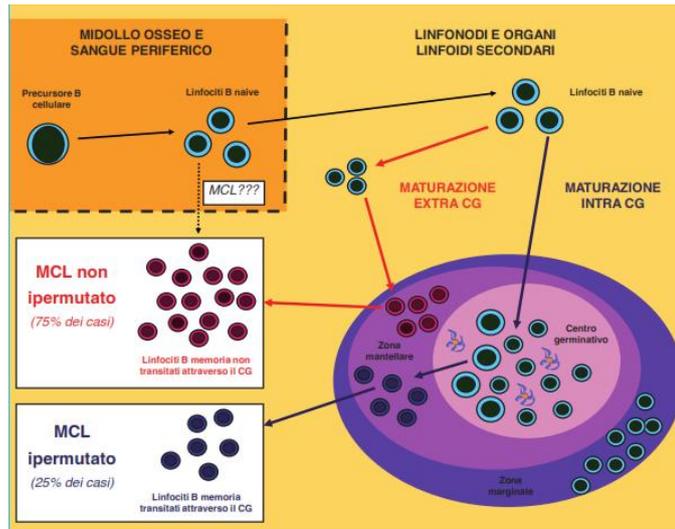


Figura 1 - Ontogenesi cellulare del MCL. La maggior parte dei casi origina da linfociti B memoria che sono andati incontro a maturazione al di fuori del centro germinativo (CG) del follicolo linfoide e pertanto non hanno accumulato ipermutazioni somatiche nel gene delle immunoglobuline (MCL non ipermutato) (75% dei casi). Circa un quarto dei casi di linfoma mantellare origina invece da linfociti B memoria che sono andati incontro a maturazione all'interno del centro germinativo, accumulando così ipermutazioni somatiche (MCL ipermutato) (25% dei casi). Meno verosimile l'ipotesi secondo la quale il linfoma mantellare deriverebbe da linfociti B naive.

Patogenesi molecolare

Il MCL è caratterizzato da una traslocazione cromosomica che coinvolge il braccio lungo del cromosoma 11 e il braccio lungo del cromosoma 14 $t(11;14)(q13;q32)$. Questa traslocazione si ritrova nella maggioranza dei pazienti, più del 95%, e determina la giustapposizione del gene della ciclina D1 (CCND1), situata sul braccio lungo del cromosoma 11, con il promotore del gene della catena pesante delle Immunoglobuline (IGH), sul cromosoma 14. Il promotore del gene IGH determina l'iperespressione costitutiva di CCND1, con aumento della disponibilità di ciclina D1. Questo mediatore promuove il ciclo cellulare, dalla fase G1 alla fase S, con un aumentato stimolo proliferativo, alla base della crescita incontrollata del tumore. Questa molecola può essere utilizzata come marker per la diagnosi del MCL in quanto non è rintracciabile nel tessuto linfoide normale¹⁰, infatti il prodotto di questa traslocazione prende anche il nome di BCL1, gene 1 della leucemia/linfoma a cellule B. Per questo motivo il MCL è considerato l'esempio di un linfoma con aumentata proliferazione cellulare dovuta ad un alterato controllo del ciclo cellulare. Il prodotto della trascrizione del gene della ciclina (CCND1

mRNA) è anche stato recentemente utilizzato come indice di proliferazione cellulare in studi sul profilo dell'espressione genica¹¹.

Inoltre, alcune mutazioni all'interno dello stesso gene favoriscono l'azione della ciclina D1 nella proliferazione cellulare: il gene *CCDN1* contiene 5 esoni e attraverso lo splicing alternativo vengono trascritte alternativamente 2 isoforme, la ciclina D1a e la forma D1b. In molti casi gli RNA messaggeri (mRNA) di entrambe le forme sono coespressi, ma la ciclina D1a sembra quella preferenzialmente coinvolta nella patogenesi del tumore. Il trascritto mRNA della ciclina D1a presenta una lunga regione non tradotta (UTR) all'estremità 3' responsabile della sua instabilità e ridotta emivita. In questa regione, inoltre, si possono legare molecole di micro-RNA 16/15 (miRNA 16/15) che sono in grado di inibire la traduzione del trascritto. Delezioni genomiche e mutazioni puntiformi del gene *CCDN1* possono portare alla perdita del lungo UTR al 3' determinando la trascrizione di filamenti di RNA più stabili. Questi, di conseguenza, sono più facilmente tradotti e dunque si produce un maggior stimolo proliferativo per la cellula. Queste mutazioni si riscontrano nei tumori altamente proliferativi e con prognosi peggiore. Le cicline agiscono nel nucleo, legando le Chinasi Ciclina-Dipendenti tipo 4 e 6 (CDK4/6). Queste, grazie alla loro capacità di fosforilazione, attivano una cascata di segnali intracellulari che porta al rilascio di fattori di trascrizione del DNA, in particolare il fattore E2F.

Si è inoltre notato come le CDK4/6 risultano spesso iperespresse nei linfomi più aggressivi¹².

I pochi casi di MCL negativi per la traslocazione t(11;14) condividono comunque simili caratteristiche cliniche, morfologiche e di espressione genica e spesso mostrano un'iperespressione delle cicline D2 e D3¹³.

Ulteriori eventi genetici incrementano il potenziale oncogenico delle cicline, spesso attraverso l'inattivazione dei meccanismi di risposta al danno del DNA, che determinano una forte suscettibilità ad altre mutazioni e fanno del MCL uno dei tumori a cellule B geneticamente più instabili.

Gli oncosoppressori che risultano più spesso mutati sono i geni inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CDKN) che codificano per le proteine p16 INK/p14 ARF.

Un'altra classe di geni che possono essere mutati, sono i geni che codificano per le chinasi ATM e ATR, le quali si attivano normalmente in risposta al danno e determinano l'attivazione di p53. Questa proteina ha un ruolo importante nel mantenimento della stabilità del DNA, infatti media l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA e l'eventuale apoptosi. Una mutazione delle chinasi ATM o ATR determina una ridotta attivazione di p53 e di conseguenza vi è una risposta al danno non adeguata, in cui è compromessa la capacità di riparazione del DNA e concessa la sopravvivenza di cellule mutate che possono dunque andare incontro più facilmente a degenerazione maligna. La mutazione di ATM si è riscontrata nel 75% dei casi e inoltre è nota la predisposizione alla linfomagenesi nell' Atassia-teleangectasia, una sindrome a trasmissione autosomica recessiva con inattivazione germinale di ATM¹⁴.

Le mutazioni possono coinvolgere direttamente il gene TP53 e altri geni che codificano per proteine con attività chinasiche e con ruolo di mediatori intracellulari come MAP2 e MAP6 (proteina attivata da mitogeni).

Inoltre la sopravvivenza e la crescita tumorale sono promosse dall'alterazione di diverse altre vie di segnalazione intracellulare: fra queste l'attivazione costitutiva della via di segnalazione PI3K (fosfatidil inositolo 3 chinasi), PKB (proteina chinasiche B), mTOR (mammalian Target of Rapamicina)¹⁵ che può derivare da un'attivazione costitutiva a monte di questa via di segnalazione del recettore delle cellule B (BCR) o dall'attivazione costitutiva a valle di una singola chinasi.

Altre vie coinvolte possono essere le vie proliferative di WNT¹⁶, Hedgehog, NF- κ B¹⁷ e la riduzione della trascrizione del gene BIK (Bcl-2 interacting Killer), che traduce per una proteina proapoptotica che determina la degradazione di Bcl-2 (B cell Lymphoma2), una proteina antiapoptotica che agisce a sua volta sequestrando BAX (Bcl-2-associated X protein) e Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer), che risultano in questo modo meno inibite.

Di recente è stato scoperto un pannello di geni proliferativi (tra i quali SOX11) che ci permette di discernere i classici casi di MCL da quel sottogruppo di pazienti SOX11 negativi caratterizzati da una prognosi favorevole e definiti pertanto linfomi mantellari indolenti¹⁸, tra questi ritroviamo sia quelli con IGHV mutato che non-mutato. A tutt'oggi non è stato ancora chiarito se lo stato mutazionale delle IGHV

nel MCL definisca due gruppi a diversa prognosi, come avviene in altri contesti, ad esempio nella CLL¹².

Per contro, tra i linfomi mantellari aggressivi possiamo distinguere la variante di MCL blastoide, caratterizzata da un alto indice di proliferazione cellulare, ricavato dalla percentuale di cellule positive al Ki-67, proteina nucleare prodotta non in G0 e quindi strettamente correlabile alla proliferazione cellulare; inoltre con un alto indice mitotico (MI) e dunque prognosi peggiore. Questa variante è caratterizzata dal punto di vista patogenetico dalla delezione del braccio corto del cromosoma 17(17p) che include il gene TP53¹⁹.

Nella review di Beà S. *et al*²¹ si sottolinea come il MCL risulti altamente eterogeneo dal punto di vista della patogenesi, sia in stadi iniziali che nella sua evoluzione, nella quale si verifica l'accumulo di ulteriori mutazioni in associazioni spesso preferenziali. Nello studio viene sequenziato il genoma (Whole genome sequencing) o solo gli esoni di interesse (whole exome sequencing) rispettivamente di 4 e 29 pazienti. I geni maggiormente coinvolti nella patogenesi del MCL risultano essere ATM, CCND1 e TP53. Sono state riscontrate particolari associazioni di questi geni mutati. Il gene ATM risulta mutato in più della metà dei casi in associazione alla positività per l'espressione del gene SOX11, mentre non risulta mai associato ai casi SOX11 negativi; la mutazione per il gene CCND1 è presente nei pazienti che non presentano l'espressione del gene SOX11 e che invece presentano la porzione variabile della catena pesante delle immunoglobuline (IGHV) mutato, suggerendo l'acquisizione di questa mutazione nel microambiente del centro germinativo. Il gene TP53 mutato presenta una distribuzione uguale indipendentemente dalla presenza di IGHV ipermutato e SOX11 positivo, ma si associa spesso ad alterazioni di 17p²² (*Figura 2*).

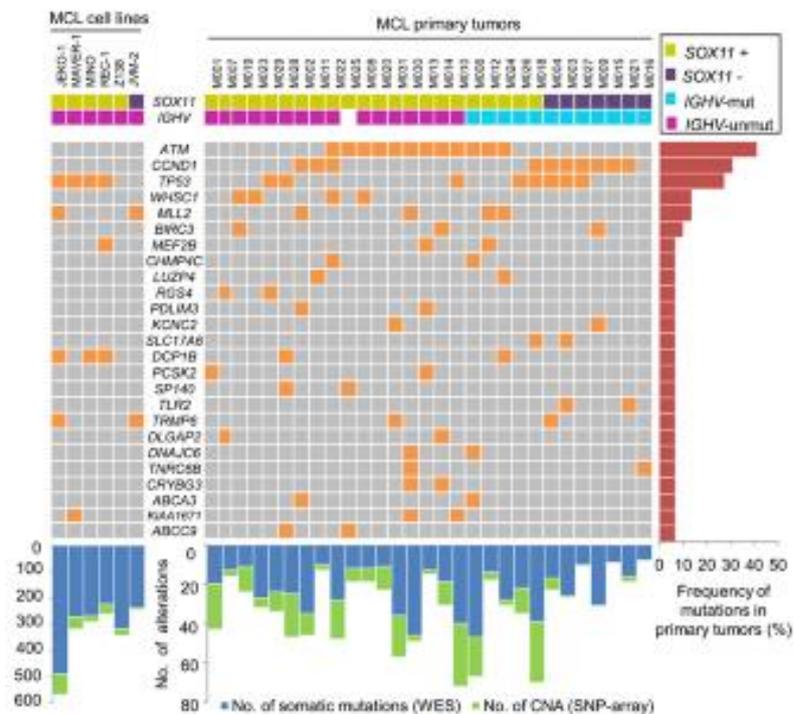


Figura 2. Frequenza e associazione dei geni più spesso coinvolti nella patogenesi del linfoma mantellare, correlati con lo stato mutazionale IGHV.

Epidemiologia

Il MCL rappresenta un'entità relativamente rara tra le neoplasie ematologiche, con un'incidenza di 2/3 nuovi casi su 100.000 abitanti/anno in Usa e Europa²², costituisce il 6% dei linfomi non Hodgkin²³ e in Italia ne vengono diagnosticati ogni anno circa 300 casi (www.registri-tumori.it). Questa patologia si ritrova preferenzialmente nella popolazione anziana con età media alla diagnosi di 65 anni ed è prevalente nella popolazione maschile, con un rapporto maschio/femmina di 3-4:1.

Presentazione Clinica

Il MCL è una neoplasia originante dalle cellule del sistema immunitario, pertanto può coinvolgere le strutture dove tali cellule sono più abbondanti, quali gli organi linfoidi secondari, le mucose, il midollo osseo. Una caratteristica importante del sistema immunitario è di essere diffuso nell'intero organismo, per la continua circolazione delle sue cellule, per questo motivo questa malattia può localizzarsi potenzialmente in qualsiasi organo. Da queste prime considerazioni si può comprendere come la presentazione clinica di questa malattia sia molto varia e

possano presentarsi segni e sintomi tipici, sia localizzati che sistemici, oppure un quadro clinico aspecifico e difficilmente riconoscibile senza indagini ulteriori.

Molti pazienti si presentano alla diagnosi allo stadio IV secondo classificazione di Ann Arbor e più del 90% presenta coinvolgimento extranodale, specialmente del midollo osseo (nel 90% dei casi), del tratto gastrointestinale (nel 60% dei casi) e del fegato (20%)²⁴.

Diagnosi

La diagnosi viene posta in accordo con i criteri della classificazione di WHO delle neoplasie ematologiche. Il sospetto clinico deve trovare conferma nella diagnosi istologica, eseguita tramite biopsia linfonodale o del tessuto coinvolto quando è possibile.

Il tessuto prelevato viene fissato in formalina, incluso in paraffina e analizzato in anatomia patologica con tecniche di immunistochemica (IHC). Si valutano l'architettura del tessuto, le caratteristiche morfologiche delle cellule, la loro disposizione nello spazio e la percentuale di cellule monoclonali rispetto ai linfociti totali attraverso immuno-colorazioni. La maggior parte dei MCL hanno cellule con morfologia classica, di media grandezza, nuclei irregolari con cromatina densa e senza nucleoli visibili. Ci possono essere numerose varianti morfologiche che rendono difficoltosa la diagnosi differenziale con altre neoplasie ematologiche come la CLL, il linfoma marginale e linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL).

Una alternativa alle tecniche di immunistochemica per identificare l'immunofenotipo cellulare è la citometria a flusso. Questa tecnica necessita di cellule in sospensione che vengono incubate con anticorpi monoclonali legati ad un fluorocromo. La prima distinzione avviene tra la cellula B e T, la prima presenta positività per le immunoglobuline di superficie (IgD e IgM) e specifici CD, e la seconda si identifica attraverso il recettore delle cellule T (TCR) e altri specifici CD. Per identificare i sottogruppi cellulari si vanno ad analizzare ulteriori marcatori di superficie. L'immunofenotipo classico della cellula di MCL presenta la positività per le immunoglobuline M/D, e CD19, CD20, CD22, CD43, CD79a, CD5. Risulta invece solitamente negativa per CD23, CD10, CD200, BCL6. Questa metodica ci permette di effettuare la diagnosi differenziale con altre neoplasie delle cellule B: la positività per CD5 che ci consente di escludere il linfoma marginale, la negatività per CD23 ed il CD200 esclude la CLL, la negatività per CD10 esclude il linfoma

follicolare (FL). Un altro antigene che viene riconosciuto come caratteristico di questo tipo di linfoma è la ciclina D1 (*figura 3*). Infatti l'aumento della sua espressione, come è stato approfondito nel capitolo sulla patogenesi molecolare, è secondario alla traslocazione genetica t(11;14)(q13;q32) tipica del MCL ed è presente in più del 95% dei casi. Per la ricerca di queste traslocazioni sono state abbandonate le tecniche tradizionali di indagine citogenetica, a causa delle difficoltà nel reperire cellule in mitosi, in favore di tecniche più moderne come l'ibridazione fluorescente in vitro (FISH). Un indubbio vantaggio di questa tecnica è quello di poter identificare, mediante sonde marcate, specifiche regioni cromosomiche in nuclei in interfase. È pertanto possibile evitare la coltura cellulare semplificando l'analisi e ovviare al problema di assenza delle mitosi.

Un'altra tecnica di indagine genetica è la reazione a catena della polimerasi. Questa tecnica ci consente di studiare la clonalità delle cellule attraverso l'identificazione e l'espansione di sequenze specifiche di DNA. Nel caso del MCL si possono utilizzare come marker di clonalità il bcl-1, prodotto genico specifico della traslocazione t(11;14), oppure il gene della catena pesante delle immunoglobuline. Come verrà esposto successivamente, questa tecnica è fondamentale ai fini della valutazione della malattia minima residua (MRD) in questo studio²⁵.

L'ago-aspirato midollare e la biopsia di midollo osseo vengono eseguiti alla diagnosi perché ci consentono di confermare il coinvolgimento midollare, che è presente in più del 90% dei casi. Il primo consiste in un campione citologico, ottenuto per aspirazione del tessuto midollare, effettuata in genere a livello della cresta iliaca anteriore o posteriore oppure a livello dello sterno. Questo materiale viene strisciato e colorato su vetrino per l'osservazione microscopica che consente la visualizzazione morfologica delle cellule. Il campione prelevato può essere utilizzato per indagini ulteriori come l'immunofenotipo e l'esame citogenetico. Nell'esame citologico vengono valutate la cellularità globale, il rapporto leuco-eritroblastico e l'evolutivezza maturativa delle linee emopoietiche. L'esame microscopico del tessuto osseo con il tessuto midollare ad esso aderente, prelevato con la biopsia osteomidollare, è valutato in anatomia patologica; ci fornisce indicazioni sulla cellularità midollare, sulla proporzione relativa delle diverse linee, sulla distribuzione del tessuto emopoietico delle differenti linee cellulari e sui loro rapporti reciproci nel tessuto (*Figura 3*).

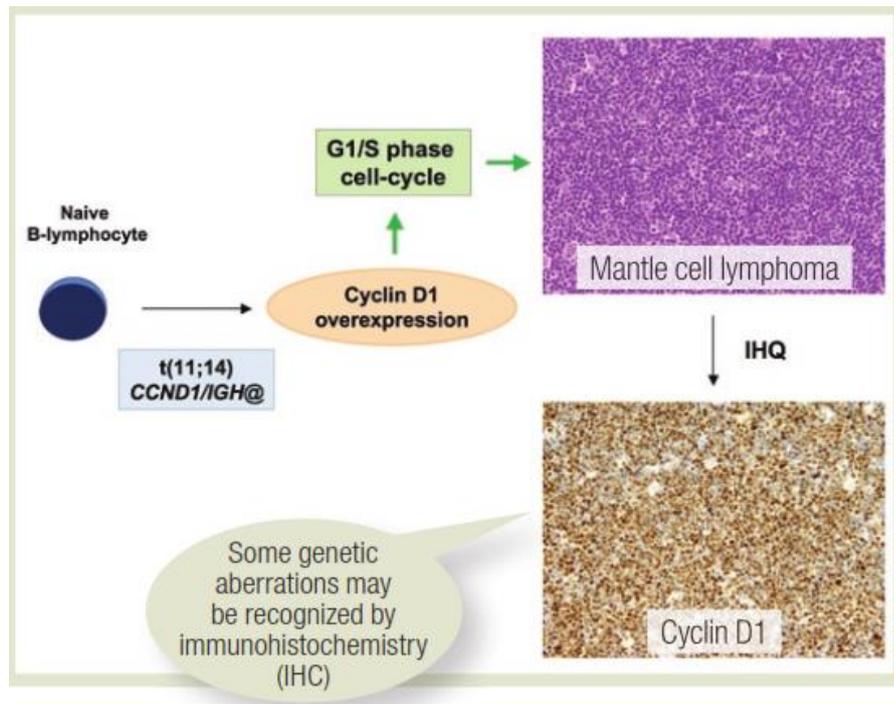


Figura 3. Colorazione IHC per ciclina D1 in MCL. (Lymphomas, Ghielmini, Montolo ESMO2012)

Fattori prognostici

Dal suo riconoscimento nel 1994, è noto che MCL sia una neoplasia a cattiva prognosi, con un decorso clinico aggressivo e caratterizzato da precoci recidive e conseguente chemiorefrattarietà, e da una sopravvivenza media di 3-5 anni.

Nell'ultimo decennio lo scenario clinico per questo tumore è andato progressivamente migliorando, grazie soprattutto all'introduzione del farmaco Rituximab, anticorpo monoclonale anti-CD20. Inoltre grazie all'impiego di alte dosi di citarabina seguite dal trapianto autologo di cellule staminale (ASCT) in pazienti giovani è possibile raggiungere una remissione clinica di malattia fino a 10 anni, a fronte di una tossicità controllabile. Anche nei pazienti anziani sono stati fatti alcuni progressi in termini di allungamento della PFS (sopravvivenza libera da progressione) grazie all'efficacia e buona tollerabilità della Bendamustina e l'impiego del Rituximab come terapia di mantenimento. Inoltre lo studio della patogenesi molecolare del MCL ha consentito lo sviluppo di nuovi farmaci (bortezomib, temsirolimus, lenalidomide, ibrutinib) che possono essere utilizzati in diverse combinazioni per proporre linee terapeutiche alternative.

Per la disponibilità di questo nuovo ventaglio terapeutico è fondamentale eseguire la stratificazione prognostica dei pazienti. Per ogni classe di rischio possiamo identificare una terapia appropriata, ottimizzando così i risultati e minimizzando gli effetti tossici quando non necessario¹⁵.

La stratificazione prognostica viene eseguita mediante parametri biologici e parametri clinici. Tra i biologici il più importante parametro di prognosi avversa è l'indice di proliferazione cellulare, misurato attraverso la percentuale di cellule esprimenti Ki-67¹⁶ in immunistochemica. L'antigene Ki-67 è una proteina nucleare che viene espressa in tutte le fasi della cellula eccetto in G0, caso in cui la cellula è quiescente. Dunque la sua espressione, valutata tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali, ci indica che la cellula è in attiva crescita. Il valore prognostico di Ki67 è sostenuto dai risultati di studi randomizzati e prospettici in pazienti trattati con immunochemioterapia contenente Rituximab.

Nel 2005, l'European MCL Network ha effettuato uno studio su 300 pazienti con MCL trattato in modo eterogeneo in diversi studi prospettici, da cui è risultato come l'alto indice di proliferazione cellulare sia associato a breve OS¹⁶. Uno studio successivo prospettico e randomizzato con 249 pazienti affetti da MCL in stadio avanzato trattati in prima linea con R-CHOP, confermava definitivamente il valore predittivo del Ki-67¹⁷. Altri studi infine hanno dimostrato come l'indice di proliferazione Ki-67 sia il miglior fattore biologico predittivo di sopravvivenza nei pazienti con MCL indipendentemente da altri parametri clinici.

Con l'IHC possiamo indagare l'espressione di altri marker di proliferazione come alcune proteine o enzimi espressi quando la cellula è in fase di attiva proliferazione, come la topoisomerasi IIa, MDM2 che è una proteina della classe delle ligasi che porta all'ubiquitinazione di p53 e di conseguenza all'inibizione dei meccanismi di interruzione del ciclo, oppure ancora la proteina p86 anch'essa implicata nel controllo del ciclo cellulare, ma nessuno di questi è stato valutato in coorti sufficientemente grandi di pazienti¹⁵.

Durante gli anni sono stati individuati inoltre altri fattori prognostici negativi, tra i quali lo stadio avanzato di malattia, la presenza di sintomi B, la variante blastoide o la morfologia pleomorfa, la trisomia 12 e la delezione 9q, la presenza di un cariotipo complesso e la mutazione TP53.

Recentemente il German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG) e European MCL Network hanno proposto un nuovo indice prognostico di sopravvivenza, il MIPI (MCL International Prognostic Index)¹⁸, un indice prognostico riconosciuto a

livello internazionale e standardizzato. La necessità di individuare un indice prognostico specifico per il MCL è scaturita dal fatto che gli indici prognostici precedentemente elaborati per il DLBCL, chiamato IPI (International Prognostic Index) e quello per il FL, denominato FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) non erano in grado di individuare quei pazienti che godevano di prognosi decisamente migliore rispetto alla maggior parte dei casi di MCL.

Il punteggio che attribuiamo al MIPI prende in considerazione i fattori di età, PS ECOG, LDH, conta dei globuli bianchi per $10^6/L$:

$$\begin{aligned} \text{MIPI score} = & 0.03535 \times \text{età (in anni)} + 0.6978 \text{ (se ECOG} > 1, \\ & \text{se no 0)} + 1.367 \times \log_{10} (\text{LDH/ valore limite più alto normale}) \\ & + 0.9393 \times \log_{10} (\text{ conta WBC per } 10^{-6} \text{ L})^5 \end{aligned}$$

Pazienti con $\text{MIPI} < 5.7$ sono considerati a basso rischio (LR), pazienti con $\text{MIPI} \geq 5.7$ e < 6.2 sono a rischio intermedio (IR), e con $\text{MIPI} \geq 6.2$ sono considerati ad alto rischio (HR).

In aggiunta può essere calcolato il MIPI semplificato (sMIPI) come surrogato del MIPI per facilitarne l'applicazione nella pratica clinica quotidiana (*tabella 1*).

Punteggio	Età (anni)	ECOG	LDH/max valore limite unità	Leucociti($\times 10^9/L$)
0	<50	0-1	< 0.670	<6.700
1	50-59	-	0.670-0.999	6.700-9.999
2	60-69	2-4	1.000-1.499	10.000-14.999
3	>69	-	>1.499	>14.999

Tabella 1. sMIPI. Si applica un punteggio da 0 a 3 per ogni fattore prognostico, fino ad un massimo di 11 punti. I pazienti la cui somma sia <4 sono classificati come basso rischio; i pazienti la cui somma sia 4-5 sono classificati come rischio intermedio; i pazienti la cui somma sia > 5 sono classificati come alto rischio.

Grazie all'utilizzo di questo nuovo strumento è possibile suddividere i pazienti in tre gruppi ben bilanciati caratterizzati da prognosi decisamente differenti in termini di OS): i pazienti ad alto rischio hanno una sopravvivenza media di 29 mesi, i pazienti a rischio intermedio di 51 mesi e quelli a basso rischio ancora maggiore. Pertanto, il MIPI potrà rivelarsi utile nel prendere decisioni terapeutiche

individualizzate sul livello di rischio di ciascun paziente e permetterà una migliore stratificazione dei pazienti negli studi clinici, fornendo così una base comune per valutare il ruolo dei nuovi marcatori prognostici biologici.

Il tentativo di integrazione di Ki-67 all'interno del MIPI, nell'intento di costruire un indice combinato (MIPI-b, ossia MIPI biologico), non ha però sostanzialmente migliorato il potere prognostico del MIPI classico.

Pertanto, considerando anche che il valore del Ki-67 non è facilmente ottenibile per motivi tecnici in tutti i pazienti e che la standardizzazione e riproducibilità di questo marcatore necessitano ancora di essere affinate, al momento, il MIPI-b non è particolarmente utile al di fuori del contesto di studi sperimentali²⁷.

Approccio terapeutico

Watch and wait

Sebbene il MCL sia considerato una malattia aggressiva, con rapida progressione, una risposta temporanea alle terapie e un alto indice di recidive, una percentuale minore di casi (10-15%) si presenta sotto forma di MCL non nodale leucemizzato, e può non richiedere terapia per diversi anni. L'identificazione di questo sottogruppo è auspicabile sia nei pazienti anziani *frail* che nei giovani, in quanto permette di evitare il trapianto autologo e orientarsi verso un approccio watch and wait. In questi pazienti l'osservazione può prolungarsi per molti mesi e fino oltre una decade; saranno necessari nei primi due anni dalla diagnosi controlli clinici trimestrali, con approfondimento radiologico in caso di sospetto di progressione della malattia¹⁴.

MCL comunemente insorge nell'età avanzata, in pazienti che possono presentare comorbidità importanti, per questo motivo non è sempre possibile eseguire una terapia ad alte dosi seguita da ASCT perché gravata da importanti effetti tossici soprattutto a livello del midollo osseo e cardiaco. Da qui la necessità di stratificare i pazienti in base al loro PS, distinguendo quelli eleggibili alla terapia gold standard con l'obiettivo di raggiungere una remissione completa, da quelli a cui sarà proposta una terapia a dosi ridotte. Possiamo identificare, per i pazienti più anziani con l'ausilio del Comprehensive Geriatric Assessment (CGA), pazienti giovani (*fit o unfit*), anziani (*fit o unfit*) e le categorie *frail*, adattando la terapia in base alle caratteristiche del paziente. La terapia ad alte dosi solitamente viene proposta a pazienti giovani (< 65 anni) e fit, con eccezioni possibili per pazienti più anziani.

Prima linea: pazienti <65 anni e fit

Nei pazienti giovani l'obiettivo terapeutico è la remissione completa di malattia, con il prolungamento massimo della PFS), utilizzando una polichemoimmunoterapia massimale e trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche. Il trattamento che risulta migliore in termini di tempo medio di fallimento della terapia (*median time to treatment failure*, TTF) con il suo prolungamento fino a 9.1 anni, risulta lo schema con 3 cicli di R-CHOP (Rituximab, Ciclofosfamide, Doxorubicina, Vincristina, Prednisolone) o R-DHAP (Rituximab, Desametasone, Citarabina ad alte dosi, Cisplatino) seguito da alte dosi di Citarabina e ASCT²⁰. L'impatto dell'AraC ad alte dosi è legato ad un aumento della remissione molecolare che passa dal 40% al 70% dei casi. Nei pazienti con funzione renale compromessa o negli anziani il cisplatino può essere sostituito con l'Oxaliplatino, che provoca meno tossicità renale e neurologica, integrato nello schema DHAOx¹⁴.

Il ruolo sinergico dell'anticorpo monoclonale Rituximab associato a polichemioterapia nel trattamento di prima linea dell'MCL è stato confermato da uno studio del German low grade Lymphoma study group (GLSG) in cui 122 pazienti vengono randomizzati tra 6 cicli di CHOP e 6 di R-CHOP. Lo schema R-CHOP risulta significativamente superiore in termini di tasso di risposta obiettiva (*objective response rate*, ORR) (94% vs 75%), CR (34% vs 7%), e TTF media (21 vs 14 mesi)²². L'efficacia di questo anticorpo monoclonale è stata valutata anche in associazione alla Bendamustinaschema RB) o con la combinazione bendamustina ed AraC (schema R-BAC), sia per la terapia di prima linea, che in recidiva, con buoni risultati²³.

Negli ultimi anni molti studi hanno confermato l'attività terapeutica degli schemi contenenti AraC, quali DHAP o in alternanza a cicli di Hyper CVAD (Ciclofosfamide iperfrazionata, vincristina, doxorubicina, desametasone)^{24,25,26}. Anche l'ASCT come terapia di consolidamento in prima linea è supportato da diversi studi, in termini di risposta al trattamento e di sopravvivenza²⁷.

Da questi dati deriva il razionale per l'utilizzo di R-CHOP, AraC ad alte dosi e ASCT come trattamento di prima linea per MCL nel paziente giovane e fit, sebbene non si possa ancora apprezzare un plateau della sopravvivenza libera da malattia e la remissione molecolare risulti ancora un punto critico.

È stato inoltre recentemente avviato lo studio Triangle dell'European MCL Network per il trattamento in prima linea di MCL in pazienti giovani. Si tratta di uno studio di fase III internazionale randomizzato a tre bracci: nel primo braccio, i pazienti sono

sottoposti al trattamento standard (induzione con 6 cicli di R-CHOP/R-DHAP alternati, seguito da ASCT); nel secondo braccio, viene aggiunto Ibrutinib sia durante il trattamento di induzione, sia come terapia di mantenimento post-ASCT per due anni; nel terzo braccio, i pazienti non vengono sottoposti ad ASCT, ma solamente al trattamento di induzione con R-CHOP+Ibrutinib/R-DHAP e alla terapia di mantenimento con Ibrutinib.

Prima linea: pazienti >65 anni *fit*

L'obiettivo terapeutico rimane il raggiungimento della remissione completa con una prolungata PFS utilizzando una polichemoimmunoterapia associata ad una terapia di mantenimento.

La terapia classica per questo gruppo di pazienti era rappresentata da cicli di R-CHOP o R-CVP (senza doxorubicina in presenza di comorbilità cardiache), che però non garantivano controllo a lungo termine della patologia.

In alternativa sono stati studiati schemi contenenti fludarabina, con o senza ciclofosfamide e mitoxantrone (FC e FCM). L'European MCL network ha recentemente effettuato uno studio di fase III comparando gli schemi terapeutici R-CHOP e R-FC (seguito da una seconda randomizzazione per il mantenimento tra rituximab vs interferone- α) dal quale è emersa una superiorità di R-CHOP in termini di progressione di malattia, OS e tossicità ematologica. Inoltre il mantenimento con rituximab ha ridotto il rischio di progressione di malattia del 45%, una durata quasi doppia di remissione e migliorato l'OS nei pazienti trattati con R-CHOP²⁸.

Altri regimi chemioterapici sono stati esplorati; tra questi un ottimo candidato è la bendamustina, che da tempo dimostra ottime risposte in pazienti con MCL recidivato. In uno studio clinico randomizzato su 94 pazienti con MCL, vengono messi a confronto R-CHOP e R-Bendamustina come terapie di prima linea, dimostrando una non inferiorità in termini di PFS e una minor tossicità acuta (inferiori neutropenia, infezioni, polineuropatia e alopecia) della combinazione R-bendamustina²⁹. Inoltre i promettenti risultati della bendamustina, del rituximab e della citarabina, sono stati confermati nello schema combinato R-BAC sia come terapia di prima linea che nelle recidive, ottenendo una PFS a 2 anni del 70% per le recidive e 95% in prima linea²³. Poiché però quest'ultimo protocollo presentava una percentuale di tossicità non trascurabile, soprattutto in termini di piastrinopenia (76%), si è pensato di ridurre le dosi di Ara-C, portando alla nascita dello schema

R-BAC 500: ciò ha determinato una diminuzione del tasso di piastrinopenia (52%), pur conservando una buona efficacia (CR 93%, PFS a 2 anni 81%, OS 86%)²⁹.

Nuovi farmaci candidati ad un intervento di prima linea sono il bortezomib, inibitore del proteasoma, e la lenalidomide, un farmaco immunomodulatore, entrambi già impiegati nel contesto della malattia recidivata o refrattaria in monoterapia. R-CHOP associato al bortezomib ha portato ad interessanti risultati in uno studio di fase II su 36 pazienti con MCL primitivo con un ORR del 91%, CR del 72% e PFS a due anni del 44%³¹. Questo farmaco è stato impiegato anche in associazione alla doxorubicina, desametasone, clorambucile e rituximab (nel regime RiPAD+C) dando buoni risultati, ma a fronte di una importante tossicità¹⁴. Un ulteriore studio recentemente condotto (LYM-3002) ha invece confrontato il regime R-CHOP con il regime VR-CAP (in cui la vincristina è sostituita dal bortezomib) in 487 pazienti adulti inelleggibili all'ASCT: il regime VR-CAP si è rivelato migliore in termini di PFS mediano (14.4 mesi vs 24.7), percentuale di CR (42% vs 53%) e sua mediana di durata (18.0 mesi vs 42.1), intervallo libero da trattamento mediano (20.5 mesi vs 40.6) e l'OS a 4 anni (54% vs 64%). Il braccio trattato con VR-CAP ha tuttavia presentato maggiore incidenza di neutropenia e piastrinopenia³².

Attualmente sono in corso altri studi in cui questi nuovi farmaci vengono associati alla bendamustina e al rituximab; tra questi è da ricordare lo studio SHINE, uno studio multicentrico di fase III che ha recentemente terminato l'arruolamento di 520 pazienti di età ≥ 65 anni con MCL di nuova diagnosi, sottoposti a terapia con rituximab-bendamustina + ibrutinib/placebo¹³.

Prima linea: pazienti *frail*

I pazienti molto anziani o che presentano comorbidità importanti devono essere valutati per una terapia personalizzata che punti al controllo della sintomatologia, evitando tossicità importanti che potrebbero ulteriormente pesare sulla loro qualità di vita, già in partenza compromessa.

La chemioimmunoterapia più utilizzata è il clorambucile orale associato al rituximab. Un'altra associazione polichemioterapica efficace è lo schema PEP-C (prednisone, etoposide, procarbazine, ciclofosfamide).

Ben tollerata è la bendamustina, utilizzata in monoterapia o in associazione a rituximab. Di quest'ultimo non è raccomandato l'utilizzo in monoterapia (quattro dosi ad intervalli settimanali) perché presenta tassi di risposta molto bassi, un ORR del 27% con solo 2.3% di CR, e un suo utilizzo prolungato è sconsigliato per la probabilità del 13% di tossicità ematologica di grado 3-4³³.

In casi selezionati di pazienti frail si può proporre un intervento terapeutico con basse dosi di chemioterapia associata ai nuovi farmaci quali temsirolimus, bortezomib, lenalidomide, talidomide, ibrutinib, o altri anticorpi monoclonali, che presentano un basso profilo di tossicità, ma gli studi a riguardo sono ancora limitati e in Italia manca l'autorizzazione all'utilizzo di questi farmaci in prima linea.

Seconda linea: pazienti in recidiva o refrattari

Vista la sua tossicità e la modesta efficacia soprattutto tra i pazienti giovani, l'ASCT in seconda linea viene proposto solo a coloro che non hanno ricevuto una terapia di prima linea adeguata. D'altro canto il trapianto allogenico di cellule staminali midollari, sebbene risulti gravato ancora da un alto tasso di mortalità, rimane l'unico trattamento che ci consente di avere nei pazienti giovani una remissione duratura della malattia, pertanto viene proposto ai pazienti giovani e fit recidivati dopo ASCT. Data la tossicità della terapia di induzione mieloablativa e la possibilità di sfruttare l'effetto *graft-versus-lymphoma* grazie all'azione dei linfociti del donatore, è consigliabile effettuare una terapia di induzione non mieloablativa.

Per i pazienti più anziani o non fit non c'è ancora un accordo su una terapia standard da proporre al paziente. Poiché non esiste una terapia curativa e l'obiettivo è un buon controllo della malattia, valutando l'efficacia e le tossicità dei vari farmaci si possono impiegare le nuove molecole target in combinazione alle terapie tradizionali per migliorare l'outcome.

La terapia di salvataggio va dunque adeguata all'età e al PS del paziente; per gli anziani è consigliabile eseguire nuovamente la valutazione geriatrica (CGA).

Nei pazienti anziani fit possono essere utilizzati regimi contenenti rituximab, citarabina e/o bendamustina, se possibile in combinazione a farmaci target come bortezomib, lenalidomide o temsirolimus all'interno di studi clinici (BR, R-BAC, BERT, R-HADB, R-2B). Queste raccomandazioni non sono ancora sostenute da evidenze sufficienti, per questo motivo risulta fondamentale l'arruolamento in nuovi protocolli clinici.

Farmaci a bersaglio molecolare

Bortezomib. Il bortezomib è un inibitore della subunità 26s del proteasoma ed è stato il primo farmaco target ad essere registrato negli Stati Uniti per i pazienti con MCL recidivato. Inizialmente si pensava che questa molecola inibisse direttamente il fattore di trascrizione nucleare NF-κB; ulteriori studi hanno visto come invece determina il blocco dell'azione proteolitica della chemotripsina-like (CT-L)

all'interno del proteasoma, con conseguente accumulo di proteine non degradate, che comporta lo stress del Reticolo endoplasmatico (RE) e formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) con conseguente danno cellulare. Si è notato come la risposta allo stress ossidativo si associ all'aumentata trascrizione del fattore trascrizionale NRF2 e i pazienti con questa risposta risultano anche i più sensibili al farmaco. Per contro si è visto che le cellule del linfoma con parziale differenziazione plasmocitoide presentano resistenza a questo farmaco. Pertanto possiamo utilizzare l'espressione di alcune molecole di superficie (CD38, CD138) o di mediatori intracellulari come markers predittivi di risposta o resistenza alla terapia¹¹.

La combinazione del bortezomib col rituximab e la chemioterapia (schema VR-CAP) ha prodotto buoni risultati in pazienti adulti inelleggibili all'ASCT³². E' stato inoltre utilizzato in combinazione a rituximab e steroidi³⁴, o in schemi di chemioimmunoterapia come R-HAD (Desametasone, Rituximab e alte dosi di Citarabina)³⁵, R-CP (Rituximab, Prednisone e Ciclofosfamide)³⁶, BR (Bendamustina e Rituximab)³⁷. Le tossicità principali più frequentemente riscontrate sono la polineuropatia, neutropenia e trombocitopenia.

Temsirolimus. Il temsirolimus, inibitore di mTOR (mammalian target of rapamicina), è stato approvato nel 2009 dall' European Medicines Agency per la sua attività in monoterapia nel MCL recidivato. Induce un significativo miglioramento del PFS e ORR rispetto ad altri farmaci scelti in monoterapia (4.8 vs 1.9 mesi, 22% vs 2% rispettivamente)³⁸. Gli effetti collaterali sono solitamente ben controllati da una riduzione della dose o dalla sospensione del farmaco.

E' stato studiato in associazione al rituximab in uno studio di fase II su 71 pazienti, con un miglioramento in termini di ORR e CR, e un profilo di tossicità simile in monoterapia³⁹.

Un altro farmaco biologico inibitore di mTOR è everolimus, ma la sua efficacia è ancora in corso di valutazione⁴⁰.

Lenalidomide. Negli ultimi anni è aumentato l'interesse sul ruolo che la neoangiogenesi e il microambiente giocano nella patofisiologia dei disordini linfoproliferativi, incluso il MCL. Farmaci diretti contro questi processi possono rappresentare nuove ulteriori strategie terapeutiche.

Lenalidomide, analogo della talidomide, è un agente immunomodulante ad attività antitumorale già documentata per il mieloma multiplo⁴¹, in sindromi mielodisplastiche associate a delezione di 5q⁴², CLL⁴³ e linfomi non-Hodgkin^{44, 45}.

Nei tumori ematopoietici l'effetto antiproliferativo della lenalidomide è determinato dall'inibizione della via AKT e l'iperespressione di p21, arrestando il ciclo cellulare in G1. Inoltre la Lenalidomide inibisce l'attività T regolatoria e ha un effetto antiangiogenetico sul microambiente tumorale^{46 47 48}.

Wiernik et al.⁴⁶ nel loro studio hanno utilizzato lenalidomide 25mg per via orale una volta al giorno nei giorni 1/21 ogni 28 giorni, nei pazienti con linfomi non Hodgkin aggressivi recidivati/refrattari. Su 49 pazienti valutati il 35% dei pazienti presentava una risposta obiettiva (6 CR e 11 PR), la durata media della risposta è 6.2 mesi, con PFS media di 4 mesi. Da questo studio risaltava particolarmente evidente la risposta dei pazienti con MCL, che era del 53%. Gli effetti collaterali più comuni risultavano essere ematologici, gastrointestinali e reazioni allergiche cutanee. Gli autori concludevano che la lenalidomide orale in monoterapia fosse un farmaco attivo nei NHL aggressivi recidivati/refrattari e con effetti collaterali controllabili. Un'attività simile di questo farmaco è stata riscontrata da altri gruppi, come per esempio nello studio pubblicato da Zinzani et al. in cui viene descritta l'attività della lenalidomide in monoterapia a fronte di una tossicità G3-4 soprattutto ematologica (neutropenia 46%, trombocitopenia 30%, anemia 13%) controllabile⁴⁹.

Sono stati inoltre recentemente pubblicati i risultati delle analisi preliminari dello studio randomizzato di fase II MCL-002 (SPRINT), che confronta l'efficacia e la sicurezza della lenalidomide in monoterapia nel MCL recidivo/refrattario a un farmaco in monoterapia a scelta tra rituximab, gemcitabina, fludarabina, clorambucile e citarabina. In questo protocollo sono stati arruolati 254 pazienti inelleggibili alla chemioterapia intensiva o al trapianto allogenico; tra questi, il gruppo trattato con lenalidomide ha avuto una migliore risposta in termini di PFS mediano (8.7 mesi vs 5.2)⁵⁰.

Da questi studi, la lenalidomide risulta essere un farmaco utile nel trattamento in monoterapia del MCL refrattario/recidivato a fronte di effetti collaterali controllabili.
90Y-ibritumomab tiuxetan.

Lo zevalin è un anticorpo monoclonale associato ad un radiofarmaco efficace in molti linfomi, ma nonostante il suo buon profilo di sicurezza (minor tossicità ematologica), sembra non impattare in modo significativo sulla prognosi del MCL recidivato/refrattario con un ORR 32% e un EFS (event free survival) di 6 mesi⁵¹. Recenti studi stanno valutando la sua efficacia in associazione ad altri farmaci biologici come il bortezomib⁵².

Ibrutinib. L'ibrutinib è uno dei nuovi farmaci impiegati per la target therapy. Viene assunto oralmente e agisce a livello molecolare come inibitore della chinasi di Bruton (BTK), che blocca nello specifico il BCR (B-cell receptor), da cui origina la cascata del segnale di sopravvivenza della cellula. In uno studio internazionale su pazienti con MCL recidivato o refrattario, ibrutinib in monoterapia presenta una buona efficacia e un buon profilo di tollerabilità con un ORR del 67%, 23% di CR, PFS a 24 mesi 31%, OS 47%. Degno di nota il suo profilo di sicurezza particolarmente favorevole con meno del 20% di casi di tossicità ematologica di grado 3/4⁵³.

Uno studio multicentrico randomizzato di fase III ha confrontato l'efficacia e la sicurezza dell'ibrutinib e del temsirolimus, entrambi in monoterapia, in pazienti con MCL recidivo/refrattario; questo studio ha dimostrato un vantaggio dei pazienti trattati con ibrutinib sia in termini di PFS mediano (14.6 mesi vs 6.2), che in termini di tossicità, con una percentuale di eventi avversi di grado ≥ 3 del 68% vs 87%⁵⁴. Infine, un recente studio di fase II ha valutato l'efficacia e la sicurezza della terapia combinata con rituximab e ibrutinib in 50 pazienti con MCL recidivo/refrattario. Dopo 16.5 mesi di follow-up mediano, è stata raggiunta una CR nel 44%, e una PR nel 44%. L'unico evento avverso di grado 3 registrato in più del 10% dei pazienti è stata la fibrillazione atriale (12%), mentre una tossicità di grado 4 è stata registrata in due soli casi, uno di diarrea e uno di neutropenia⁵⁵

Obinutuzumab, ofatumumab e ab antiCD19/CD3. Nuovi anticorpi monoclonali (mAb) come GA101 (obinutuzumab) e ofatumumab, colpiscono epitopi del CD20 diversi rispetto al rituximab, e sono in corso di studio in trial preclinici e clinici, ma i dati su MCL sono ancora scarsi⁵⁶. Altri interessanti approcci sembrano riguardare gli anticorpi monoclonali bispecifici anti CD19/CD3 che mostrano un'alta efficacia in pazienti con MCL in studi di fase I/II⁵⁷, le tossine immunoconiugate all'anticorpo monoclonale come anti-CD79b-DCDS4501A

Flavopiridol, Abexinostat, Venetoclax. Due molecole che hanno come target proteine che controllano il ciclo cellulare, inibendo in modo diretto le chinasi ciclina dipendenti 4 e 6, sono il flavopiridol e PD0332991, le quali mostrano una attività contro MCL recidivato solo in associazione a fludarabina, rituximab e bortezomib^{58,59}.

Infine risultati promettenti sembrano arrivare da ABT-199 (venetoclax), molecola di seconda generazione agonista del dominio BH3 di BCL-2 è un anti-BCL2 e da una molecola inibitore di pan-istone deacetilasi, abexinostat. In particolare, è stato

condotto uno studio di fase I per valutare la sicurezza, la farmacocinetica e l'efficacia del venetoclax in 106 pazienti con linfoma non-Hodgkin recidivo/refrattario, in cui erano presenti 28 casi di MCL. In questi ultimi è stato osservato un ORR del 75% e un PFS mediano di 14 mesi, mentre per quanto riguarda il profilo di sicurezza, di tutti i pazienti arruolati il 56% ha manifestato tossicità di grado 3/4, inclusi casi di tossicità ematologica (anemia 15%, neutropenia 11%, piastrinopenia 9%). Ciò suggerisce l'attività del venetoclax come singolo agente nel MCL, e sono in corso nuovi studi che definiranno meglio la sua efficacia⁶⁰.

Terapia di mantenimento

Nonostante i notevoli progressi fatti in campo terapeutico, i pazienti con MCL risultano ancora caratterizzati da un pattern di continue recidive, e il raggiungimento della remissione clinica e/o molecolare completa a fine trattamento non garantisce la completa eradicazione della malattia. D'altro canto i successi ottenuti in termini di allungamento del PFS e OS con una terapia di mantenimento con Rituximab nei pazienti anziani²⁸, suggeriscono l'efficacia di una terapia di mantenimento. Con questo obiettivo il rituximab è stato proposto anche per pazienti giovani dopo ASCT in uno studio randomizzato di fase III, i cui risultati finali sono stati recentemente presentati: i pazienti trattati con rituximab di mantenimento presentano un vantaggio in termini di PFS a 4 anni (82% vs 65%, OS a 4 anni (89% vs 81%) e EFS a 4 anni (79% vs 61%) a partire dalla randomizzazione⁶¹. Per cui verosimilmente il rituximab di mantenimento sarà approvato a livello europeo e incluso nella terapia standard di prima linea del MCL nei pazienti giovani.

Oltre al rituximab, altri farmaci possono candidarsi per una terapia di mantenimento; lo studio CALGB (Alliance) 50403 ha infatti valutato l'efficacia del bortezomib come terapia di mantenimento⁶². La tossicità controllabile e la formulazione orale della lenalidomide, oltre alla sua efficacia, ne fanno un'opzione interessante per la terapia di mantenimento, sia nei pazienti anziani che per i pazienti giovani, come valutato nel protocollo MCL0208.

Valutazione della risposta

Il decorso clinico di MCL è molto vario tra i pazienti, per questo al momento attuale è urgente identificare degli strumenti affidabili per valutare la qualità della risposta alla terapia e di conseguenza stimare il rischio di recidiva. I criteri di Cheson

pubblicati sul Leukemia nel 2007⁶³ sono i criteri standard, impiegano tecniche tradizionali di indagine (CT, PET e biopsia midollare con indagine immunoistochimica) e definiscono 4 categorie di risposta (*tabella 2*).

Lo studio della MRD, trattato successivamente, attraverso tecniche di indagine molecolare è una metodica di valutazione ampiamente superiore rispetto ai soli criteri clinici nel predire la recidiva dopo un trattamento efficace. Nonostante i risultati promettenti, non ci sono ancora studi clinici randomizzati che confrontino questo approccio con quello standard, dunque questa strategia non è ancora raccomandata nella pratica clinica.

Un altro strumento che si è rivelato utile nella valutazione della malattia e nella stadiazione è la citometria a flusso multicolore. Questa metodica però si è rivelata meno sensibile nel follow-up rispetto alla MRD molecolare⁶⁴.

Type of response	Definition	Lymph nodes	Spleen, Liver	Bone Marrow
CR	Disappearance of all evidence of disease	Masses of any size permitted, if FDG-PET negative	No palpable spleen Liver nodules disappeared	Infiltrate cleared on repeated biopsy; if indeterminate by morphology, immunohistochemistry should be negative
PR	Regression of measurable disease and no new sites	≥50% decrease in SPD of up to six largest masses; no increase in size of other nodes One or more FDG-PET positive at previously involved sites	≥50% decrease in SPD of nodules; no increase in size of liver or spleen	Irrelevant, if positive prior to therapy (cell type should be specified)
SD	Failure to attain CR or PR	FDG-PET positive at prior sites of disease and no new sites on CT scan or FDG-PET		
Relapse or PD	Any new lesion or increase by ≥50% of previously involved sites	Appearance of a new lesion or increase by ≥ 50 in the longest diameter of a previous node Any new FDG-PET positive lesion	Increase by ≥ 50% in the SPD of any previous lesion	New or recurrent involvement

CR: Complete Remission; FDG: FluoroDeoxyGlucose; PET: Positron Emission Tomography; CT: Computed Tomography; PR: Partial Response; SPD: Sum of the Product of Diameters; SD: Stable Disease; PD: Progressive Disease

Tabella 2. Criteri di risposta alla terapia. Cheson Leukemia 2007

La malattia minima residua

Negli ultimi anni, i risultati ottenuti con i nuovi approcci terapeutici in diversi campi dell'ematologia oncologica hanno permesso di incrementare notevolmente la frazione di pazienti che raggiungono un quadro di remissione completa con scomparsa dei segni clinici, patologici e strumentali di malattia. Rimane tuttavia elevata la percentuale di soggetti che vanno incontro, più o meno precocemente, ad una recidiva di malattia; tale recidiva è correlata alla persistenza di un piccolo numero di cellule tumorali che non possono essere rilevate dalle comuni indagini cliniche, perché al di sotto della loro soglia di sensibilità. Negli ultimi vent'anni sono stati studiati numerosi metodi atti ad individuare e quantificare la MRD, con l'intento di indagare la presenza ed eventualmente la cinetica evolutiva della popolazione tumorale residua. La possibilità di valutare la MRD rappresenta uno strumento estremamente utile per trarre importanti considerazioni di natura prognostica, nonché per indagare l'efficacia di eventuali trattamenti mirati al controllo e all'eradicazione di tali popolazioni residue. Tra le metodiche che si prefiggono di valutare la MRD particolare rilevanza hanno assunto negli ultimi anni le tecniche basate sulla reazione polimerasica a catena (PCR). I primi risultati di impatto in questo senso sono stati descritti in patologie della serie mieloide caratterizzate da un marcatore molecolare stabile e facilmente identificabile come BCR/ABL nella leucemia mieloide cronica e PML/RARalfa nella leucemia promielocitica acuta (APL M3). Nel campo delle patologie linfoproliferative, gli studi maggiori si concentrano sulla leucemia linfoblastica acuta (ALL) (marcatore basato su IGH e TCR), dove da diversi anni è ormai chiaro l'impatto clinico della MRD, che rappresenta uno strumento attualmente usato nella routine clinica per guidare le scelte terapeutiche sulla base del rischio di recidiva del singolo paziente⁶⁵. Più recentemente gli studi di MRD sono stati applicati anche alle patologie linfoproliferative mature, in particolare al FL⁶⁶, al MCL⁶⁷ e alla CLL⁶⁸. Parallelamente alle analisi di biologia molecolare, per diverse patologie sono emersi negli ultimi anni importanti strumenti per la validazione della MRD basati sulle tecniche citofluorimetriche. In particolare grandi passi in avanti in termini di applicabilità e sensibilità sono stati fatti nel campo della CLL⁶⁹ e del MM⁷⁰, ma ancora poco convincenti sembrano i risultati nel MCL⁷¹.

Dato che l'oggetto di questa tesi è la validazione della MRD molecolare, descriveremo più nel dettaglio gli aspetti tecnici delle diverse applicazioni della PCR.

Reazione Polimerasica a Catena (PCR)

La PCR è una tecnica, messa a punto tra il 1983 e il 1985 da Kery Mullis, che permette di amplificare esponenzialmente un tratto specifico di DNA, purché si conosca almeno una parte della sua sequenza nucleotidica. La parte nota della sequenza è utilizzata per sintetizzare due oligonucleotidi complementari a tratti di sequenza che si trovano su lati opposti della regione che deve essere amplificata e su filamenti diversi. Questi oligonucleotidi (amplimeri) sono utilizzati come primers per la sintesi di DNA in vitro e quindi come innesco di una serie di reazioni cicliche catalizzate da una speciale DNA polimerasi termoresistente, denominata Taq-polimerasi, isolata da un batterio termofilo che sopravvive ad alte temperature. Tale caratteristica rende la DNA polimerasi non denaturabile dai ripetuti cicli di riscaldamento previsti. Ogni ciclo della reazione richiede infatti un primo breve riscaldamento per denaturare e quindi separare i due filamenti della doppia elica di DNA, ed un successivo raffreddamento che in presenza di un grande eccesso dei due primer, permette a questi oligonucleotidi di ibridizzarsi a sequenze complementari nel DNA genomico (processo chiamato "annealing"); infine, la DNA polimerasi effettua l'estensione della catena a partire dalle terminazioni 3'-OH degli amplimeri. Quando il procedimento è ripetuto, i frammenti di nuova sintesi servono a loro volta da stampo; il prodotto risultante è un singolo frammento di DNA la cui lunghezza corrisponde alla distanza tra i due primer originali. Tale ciclo termico è ripetuto 20-40 volte per amplificare in modo esponenziale il DNA; ciascun ciclo raddoppia la quantità di DNA sintetizzato nel ciclo precedente. Tuttavia l'amplificazione mediante PCR è contraddistinta da un effetto plateau, cioè, dopo un certo numero di cicli (circa 30) il processo di duplicazione satura e non conviene procedere ulteriormente. La PCR permette di amplificare frammenti di DNA evitando il laborioso e complesso clonaggio in cellule ospiti mediante plasmidi o virus. Tuttavia questa metodica non è priva di inconvenienti tecnici: l'alta sensibilità diventa controproducente in presenza di DNA estraneo, fonte di contaminazione. Questo rende necessario inserire in ogni reazione di PCR controlli negativi interni che rivelino la presenza di eventuale DNA contaminante nei reattivi⁷². Quando la PCR viene utilizzata per valutare la MRD è necessaria la presenza di un marcatore tumorale, cioè una sequenza di DNA o RNA che sia costantemente

presente nella popolazione neoplastica ma costantemente assente nelle cellule normali. In particolare nel MCL i marcatori molecolari utilizzabili in PCR sono il prodotto genico della traslocazione t(11;14) ed il riarrangiamento della catena pesante delle immunoglobuline. Prima di procedere alla descrizione dei due marcatori è opportuno soffermarsi brevemente sulle caratteristiche principali dei geni delle immunoglobuline.

I geni delle immunoglobuline

La capacità delle immunoglobuline di riconoscere un elevato numero di antigeni deriva dal particolare processo di riarrangiamento a cui i geni che le compongono sono sottoposti, che determina la formazione di sequenze amminoacidiche uniche e diverse tra i vari anticorpi, nel contesto di una struttura generale dell'immunoglobulina che resta relativamente conservata. La sequenza che viene tradotta, infatti, non è il risultato di una trascrizione di segmenti genici contigui, ma il risultato di uno specifico riarrangiamento tra i geni interessati alla costituzione delle catene Ig, che si ritrovano su cromosomi diversi: i geni per le catene pesanti (IGH) sono situati sul cromosoma 14, quelli per le catene leggere (IGL) sui cromosomi 22 (catene K) e 2 (catene λ).

La maggior parte dei geni che codificano per la catena pesante delle immunoglobuline (IGH) si trovano sul cromosoma 14q32.33. Nel complesso il locus comprende più di un milione di paia di basi (1.25 Mb), suddivise in 4 segmenti che codificano per: porzione variabile (V), di diversità (D) di unione (J) e una regione costante (C), in ordine in direzione 5'-3'. I geni IGHV sono in numero di circa 123-129, di cui solo 38-46 sono funzionanti; inoltre si possono trovare varianti polimorfiche in termini di numero di copie e struttura soprattutto per quanto riguarda i geni IGHV. Nel locus si trovano inoltre 27 geni codificanti per IGHD, di cui 23 funzionanti, e 6 IGHJ, tutti funzionanti. Infine troviamo il locus IGHC, che comprende 11 geni di 300kb di DNA.

La produzione delle immunoglobuline richiede la ricombinazione di queste sequenze geniche e la successiva espressione del trascritto. Il processo di riarrangiamento inizia dalla catena pesante nei gruppi genici D-J, poi V-D-J per VH, in seguito V-J per VL. Questo processo avviene nei precursori dei linfociti all'interno del midollo osseo ed è strettamente regolato tramite il riconoscimento di specifiche sequenze di DNA chiamate sequenze segnale di ricombinazione (RSS) altamente conservate, posizionate all'inizio delle sequenze V e alla fine delle J e in entrambi i lati delle D. Il tutto è orchestrato da proteine che riconoscono queste

specifiche sequenze, alcune caratteristiche dei linfociti in maturazione come RAG1/RAG2 (recombination activating gene) e TdT (terminal deoxynucleotidil transferase) (Figura 4).

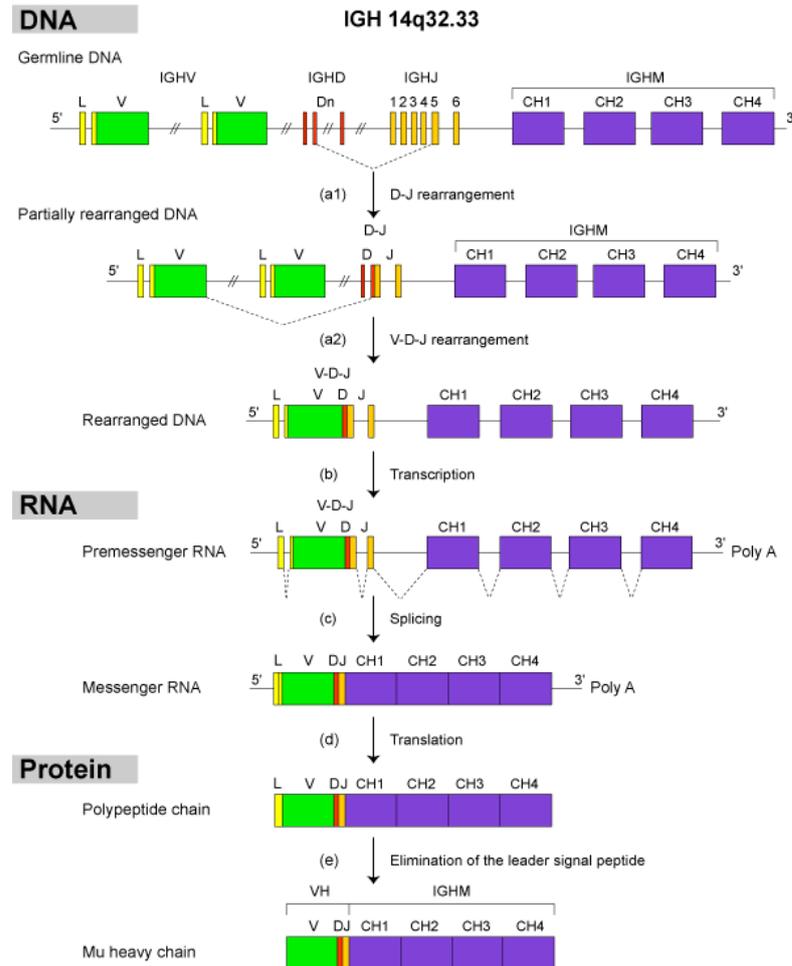


Figura 4. Sintesi catena pesante IG.

Nella maggior parte dei casi i geni di IGH riarrangiano prima di quelli per la catena leggera e la catena K (IGK) prima di quella L (IGL). Grazie a questo è possibile definire diverse tappe della maturazione del linfocita B basandosi sul riarrangiamento di questi geni, nonché su ciò che viene espresso sulla superficie cellulare (marker).

La variabilità delle molecole anticorpali è data dalla ricombinazione diversificata di queste sequenze, ma nello specifico, sul DNA ci sono regioni definite "ipervariabili", la cui traduzione determina la vera selettività dell'anticorpo e per

questo sono chiamate regioni determinanti la complementarità (CDR). In direzione N-terminale verso C-terminale della catena possiamo riconoscere tre regioni ipervariabili: CDR1, CDR2 e CDR3. Queste regioni sono intervallate da segmenti più conservati chiamati regioni framework (FR) che vengono invece utilizzate per la costruzione dei primers in PCR. Le regioni ipervariabili si creano sostanzialmente per due fenomeni che avvengono durante la ricombinazione dei segmenti genici: da un lato il processo di taglio ad opera degli enzimi chiamati Ricombinasi è impreciso, dall'altro durante l'unione dei due monconi avviene l'inserzione casuale di alcuni nucleotidi, generando così brevi sequenze definite "regioni N" (Figura 5).

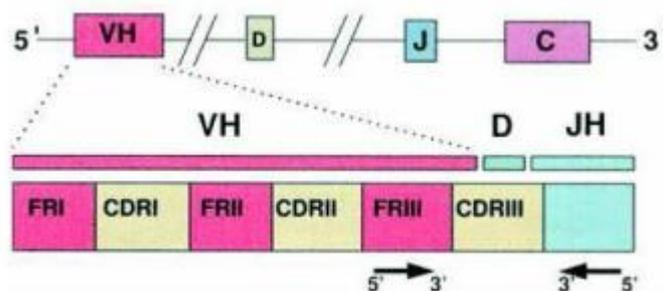


Figura 5. Organizzazione regione variabile delle IGH.

Bisogna inoltre ricordare che la maturazione del linfocita B termina a livello degli organi linfoidi periferici, dove avvengono ancora due processi che vanno a determinare ulteriore variabilità dei geni IG: l'ipermutazione somatica, che coinvolge preferenzialmente i domini V (variabili) e il class-switch che comporta il cambiamento del dominio C (costante). L'ipermutazione somatica migliora ulteriormente l'affinità della regione variabile per l'antigene, mentre il cambiamento di classe ne ottimizza la funzionalità all'interno dell'organismo⁷³.

Si ritiene che la traslocazione t(11;14) tipica del MCL sia la conseguenza di un errore nel riarrangiamento dei geni D-JH durante la maturazione del linfocita B nel midollo osseo, ma i meccanismi che sottendono a questo processo sono tutt'ora sconosciuti⁷⁴.

Data l'elevatissima variabilità della regione CDR3, questa risulta essere la più utilizzata nella ricerca della clonalità cellulare, pertanto individuata la sua sequenza

nella cellula tumorale, può essere utilizzata come marker molecolare di malattia per lo studio della MRD.

Marcatori molecolari del MCL: IGH e BCL1

Come anticipato nei paragrafi precedenti, il marcatore molecolare maggiormente utilizzato per lo studio della MRD nel MCL è rappresentato dal riarrangiamento delle catene pesanti delle immunoglobuline, anche se i primi studi di MRD sono stati condotti sul gene di fusione BCL1, prodotto specifico della traslocazione t(11;14)^{75,76,77}.

La traslocazione t(11;14) coinvolge il locus BCL1 e i geni delle IGH. I punti di rottura sul cromosoma 11 sono, solo nel 30-40% dei casi, compresi in una regione di piccole dimensioni cosiddetta "major translocation cluster" (MTC), mentre gli altri tendono a disperdersi su una porzione molto più ampia di genoma (circa 100 kb)⁷⁸. Le traslocazioni localizzate nell'MTC sono pertanto un ottimo bersaglio per l'amplificazione mediante PCR, anche se utilizzabili per la valutazione della MRD solo in circa il 30% dei pazienti. Per identificare la traslocazione t(11;14) si utilizza la tecnica della semi-nested PCR, ovvero sono effettuate due amplificazioni consecutive, usando in entrambe lo stesso primer 3' derivato dalla regione J_H e due differenti primers 5' derivati dalla regione MTC nel locus Bcl-1. L'analisi della sequenza del prodotto così amplificato, consente di identificare le regioni N specifiche del paziente su cui viene disegnato il primer specifico impiegato per valutare la clonalità delle cellule⁷⁹.

Per quanto riguarda invece il riarrangiamento IGH, questo marcatore è rintracciabile nel 70-80% dei pazienti, ma l'amplificazione mediante PCR risulta più complessa, perché per sequenziare la regione ipervariabile delle IGHV sono necessari primers specifici per ogni paziente. Inoltre in presenza di basse infiltrazioni tumorali (<5% valutata in citofluorimetria), per limiti di sensibilità del sequenziamento Sanger risulta difficile identificare questo marcatore. Un altro motivo di fallimento della ricerca del marcatore sulle IGH è l'ipermutazione somatica della sequenza immunoglobulinica, che rende impossibile il legame del primer di sequenziamento. Nonostante ciò, al momento è il marcatore più utilizzato nel MCL per lo studio MRD⁸⁰.

Nel MCL, come confermato in questa tesi, è possibile dunque rintracciare un marcatore molecolare per lo studio MRD in più del 90% dei pazienti considerando entrambi i marcatori.

Approccio MRD paziente-specifico basato su PCR qualitativa (Nested PCR)

La Nested PCR è una metodica ampiamente utilizzata per la ricerca del riarrangiamento IgH, infatti ci consente di amplificare le regioni ipervariabili di DNA che fanno parte del gene delle IG e sono caratteristiche del clone cellulare. Come verrà spiegato nel dettaglio in seguito, la porzione di DNA contenente le regioni ipervariabili viene amplificata utilizzando amplimeri derivanti dalle regioni più conservate dei geni delle IGH, le regioni framework. Successivamente viene sequenziato il prodotto di amplificazione, ottenendo in questo modo le sequenze di interesse CDR2 e la CDR3 su cui vengono disegnati i primers tumore specifici che verranno impiegati per valutare la MRD nei campioni durante e dopo il trattamento. La Nested PCR, pur essendo un'analisi qualitativa, si è rivelata molto utile nella valutazione della MRD e ha dimostrato un notevole significato prognostico; infatti in diversi studi è stata riscontrata una correlazione tra la positività alla PCR e l'incidenza di recidiva di malattia in molteplici patologie^{77,81,82}. Per la sua natura qualitativa, questa metodica ha lo svantaggio di fornire solo una risposta del tipo "tutto o nulla"; questo limite ha portato nel tempo allo sviluppo di nuove metodiche di tipo quantitativo per lo studio della MRD.

Approccio MRD paziente-specifico basato su PCR quantitativa (RQ-PCR)

La strategia più diffusa per la valutazione della MRD, applicabile su entrambi i marcatori molecolari, è la PCR quantitativa o real time PCR (RQ-PCR), metodica che consente di definire la quantità di DNA tumorale presente nel campione in analisi. L'utilizzo di RQ-PCR in sostituzione alla PCR qualitativa è ancora ampiamente dibattuto, infatti quest'ultima risulta più sensibile per una maggior quantità di DNA testato per ogni reazione ed è inoltre più economica. D'altro canto la RQ-PCR non solo consente di quantificare il residuo tumorale, ma riduce il rischio di contaminazione⁸³ ed è più facilmente standardizzabile (linee guida EuroMRD).

L'introduzione della tecnologia TaqMan e lo sviluppo dei termoamplificatori analitici hanno permesso la realizzazione di un approccio più accurato e riproducibile per l'analisi quantitativa della MRD⁸⁴. L'analisi quantitativa condotta con la Real Time PCR utilizza una coppia di primers e una sonda cromogenica di consenso complementare alla porzione di DNA contenuta tra gli amplimeri. Durante l'amplificazione la sonda viene clivata dall'attività esonucleasica 5'→3' della TaqMan; dalla sonda viene così liberato un gruppo cromoforo che diventa fotometricamente attivo e pertanto misurabile dal lettore laser del

termoamplificatore analitico. L'incremento della fluorescenza, proporzionale all'accumulo di prodotto amplificato, viene misurato diverse volte ad ogni ciclo, ottenendo così una misurazione in tempo reale del numero di cicli richiesto da ogni singola reazione per entrare nella fase esponenziale (parametro denominato Ct, threshold cycle): si tratta del ciclo soglia, ovvero del punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare in maniera esponenziale (solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base)⁸⁴⁻⁸⁸. Per effettuare una quantificazione molecolare sui campioni da analizzare, vengono amplificati contemporaneamente alcuni campioni contenenti concentrazioni note di DNA bersaglio. Dai Ct di questi campioni il software del termoamplificatore analitico ricava la "curva standard" che permette di risalire al numero di copie di DNA bersaglio presenti nel campione in esame (Figura 6).

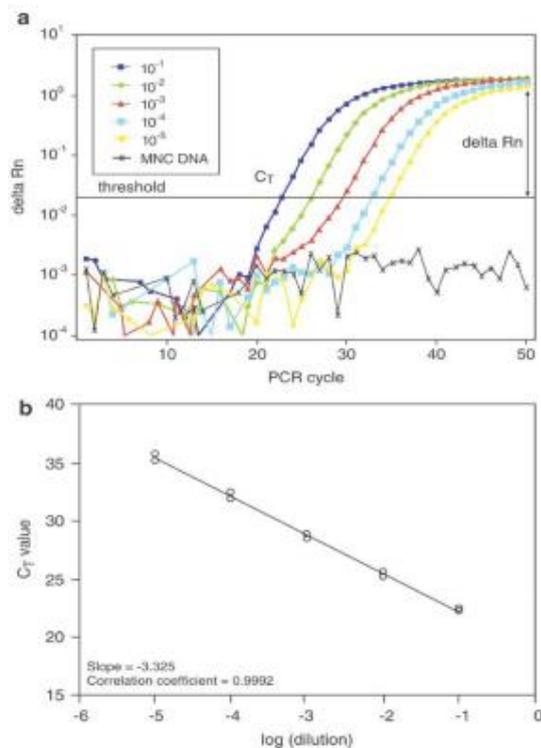


Figura 6. Esempio di curva standard ottenuta con la tecnica di RQ-PCR.

Per la valutazione della MRD nel MCL vengono utilizzate delle sonde che consentono di riconoscere come markers molecolari il BCL1 e il riarrangiamento specifico del gene IGH. In quest'ultimo caso il primo approccio è stato quello di costruire sonde specifiche per le CDR3, quindi specifiche per ogni singolo paziente. L'elevato costo di sintesi delle sonde cromogeniche ha condotto allo sviluppo di una strategia alternativa basata sull'impiego di sonde di consenso derivate dalle regioni conservate FR, associate a primers tumore specifici derivanti

dalle CDR2 e CDR3. Questo ha permesso di utilizzare la medesima sonda nei diversi pazienti in esame mantenendo la stessa efficacia, ma riducendo notevolmente i costi⁸⁶.

Nuovi approcci metodologici per lo studio della MRD

Le tecniche di amplificazione genica mediante PCR, sebbene risultino le metodiche standard per la valutazione della MRD e impiegabili su larga scala come dimostrato da questa tesi, presentano alcune limitazioni. Infatti il procedimento risulta laborioso per la necessità in RQ-PCR di costruire una curva standard di riferimento a diverse diluizioni ed è inoltre necessaria una quantità sufficiente di materiale per eseguire le diverse misurazioni. La reazione necessita di reagenti paziente specifici che fanno aumentare i costi delle procedure, e in alcuni casi l'identificazione del marcatore fallisce. Spesso questo accade per la scarsa infiltrazione tumorale al livello del midollo (BM) e del sangue venoso periferico (PB), per cui non è possibile costruire la curva standard, oppure l'ipermutazione delle IGH rende difficile l'appaiamento del primer, o ancora la quantificazione di malattia risulta non possibile per i limiti di sensibilità della metodica (non superiore a 1×10^{-5}). L'analisi MRD con ASO RQ-PCR può presentare dei limiti nei casi di ALL che vanno incontro ad evoluzione clonale, rendendo necessaria la creazione di un nuovo primer clone specifico. Alcuni casi di MCL, anche se rari, possono rimanere localizzati nel tessuto e regione di origine (es. apparato gastrointestinale) e non leucemizzare, rendendo impossibile l'identificazione della malattia nel PB o nel BM. Questo problema risulta comunque più rilevante per altre neoplasie ematologiche come il DLBCL.

Alcuni limiti sopra elencati possono essere superati con nuove tecniche promettenti:

1. Droplet Digital PCR (ddPCR): consente una quantificazione assoluta e non relativa di malattia e non richiede la creazione di una curva standard di riferimento, consentendo a lungo termine di risparmiare in termini di costi e laboriosità delle procedure, ed inoltre rende possibile usare materiale con scarsa invasione tumorale superando il problema della malattia non quantificabile. Questi vantaggi si associano ad un'ottima correlazione nei risultati con la RQ-PCR e ad una non inferiore accuratezza, sensibilità e riproducibilità⁸⁹.
2. Next-generation sequencing (NGS): permette lo studio di tutte le mutazioni di origine neoplastica a prescindere dalla loro frequenza alla diagnosi,

riducendo così il rischio di risultati falsi negativi nella valutazione della MRD legati ad un processo di evoluzione clonale: è infatti dimostrato che sub-cloni presenti in minor frequenza alla diagnosi possono diventare predominanti alla recidiva selezionati dalla terapia; un altro vantaggio è che con l'utilizzo del primer di consenso non si rende necessaria la creazione di un primer paziente-specifico per ogni clone individuato, ottenendo così un notevole risparmio in termini di tempo e costi. I dati relativi alle prestazioni tecniche della metodica dimostrano come la sensibilità sia limitata solamente dal numero di cellule utilizzato per l'analisi, e quindi dalla quantità di DNA disponibile per la reazione⁹⁰.

3. MRD su DNA libero circolante (da plasma o siero) con metodica NGS: questa tecnica rende possibile fare analisi MRD anche su tumori localizzati e non leucemici, per i quali la ricerca delle cellule neoplastiche risulterebbe falsamente negativa su BM o PB. Questa metodica è stata proposta ad esempio per il monitoraggio della MRD nella Macroglobulinemia di Waldenström⁹¹.

La malattia minima residua nel MCL

L'impatto clinico della MRD nella gestione del MCL negli ultimi anni è diventato particolarmente evidente. Fino alla fine degli anni '90, questa neoplasia ematologica era considerata resistente alla chemioterapia e non esistevano trattamenti molto efficaci. Attualmente l'utilizzo di nuovi approcci terapeutici permette spesso il raggiungimento di una remissione clinica completa di malattia e spesso anche molecolare, con una OS dei pazienti che va migliorando nel tempo. Gli studi attuali si concentrano sulla valutazione della MRD come indice di andamento della malattia, in particolare sulla correlazione tra presenza di malattia a livello molecolare (cioè positività ai marcatori tumorali) e recidiva clinica.

Metodi per l'analisi MRD

Citofluorimetria

La citometria a flusso multiparametrica (MFC) è il metodo consolidato per la diagnosi di malattie ematologiche. Nel MCL è in grado di rilevare in modo preciso ed affidabile l'infiltrazione di malattia sia nel PB che nel BM, con un limite di sensibilità di 8×10^{-4} quando si usa un'analisi MFC a quattro colori (4-MFC)⁷¹. Come illustrato dai risultati dello studio MCL Younger²⁰ o MCL Elderly²⁸ dell'European MCL Network, più dell'85% dei pazienti con MCL stadi II-IV di Ann Arbor ha alla diagnosi una malattia diffusa rilevabile nel PB o nel BM tramite MFC. Ad oggi non esistono però pannelli citofluorimetrici validati per la quantificazione di MRD durante il follow-up. In una analisi comparativa in cui è stata usata una restrizione delle catene leggere nella sottopopolazione CD19+CD5+, la 4-MFC mancava di sensibilità per la quantificazione di MRD, risultando inferiore alla RQ-PCR⁷¹. In una recente pubblicazione è stato dimostrato che una MFC a otto colori ha permesso una specifica valutazione della MRD con il raggiungimento di una sensibilità dello 0.01% in tutti i pazienti; comunque tali approcci raramente superano questo limite di sensibilità^{92,93}. Usando come cut-off lo 0.01%, l'MFC ha rilevato la presenza di MRD soltanto nell'80% dei casi risultanti positivi alla RQ-PCR. Con l'evidenza che anche livelli molto bassi di MRD-positività possono essere usati per guidare scelte terapeutiche all'interno dei trial clinici, si rendono necessarie strategie ottimizzate di MFC con l'impiego di nuove combinazioni di anticorpi o nuovi strumenti bioinformatici per l'analisi di quantità maggiori di cellule al fine di raggiungere una sensibilità comparabile o anche maggiore della RQ-PCR.

RQ-PCR

La RQ-PCR è attualmente la metodica utilizzata per la valutazione della MRD nel MCL, in quanto è la tecnica più standardizzata e sensibile. Il riarrangiamento delle catene pesanti delle immunoglobuline rappresenta il marcatore molecolare principalmente seguito nello studio della MRD nel MCL, in quanto rilevabile in circa l'80-95% dei casi. Come già precedentemente descritto, l'identificazione del riarrangiamento clonale IGH in campioni diagnostici tramite PCR e il seguente sequenziamento della regione giunzionale permettono di costruire un oligonucleotide allele-specifico (ASO) tumore-specifico per RQ-PCR (ASO-RQ-PCR), in modo da amplificare la CDR ipervariabile e tumore-specifica.

La traslocazione t(11;14), essendo la specifica lesione genetica del MCL, rappresenta un secondo bersaglio idoneo per la RQ-PCR grazie alla sua stabilità ed alla mancanza di mutazioni somatiche; tuttavia, è rilevabile tramite PCR soltanto nel 25-40% dei pazienti⁹⁴. Ciò è dovuto al fatto che i punti di rottura sul cromosoma 11 spesso cadono fuori dalle regioni MTC e non sono rilevate dai primers consenso costruiti sul cromosoma 11.

La PCR qualitativa eseguita con primer consenso per le regioni di variabilità o di giunzione del locus IGH ha un limite di rilevamento di circa 1-2% di cellule di linfoma in un background policlonale, ed è quindi poco idonea per la valutazione della MRD⁷¹. Per contro, la nested PCR qualitativa o l'ASO-RQ-PCR eseguite con primer consenso o allele-specifici t(11;14) o primer specifici per il riarrangiamento IGH possiedono invece una sensibilità riproducibile di 1 cellula tumorale su 100.000 globuli bianchi^{95,75}.

La RQ-PCR per la valutazione della MRD è applicabile nella grande maggioranza dei pazienti MCL, come illustrato dai risultati degli studi European MCL Younger e Elderly: nel 96% dei 641 pazienti MCL studiati di cui era disponibile almeno un campione diagnostico di PB o di BM, un segnale clonale IGH o la traslocazione t(11;14) è stato rilevato tramite PCR⁷⁷. La natura leucemica del MCL è stata ulteriormente comprovata dall'alta mediana di infiltrazione cellulare nel PB alla diagnosi pari a 6.3×10^{-2} . Tuttavia, la RQ-PCR per entrambi i bersagli molecolari è ristretta a quei pazienti con regioni giunzionali idonee al raggiungimento di una sufficiente sensibilità, applicando le linee guida⁸⁰. Secondo questi criteri, l'86% della coorte in studio nei trial European MCL Younger e MCL Elderly è stata quantificabile tramite RQ-PCR; i risultati ottenuti tramite ASO-RQ-PCR sulla traslocazione t(11;14) e sulle IGH sono stati altamente paragonabili.

Un approccio standardizzato nella valutazione MRD e regolari controlli di qualità sono essenziali per ottenere una elevata comparabilità interlaboratorio nell'interpretazione della MRD e per permettere trattamenti terapeutici guidati dalla MRD. Lo European Study Group on MRD (Euro-MRD), come divisione dell'ESHLO (European Scientific Foundation for Laboratory Hemato-Oncology), ha sviluppato linee guida per l'analisi e l'interpretazione dei dati di MRD analizzata in RQ-PCR nella ALL che possono essere applicati direttamente al MCL⁸⁰.

In sintesi, la RQ-PCR sul locus IGH o la traslocazione t(11;14) è quindi considerata il gold standard per la valutazione della MRD nel MCL, in quanto possiede elevata sensibilità, fornisce risultati quantitativi ed è altamente standardizzata e ampiamente applicabile.

High-throughput sequencing (HTS)

Le tecnologie di sequenziamento di ultima generazione (NGS) potrebbero fornire un nuovo approccio per lo studio della MRD, che potrebbe superare gli svantaggi legati all'ASO-RQ-PCR⁹⁶. Questo nuovo approccio, basato sugli ampliconi dei riarrangiamenti clonali IGH, oltrepassa l'analisi paziente specifica e fornisce risultati più precisi e specifici rispetto alla RQ-PCR, in cui eventuali legami non specifici degli ASO primer possono condurre a risultati falsi positivi. Tuttavia, dato che HTS si basa sull'amplificazione mediante PCR di riarrangiamenti clonali IGH, nell'identificazione del marcatore, questa metodica mostra le stesse restrizioni tecniche della PCR standard.

L'HTS è stato confrontato con la RQ-PCR in tre diverse tipologie di malattie B-cellulari, inclusa una serie di 30 pazienti MCL (Ladetto Leukemia 2014). In 4 casi, NGS ha quantificato livelli di MRD mentre non è stato possibile identificare marcatori idonei per l'analisi mediante RQ-PCR, a causa o di fallimento del sequenziamento classico o per la mancata identificazione di una regione idonea alla costruzione di primer paziente specifici. Di 156 campioni al follow-up, l'82% erano concordanti tra le due metodiche. Le discordanze erano per l'1% qualitative maggiori, per il 13% qualitative borderline e per il 3% discordanze quantitative; RQ-PCR ha ottenuto un risultato positivo o un risultato di 1 logaritmo più elevato se confrontato all'NGS nel 10% dei casi, mentre il contrario nell'8%. Questi risultati sono molto incoraggianti, tuttavia anche la quantificazione dell'MRD mediante HTS è dipendente dalla quantità di input del DNA che ne limita la sensibilità. Inoltre, il presupposto che HTS sia in grado di rilevare sequenze specifiche in modo assoluto

può essere messo in discussione, in quanto potrebbero verificarsi amplificazioni di cloni aspecifici che ne limiterebbero la sensibilità.

Il grado di infiltrazione di cellule tumorali dei campioni diagnostici, come per la RQ-PCR, è un dato critico per la determinazione del clonotipo, anche in NGS; come nella ALL, per assegnare un clonotipo di origine tumorale, viene applicato un limite di frequenza del 5%. Alcuni risultati sul valore prognostico del rilevamento di MRD mediante HTS sono stati pubblicati sia per la ALL⁹⁷ che per il MM⁹⁸; attualmente non ci sono ancora dati disponibili per MCL.

Ulteriori studi di standardizzazione, controllo di qualità e validazione dell'HTS così come lo sviluppo di linee guida per la valutazione bioinformatica e l'interpretazione dei dati, dovranno essere svolti a livello multicentrico affinché la metodica possa essere utilizzata nella routine per l'analisi della MRD nel MCL. Idealmente, un uso integrato di MFC, RQ-PCR e HTS standardizzati consentirà una valutazione precisa di MRD per la maggioranza dei pazienti MCL arruolata all'interno di studi clinici.

MRD durante e dopo il trattamento di induzione

Durante e dopo il trattamento, la valutazione della MRD tramite RQ-PCR offre la possibilità di indagare l'effetto di differenti strategie terapeutiche sul carico tumorale e di rilevare le cellule tumorali residue con una elevata sensibilità. La chemioterapia CHOP-like senza rituximab non sembra portare ad una rilevante riduzione del carico tumorale nel PB, nel BM o nei prodotti aferetici di cellule staminali da PB, neanche tra i pazienti che raggiungono una remissione clinica, come riportato dallo studio Nordic MCL1⁹⁹ e su una serie di giovani pazienti MCL trattati in maniera omogenea in un singolo centro⁷⁵. L'immuno-chemioterapia con R-CHOP negli studi European MCL Younger e Elderly ha illustrato per la prima volta l'ottenimento di elevati tassi di remissione molecolare (MRD-negatività) pari al 40%, con un 21% ottenuto a metà dell'induzione²⁰. L'ulteriore intensificazione del trattamento di induzione con citarabina ad alte dosi nel braccio alternante R-CHOP/R-DHAP dello studio European MCL Younger è stata associata al 66% di remissioni molecolari, con il 39% già a metà dell'induzione²⁰. L'impatto di ulteriori cicli del trattamento sulla riduzione delle cellule tumorali a metà dell'induzione è stato ben documentato per entrambi i bracci di trattamento tramite un incremento del tasso di remissione molecolare dopo l'induzione completa. Come nello studio European MCL Younger, anche nello studio Nordic MCL3 il 53% delle remissioni

molecolari sono state osservate in Nested PCR in pazienti con remissione clinica dopo 5 cicli alternanti R-CHOP/R-HA¹⁰⁰.

L'analisi MRD durante il trattamento di induzione indica che la maggiore intensità dei regimi terapeutici moderni si riflette in una rapida clearance di cellule tumorali nel PB e nel BM. Di conseguenza, la valutazione MRD sembra idonea a monitorare in maniera precisa l'impatto di diversi schemi di trattamento o di singoli farmaci sulla clearance delle cellule tumorali.

Attualmente, sono disponibili dati molto limitati relativamente all'impatto sulla MRD di trattamenti meno intensivi, come immunochemioterapia basata su bendamustina. Nello studio Nordic MCL4, dopo sei cicli di rituximab, bendamustina e lenalidomide, la percentuale di pazienti MRD positivi in nested PCR era 56% nel BM e 61% nel PB, su 36 pazienti valutabili¹⁰¹. In uno studio più piccolo di fase II, in 19 pazienti su 23 i clonotipi sono stati identificati tramite HTS per la valutazione MRD e il 77% di 13 pazienti dopo 3 cicli di R-Bendamustina erano MRD-negativi su PB tramite HTS¹⁰². Inoltre, al momento non ci sono dati disponibili sugli effetti dei nuovi farmaci a bersaglio molecolare come l'ibrutinib nel MCL.

MRD prima del consolidamento ad alte dosi

Diversi studi hanno dimostrato il forte impatto prognostico dello stato di MRD in remissione clinica alla fine dell'induzione e prima del consolidamento ad alte dosi, sul successivo PFS. Nello studio European MCL Younger, la MRD-positività prima dell'ASCT era fortemente predittiva di un più breve PFS (hazard ratio in PB: 2.7, in BM: 1.8), indipendentemente dal braccio del trattamento di induzione²⁰. Di conseguenza, il prolungato PFS nel braccio trattato con citarabina ad alte dosi R-CHOP/R-DHAP rispetto al R-CHOP potrebbe essere il risultato di un maggiore tasso di remissione molecolare alla fine dell'induzione, sostenendo l'ipotesi che l'intensificazione del trattamento di induzione proposta dal Nordic Lymphoma Group e dall'European MCL Network 15 anni fa ha portato ad un miglioramento dell'outcome nei pazienti MCL giovani.

Nello studio Nordic MCL3, i pazienti trapiantati in remissione molecolare dopo R-CHOP/R-HA avevano un PFS prolungato (circa 82% vs. 62% a 4 anni)¹⁰⁰. Allo stesso modo, nel LyMA trial del LySA¹⁰³, pazienti trapiantati in remissione molecolare dopo 4 cicli R-DHAP avevano un PFS maggiore rispetto ai pazienti MRD-positivi pre-ASCT; questo effetto prognostico sembra essere più prominente nei pazienti osservati dopo ASCT (PFS a 3 anni di pazienti MRD-negativi vs MRD-positivi pre-ASCT: 87% vs 52% nel PB, 84% vs 62% nel BM) rispetto ai pazienti

trattati con rituximab di mantenimento dopo ASCT (93% vs 80% nel PB, 92% vs 86% nel BM). Una serie di studi minori ha illustrato il valore prognostico dello stato MRD dopo varie immuno-chemioterapie di induzione e prima del consolidamento ad alte dosi^{104,105}.

Per quel che riguarda l'ASCT, ci si chiede se la presenza di MRD nelle cellule staminali reinfuse sia associata ad una ridotta PFS. Quattro studi hanno uniformemente riportato che la presenza o il relativo contenuto di cellule tumorali nel prodotto di cellule staminali non ha ulteriori effetti sull'esito clinico^{75,99, 104,106}. Ciò potrebbe indicare che le cellule tumorali che contaminano le cellule staminali reinfuse possano non essere capaci di causare o promuovere la progressione clinica, e che la citoriduzione nei tessuti coinvolti mediante il trattamento di induzione e consolidamento abbia un maggiore impatto sul controllo tumorale¹⁰⁶.

MRD dopo il consolidamento ad alte dosi

Nelle due serie di pazienti con MCL trattati con chemioterapia CHOP-like senza rituximab tramite cui virtualmente non sono state raggiunte remissioni molecolari, sono stati osservati il 38%⁹⁹ e il 52%⁷⁵ di remissioni molecolari dopo il consolidamento ad alte dosi e l'ASCT. Nello studio European MCL Younger, il consolidamento ad alte dosi ha incrementato il tasso di remissioni molecolari dopo l'R-CHOP dal 47% al 68% nel PB e dal 36% al 59% nel BM, e dopo l'R-CHOP/R-DHAP dal 79% al 85% nel PB e dal 61% al 79% nel BM. Le minori percentuali di remissione molecolare ottenute dopo ASCT nel braccio trattato senza HA suggeriscono che il trattamento mieloablativo potrebbe non compensare le basse quote di remissione molecolare osservate prima del ASCT²⁰. Nello studio Nordic MCL2, la quota di remissione molecolare dopo il trattamento alternante R-CHOP/R-DHAP e ASCT era elevata, con il 92% nel PB e/o BM^{27,107}. Nello studio Nordic MCL3, l'ASCT ha aumentato la percentuale di pazienti MRD-negativi nel PB e/o BM dal 53% dopo R-CHOP/R-HA al 83%⁹¹. In un'analisi intermedia dello studio LySA-LyMA, ASCT ha incrementato le percentuali di pazienti MRD-negativi tra i pazienti in remissione clinica dopo 4 cicli R-DHAP dal 80% al 95% nel PB e dal 66% al 82% nel BM¹⁰³.

Questi risultati documentano come l'effetto aggiuntivo del consolidamento ad alte dosi sulla clearance delle cellule tumorali dipenda dall'intensità del precedente trattamento di induzione. Incrementando la risposta MRD precedente al consolidamento ad alte dosi, l'effetto del ASCT sulla prognosi potrebbe essere meno evidente¹⁰⁶.

MRD nella remissione clinica dopo il trattamento

Mentre il valore prognostico di MRD misurata durante la citoriduzione o il consolidamento può essere influenzato dai successivi trattamenti, i risultati sul valore prognostico della MRD dopo il trattamento riflettono più da vicino la relazione biologica tra la MRD e la progressione clinica e il potenziale valore predittivo dello stato MRD. Diversi studi che hanno indagato il valore prognostico della MRD dopo il trattamento, specialmente dopo il consolidamento ad alte dosi, hanno uniformemente illustrato un elevato valore predittivo della MRD per il successivo PFS.

Nel report di un singolo centro⁷⁵ di 27 pazienti trattati con radio chemioterapia mieloablativa dopo induzione CHOP-like senza rituximab, la MRD-positività nel PB o nel BM durante il primo anno dopo ASCT era altamente predittiva di progressione clinica, con una PFS mediana di 21 mesi nei pazienti MRD-positivi rispetto ai 92 mesi nei pazienti MRD-negativi. La MRD-positività dopo ASCT era anche prognostica per una più breve OS e la rilevanza prognostica della MRD-positività per PFS e OS era indipendente dalle variabili al baseline e dalla CR clinica.

Nello studio Nordic MCL²⁷, tra 79 pazienti in remissione clinica dopo ASCT, il PFS differiva ampiamente tra i pazienti MRD-positivi nel PB o nel BM durante il primo anno dopo ASCT (PFS mediano 1.5 anni), i pazienti MRD-positivi ad un timepoint più tardivo (mediana PFS 5 anni) e i pazienti costantemente MRD-negativi dopo ASCT (mediana PFS non raggiunta). Similmente, nello studio Nordic MCL¹⁰⁰, lo stato MRD dopo ASCT era fortemente prognostico, con un PFS a 4 anni di circa 38% (mediana PFS circa 3 anni) in 18 pazienti MRD-positivi nel PB o BM rispetto a circa l'88% in 89 pazienti MRD-negativi. Il valore prognostico dello stato MRD dopo ASCT era maggiore di quello prima del ASCT, e questo è stato visto anche dopo stratificazione per MIPI, indice Ki67, parametri TC e PET pre-ASCT, con un rapporto di rischio aggiustato (HR) di 5.0 per PFS e 4.8 per OS.

Nello studio European MCL Younger, lo stato MRD durante il primo anno dopo ASCT era fortemente prognostico per la sopravvivenza libera da malattia (PFS), con HR di 3.2 nel PB e 2.2 nel BM²⁰. L'effetto prognostico dello stato MRD post-ASCT era maggiore rispetto al timepoint pre-ASCT ed era indipendente dal MIPI score, dal raggiungimento di una CR clinica e dal gruppo di trattamento. In particolare, tra i pazienti trapiantati dopo il regime R-CHOP/R-DHAP, quelli MRD-negativi in PB durante il primo anno dopo ASCT avevano un PFS prolungato rispetto a quelli con almeno un campione di PB MRD-positivo (HR adjusted 3.2).

Nello studio European MCL Elderly, la remissione molecolare sostenuta durante il primo anno di mantenimento in PB era predittiva per il successivo PFS, e questo è stato osservato uniformemente nei pazienti trattati in induzione con R-CHOP o con R-FC. Infine, un'analisi combinata dei due studi European MCL Younger e Elderly¹⁰⁸ ha illustrato che in 406 pazienti in remissione clinica dopo il trattamento, la MRD-positività nel PB a diversi timepoints durante il follow-up era fortemente predittiva per il successivo PFS (tra 1 e 2 anni). Il valore predittivo dello stato MRD nel PB durante il follow-up era indipendente dai fattori prognostici clinici e simile tra le coorti dei due studi e tra i gruppi di trattamento all'interno di ogni studio. Inoltre, in questa analisi preliminare, lo stato MRD in PB in remissione clinica dopo il trattamento era prognostico anche per l'OS. Ulteriori analisi su questa e altre coorti più numerose di pazienti MCL potranno potenzialmente confermare il valore prognostico della MRD non solo sul PFS ma anche sull'OS.

In conclusione, esiste una consistente evidenza che la MRD-positività dopo il trattamento standard sia fortemente predittiva per una recidiva clinica entro 1-2 anni, mentre l'esito dei pazienti in remissione molecolare sostenuta appare favorevole. Future indagini su nuove strategie di trattamento potrebbero far luce su come migliorare il pessimo esito dei pazienti che non rispondono adeguatamente al trattamento standard, come determinato dalla presenza o dalla ricomparsa della MRD¹⁰⁶.

Fonte di materiale per la valutazione MRD

Come illustrato nei trial European MCL Younger e Elderly, mentre alla diagnosi il livello di infiltrazione tumorale di BM e PB è comparabile, durante e dopo il trattamento il PB è più frequentemente e più rapidamente ripulito dalla MRD rispetto al BM⁷⁷. In questi studi viene dimostrato come solo l'analisi del PB non sia in grado di dimostrare la presenza di cellule di linfoma alla fine del trattamento di induzione in circa il 15% dei pazienti che erano MRD positivi anche sul BM. Sembra invece che una vera negatività, intesa come "guarigione" ed eliminazione di ogni cellula di MCL, non sia raggiunta nella maggioranza dei pazienti arruolati negli attuali protocolli clinici. Tuttavia, i risultati attualmente disponibili dagli studi European MCL Younger e Elderly suggeriscono che l'impatto prognostico dell'eradicazione della MRD nel PB è maggiormente predittivo che nel BM almeno durante i trattamenti di induzione e consolidamento²⁰. Inoltre, l'analisi MRD nel PB è preferibile a quella nel BM a causa del più facile accesso e del comfort del paziente per il prelievo. Di conseguenza, la RQ-PCR potrebbe identificare i

pazienti da cui la malattia potrebbe potenzialmente essere eradicata, dato che la MRD-negatività riflette la sensibilità al trattamento.

In conclusione, la scelta del materiale dipende dallo scopo della valutazione della MRD; sia il BM che il PB sembrano informativi nel descrivere gli effetti del trattamento sulla MRD-clearance; per contro, allo scopo del trattamento MRD-guidato in remissione clinica, l'uso del PB sembra fattibile e giustificato dal forte valore predittivo e prognostico della MRD¹⁰⁶.

Nuovi concetti per la valutazione della risposta clinica nel MCL

Criteri di risposta standardizzati sono critici per la gestione ottimale dei pazienti con MCL, in particolare alla luce dell'aumento dell'ottenimento di risposta completa mediante l'impiego di nuove terapie. Tuttavia, le tecniche convenzionali di imaging potrebbero non essere sufficientemente sensibili per una accurata valutazione della risposta. Ciò ha determinato l'inclusione della F-FDG-PET CT per la stadiazione dei linfomi FDG-avidivi nella classificazione di Lugano recentemente pubblicata¹⁰⁹. La valutazione della MRD emerge come un attraente strumento per valutare la risposta al trattamento nel MCL ad un livello altamente sensibile. Quasi tutti i pazienti con MCL presentano una disseminazione rilevabile in PCR al BM o al PB, e la valutazione della MRD tramite RQ-PCR è fattibile in circa l'85% dei pazienti che si presentano con MCL in stadio avanzato. La quantificazione della MRD mediante RQ-PCR è altamente standardizzata, essa riflette l'effetto del trattamento citoriduttivo e la risposta MRD è un marcatore fortemente prognostico e predittivo per il successivo esito clinico.

La remissione molecolare è un indicatore per la qualità e la profondità della remissione clinica, sembra quindi ragionevole combinare la stadiazione clinica mediante imaging con lo studio della MRD, per permettere una valutazione più specifica dell'efficacia del trattamento. Di conseguenza, i criteri di risposta dovrebbero integrare la risposta MRD come importante parametro per una valutazione ottimale della risposta. Durante il follow-up in remissione clinica, il forte potere predittivo della valutazione MRD per la progressione clinica suggerisce che un monitoraggio molecolare potrebbe aggiungersi o sostituirsi al regolare monitoraggio in imaging attualmente utilizzato nel MCL. Inoltre, un potenziale futuro endpoint per l'efficacia del trattamento dovrebbe combinare i dati della valutazione MRD con la progressione clinica¹⁰⁷.

Strategie di trattamento MRD-driven

Attualmente, il trattamento guidato dalla MRD non è raccomandato nella pratica clinica. Il trattamento con Rituximab pre-emptive della recidiva molecolare dopo il consolidamento ad alte dosi è l'unica strategia MRD-guidata che sia stata indagata nei pazienti con MCL. Nello studio Nordic MCL2, il rituximab pre-emptive è stato somministrato in monoterapia a 26 pazienti in remissione clinica dopo recidiva molecolare, ciò ha determinato una riconversione alla MRD-negatività nel 92% dei casi, con una mediana di durata della remissione molecolare reindotta di 1.5 anni⁷⁶. Sebbene non siano state reindotte delle remissioni molecolari a lungo termine, la sopravvivenza libera da recidiva clinica osservata in più del 50% dopo due anni suggeriva un potenziale ruolo del trattamento con Rituximab post-ASCT. In 4 pazienti in recidiva molecolare, con o senza recidiva clinica dopo trapianto allogenico, l'immunomodulazione con Rituximab e infusione dei linfociti del donatore induceva ancora la remissione clinica e molecolare¹¹⁰. Finora, mancano maggiori valutazioni riguardo il trattamento pre-emptive della recidiva molecolare, che comparino questa strategia MRD-guidata ad un approccio standard in termini di esito a lungo termine.

In linea di principio, esistono diverse opzioni per le strategie di intervento basate sulla MRD che potrebbero essere indagate in futuri studi clinici. Negli studi multicentrici pubblicati, l'intensificazione del trattamento era uniformemente associata ad un maggiore tasso di remissione molecolare predittivo per una prolungata remissione clinica, suggerendo che una precoce eradicazione della MRD dovrebbe essere un obiettivo terapeutico nel trattamento del MCL. È quindi di grande interesse chiarire la risposta MRD ai nuovi trattamenti a bersaglio molecolare, per selezionare le strategie più efficaci. Una strategia MRD-guidata potrebbe quindi prevedere un trattamento con blocchi di induzione intensificati e l'aggiunta di nuovi farmaci nei pazienti MRD-positivi, e successivamente una rivalutazione del consolidamento ad alte dosi nei pazienti MRD-negativi in remissione clinica, a favore di un'intensiva terapia di mantenimento. Inoltre, per quel che riguarda la terapia di mantenimento, dato il forte valore prognostico e predittivo della MRD-positività per la successiva progressione clinica, la ricomparsa della MRD potrebbe indirizzare all'impiego di nuove terapie, per migliorare l'esito a lungo termine in questi pazienti.

In conclusione, le strategie di terapia MRD-guidate, come ogni nuovo concetto terapeutico, dovrebbero essere avviate negli studi futuri con una comparazione

randomizzata al trattamento standard, in relazione ad un endpoint clinicamente significativo come l'OS¹⁰⁶.

Razionale dello studio

Nonostante i notevoli progressi compiuti in campo terapeutico negli ultimi anni, il MCL rimane una malattia di difficile gestione, caratterizzata da una prognosi infausta a medio-lungo termine. Infatti, nonostante i netti vantaggi ottenuti in termini di PFS e OS grazie alle moderne terapie ad alte dosi di citarabina supportate da ASCT e rituximab e ai nuovi farmaci a bersaglio molecolare, al momento non è ancora possibile la completa eradicazione dalla patologia e la storia naturale dei pazienti è caratterizzata da un pattern di continue recidive, sempre più chemiorefrattarie, che esitano nel decesso del paziente. Inoltre, la risposta alla terapia risulta molto variegata fra diversi pazienti con MCL, in termini di PFS e OS. Infatti, pur se caratterizzati globalmente da una sopravvivenza mediana di 3-5 anni, alcuni pazienti raggiungono PFS anche superiori ai 10 anni dopo trapianto autologo, mentre altri risultano refrattari alla terapia iniziale oppure non rispondono in modo ottimale e recidivano in poco tempo dal termine delle terapie. Questi dati clinici ci suggeriscono come il MCL presenti dunque un comportamento clinico molto eterogeneo, verosimilmente legato a differenze biologiche della malattia stessa.

Allo stato attuale purtroppo non sono disponibili forti fattori prognostici biologici in grado di predire già alla diagnosi in modo accurato l'andamento della malattia. Tra gli strumenti disponibili esiste lo score prognostico clinico MIPI e la valutazione patologica dell'antigene proliferativo Ki-67, che però presentano entrambi diversi limiti di applicabilità e al momento non sono utilizzati come guida delle scelte terapeutiche. In questo contesto può risultare determinante la profondità di risposta alla terapia, valutata tramite l'analisi della MRD eseguita a timepoint precoci post-trattamento. Tale analisi, di cui è stato già dimostrato il valore prognostico indipendente, si propone come nuovo precoce strumento predittivo dell'outcome del singolo paziente.

Lo studio oggetto di questa tesi si propone di valutare in pazienti con MCL giovani in prima linea di terapia, arruolati nel protocollo prospettico randomizzato di fase III FIL MCL0208, i dati sulla MRD, andando a verificarne la clearance post

trattamento e nel particolare la cinetica di abbattimento durante l'intero programma terapeutico e il successivo follow-up. In particolare studiando nel tempo la MRD possiamo identificare i pazienti in cui persiste una minima traccia di malattia, con l'obiettivo finale di identificare precocemente tra i pazienti in risposta clinica coloro a maggiore rischio di recidiva a breve termine. Il marcatore paziente specifico viene ricercato con l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare basate sul riarrangiamento IGH e il gene ibrido BCL1 mediante tecniche di nested PCR e RQ-PCR, che ci consentono di identificare e quantificare anche minimi residui di malattia.

Pertanto gli obiettivi che questo studio si pone sono:

- Verificare la fattibilità della ricerca del marcatore molecolare e dello studio della MRD all'interno di un ampio protocollo multicentrico randomizzato di fase III.
- Valutare precocemente nel singolo paziente la diversa efficacia dei diversi blocchi di trattamento in termini di abbattimento della MRD (risposta molecolare). Nel particolare: dopo la terapia con antracicline (R-CHOP+EDX), sulle leucoaferesi, dopo le alte dosi di Citarabina, dopo il trapianto autologo e durante il mantenimento con Lenalidomide.
- Validare il significato prognostico della MRD ai vari timepoint del trattamento citati, mediante la correlazione tra dati molecolari e dati di risposta clinica e outcome dei pazienti
- Valutare la correlazione fra i valori quantitativi di MRD registrabili in diversi tessuti: BM (standard attuale) e PB (tessuto di più facile prelievo)

I risultati ottenuti potranno validare la fattibilità e l'impatto prognostico della MRD nel contesto di un ampio studio clinico. Questi risultati potranno porre le basi per una diffusione nella clinica dell'analisi MRD come strumento precoce predittivo dell'outcome, in grado di stratificare i pazienti in differenti classi di rischio, ai quali eventualmente poter proporre un trattamento personalizzato ("tailored therapy"), come già avviene in altre patologie ematologiche, come la ALL. Inoltre la valutazione della MRD si propone come parametro precoce di outcome nell'analisi dell'efficacia di trattamenti alternativi nel contesto di studi clinici randomizzati di fase III⁷⁷) e particolarmente utile nello studio dell'attività citoriduttrice dei nuovi farmaci a bersaglio molecolare già a partire da fasi precoci di studio (fase I/II).

Pazienti, materiali e metodi

Disegno dello studio clinico MCL0208

MCL0208 è uno studio clinico multicentrico randomizzato controllato di fase III, proposto per valutare l'efficacia e la sicurezza del farmaco lenalidomide (Revlimid) come terapia di mantenimento in confronto alla sola osservazione in pazienti adulti con MCL in stadio avanzato, in completa o parziale remissione, dopo trattamento di prima linea con alte dosi di chemioterapia associata a Rituximab e seguita da ASCT.

Il protocollo è costituito da tre fasi: una fase di screening, una fase di trattamento e una fase di follow-up.

Fase di screening

Vengono selezionati, previo consenso informato, i pazienti con nuova diagnosi MCL secondo i criteri WHO di età compresa tra i 18-60 anni, i quali vengono sottoposti a specifici esami diagnostici (biopsia con conferma dell'iperespressione della ciclina D1 alla RT-PCR o conferma della traslocazione specifica alla FISH) e di stadiazione, nonché una valutazione del PS (0-3).

Vengono esclusi dal protocollo i pazienti con linfomi di altri sottotipi istologici o con MCL a decorso indolente, pazienti che presentano altre gravi neoplasie maligne o hanno un coinvolgimento del SNC. Sono esclusi, inoltre, i pazienti con gravi disfunzioni d'organo (FE<45%, insufficienza epatica o renale e insufficienza midollare per cause non correlate al linfoma).

Fase di trattamento

- 1) Terapia di induzione:
 - chemio immunoterapia con schema R-CHOP ogni 21 giorni per 3 cicli;
 - chemio immunoterapia con schema R-Ciclofosfamide 4 g/mq per un ciclo.
- 2) Terapia di consolidamento con Ciclofosfamide e due cicli di Citarabina ad alte dosi per 3 giorni, associate ad una infusione di rituximab. La prima leucaferesi (LK1) viene effettuata dopo il primo ciclo; una seconda raccolta (LK2) viene effettuata dopo il secondo ciclo solo nei pazienti MRD+ alla LK1, nei pazienti no marker o nei pazienti che non presentassero una prima raccolta sufficiente.
- 3) Condizionamento e trapianto autologo di cellule staminali: il regime di condizionamento viene fatto con la chemioterapia ad alte dosi secondo lo

schema BEAM (Carmustina, Etoposide, Citarabina, Melphalan), successivamente si reinfondono le cellule staminali e si somministra fattore di crescita G-CSF.

Fase di randomizzazione e mantenimento

Terminata la prima linea di immunochemioterapia seguita da ASCT, i pazienti che ottengono una risposta completa o parziale vengono randomizzati in due gruppi: uno sottoposto ad una terapia di mantenimento con lenalidomide e l'altro a sola osservazione. La randomizzazione avviene dopo 60-90 giorni dal trapianto autologo e ad essa segue l'eventuale inizio del mantenimento.

I pazienti ottenenti una risposta alla prima linea vengono stratificati in due gruppi:

1. Pazienti in risposta clinica completa e negativi a livello molecolare per il marcatore in PCR
2. Pazienti in risposta clinica completa, ma con positività al marcatore molecolare o in parziale risposta clinica con qualsiasi stato molecolare, o pazienti in parziale risposta clinica dei quali non è stato individuato marcatore alla diagnosi.

All'interno di ogni gruppo i pazienti vengono randomizzati con un rapporto 1:1 nei due bracci:

- Braccio A: somministrazione di lenalidomide dal giorno 1 al giorno 21 ogni 28 giorni del ciclo;
- Braccio B: si monitorizza lo stato di salute generale e di malattia del paziente, ma non terapie specifiche per il MCL (braccio osservazionale).

Durante il mantenimento vengono effettuate visite in occasione dell'inizio di ogni ciclo, per verificare l'effettiva indicazione al proseguimento dello studio.

Fase di follow-up

In linea generale i pazienti usciti dallo studio per qualsiasi motivo vengono seguiti ogni 90 giorni (+/- 14). I pazienti che interrompono il trattamento per progressione o recidiva sono indirizzati verso una terapia di seconda linea al di fuori del protocollo di studio.

La fase di follow-up dura 36 mesi a partire dalla randomizzazione.

MRD nel protocollo MCL0208

Per ciascun timepoint sono stati prelevati campioni di BM e PB, mentre dalle LK è stata raccolta un'aliquota di cellule per MRD

I timepoint specifici in cui avviene il campionamento del materiale biologico e lo studio della MRD sono: al momento della diagnosi, dopo la terapia di induzione (post R-CHOP), sul materiale della prima (LK1) ed eventuale seconda leucaferesi (LK2), dopo la terapia di consolidamento (post Ara-C), dopo il trapianto autologo (post ASCT), a 6 (M1), 12 (M2), 18 (M3), 24 (M4), 30 (M5), 36 (M6) mesi dalla randomizzazione in entrambi i bracci (figura 7).

I risultati delle analisi molecolari rimangono sconosciuti per i singoli centri, ad eccezione delle leucoferesi.

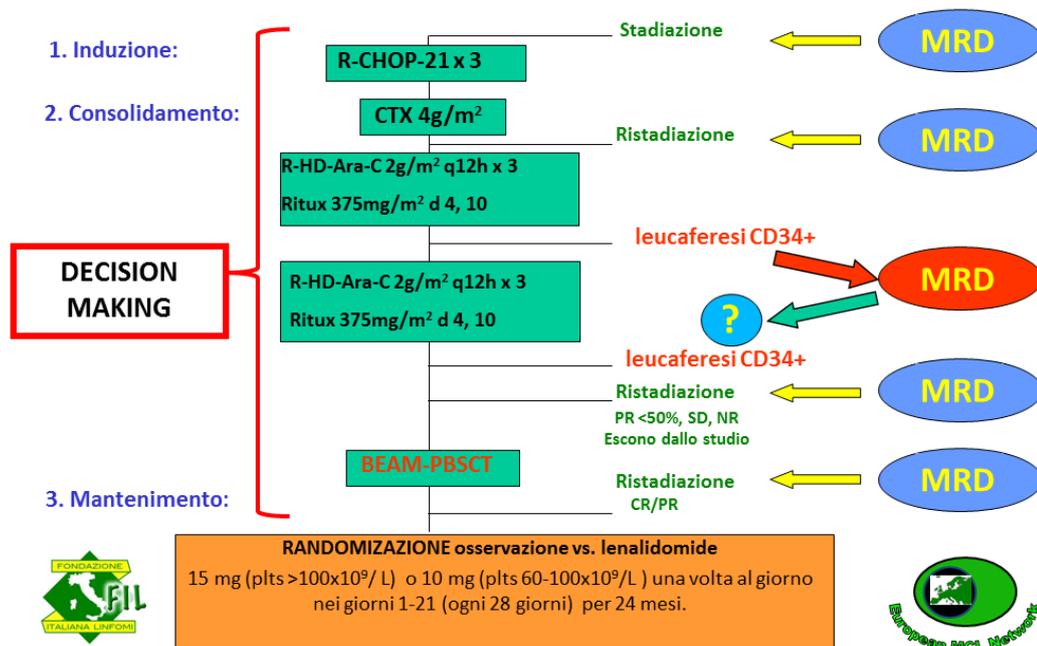


Figura 7. Schema riassuntivo dei timepoint in cui si effettua l'analisi della MRD

Processazione dei campioni ed estrazione degli acidi nucleici

Per l'identificazione e la quantificazione di cellule neoplastiche nei campioni alla diagnosi è stata utilizzata la citofluorimetria standardizzata a quattro colori, utilizzando i seguenti anticorpi: anti-CD19 APC, anti-CD23 PE (ficoeritrina), anti-CD5 FITC, anti-CD20 PE.

Le cellule mononucleate sono state separate sia da BM che da PB mediante centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) o mediante lisi eritrocitaria. La lisi consiste nel risospingere il BM o PB con una soluzione di lisi (1,55 mol/L NH₄Cl, 0,1 mol/L KHCO₃ e 0,5 mol/L EDTA), omogeneizzare e centrifugare a 1500 rpm per 10 minuti. Buttare il surnatante e ripetere quest'operazione una seconda volta.

Il DNA genomico è stato estratto mediante utilizzo di DNAzol (Life Technologies, Grand Island, NY), secondo il protocollo fornito dai produttori o con estrattore automatico Maxwell® 16 Instrument (Promega) che utilizzato assieme al Maxwell® RSC blood DNA (Promega) consente la purificazione dell'acido nucleico in automatico, fino a un massimo di 16 campioni, utilizzando la lisi cellulare e il legame dell'acido nucleico con particelle di silice magnetizzata come principale principio di separazione.

Il DNA estratto è stato successivamente quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop 2000 (ThermoFisher). La qualità del DNA estratto è indicata dal rapporto dell'assorbanza a 260nm/280nm; i campioni sono stati reputati idonei quando presentanti un rapporto compreso tra 1,7 e 2,0.

L'amplificabilità del DNA è stata valutata effettuando l'analisi del gene di controllo p53-esone 8, mediante tecnica di PCR qualitativa.

Ricerca del marcatore molecolare e monitoraggio della MRD

Nested-PCR

I marcatori molecolari utilizzati per lo studio della MRD sono stati il riarrangiamento della catena pesante delle immunoglobuline e la traslocazione t(11;14) BCL1/IGH. I riarrangiamenti del locus IGH sono stati amplificati mediante PCR qualitativa, partendo da DNA genomico ed utilizzando un primer consenso 5' costruito sulla regione FR1 ed un primer consenso 3' costruito sulla regione FR4. 1 µg di DNA è stato amplificato utilizzando il seguente profilo termico: una denaturazione iniziale a 94°C per 1 minuto, seguita da 30-33 cicli di denaturazione a 94°C ibridazione a 62°C ed estensione a 72°C tutti per 30 secondi ed un'estensione finale a 72 °C per 10 minuti. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%; le bande apparentemente clonali sono state fatte migrare su gel di agarosio al 2% ed infine purificate mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Germany) secondo le indicazioni fornite dal produttore.

Il DNA genomico estratto è stato quindi sequenziato mediante tecnologia di Sanger con dNTP marcati (Sequenziatore capillare ABI 3730, Applied biosystem, Biofab Research, Roma). Le sequenze nucleotidiche ottenute per ogni paziente sono state analizzate mediante software e database IMG T (<http://imgt.cines.fr>), i quali identificano la sequenza nucleotidica confrontandola con tutte le sequenze immunoglobuliniche simili contenute nella banca dati internazionale. Questa analisi permette di identificare le regioni conservate FR e le regioni CDR dei geni

IGH. Sulle regioni CDR2 e CDR3 sono stati disegnati gli oligonucleotidi tumore-specifici (ASO primer) per ogni paziente utilizzati successivamente in nested-PCR. La traslocazione t(11;14) è stata valutata in seminested PCR, attraverso due amplificazioni: la prima utilizza un primer 5' sense localizzato a monte della regione MTC nel locus BCL1, mentre la seconda amplificazione utilizza un primer 5' sense più interno. Entrambe le amplificazioni impiegano un primer 3' anti-sense derivato dalla regione JH del gene delle IGH. Per la prima amplificazione è stato utilizzato 1 µg di DNA e 2 µl del primo prodotto di amplificazione per la seconda reazione. I profili termici di entrambe le amplificazioni prevedono 30 cicli di denaturazione a 94°C per un minuto, ibridazione a 58°C per 30 secondi, estensione a 72°C per 30 secondi ed estensione finale a 72°C per 10 minuti. Successivamente i prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%. I prodotti di reazione positivi sono stati sequenziati mediante sequenziamento di Sanger; le sequenze nucleotidiche, ottenute in forma di cromatogramma per ogni paziente, sono state analizzate mediante il programma BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn), il quale confronta la sequenza nucleotidica del paziente con quella germline. Per ogni sequenza sono stati identificati i punti di rottura sul cromosoma 11-14 e la regione N specifica per ogni paziente. L'omologia della regione N tra la diagnosi e il follow-up ha permesso la conferma dell'invariabilità del clone.

Real-Time PCR

La valutazione quantitativa per entrambi i marcatori (IGH e BCL1) è stata eseguita a partire da 500 ng di DNA mediante la quantificazione assoluta in Real Time Quantitative PCR. Tale approccio ha previsto l'impiego di una curva standard di quantificazione costituita da diluizioni scalari di DNA alla diagnosi contenente il riarrangiamento clonale specifico del paziente in esame, in un "pool" di DNA derivante da linfociti normali prelevati da 5-10 donatori sani secondo quanto specificato dalle linee guida relative alla standardizzazione europea. La reazione di amplificazione in RQ-PCR è stata eseguita con il sistema AbiPrism 7900 HT (Applied Biosystems, UK) su un volume totale di 25 µl mediante il seguente profilo termico di amplificazione: due minuti a 50 °C, dieci minuti a 95 °C seguiti da 42 cicli a 95 °C per 15 secondi e 60°C per un minuto.

Per la quantificazione del marcatore IGH è stata utilizzata una sonda di consenso costruita nella regione FR3 in associazione agli ASO primers paziente specifici.

Per la quantificazione del BCL1 è stata utilizzata una sonda e un primer forward di consenso costruiti nella regione JH specifica del paziente in associazione ad un primer reverse costruito nella regione N specifica per ciascun paziente.

I risultati di Real Time sono stati analizzati secondo le linee guida del gruppo di standardizzazione europea Euro-MRD.

Per alcuni pazienti è stata riscontrata una quantità di malattia minima, non quantificabile in RQ-PCR, che convenzionalmente abbiamo definito come 1×10^{-6} , ossia un valore che si attesti tra il limite inferiore di sensibilità della metodica (1×10^{-5}) e la negatività definita come 1×10^{-8} .

Droplet Digital PCR

Sui campioni per i quali non è stato possibile ottenere un risultato in RT-PCR, è stata utilizzata la metodica Droplet Digital PCR (DDPCR). La procedura è stata eseguita utilizzando il sistema QX100 Droplet Digital PCR system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). I campioni sono stati testati in triplicato utilizzando 500 ng di DNA genomico. Per entrambi i marcatori molecolari sono stati utilizzati gli stessi primer e sonde impiegati nelle reazioni di RT-PCR.

Brevemente, le gocce sono state generate tramite il generatore QX100 (Biorad) e la successiva PCR è avvenuta mediante termociclatore T100 (Biorad). Successivamente il prodotto di PCR è stata caricato su un lettore di gocce QX100 e analizzato mediante QuantaSoft v1.2 (Biorad Laboratories). La quantità finale di massa tumorale è stata quantificata secondo la distribuzione di Poisson.

I dati generati dalla DD-PCR, per poter essere adeguatamente confrontati con quelli generati dalla RT-PCR, sono stati analizzati applicando le stesse linee guida dell'Euro-MRD.

Analisi statistiche

Per ogni timepoint considerato, il TTP (Time to Progression) è stato calcolato a partire dalla data di arrivo del campione corrispondente. I dati di outcome clinico utilizzati per le analisi sono aggiornati al 17 gennaio 2017. Le analisi di sopravvivenza sono state effettuate secondo il metodo di Kaplan-Meier, e le differenze tra sottogruppi sono state valutate mediante il log-rank test. Tutti i valori di p riportati sono stati ottenuti mediante il "two-sided exact method" al convenzionale livello di significatività del 5%.

Il confronto delle mediane è stato effettuato tramite Mann-Whitney t-test per l'analisi di due variabili e tramite one-way ANOVA test per l'analisi di tre variabili.

Le analisi sono state condotte secondo l'intention to treat.

Risultati

Sintesi dei risultati clinici

Caratteristiche dei pazienti arruolati

Il protocollo MCL0208 è stato disegnato dalla FIL nel 2008. L'arruolamento dei pazienti è iniziato nel maggio 2010 ed è terminato nell'agosto 2015, quando è stato raggiunto l'obiettivo previsto dallo studio, ovvero 300 pazienti, arruolati in 48 centri italiani e in un centro portoghese a Lisbona. L'analisi ad interim su cui si basano i dati di questa tesi è stata effettuata a gennaio 2017.

I pazienti sono stati selezionati nella fase di screening secondo i criteri sopra citati; presentano un'età media alla diagnosi di 57 anni (intervallo 51-62), e il 78% è di sesso maschile, come atteso. La malattia si presentava alla diagnosi nella maggioranza dei casi (98%) in stadio avanzato, III-IV secondo la classificazione di Ann Arbor, con performance status (scala ECOG) favorevole; era inoltre presente nel 33% dei pazienti una lesione bulky, valori sierici di lattato deidrogenasi (LDH) elevati nel 32% dei pazienti e midollo osseo infiltrato nel 79% dei pazienti. Dal punto di vista prognostico le categorie MIPI erano così rappresentate: il 60% dei pazienti era a basso rischio, il 25% a rischio intermedio e il 15% ad alto rischio; l'8% dei pazienti presentava inoltre morfologia blastoide. (tabella 3)

	N = 300	N Mancanti
Sesso		0
Femminile	65 (22%)	
Maschile	235 (78%)	
Età al consenso, mediana (IQR)	57 (51;62)	0
ECOG		0
0	231 (77%)	
1	60 (20%)	
2	9 (3%)	
Stadio AA		1
II	5 (2%)	
III	14 (5%)	
IV	280 (93%)	
Bulky (> 5 cm)		2
No	200 (67%)	
Sì	98 (33%)	
Istologia		0
MCL Classico	275 (92%)	
MCL variante Blastoides	25 (8%)	
LDH		4
Normale	200 (68%)	
Anormale	96 (32%)	
WBC, mediana (IQR)	7.465 (1.100;195.580)	0
Ki67		63
< 30%	120 (51%)	
≥ 30%	117 (49%)	
Infiltrazione BM (istologia)		4
Negativo	63 (21%)	
Positivo	233 (79%)	
Mediana (IQR)	30% (1;100)	
MIPI		3
Basso	179 (60%)	
Intermedio	73 (25%)	
Alto	45 (15%)	

Tabella 3. Caratteristiche generali alla diagnosi dei pazienti arruolati nello studio MCL0208

Fattibilità clinica dello studio e workflow dei pazienti

Dei 300 pazienti arruolati, 266 (89%) hanno completato al momento dell'analisi ad interim l'immuno-chemioterapia secondo lo schema R-CHOP seguita da alte dosi di Ara-C, 247 (82%) il trapianto autologo di cellule staminali e 205 (68%) sono i

pazienti che sono stati alla fine randomizzati tra terapia di mantenimento con lenalidomide (104) e osservazione (101) (figura 8).

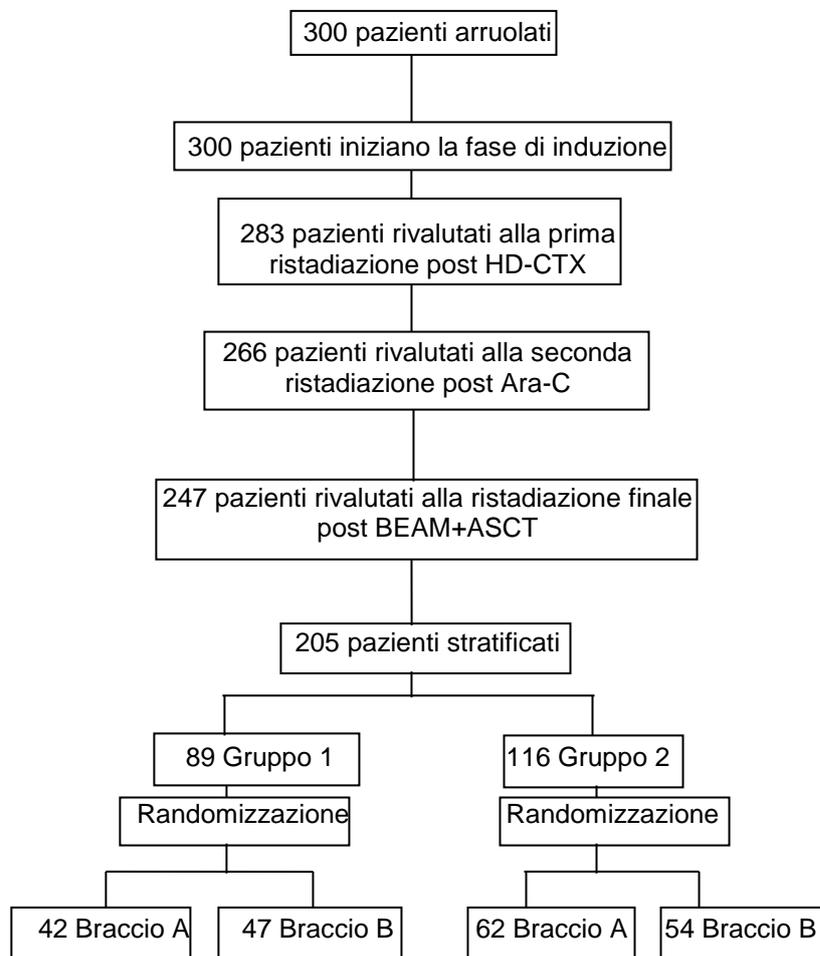


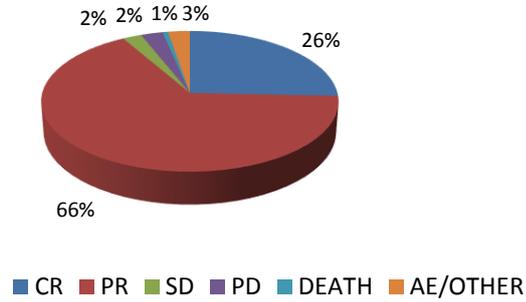
Figura 8. Workflow dei pazienti arruolati nello studio MCL0208

Risposta clinica

La valutazione della risposta clinica è stata effettuata secondo i criteri di Cheson del 2007 su tutti i 300 pazienti arruolati: 77 pazienti (26%) raggiungevano la remissione completa dopo R-CHOP, 199 (66%) dopo Ara-C, 222 (74%) dopo ASCT. I pazienti che invece andavano incontro a progressione erano 8 (2%) dopo la prima ristadiatione, 5 dopo la seconda e 11 dopo la terza, per un totale di 24 (8%) progressioni fino al timepoint post ASCT (Figura 9).

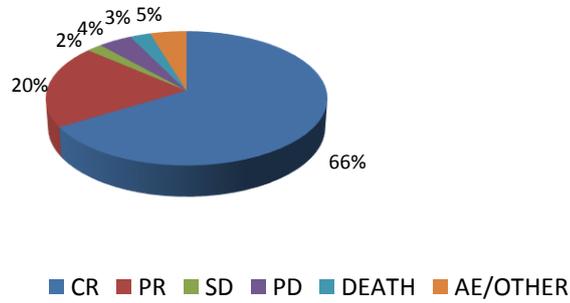
a.

Risposte cliniche post R-CHOP



b.

Risposte cliniche post Ara-C



c.

Risposte cliniche post ASCT

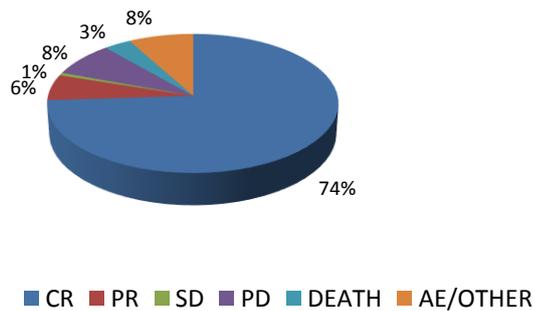


Figura 9. Risposte cliniche dei pazienti arruolati nello studio MCL0208 alla prima ristadiatione (post R-CHOP, a), alla seconda ristadiatione (post Ara-C, b) e alla ristadiatione finale (post ASCT, c). CR: remissione completa; PR: risposta parziale; SD: malattia stabile; PD: malattia in progressione; Death: decesso non dovuto a progressione; AE/Other: eventi avversi/altro.

Per quanto riguarda i dati di sopravvivenza, dopo un follow up mediano di 36 mesi, il PFS mediano stimato a 2 anni è del 77.2% (95%CI: 71.8-81.7) e a 3 anni del 66.7% (95%CI: 60.4-72.2), mentre l'OS stimato a 2 anni è del 89.7% (95%CI: 85.3-92.8) e a 3 anni del 86.3% (95%CI: 81.3-90) (Figura 10).

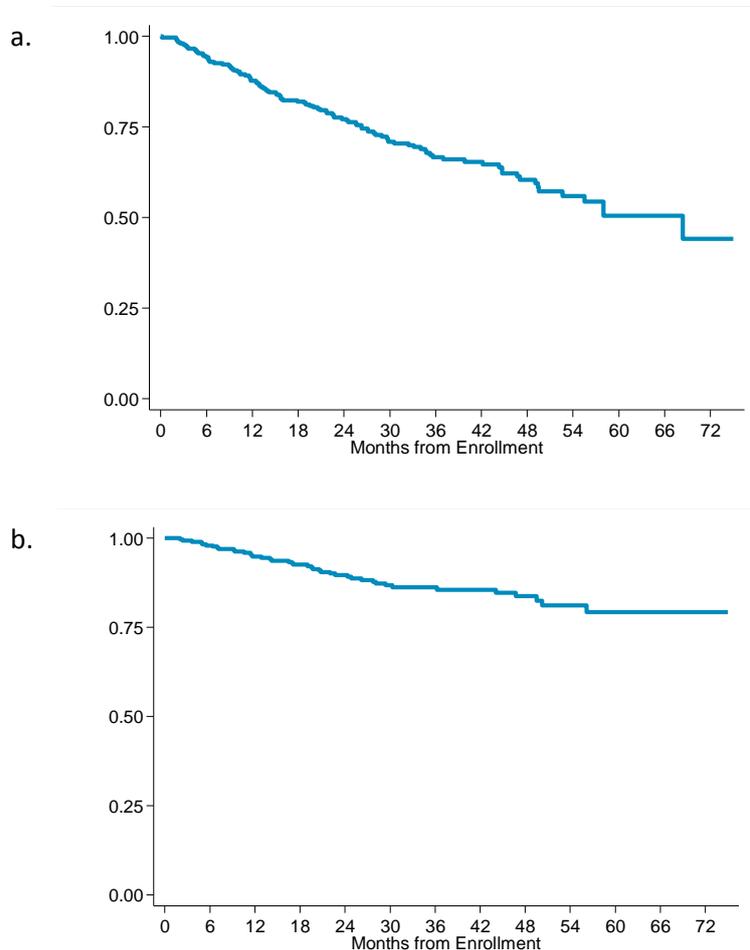


Figura 10. Curve di sopravvivenza: PFS (a) e OS (b) dei pazienti MCL0208 a partire dall'arruolamento.

Risultati molecolari

Fattibilità dello studio molecolare e analisi dei marcatori al baseline

L'arruolamento dei pazienti è stato concluso nell'agosto 2015; per la totalità dei pazienti era disponibile almeno un campione diagnostico: 287/300 (95,6%) BM e 299/300 (99,6%) PB. In 250/300 pazienti (83%) è stato possibile identificare un marker molecolare, basato sul riarrangiamento IGH in 211 pazienti (70%) e sul

riarrangiamento BCL1/IGH in 97 pazienti (32%). 58 casi presentavano entrambi i marcatori (19%) e 50 (17%) nessun marcatore. (Figura 11)

Dei 50 pazienti senza marcatore, la percentuale mediana di infiltrazione tumorale midollare valutata in citofluorimetria era 0,7% (range 0-70), pertanto significativamente inferiore rispetto all'8,7% (range 0-92,6) dei pazienti con marcatore ($p < 0.0001$). Abbiamo inoltre riscontrato significative differenze di percentuale di infiltrazione midollare sulla base del marcatore molecolare individuato: 10,2% (range 0-87) nei pazienti con solo IGH, 1,6% (range 0,1-57,2) in quelli con solo BCL1, 14,5% (range 0,1-92,6) in quelli con entrambi i marcatori ($p < 0.0001$).

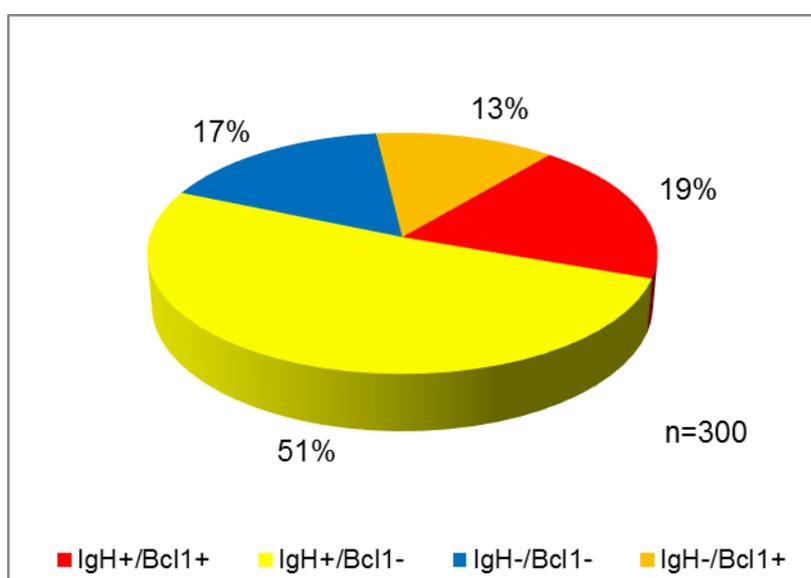
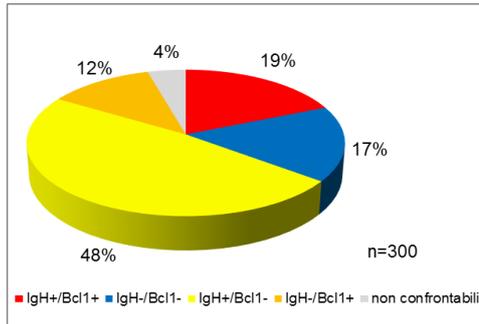


Figura 11. Valutazione dei marcatori molecolari alla diagnosi

Analisi delle discordanze fra marcatori al baseline: IGH vs BCL1

Le percentuali di individuazione dei marker molecolari sono analoghe su BM e PB. Nel particolare, sui 300 pazienti arruolati nello studio, i pazienti che presentano entrambi i marcatori sono 56 (19%) sul BM e 58 (19%) sul PB, quelli che hanno solo il marcatore IGH sono 145 (48%) sul BM e 152 (51%) sul PB, quelli che hanno solo il marcatore BCL1 sono 36 (12%) sul BM e 39 (13%) sul PB. I casi non confrontabili per mancato arrivo del campione o per materiale insufficiente sono 13 (4%) sul BM e 1 (0,003%) sul PB. (Figura 12).

a.



b.

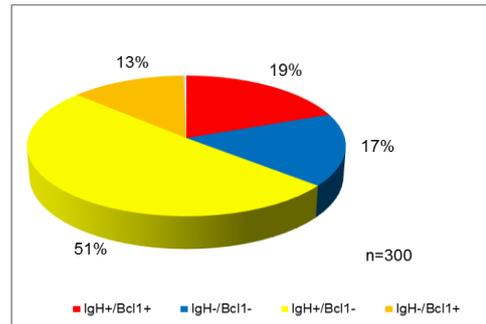


Figure 12. Confronto tra la diagnosi dei due marcatori IGH e BCL1, sul BM (a) e sul PB (b).

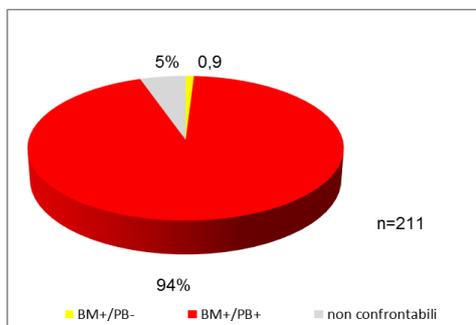
Analisi delle discordanze fra tessuti al baseline: BM vs PB

Le percentuali di individuazione dei marker molecolari su BM e PB sono analoghe per entrambi i marcatori.

Nel particolare, sui 211 pazienti che hanno il marcatore IGH, 198 (94%) presentano il marcatore concordantemente positivo su BM e PB, 2 casi (0,009%) presentano il marcatore solo su BM mentre il contrario (BM-/PB+) non si verifica. 11 casi (5%) risultano non confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti.

Sui 97 pazienti che hanno il marcatore BCL1, 89 (92%) presentano il marcatore concordantemente positivo su BM e PB, 2 casi (2%) presentano il marcatore solo su BM, mentre il contrario (BM-/PB+) si verifica in 3 casi (3%). In 3 casi (3%) non è stato possibile effettuare il confronto per mancanza di uno dei due tessuti. (Figura 13).

a.



b.

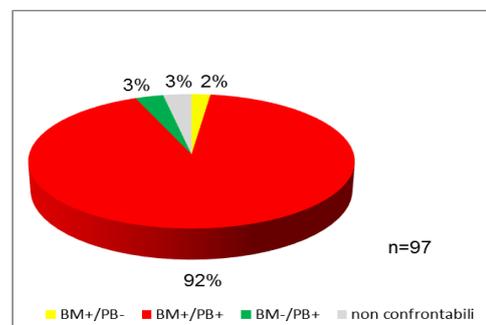


Figura 13. Confronto tra la valutazione nei due tessuti (BM e PB) del marcatore IGH (a) e BCL1 (b), alla diagnosi

Analisi della MRD in PCR qualitativa (Nested PCR)

In totale sono pervenuti al nostro laboratorio i campioni baseline di 300 pazienti (287 BM/299 PB). Inoltre, al momento della presente analisi sono arrivati i campioni di: 224 pazienti relativi al timepoint post R-CHOP, 204 LK1, 45 LK2, 196 post Ara-C, 192 post ASCT, 135 M1 e 124 M2.

Il tasso di negativizzazione molecolare post R-CHOP è risultato del 30% su BM (65/221) e del 46% su PB (101/218), post Ara-C del 54% su BM (102/189) e del 78% su PB (150/193), post ASCT del 53% su BM (101/190) e del 77% su PB (146/189), M1 del 39% su BM (44/114) e del 54% su PB (60/110), M2 del 47% su BM (48/102) e del 53% (54/101) su PB.

Alla LK1, 164/204 campioni (81%) sono risultati negativi, pertanto, come da protocollo, questi pazienti non hanno eseguito la seconda raccolta. Delle 45 LK2 giunte in laboratorio (pazienti positivi alla prima), 23 sono risultate negative (49%).

(Figura 14).

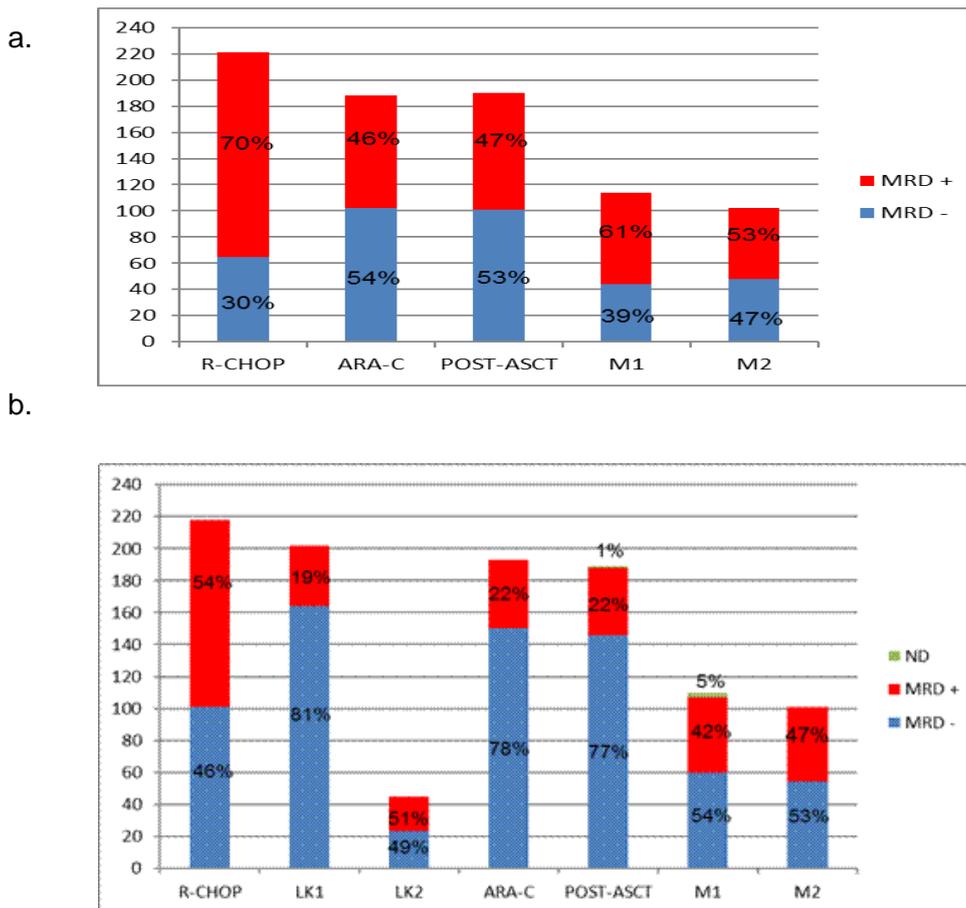


Figura 14. Istogrammi rappresentanti i tassi di negativizzazione sul BM (a) e sul PB e le due LK (b)

Analisi discordanze fra tessuti nell'analisi MRD: BM vs PB

L'analisi della MRD al timepoint post R-CHOP mostra che su 189 pazienti con marcatore IGH, 138 (73%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 97 (51%) sono concordanti positivi e 41 (22%) concordanti negativi. Invece, 37 pazienti (20%) sono positivi sul BM e negativi sul PB mentre il contrario (BM-/PB+) avviene in soli 8 casi (4%). 6 pazienti (3%) non sono confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti. La stessa analisi è stata condotta sui 85 pazienti per i quali era disponibile un marcatore BCL1. 55 casi (65%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 28 (33%) sono concordanti positivi e 27 (32%) sono concordanti negativi. 22 casi (26%) sono positivi solo sul BM, mentre 5 casi (6%) sono positivi solo sul PB. I non confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti sono 3 (3%) (*Figura 15*).

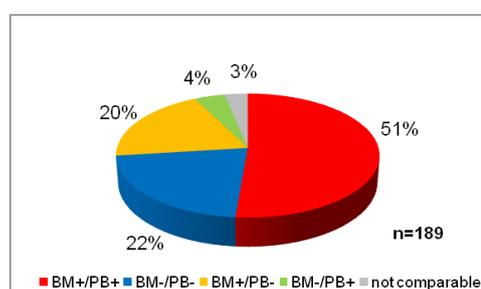
L'analisi della MRD al timepoint post Ara-C fa vedere che su 167 pazienti con marcatore IGH, 99 (59%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 28 (17%) sono concordanti positivi e 71 (42%) concordanti negativi. Invece, 47 pazienti (28%) sono positivi sul BM e negativi sul PB mentre il contrario (BM-/PB+) avviene in soli 6 casi (4%). 15 pazienti (9%) non sono confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti. La stessa analisi è stata condotta sui 73 pazienti per i quali era disponibile un marcatore BCL1. 56 casi (77%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 3 (4%) sono concordanti positivi e 53 (73%) sono concordanti negativi. 10 casi (14%) sono positivi solo sul BM, mentre 4 casi (5%) sono positivi solo sul PB. I non confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti sono 3 (4%) (*Figura 16*).

L'analisi della MRD al timepoint post ASCT fa vedere che su 162 pazienti con marcatore IGH, 110 (68%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 37 (23%) sono concordanti positivi e 73 (45%) concordanti negativi. Invece, 45 pazienti (28%) sono positivi sul BM e negativi sul PB mentre il contrario (BM-/PB+) avviene in soli 3 casi (2%). 4 pazienti (2%) non sono confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti. La stessa analisi è stata condotta sui 74 pazienti per i quali era disponibile un marcatore BCL1. 61 casi (82%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 7 (9%) sono concordanti positivi e 54 (73%) sono concordanti negativi. 9 casi (12%) sono positivi solo sul BM, mentre 1 caso (1%) è positivo solo sul PB. I non confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti sono 3 (4%) (*Figura 17*).

L'analisi della MRD al timepoint M1 fa vedere che su 90 pazienti con marcatore IGH, 69 (77%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 44 (49%) sono concordanti positivi e 25 (28%) concordanti negativi. Invece, 10 pazienti (11%) sono positivi sul BM e negativi sul PB mentre il contrario (BM-/PB+) non avviene. 11 pazienti (12%) non sono confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti. La stessa analisi è stata condotta sui 54 pazienti per i quali era disponibile un marcatore BCL1. 42 casi (78%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 7 (13%) sono concordanti positivi e 35 (65%) sono concordanti negativi. 6 casi (11%) sono positivi solo sul BM, mentre 1 caso (2%) è positivo solo sul PB. I non confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti sono 5 (9%) (Figura 18).

L'analisi della MRD al timepoint M2 fa vedere che su 80 pazienti con marcatore IGH, 65 (81%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 43 (54%) sono concordanti positivi e 22 (27%) concordanti negativi. Invece, 6 pazienti (8%) sono positivi sul BM e negativi sul PB mentre il contrario (BM-/PB+) avviene in 5 casi (7%). 4 pazienti (5%) non sono confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti. La stessa analisi è stata condotta sui 49 pazienti per i quali era disponibile un marcatore BCL1. 42 casi (86%) concordano per il risultato fra BM e PB: in particolare, 4 (8%) sono concordanti positivi e 38 (78%) sono concordanti negativi. 4 casi (8%) sono positivi solo sul BM, mentre 1 caso (2%) è positivo solo sul PB. I non confrontabili per mancanza di uno dei due tessuti sono 2 (4%). (Figura 19).

a.



b.

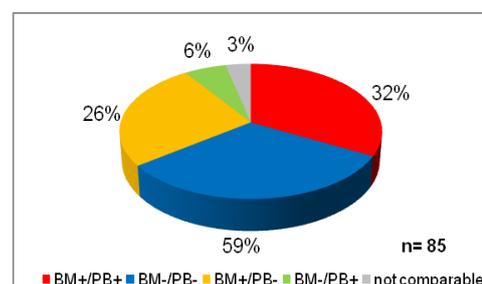
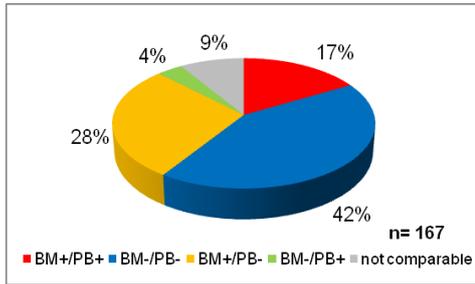


Figura 15. Confronto tra la valutazione nei due tessuti (BM e PB) del marcatore IGH (a) e BCL1 (b) al timepoint post ASCT

a.



b.

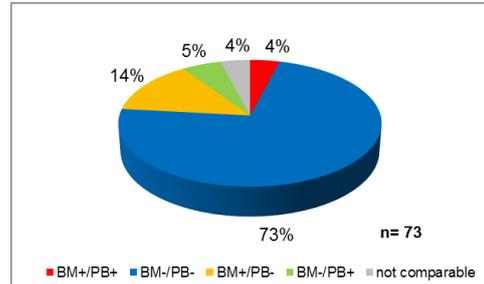
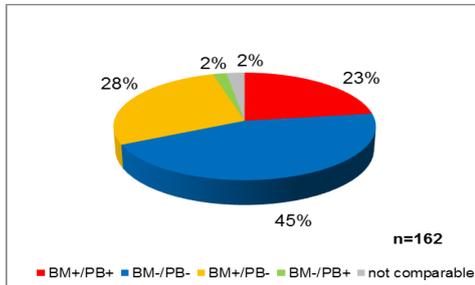


Figura 16. Confronto tra la valutazione nei due tessuti (BM e PB) del marcatore IGH (a) e BCL1 (b) al timepoint post Ara-C

a.



b.

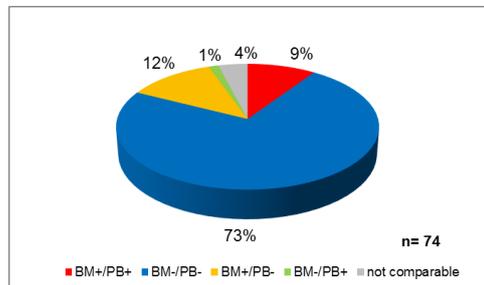
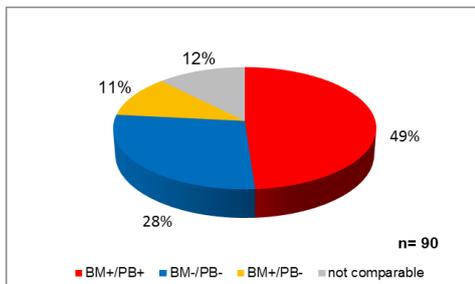


Figura 17. Confronto tra la valutazione nei due tessuti (BM e PB) del marcatore IGH (a) e BCL1 (b) al timepoint post ASCT

a.



b.

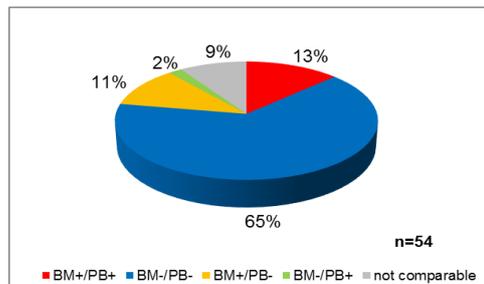


Figura 18. Confronto tra la valutazione nei due tessuti (BM e PB) del marcatore IGH (a) e BCL1 (b) al timepoint M1

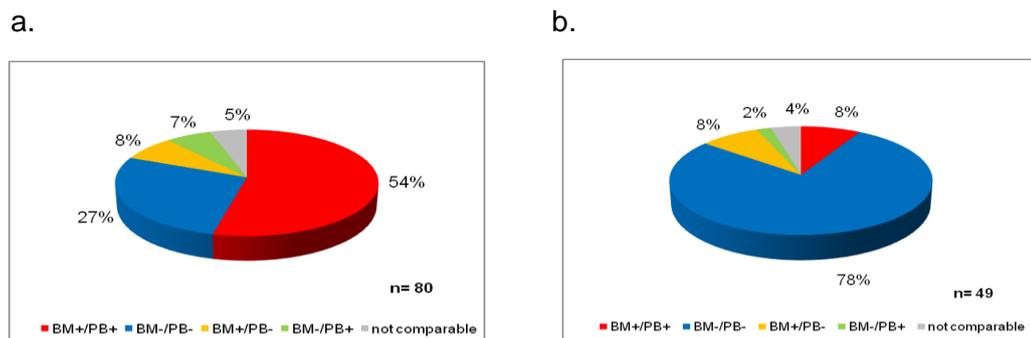


Figura 19. Confronto tra la valutazione nei due tessuti (BM e PB) del marcatore IGH (a) e BCL1 (b) al timepoint M2

Analisi discordanze fra marcatori nell'analisi MRD: IGH vs BCL1

L'analisi della MRD al timepoint post R-CHOP sul BM di 52 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 45 (86%) casi i due marcatori concordano: in particolare 35 (67%) sono doppiamente positivi e 10 (19%) doppiamente negativi. 4 (8%) pazienti sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) si verifica in 2 (4%) pazienti. Un caso (2%) non è confrontabile perché in corso di analisi durante la stesura di questo lavoro. La stessa analisi condotta sul PB di 51 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 41 (80%) casi i due marcatori concordano: in particolare 22 (43%) sono doppiamente positivi e 19 (37%) doppiamente negativi. 8 pazienti (16%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) si verifica solo in 1 paziente (2%). 1 paziente (2%) non è confrontabile perché in corso di analisi durante la stesura di questo lavoro (Figura 20).

L'analisi della MRD sulle LK1 di 45 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e Bcl1, fa vedere che in 42 casi (93%) i due marcatori concordano: in particolare 7 (15%) sono doppiamente positivi e 35 (78%) doppiamente negativi. 3 pazienti (7%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) non si verifica.

L'analisi della MRD sulle LK2 di 10 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 6 casi (60%) i due marcatori concordano: in particolare 3 (30%) sono doppiamente positivi e 3 (30%) doppiamente negativi. 3 pazienti (30%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/ BCL1+) si verifica in un solo paziente (10%) (Figura 21).

L'analisi della MRD al timepoint post Ara-C sul BM di 42 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 30 casi (71%) i due marcatori concordano: in particolare 6 (14%) sono doppiamente positivi e 24 (57%) doppiamente negativi. 11 pazienti (26%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/ BCL1+) si verifica in un solo paziente (2%). La stessa analisi condotta sul PB di 41 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 35 casi (85%) i due marcatori concordano: in particolare 2 (5%) sono doppiamente positivi e 33 (80%) doppiamente negativi. 4 pazienti (10%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) si verifica in 2 pazienti (5%) (*Figura 22*).

L'analisi della MRD al timepoint post ASCT sul BM di 44 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 29 (66%) casi i due marcatori concordano: in particolare 11 (25%) sono doppiamente positivi e 18 (41%) doppiamente negativi. 13 (30%) pazienti sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) si verifica in 2 pazienti (5%). La stessa analisi condotta sul PB di 42 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 35 casi (84%) i due marcatori concordano: in particolare 7 (17%) sono doppiamente positivi e 28 (67%) doppiamente negativi. 6 pazienti (14%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) si verifica in un paziente (2%) (*Figura 23*).

L'analisi della MRD al timepoint M1 sul BM di 28 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 13 casi (47%) i due marcatori concordano: in particolare 5 (18%) sono doppiamente positivi e 8 (29%) doppiamente negativi. 13 pazienti (46%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) si verifica in 1 caso (3%). 1 caso (3%) non è confrontabile perché in corso di analisi durante la stesura di questo lavoro. La stessa analisi condotta sul PB di 28 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 14 casi (50%) i due marcatori concordano: in particolare 3 (11%) sono doppiamente positivi e 11 (39%) doppiamente negativi. 12 pazienti (43%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) non si verifica. 2 pazienti (7%) non sono confrontabili perché in corso di analisi durante la stesura di questo lavoro (*Figura 24*).

L'analisi della MRD al timepoint M2 sul BM di 26 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 16 casi (61%) i due marcatori concordano: in particolare 6 (23%) sono doppiamente positivi e 10 (38%)

doppiamente negativi. 8 pazienti (31%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) non si verifica. I non confrontabili perché in corso di analisi durante la stesura di questo lavoro sono 2 (8%). La stessa analisi condotta sul PB di 25 pazienti che presentavano entrambi i marcatori IGH e BCL1, fa vedere che in 13 casi (55%) i due marcatori concordano: in particolare 4 (16%) sono doppiamente positivi e 9 (36%) doppiamente negativi. 9 pazienti (36%) sono invece positivi per IGH e negativi per BCL1 mentre il contrario (IGH-/BCL1+) si verifica in un solo paziente (4%). 2 pazienti (8%) non sono confrontabili perché in corso di analisi durante la stesura di questo lavoro. (Figura 25).

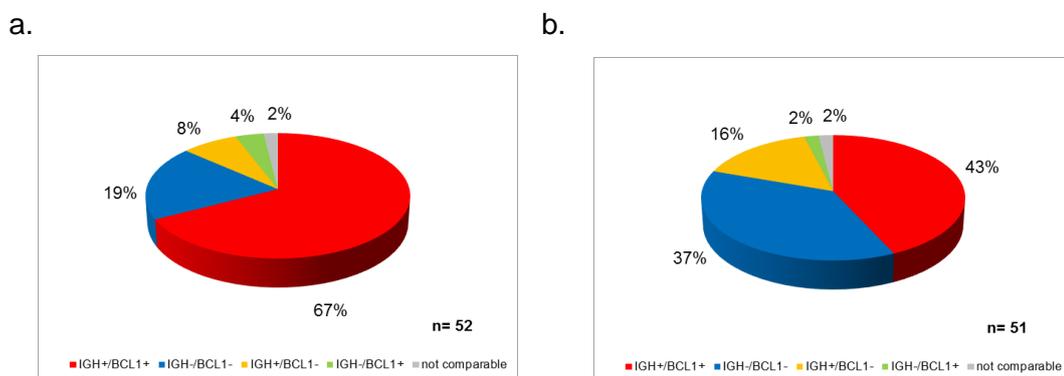


Figura 20. Confronto tra la valutazione dei due marcatori (IGH e BCL1) nel BM (a) e nel PB (b) al timepoint post R-CHOP

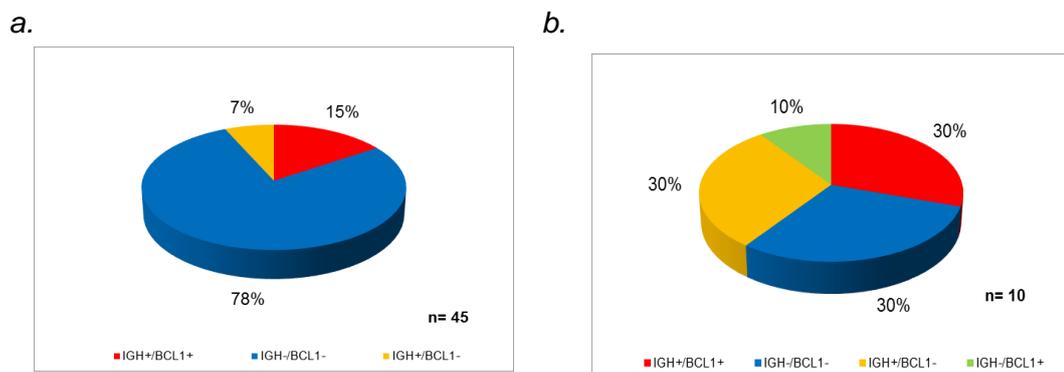


Figura 21. Confronto tra la valutazione dei due marcatori (IGH e BCL1) alla prima (a) e alla LK2 (b)

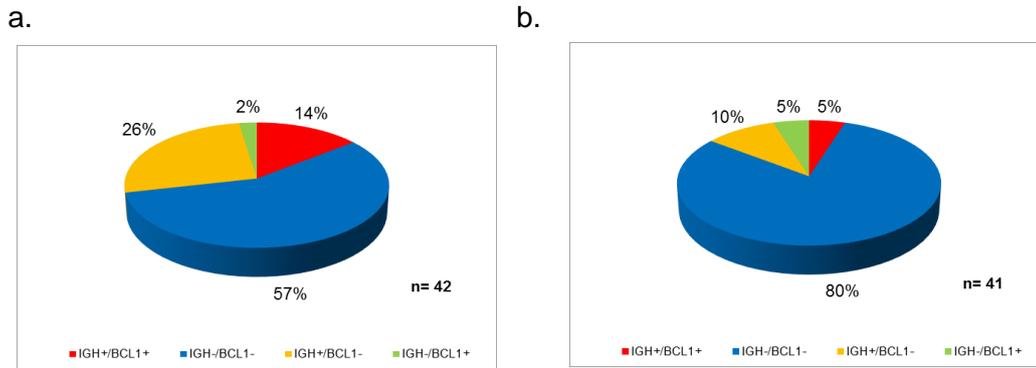


Figura 22. Confronto tra la valutazione dei due marcatori (IGH e BCL1) nel BM (a) e nel PB (b) al timepoint post Ara-C

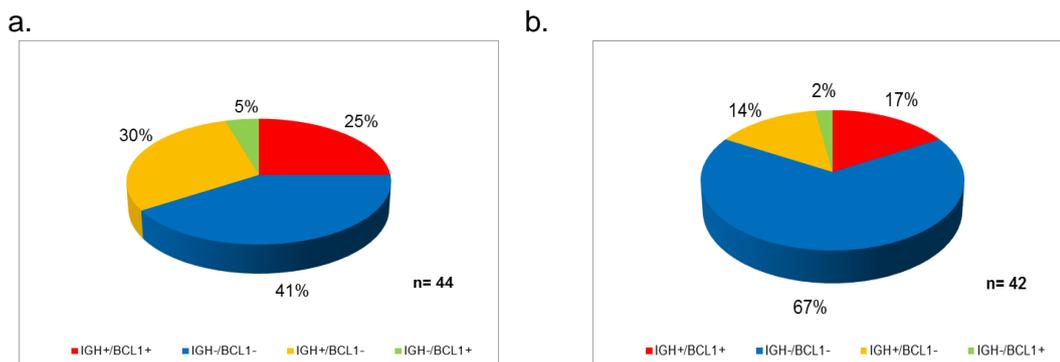


Figura 23. Confronto tra la valutazione dei due marcatori (IGH e BCL1) nel BM (a) e nel PB (b) al timepoint post ASCT

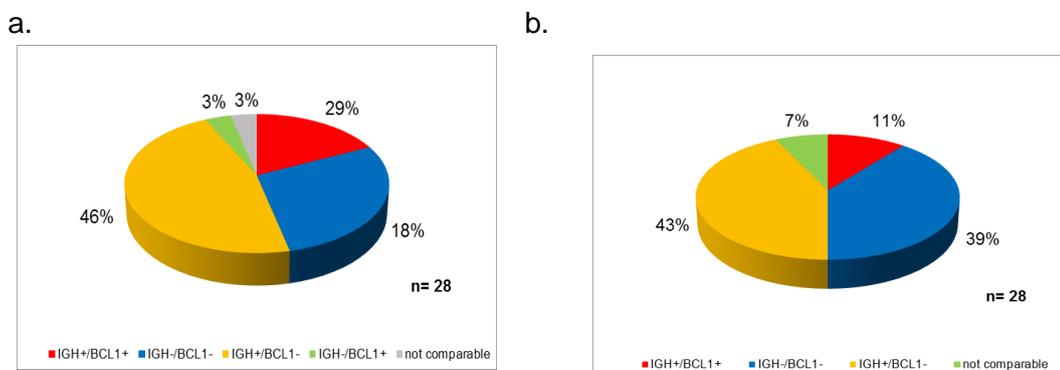
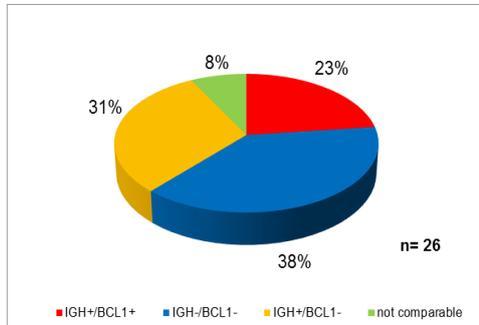


Figura 24. Confronto tra la valutazione dei due marcatori (IGH e BCL1) nel BM (a) e nel PB (b) al timepoint M1

a.



b.

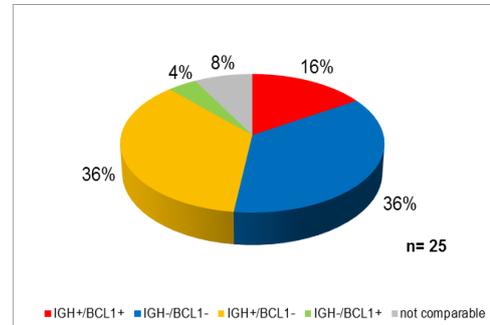


Figura 25. Confronto tra la valutazione dei due marcatori (IGH e BCL1) nel BM (a) e nel PB (b) al timepoint M2

Impatto clinico della valutazione MRD in Nested PCR

Per meglio descrivere la popolazione seguita nello studio MRD, abbiamo valutato l'andamento dei pazienti con marcatore molecolare (248) rispetto a quello dei pazienti senza marcatore molecolare (50); 2 pazienti con marcatore non sono inclusi nell'analisi per uscita dallo studio nelle fasi immediatamente successive all'arruolamento. Il TTP è più corto nel gruppo di pazienti con marcatore (mediana 58 mesi, TTP stimato a 36 mesi 67%) rispetto al gruppo di pazienti senza marcatore (mediana non raggiunta, TTP stimato a 36 mesi 82%). La differenza osservata tra le due popolazioni è statisticamente significativa ($p=0.0135$) (Figura 26).

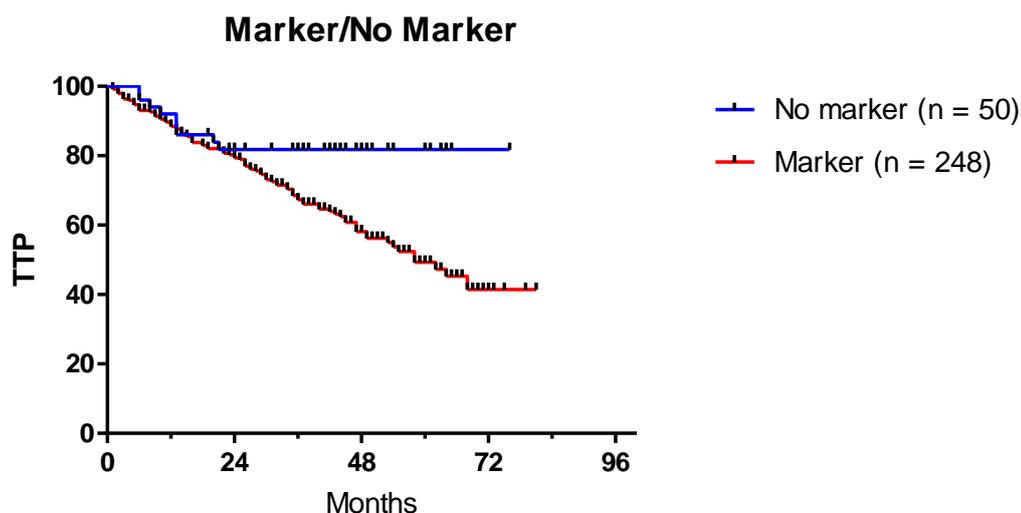


Figura 26. Curva di sopravvivenza: TTP dei pazienti con e senza marcatore molecolare, a partire dall'arruolamento

L'analisi della MRD in Nested PCR ai diversi timepoint ha permesso di suddividere i pazienti in MRD+ e MRD-. Correlando i dati molecolari ai dati clinici di outcome abbiamo confrontato il TTP delle diverse popolazioni mediante curve di Kaplan-Mayer, che vengono di seguito riportate.

Nel timepoint post R-CHOP si osserva un trend non significativo verso un migliore TTP per i pazienti MRD- sia su BM (TTP a 36 mesi: 64% vs 76%, TTP mediano: 52 mesi vs non raggiunto, $p=0.09$) che su PB (TTP a 36 mesi: 63% vs 73%, TTP mediano: 52 mesi vs non raggiunto, $p=0.09$) (Figura 27).

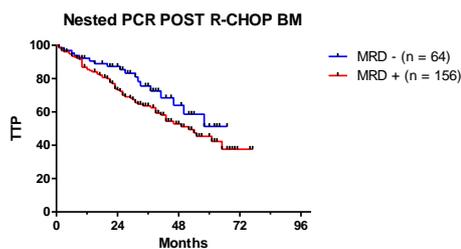
Nessuna significativa differenza nel TTP si osserva al timepoint post Ara-C in accordo alla MRD sia sul BM (TTP a 36 mesi: 63% vs 72,5%, TTP mediano: 50 mesi vs 57 mesi, $p=0.11$) che sul PB (TTP a 36 mesi: 63% vs 69,5%, TTP mediano: 50 mesi vs 57 mesi, $p=0,7$) (Figura 28).

Un miglioramento del TTP statisticamente significativo si osserva invece al timepoint post ASCT, sia su BM (TTP a 36 mesi: 55% vs 76%, TTP mediano: 45 mesi vs 57 mesi, $p=0.0169$) che su PB (TTP a 36 mesi: 51.7% vs 70.7%, TTP mediano: non raggiunto vs 57 mesi, $p=0.058$ borderline).

Inoltre, i pazienti autotrapiantati con LK1 negativa presentano un trend non statisticamente significativo rispetto a quelli che presentavano la LK1 MRD+ (TTP a 36 mesi: 64% vs 70%, TTP mediano: 51 mesi vs 59 mesi, $p=0.4$) (Figura 30).

Al timepoint M1 (senza stratificazione dei pazienti in base al braccio di randomizzazione, ancora blinded al momento delle analisi) si rileva un trend non significativo di migliore TTP per i pazienti MRD -, sia sul BM (TTP a 36 mesi: 58% vs 79%, TTP mediano: non raggiunto vs 43 mesi, $p=0.07$) che sul PB (TTP a 36 mesi: 53% vs 74%, TTP mediano: non raggiunto vs 43 mesi, $p=0.07$) (Figura 31). Anche al timepoint M2 non si osserva un migliore TTP per i pazienti MRD- sul BM (TTP a 36 mesi: 53% vs 71%, TTP mediano: non raggiunto vs 44 mesi, $p=0.62$), e sul PB (TTP a 36 mesi: 55% vs 66%, TTP mediano: 41 mesi vs 44 mesi $p=0.57$) (Figura 32). E' comunque necessario considerare che i dati relativi ai timepoint più tardivi sono influenzati dal basso numero di eventi registrati, dovuto al follow-up ancora immaturo.

a.



b.

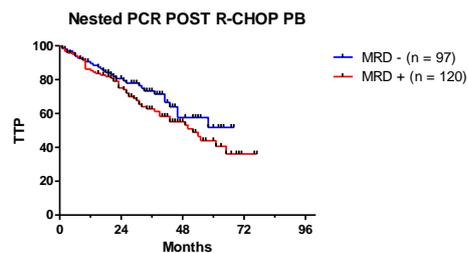
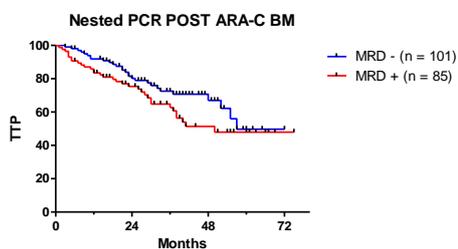


Figura 27. Curve di TTP dei pazienti MRD +/- al timepoint post R-CHOP: (a) analisi effettuata sul BM (64 MRD-, 156 MRD+, $p= 0.09$); (b) analisi effettuata sul PB (97 MRD-, 120 MRD+, $p= 0.09$)

a.



b.

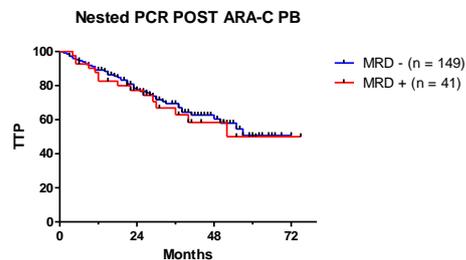
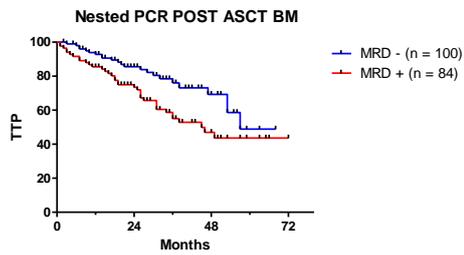


Figura 28. Curve di TTP dei pazienti MRD +/- al timepoint post Ara-C: (a) analisi effettuata sul BM (101 MRD-, 85 MRD+, $p= 0.11$); (b) analisi effettuata sul PB (149 MRD-, 41 MRD+, $p= 0.7$)

a.



b.

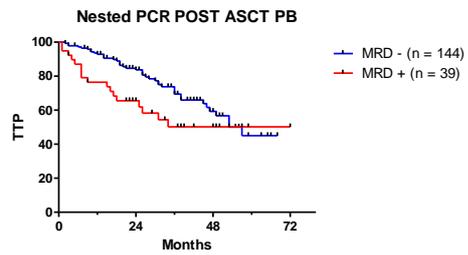


Figura 29. Curve di TTP dei pazienti MRD +/- al timepoint post ASCT: (a) analisi effettuata sul BM (100 MRD-, 84 MRD+, $p=0.0169$); (b) analisi effettuata sul PB (144 MRD-, 39 MRD+, $p=0.058$)

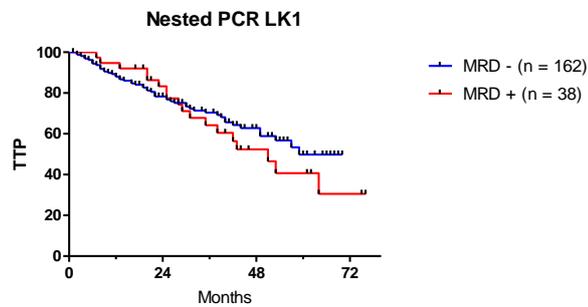
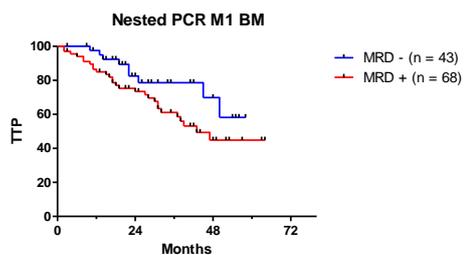


Figura 30. Curve di TTP dei pazienti MRD +/- alla LK1 (162 MRD, 38 MRD+, $p=0.4$)

a.



b.

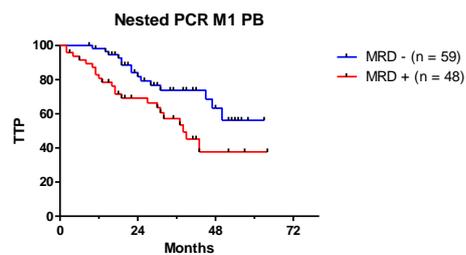
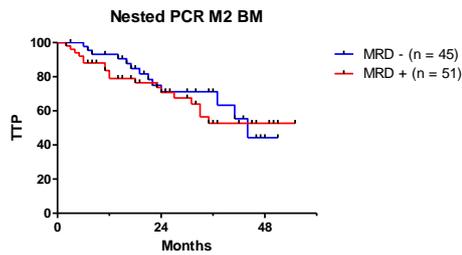


Figura 31. Curve di TTP dei pazienti MRD +/- al timepoint M1: (a) analisi effettuata sul BM (43 MRD-, 68 MRD+, $p=0.077$); (b) analisi effettuata sul PB (59 MRD-, 48 MRD+, $p=0.077$)

a.



b.

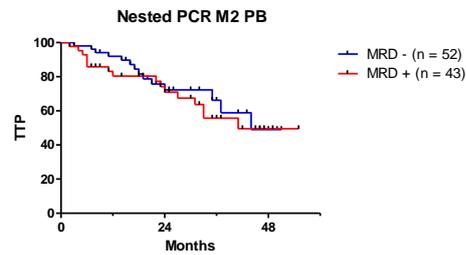


Figura 32. Curve di TTP dei pazienti MRD +/- al timepoint M2: (a) analisi effettuata sul BM (45 MRD-, 51 MRD+, p= 0.62); (b) analisi effettuata sul PB (52 MRD-, 43 MRD+, p= 0.57)

Analisi della MRD in PCR quantitativa (RQ-PCR)

L'analisi quantitativa della MRD è stata effettuata in totale su 183 pazienti: 167 di questi sono stati analizzati in RQ-PCR; per 16 casi, a causa della bassa infiltrazione tumorale del tessuto diagnostico e/o impossibilità tecnica di costruire un'adeguata curva standard, non è stato possibile eseguire una RQ-PCR con sensibilità adeguata ($\geq 10E-4$), per cui sono stati analizzati in dd-PCR.

Il tasso di negativizzazione molecolare post R-CHOP è risultato del 36% su BM (59/165) e del 47% su PB (74/157), post Ara-C del 69% su BM (97/141) e del 82% su PB (121/146), post ASCT del 79% su BM (111/140) e del 86% su PB (116/136), M1 del 67% su BM (44/66) e del 73% su PB (49/67), M2 del 56% su BM (27/48) e del 70% su PB (35/50).

Per quanto riguarda la LK1, sono stati analizzati 149 campioni; di questi, 113/149 (76%) sono risultati negativi e 36 positivi. Dei 36 pazienti con LK1 positiva, sono stati analizzati 26 campioni della LK2, di cui 12 sono risultati negativi (46%) (Figura 33).

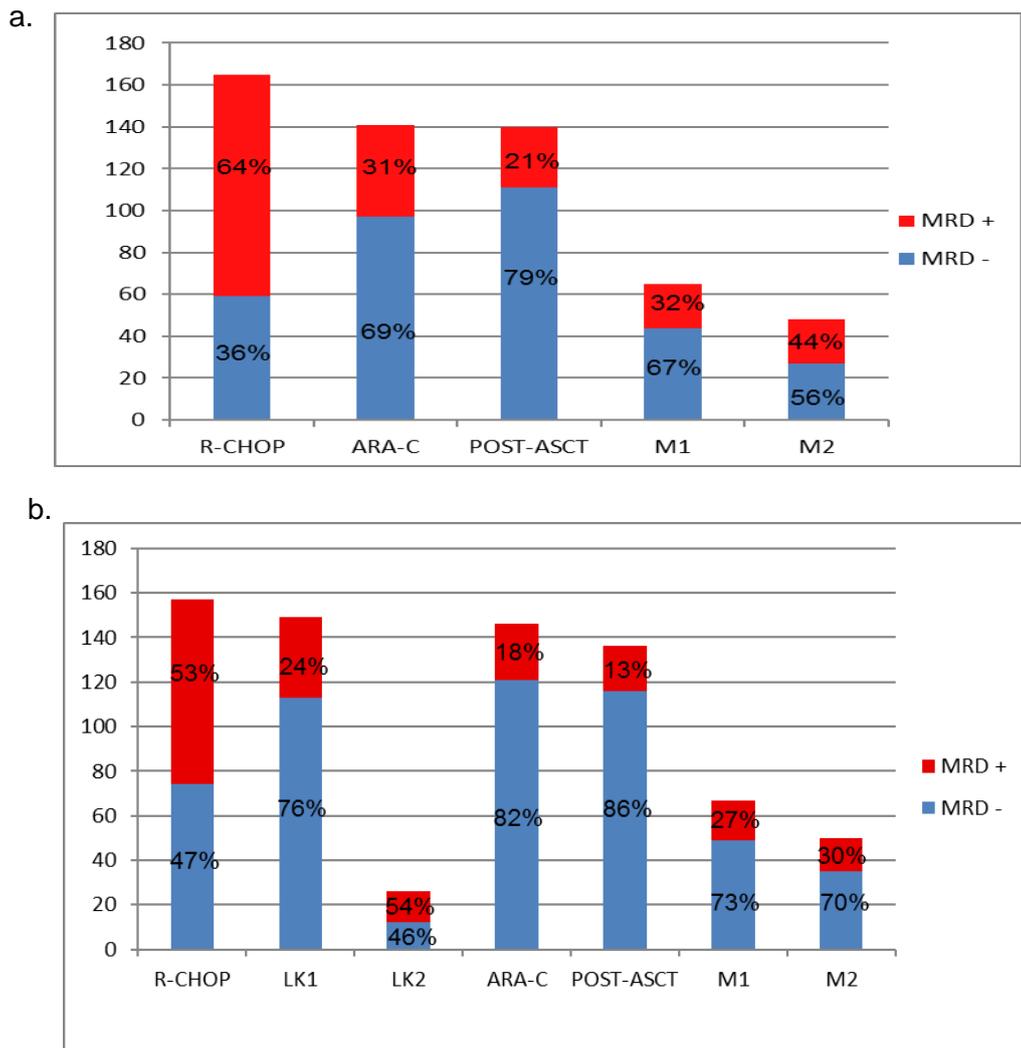


Figura 33. Istogrammi rappresentanti i tassi di negativizzazione sul BM (a) e sul PB e le due LK (b)

Analisi delle discordanze fra metodiche nell'analisi MRD: Nested PCR vs RQ-PCR

L'analisi della MRD al timepoint post R-CHOP sul BM fa vedere che su 164 pazienti analizzati con entrambe le metodiche, 129 casi (79%) concordano per il risultato: 98 (60%) sono concordanti positivi e 31 (19%) concordanti negativi. 28 pazienti (17%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 7 casi (5%), di cui 6 (4%) PNQ. La stessa analisi condotta sul PB di 156 pazienti fa vedere che 112 (72%) pazienti concordano per il risultato fra le due tecniche: 68 (44%) sono concordanti positivi e 44 (28%) concordanti negativi. 31 pazienti (20%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR, mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 13 casi (8%), di cui 11 PNQ (7%) (*Figura 34*).

L'analisi della MRD sulle LK1 fa vedere che su 146 pazienti analizzati in entrambe le metodiche, 114 casi (78%) concordano per il risultato: 17 (12%) sono concordanti positivi e 97 (66%) concordanti negativi. 14 pazienti (10%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 18 casi (12%), di cui 16 PNQ (11%).

L'analisi della MRD sulle LK2 fa vedere che su 27 pazienti analizzati in entrambe le metodiche, 17 casi (63%) concordano per il risultato: 8 (30%) sono concordanti positivi e 9 (30%) concordanti negativi. 4 pazienti (15%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 6 casi (22%), tutti PNQ (*Figura 35*).

L'analisi della MRD al timepoint post Ara-C sul BM fa vedere che su 142 pazienti analizzati in entrambe le metodiche, 91 casi (64%) concordano per il risultato: 33 (23%) sono concordanti positivi e 58 (41%) concordanti negativi. 41 pazienti (29%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 10 casi (7%), di cui 7 PNQ (5%). La stessa analisi condotta sul PB di 143 pazienti fa vedere che 104 (72%) pazienti concordano per il risultato fra le due tecniche: 12 (8%) sono concordanti positivi e 92 (64%) concordanti negativi. 25 pazienti (17%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR, mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 14 casi (10%), di cui 13 PNQ (9%) (*Figura 36*).

L'analisi della MRD al timepoint post ASCT sul BM fa vedere che su 140 pazienti analizzati in entrambe le metodiche, 78 casi (56%) concordano per il risultato: 21 (15%) sono concordanti positivi e 57 (41%) concordanti negativi. 54 pazienti (39%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR mentre il contrario (Nested-

/RQ+) avviene in 8 casi (6%), di cui 5 PNQ (4%). La stessa analisi condotta sul PB di 141 pazienti fa vedere che 106 (75%) pazienti concordano per il risultato fra le due tecniche: 11 (8%) sono concordanti positivi e 95 (67%) concordanti negativi. 25 pazienti (18%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR, mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 10 casi (7%), di cui 9 PNQ (6%) (*Figura 37*).

L'analisi della MRD al timepoint M1 sul BM fa vedere che su 63 pazienti analizzati in entrambe le metodiche, 40 casi (63%) concordano per il risultato: 21 (33%) sono concordanti positivi e 19 (30%) concordanti negativi. 22 pazienti (35%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in un solo caso (2%), che è PNQ. La stessa analisi condotta sul PB di 64 pazienti fa vedere che 37 (58%) pazienti concordano per il risultato fra le due tecniche: 12 (19%) sono concordanti positivi e 25 (39%) concordanti negativi. 21 pazienti (33%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR, mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 5 casi (8%), di cui 4 PNQ (6%) (*Figura 38*).

L'analisi della MRD al timepoint M2 sul BM fa vedere che su 47 pazienti analizzati in entrambe le metodiche, 29 casi (62%) concordano per il risultato: 15 (32%) sono concordanti positivi e 14 (30%) concordanti negativi. 13 pazienti (28%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 5 casi (10%), di cui 2 PNQ (4%). La stessa analisi condotta sul PB di 46 pazienti fa vedere che 31 (68%) pazienti concordano per il risultato fra le due tecniche: 21 (46%) sono concordanti positivi e 10 (22%) concordanti negativi. 13 pazienti (28%) sono invece positivi in Nested e negativi in RQ-PCR, mentre il contrario (Nested-/RQ+) avviene in 2 casi (4%), di cui 1 PNQ (2%) (*Figura 39*).

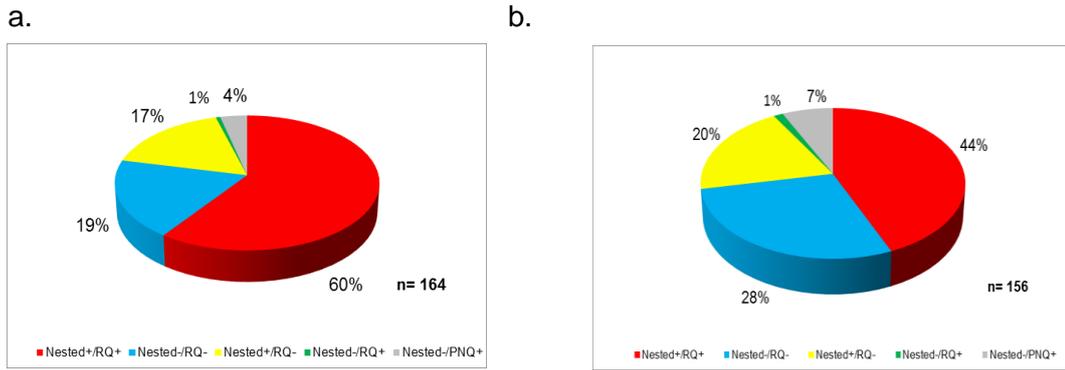


Figura 34. Confronto tra Nested-PCR e RQ-PCR sul BM (a) e sul PB (b) al timepoint post R-CHOP.

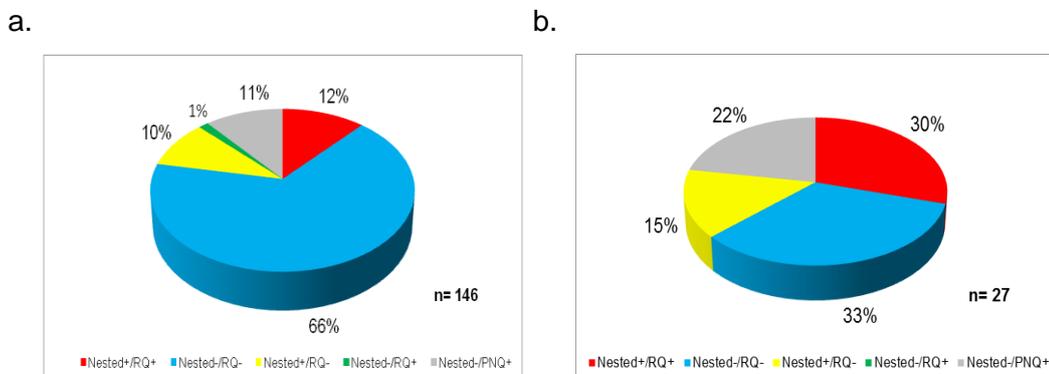


Figura 35. Confronto tra Nested-PCR e RQ-PCR sulla prima (a) e sulla seconda LK (b)

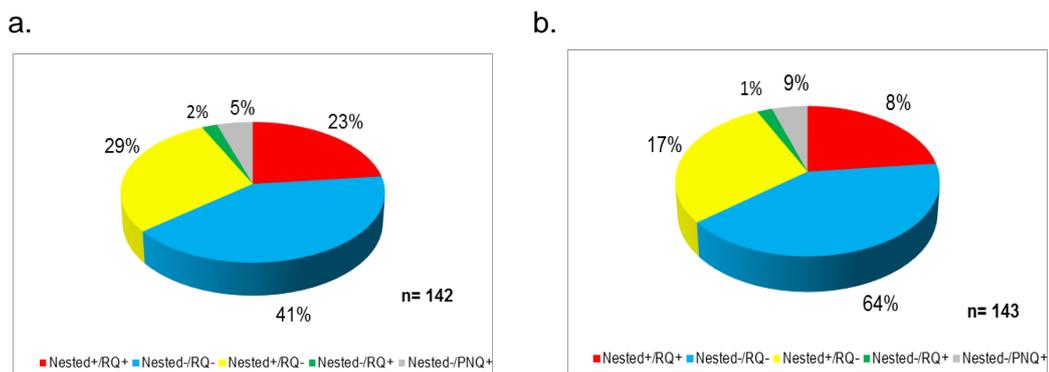


Figura 36. Confronto tra Nested-PCR e RQ-PCR sul BM (a) e sul PB (b) al timepoint post Ara-C

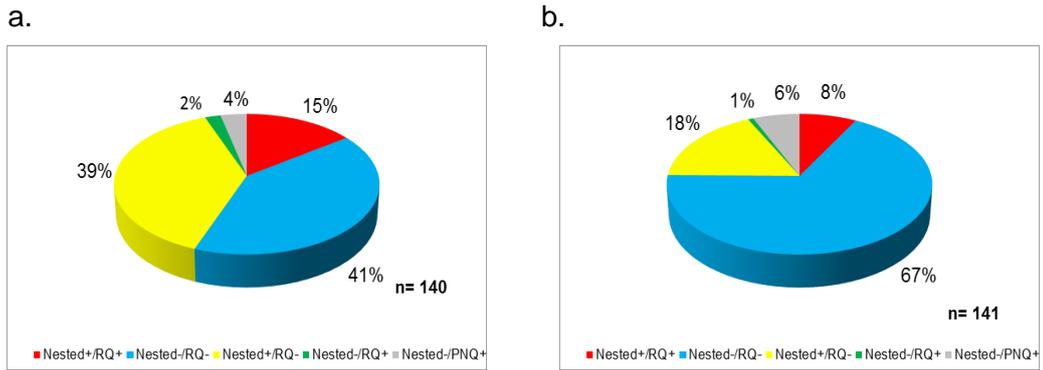


Figura 37. Confronto tra Nested-PCR e RQ-PCR sul BM (a) e sul PB (b) al timepoint post ASCT

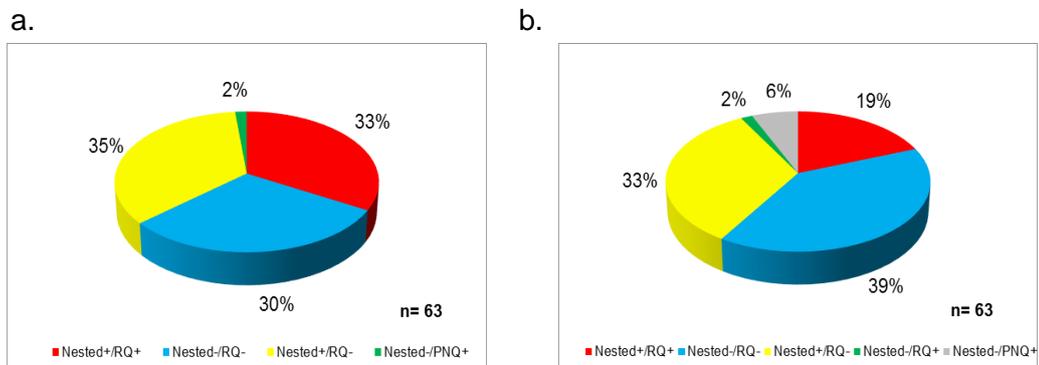


Figura 38. Confronto tra Nested-PCR e RQ-PCR sul BM (a) e sul PB (b) al timepoint M1

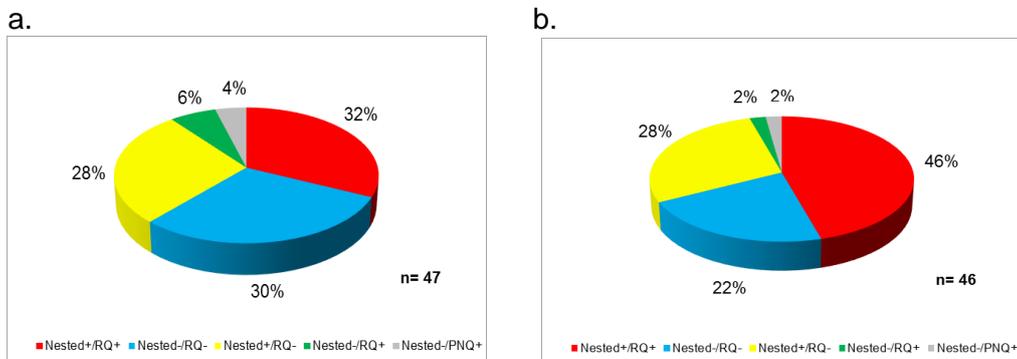


Figura 39. Confronto tra Nested-PCR e RQ-PCR sul BM (a) e sul PB (b) al timepoint M2

Correlazione quantitativa dei valori MRD nei due tessuti BM e PB

Abbiamo correlato i valori quantitativi di MRD su BM e PB ottenuti nello stesso paziente al medesimo timepoint. È stato possibile analizzare in totale 746 coppie di campioni (BM + PB), comprendenti sia campioni relativi alla diagnosi che ai diversi punti di follow-up. Dall'analisi emerge come vi sia globalmente una buona correlazione tra il dato ottenuto su BM e quello su PB (indice di correlazione di Pearson $r^2=0,64$).

Dall'analisi di tutti i campioni si nota una buona concordanza sui due tessuti (597/746, 80%): in particolare, 214 pazienti (29%) sono concordanti positivi quantificabili, 58 concordanti PNQ (7.8%) e 325 concordanti negativi (44%). Le discordanze "maggiori" BM+/PB- sono 85 (11%), in particolare 28 (3%) casi con BM positivo quantificabile e 57 (8%) con BM PNQ. Il contrario (BM-/PB+) si verifica in 24 casi (3%), di cui 3 con PB positivo quantificabile e 21 PNQ. Per quanto riguarda le discordanze "minori" (PNQ vs positivi quantificabili), si vede che 32 casi quantificabili su BM risultano PNQ su PB, mentre il contrario (BM PNQ/PB +) avviene in 8 casi.

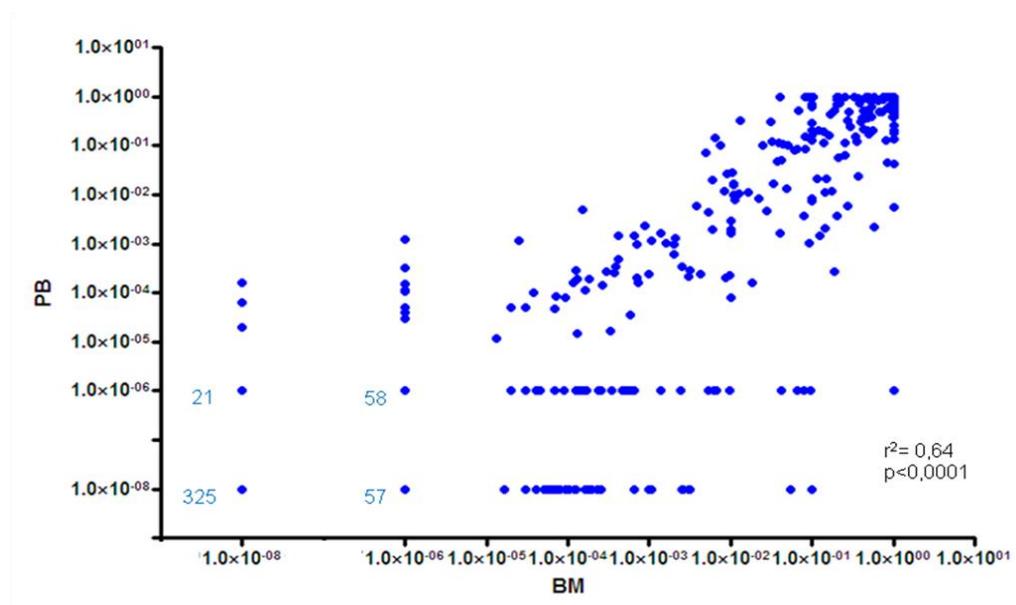


Figura 40. Correlazione tra i campioni di BM e di PB analizzati in RQ-PCR

Impatto clinico della valutazione MRD in RQ-PCR

L'analisi della MRD in RQ-PCR ai diversi timepoint ha permesso di suddividere i pazienti in MRD+, MRD PNQ e MRD-⁷⁴. Correlando i dati molecolari ai dati clinici di outcome abbiamo creato delle curve di TTP delle diverse popolazioni, che vengono di seguito riportate.

Abbiamo deciso per il timepoint post R-CHOP di aggregare i pazienti MRD- con i PNQ, cioè i pazienti a bassa carica di malattia, in quanto le due popolazioni presentavano un andamento simile. In questo timepoint l'analisi MRD in RQ-PCR evidenzia un TTP significativamente migliore per i pazienti MRD-/PNQ sul BM (TTP a 36 mesi: 54% vs 71%, TTP mediano: 43 mesi vs 58 mesi, $p=0.0174$), ma

non ancora significativo sul PB (TTP a 36 mesi: 51% vs 69%, TTP mediano: 43 mesi vs 54 mesi, $p=0.075$) (Figura 41).

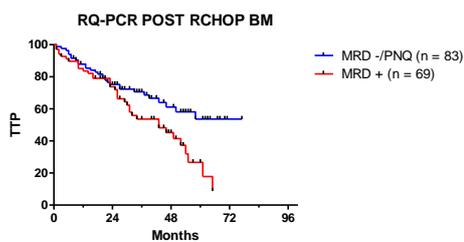
Nei timepoint successivi al post R-CHOP i pazienti PNQ sono invece stati aggregati con gli MRD+ in quanto presentavano un andamento più simile a questi ultimi rispetto ai casi MRD-. Nel timepoint post Ara-C non si osserva un TTP statisticamente migliore per i pazienti MRD- sul BM rispetto a quelli MRD+/PNQ (TTP a 36 mesi: 53% vs 70%, TTP mediano: 41 mesi vs 57 mesi, $p=0.17$) (Figura 42).

Un miglioramento statisticamente significativo del TTP si osserva invece al timepoint post ASCT, ma solamente sul BM (TTP a 36 mesi: 41% vs 70%, TTP mediano: 26 mesi vs 53 mesi, $p=0.0065$) (Figura 43).

Similmente, anche al timepoint M1 si osserva un TTP significativamente migliore sul BM (TTP a 36 mesi: 20% vs 64%, TTP mediano: 19 mesi vs 50 mesi, $p=0.03$), e non sul PB (TTP a 36 mesi: 16% vs 83%, TTP mediano: non raggiunto vs 43 mesi, $p=0.5$) (Figura 44).

L'analisi MRD al timepoint M2 rivela invece un TTP significativamente migliore per i pazienti MRD- sia sul BM (TTP a 36 mesi: 19.7% vs 93.3%, PFS mediano: 12 mesi vs non raggiunto, $p<0.0001$), che sul PB (TTP a 36 mesi: 12,5% vs 60,5%, TTP mediano: 11,5 mesi vs 41 mesi, $p=0.0025$) (Figura 45).

a.



b.

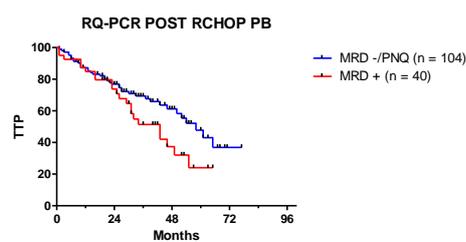
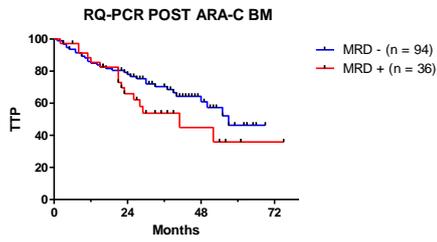


Figura 41. Curve di TTP dei pazienti MRD+ vs MRD-/PNQ al timepoint post R-CHOP: (a) analisi effettuata sul BM (83 MRD-/PNQ, 69 MRD+, $p=0.0174$); (b) analisi effettuata sul PB (104 MRD-/PNQ, 40 MRD+, $p=0.075$)

a.



b.

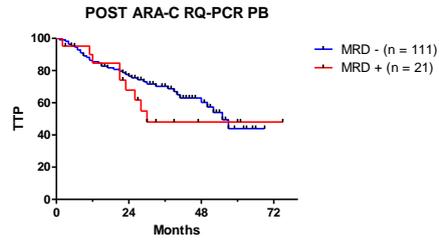
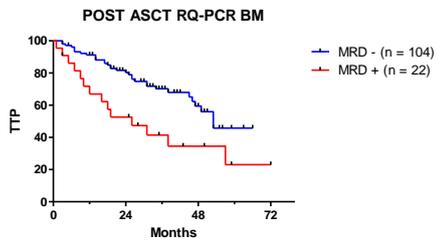


Figura 42. Curve di TTP dei pazienti MRD+/PNQ vs MRD- al timepoint post Ara-C: (a) analisi effettuata sul BM (94 MRD-, 36 MRD+/PNQ, $p=0.17$); (b) analisi effettuata sul PB (111 MRD-, 21 MRD+/PNQ, $p=0.41$)

a.



b.

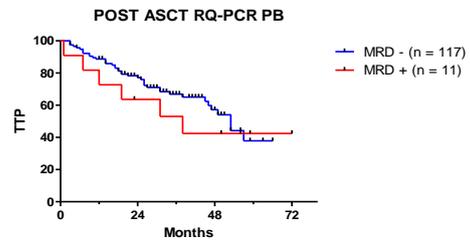
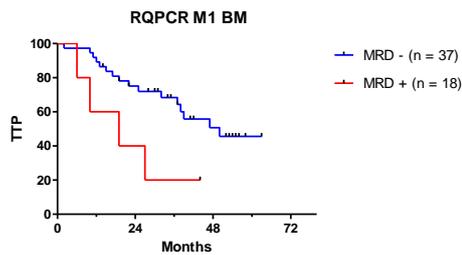


Figura 43. Curve di TTP dei pazienti MRD+/PNQ vs MRD- al timepoint post ASCT: (a) analisi effettuata sul BM (104 MRD-, 22 MRD+/PNQ, $p=0.0065$); (b) analisi effettuata sul PB (117 MRD-, 11 MRD+/PNQ, $p=0.5$)

a.



b.

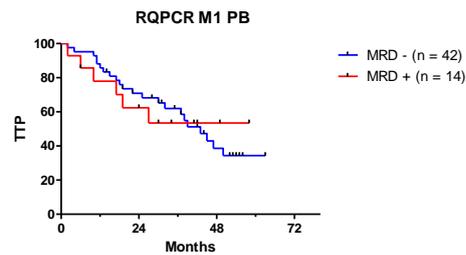
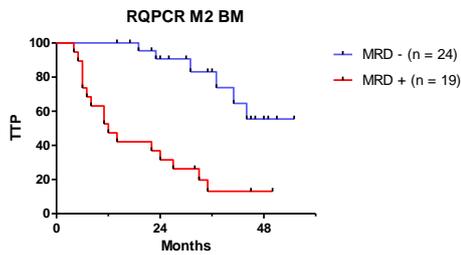


Figura 44. Curve di TTP dei pazienti MRD+/PNQ vs MRD- al timepoint M1: (a) analisi effettuata sul BM (37 MRD-, 18 MRD+/PNQ, $p=0.03$); (b) analisi effettuata sul PB (42 MRD-, 14 MRD+/PNQ, $p=0.9$)

a.



b.

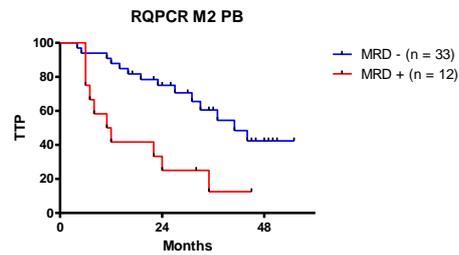


Figura 45. Curve di TTP dei pazienti MRD+/PNQ vs MRD- al timepoint M2: (a) analisi effettuata sul BM (24 MRD-, 19 MRD+/PNQ, $p < 0.0001$); (b) analisi effettuata sul PB (33 MRD-, 12 MRD+/PNQ, $p = 0.0025$)

Valutazione cinetica della MRD

Abbiamo seguito la cinetica della MRD di tutti i pazienti di cui era nota l'analisi molecolare dei differenti timepoints.

Al fine di valutare le eventuali differenze tra l'analisi di MRD ad un solo timepoint e quella comprendente timepoint multipli, l'analisi della cinetica è stata condotta secondo due differenti criteri: 1) andamento temporale della MRD e 2) accumulo di MRD positività in differenti blocchi terapeutici.

Cinetica della MRD in base al suo andamento temporale

I pazienti sono stati classificati nel modo seguente:

- "Persistentemente positivi" se mantenevano la positività a tutti i timepoint analizzati;
- "Persistentemente negativi" se, dopo una positività iniziale, raggiungevano la MRD-negatività e la mantenevano per almeno due timepoint consecutivi senza ulteriore ripositivizzazione;
- "Ripositivizzati" se, dopo la positività iniziale, raggiungevano la negatività senza però mantenerla, per cui successivamente andavano incontro a una ripositivizzazione.

Una quota di pazienti è risultata inclassificabile: si tratta dei casi che, dopo la positività iniziale, raggiungevano la negatività in un certo timepoint, ma non si aveva la disponibilità dei campioni relativi ai timepoint successivi per permetterne la classificazione.

Correlando questa classificazione ai dati di outcome clinico, abbiamo creato delle curve di sopravvivenza, riportate di seguito, per confrontare l'andamento dei pazienti inclusi nelle diverse categorie.

Per quanto riguarda l'analisi MRD in Nested-PCR, dei 250 pazienti con marcatore molecolare, quelli che possedevano un follow-up molecolare idoneo per lo studio della cinetica erano 200 casi sul BM e 203 casi sul PB. Di questi, i persistentemente positivi sono 63 sul BM e 30 sul PB, i persistentemente negativi sono 55 sul BM e 84 sul PB, i ripositivizzati sono 82 sul BM e 89 sul PB.

Lo studio della cinetica sul BM permette l'identificazione di tre gruppi di rischio, in quanto le tre categorie si differenziano sia in termini di TTP a 36 mesi (55,4% vs 72,3% vs 87%) che di TTP mediano (34 mesi vs 58 mesi vs non raggiunto) in maniera statisticamente significativa (persistentemente negativi vs ripositivizzati: $p < 0.0001$; ripositivizzati vs persistentemente positivi: $p = 0.03$) (Figura 46). Sul PB, invece, l'analisi in Nested-PCR riesce ad identificare solamente due gruppi di rischio, in quanto l'andamento dei pazienti ripositivizzati è simile a quello dei pazienti persistentemente negativi (TTP a 36 mesi: 49,9% vs 69% vs 72%, TTP mediano: 29 mesi vs 58 mesi vs 61 mesi; persistentemente negativi vs ripositivizzanti: $p = 0.03$; ripositivizzanti vs persistentemente positivi: $p = 0.07$) (Figura 47).

Per quanto riguarda l'analisi MRD in PCR quantitativa, dei 250 pazienti con marcatore molecolare, quelli che possedevano un follow-up molecolare idoneo per lo studio della la cinetica erano 152 casi sul BM e 156 casi sul PB. Di questi, i persistentemente positivi sono 34 sul BM e 20 sul PB, i persistentemente negativi sono 78 sul BM e 99 sul PB, i ripositivizzanti sono 40 sul BM e 37 sul PB.

Lo studio della cinetica sul BM permette l'identificazione di due soli gruppi di rischio, in quanto l'andamento dei pazienti ripositivizzati è simile a quello dei pazienti persistentemente positivi (TTP a 36 mesi: 45% vs 50% vs 79%, TTP mediano: 29 mesi vs 41 mesi vs non raggiunto; persistentemente negativi vs ripositivizzati: $p = 0.0014$; ripositivizzati vs persistentemente positivi: $p = 0.54$) (Figura 48). Sul PB, l'analisi in RQ-PCR permette l'identificazione di due soli gruppi di rischio, in quanto l'andamento dei pazienti ripositivizzati è simile a quello dei pazienti persistentemente positivi (TTP a 36 mesi: 45,5% vs 55% vs 76%, TTP mediano: 29 mesi vs 41 mesi vs 61 mesi; persistentemente negativi vs ripositivizzati: $p = 0.05$; ripositivizzati vs persistentemente positivi: $p = 0.45$) (Figura 49).

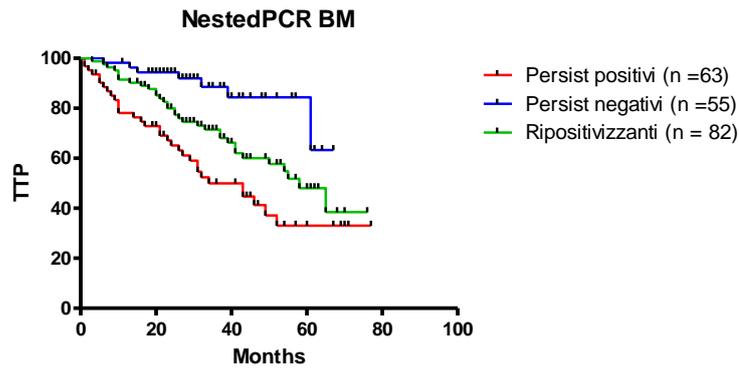


Figura 46. Cinetica MRD in base all'andamento temporale, analizzata in Nested PCR sul BM (persistentemente negativi vs ripositivizzanti: $p < 0,0001$; ripositivizzanti vs persistentemente positivi: $p = 0.03$).

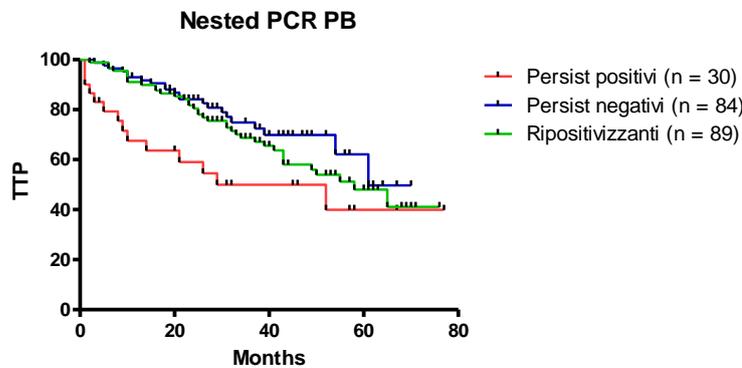


Figura 47. Cinetica MRD in base all'andamento temporale, analizzata in Nested PCR sul PB (persistentemente negativi vs ripositivizzanti: $p = 0.03$; ripositivizzanti vs persistentemente positivi: $p = 0.07$).

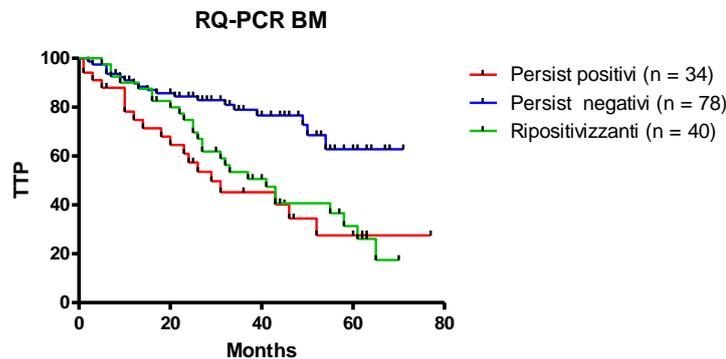


Figura 48. Cinetica MRD in base all'andamento temporale, analizzata in RQ-PCR sul BM (persistentemente negativi vs ripositivizzanti: $p = 0.0014$; ripositivizzanti vs persistentemente positivi: $p = 0.54$).

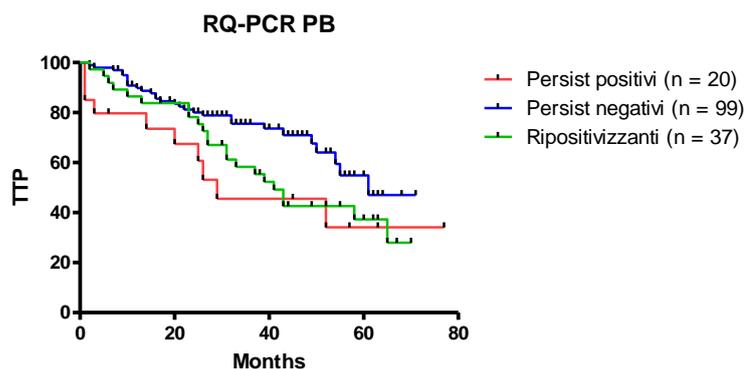


Figura 49. Cinetica MRD in base all'andamento temporale, analizzata in RQ-PCR sul PB (persistentemente negativi vs ripositivizzanti: $p = 0.5$; ripositivizzanti vs persistentemente positivi: $p = 0.45$)

Cinetica della MRD in base all'accumulo di MRD positività

Per il secondo criterio di studio della cinetica abbiamo considerato, per ciascun paziente, la quantità di campioni risultati positivi all'analisi MRD all'interno di un blocco contenente i timepoints: post ASCT e M1. I pazienti sono stati quindi classificati nel seguente modo:

- "2 positivi" se risultavano positivi nei due timepoints;
- "1 positivo" se la positività era presente solo su uno dei due timepoints;
- "2 negativi" se risultavano negativi nei due timepoints

Correlando questa classificazione ai dati di outcome clinico, abbiamo creato delle curve di sopravvivenza, riportate di seguito, per confrontare l'andamento dei pazienti inclusi nelle diverse categorie.

Per quanto riguarda l'analisi MRD in Nested-PCR, i pazienti che possedevano un follow-up molecolare idoneo per lo studio della la cinetica erano 110 casi sul BM e 101 casi sul PB. Di questi, i "2 positivi" sono 44 sul BM e 14 sul PB, i "1 positivo" sono 35 sul BM e 38 sul PB, i "2 negativi" sono 31 sul BM e 49 sul PB.

Da questo studio della cinetica MRD emerge una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi di pazienti, sia sul BM (TTP a 36 mesi: 88% vs 72% vs 55%, TTP mediano: 45 mesi vs non raggiunto vs non raggiunto, $p=0.0158$) (Figura 50) che sul PB (TTP a 36 mesi: 76% vs 72% vs 57%, TTP mediano: 34 mesi vs 47 mesi vs non raggiunto, $p=0.0289$) (Figura 51).

Per quanto riguarda l'analisi MRD in PCR quantitativa, i pazienti che possedevano un follow-up molecolare idoneo per lo studio della cinetica erano 56 casi sul BM e

57 casi sul PB. Di questi, i “2 positivi” sono 10 sul BM e 3 sul PB, i “1 positivo” sono 13 sul BM e 17 sul PB, i “2 negativi” sono 33 sul BM e 37 sul PB.

Anche mediante questa metodica emergono delle differenze, in particolare risulta statisticamente significativa la suddivisione tra i pazienti che presentano i “2 positivi” rispetto a quelli che hanno “2 negativi” sia sul BM (TTP a 36 mesi: 30% vs 71%, TTP mediano: 18,5 vs 53 mesi, $p=0.0017$) (Figura 52); che sul PB (TTP a 36 mesi: 0% vs 66%, TTP mediano: 12 mesi vs 47 mesi, $p<0.0001$) (Figura 53).

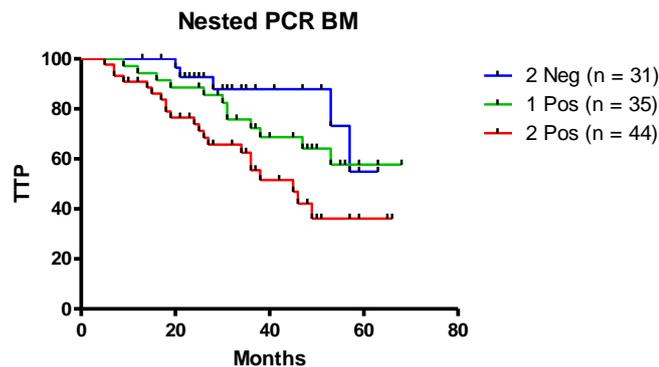


Figura 50. Cinetica MRD in base all'accumulo di positività, analizzata in Nested PCR sul BM ($p = 0.0158$).

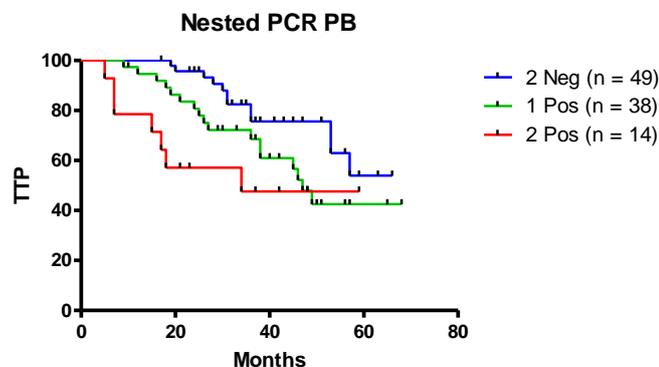


Figura 51. Cinetica MRD in base all'accumulo di positività, analizzata in Nested PCR sul PB ($p = 0.0289$).

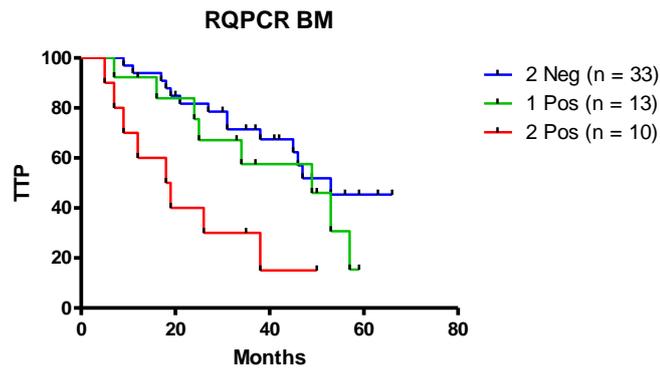


Figura 52. Cinetica MRD in base all'accumulo di positività, analizzata in RQ-PCR sul BM
 ("2 negativi" vs "2 positivi" $p = 0.017$).

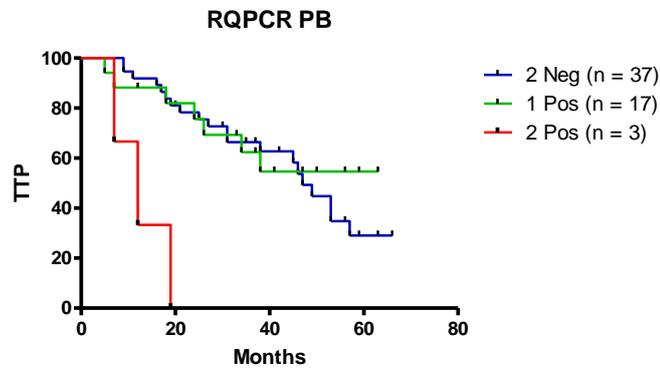


Figura 53. Cinetica MRD in base all'accumulo di positività, analizzata in RQ-PCR sul PB
 ("2 negativi" vs "2 positivi" $p < 0.0001$).

Discussione

Questa tesi descrive i risultati molecolari relativi all'analisi della MRD su un'ampia serie di pazienti giovani affetti da MCL e arruolati nel protocollo clinico prospettico multicentrico di fase III FIL MCL0208, nel quale essi ricevono una chemio-immunoterapia ad alte dosi seguita da trapianto autologo e, per il braccio sperimentale, mantenimento con lenalidomide. I principali risultati ottenuti possono essere così riassunti:

1. È stato possibile studiare per MRD la grande maggioranza dei pazienti arruolati, in linea con i dati di letteratura: infatti un marcatore molecolare è stato identificato su 250/300 pazienti (83%), di cui 211 positivi per IGH (70%), 97 per BCL1 (32%), 58 per entrambi (19%).
2. Al baseline le percentuali di ottenimento dei due marcatori sono analoghe sul BM e sul PB: la concordanza tra i due tessuti è del 94% per il marcatore IGH e del 92% per il marcatore BCL1.
3. L'analisi MRD eseguita sia in Nested-PCR che in RQ-PCR ha dimostrato una elevata efficacia del trattamento nell'indurre la negativizzazione molecolare, con risultati di RQ-PCR in linea con i dati di letteratura (MRD-post-ASCT 79% su BM e 86% su PB).
4. Il 76% delle prime LK sono risultate negative, per cui, da protocollo, sono state risparmiate 164 seconde procedure.
5. È stata osservata una buona concordanza di risultati MRD tra differenti tessuti (BM e PB), tecniche (Nested-PCR e RQ-PCR) e marcatori (IGH e BCL1) ai vari timepoint analizzati; le discordanze emerse (principalmente a favore di BM, Nested-PCR e IGH) tendono ad aumentare nei follow-up tardivi.
6. L'analisi MRD effettuata sia in Nested-PCR che in RQ-PCR ha dimostrato che i pazienti negativi ai diversi timepoint tendono a mostrare un migliore TTP rispetto ai positivi. Questo trend diventa statisticamente significativo ai timepoint più tardivi, in particolare dopo ASCT in Nested PCR su BM ($p=0,0169$) e a 6 mesi (M1) in RQ-PCR sia su BM che su PB ($p=0,0065$ e $p=0,03$ rispettivamente).
7. Lo studio dell'andamento temporale della MRD, analizzata ai diversi timepoint ("cinetica") sembra descrivere meglio l'andamento clinico dei pazienti rispetto alle analisi puntuali dei singoli timepoint.

Il valore predittivo dell'analisi MRD in pazienti affetti da MCL è già stato indagato in diversi studi clinici pubblicati. Tra questi, quelli che risultano maggiormente confrontabili al nostro studio, per caratteristiche dei pazienti arruolati ed analisi effettuate, sono gli studi del gruppo nordico NLG MCL2²⁷ e MCL3^{100,111}, lo studio MCL Younger dell'European MCL Network²⁰ e lo studio LyMA del gruppo francese Lysa¹⁰³.

Nel nostro studio, l'analisi MRD effettuata sia in Nested-PCR che in RQ-PCR ci ha permesso di confrontare i dati ottenuti con quelli già pubblicati (LyMA e EuMCL in RQ-PCR, MCL2-3 in Nested-PCR): da questi confronti emerge come i risultati esposti in questa tesi siano in linea con tali studi.

Per quanto riguarda le percentuali di ottenimento del marcatore, nel nostro studio è stato possibile identificare un marcatore molecolare nell'83% dei pazienti in analisi. Tale percentuale è pari al 60% nello studio MCL2, al 76% nel MCL3 e al 86% nello studio EuMCL.

Nel protocollo MCL0208 si può inoltre notare come la compliance dei centri partecipanti sia molto alta, con un arrivo di campioni al nostro laboratorio per ciascun timepoint quasi ottimale, sia per il BM che per il PB. Questo ha permesso di effettuare l'analisi MRD sulla maggior parte dei pazienti arruolati e di effettuare confronti multipli (BM/PB, IGH/BCL1, Nested-PCR/RQ-PCR).

Per quanto riguarda, invece, i tassi di negativizzazione analizzati in RQ-PCR, abbiamo riscontrato nel pre ASCT una percentuale di pazienti negativi all'analisi MRD pari al 69% nel BM e all'82% nel PB, mentre nel post ASCT si osservava una negatività pari al 79% e all'86% dei pazienti. L'analoga analisi effettuata nello studio LyMA (condotta solo sui 178 pz randomizzati) mostra nel pre ASCT una negatività molecolare pari al 66% (BM) e 80% (PB), e nel post ASCT del 82% (BM) e 95% (PB). Nello studio EuMCL si osservano invece dei tassi di negativizzazione significativamente diversi tra i due bracci di randomizzazione (induzione con solo R-CHOP vs alternanza di R-CHOP/R-DHAP): nel pre ASCT si hanno sul BM il 26% di pazienti MRD- nel gruppo di controllo e il 61% nel gruppo R-CHOP/R-DHAP, mentre sul PB sono rispettivamente il 47% e il 79%; nel post ASCT sul BM tali percentuali sono pari al 59% (R-CHOP) e al 79% (R-CHOP/R-DHAP), sul PB al 68% (R-CHOP) e al 85% (R-CHOP/R-DHAP). Nel nostro studio MCL0208 si osservano quindi dei tassi di negativizzazione post R-CHOP (36% su BM e 47% su PB) paragonabili a quelli pre ASCT del braccio R-CHOP dello studio EuMCL, mentre al timepoint post Ara-C (69% su BM e 82% su PB) si hanno delle

percentuali confrontabili a quelle del braccio alternante R-CHOP/R-DHAP. Da questi dati emerge come la terapia con R-CHOP sia in grado di indurre una MRD negatività in circa il 30-40% dei pazienti, mentre il trattamento con Ara-C negativizza circa il 30% dei pazienti rimasti positivi dopo R-CHOP.

Analogamente, negli studi già pubblicati si osserva come il trapianto incida maggiormente sulla negativizzazione molecolare nei pazienti che ricevono solo terapia con R-CHOP, mentre il suo impatto risulta minore in quelli che ricevono terapia con Ara-C ad alte dosi (LyMA e braccio R-CHOP/R-DHAP dell'EuMCL). Nel nostro studio, il trapianto ha mostrato un'incidenza ancora minore sulla MRD-negatività, dovuto al fatto che tutti i pazienti hanno ricevuto alte dosi di Ara-C pre-trapianto (MCL0208 2 g/mq x2/6 giorni, LyMA 2 g/mq x2/4 giorni, EuMCL 2 g/mq x2/3 giorni).

Negli studi MCL2 e MCL3 l'analisi MRD è stata invece effettuata solo in Nested-PCR; nello studio MCL2 il tasso di negativizzazione molecolare osservato nel post ASCT era del 92%, mentre nel MCL3 si osservava il 53% di negatività pre ASCT e l'83% post ASCT. È tuttavia da tenere presente che in entrambi questi studi non è stata fatta distinzione tra lo studio della MRD sul BM e sul PB, per cui queste percentuali sono verosimilmente influenzate dal fatto che, come si osserva anche nel nostro studio, il PB presenta una clearance di malattia superiore al BM. Inoltre, dei 320 pazienti inclusi in totale nei due studi, solo il 57% sono stati studiati per l'analisi della MRD.

Nel nostro studio abbiamo osservato una differenza di infiltrazione tumorale midollare statisticamente significativa tra i pazienti con marcatore molecolare e quelli senza ($p=0,0135$). A differenza di quanto riportato negli studi precedentemente descritti, in questa tesi abbiamo osservato che questi due gruppi di pazienti presentano prognosi differenti: il TTP è più corto nei pazienti con marcatore (mediana 58 mesi, TTP stimato a 36 mesi 67%) rispetto ai pazienti senza marcatore (mediana non raggiunta, TTP stimato a 36 mesi 82%), in maniera statisticamente significativa ($p=0.0135$). Questo diverso andamento può essere verosimilmente attribuito al grado di infiltrazione tumorale del midollo osseo, suggerendo come pazienti con elevata infiltrazione midollare presentino un outcome peggiore.

Focalizzando l'attenzione sull'impatto clinico dell'analisi MRD, abbiamo dimostrato che il monitoraggio molecolare è fattibile su un'ampia casistica e che fornisce informazioni sulla profondità dell'eradicazione della malattia e anche sul rischio di

ricidiva clinica. Questo è particolarmente evidente nelle analisi effettuate ai timepoint più tardivi (post ASCT e M1), in quanto verosimilmente una persistenza di MRD-positività alla fine del trattamento è indice di una malattia più resistente alle terapie e di conseguenza più aggressiva. In particolare, le curve di TTP valutate sul BM mostrano una maggiore predittività dell'analisi MRD rispetto al PB, noto per avere una clearance maggiore; questo suggerisce come anche una minima persistenza molecolare di malattia solo nel BM possa predire una ricidiva clinica. Questo dato è in linea con quanto pubblicato nello studio LyMA, in cui l'analisi MRD effettuata nel post ASCT mostra come ci sia una differenza significativa di PFS tra i pazienti MRD+ e MRD- valutati sul BM, mentre l'analisi sul PB non era predittiva dell'andamento clinico. Una stima del PFS a 3 anni effettuata in questo studio ha inoltre dimostrato l'efficacia del mantenimento con rituximab sia nei pazienti MRD+ che MRD-: al momento, dato che i bracci di randomizzazione nel nostro studio sono ancora blinded, non ci è stato possibile effettuare una valutazione analoga sul mantenimento con lenalidomide.

Nello studio MCL0208, l'analisi MRD effettuata sia mediante Nested-PCR che RQ-PCR ci ha permesso di confrontare le due metodiche tra loro. Come già descritto nell'analisi delle discordanze, la Nested-PCR sembra essere più sensibile nel rilevare anche bassissimi livelli di MRD rispetto alla RQ-PCR. Questo si riflette anche sull'impatto clinico, in particolare se si considerano le curve di TTP relative al PB, dove una positività molecolare rilevata in Nested-PCR sembra essere più predittiva di ricidiva clinica.

Quello che però sembra predire maggiormente il rischio di ricidiva clinica di ciascun paziente, rispetto all'analisi del singolo timepoint, è la valutazione globale della cinetica MRD. Le curve di TTP descrivono infatti un andamento significativamente diverso tra i pazienti che presentano una negatività persistente e quelli che invece rimangono positivi nel tempo. Questo dato è in linea con quanto già pubblicato nell'analisi congiunta degli studi MCL2 e MCL3, dove si osserva una differenza tra il PFS dei pazienti che presentano una ricidiva molecolare e quelli in remissione molecolare continua; è comunque da tenere presente che, in questi protocolli, i pazienti in ricidiva molecolare venivano trattati con rituximab preemptive, per cui questo potrebbe rendere le curve meno confrontabili.

E' necessario discutere anche alcuni limiti dello studio clinico presentato in questa tesi. Il primo fra tutti è indiscutibilmente la lentezza di arruolamento (300 pazienti in 5 anni), per cui il follow-up di diversi pazienti è ancora in corso e molti campioni

sono ancora da analizzare. Inoltre i primi dati clinici di tossicità dello studio fanno vedere come 53 pazienti (18%) non ricevono il trapianto autologo e il 33% dei pazienti non riescono a essere randomizzati per progressione precoce o tossicità. Al momento questi pazienti sono stati considerati nelle analisi MRD (analisi "intention to treat"), ma in futuro sarà opportuno concentrarsi solo sui pazienti che effettivamente ricevono ASCT e/o sono randomizzati (analisi "per protocol").

Inoltre, il significato clinico dell'analisi MRD è sicuramente influenzato dalla terapia di mantenimento con lenalidomide, per cui gli attuali risultati riguardanti lo stato MRD post ASCT saranno da riconsiderare non appena sarà aperta la randomizzazione (mantenimento vs osservazione). In più, la maturazione del follow-up renderà i dati maggiormente affidabili per l'analisi effettuata in questo studio.

Infine, il 17% dei pazienti non presenta un marcatore molecolare e non può quindi essere considerato per lo studio della MRD. Questo risultato, in linea con i dati di letteratura, è in parte dovuto alla bassa infiltrazione tumorale del campione diagnostico (come si osserva anche dalla differenza di infiltrazione midollare valutata in citofluorimetria tra i pazienti con e senza marcatore) e in parte verosimilmente alla presenza di marcatori immunoglobulinici altamente ipermutati. Le nuove tecnologie attualmente in studio potrebbero in futuro fornire una soluzione a questo problema: in particolare, le metodiche basate su Next Generation Sequencing potrebbero, in quanto dotate di alta sensibilità e specificità, aumentare la percentuale di ottenimento del marcatore molecolare e sostituire le tecniche di PCR. Tuttavia, ad oggi si tratta di metodiche altamente costose e complesse dal punto di vista della analisi dei risultati. Un'ulteriore metodica che in questi anni sta prendendo piede nell'analisi MRD è la ddPCR, una tecnica di quantificazione assoluta che potrebbe costituire un nuovo strumento in grado di analizzare anche campioni con bassissimi livelli di infiltrazione tumorale, superando il problema della malattia non quantificabile. In questo studio è stata infatti utilizzata per la quantificazione della MRD nei 15 casi in cui la RQ-PCR aveva fallito a causa della bassa infiltrazione tumorale. Questa tecnica presenta il vantaggio di non necessitare della costruzione di una curva standard, consentendo un risparmio di materiale; inoltre, rispetto all'NGS, si tratta di una metodica meno costosa e di più facile applicabilità.

In conclusione, i risultati di questa tesi dimostrano la fattibilità dell'analisi MRD su un'ampia casistica di pazienti giovani con MCL e confermano il valore predittivo

della MRD nell'identificare precocemente i pazienti a rischio maggiore di recidiva. La maturazione del follow-up dei pazienti inclusi nello studio potrà fornire in futuro dati ancora più significativi sul significato dello stato MRD. L'apertura dei bracci di randomizzazione ci permetterà inoltre di valutare l'efficacia del mantenimento con lenalidomide e di poter meglio correlare i dati di MRD successivi alla randomizzazione con l'outcome clinico. I risultati finali di questo studio potranno quindi porre le basi per l'ideazione di futuri trial che propongano un trattamento modulato sui risultati dell'analisi MRD, perseguendo l'ottica generale di una medicina personalizzata: offrire terapie sempre più efficaci e meno tossiche adattate alle caratteristiche del singolo paziente.

Bibliografia

1. Harris, N.L. *et al.* «A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.» *Blood* 84 (1994): 1361-1392.
2. Klapper, W. «Histopathology of mantle cell lymphoma.» *Semin. Hematol.* 48 (2011): 148-154.
3. Fu, K. *et al.* «Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling.» *Blood* 106 (2005): 4315–4321.
4. Briani, C., M. Schlotter, P. Lichter, e C. Kalla. «Development of a mantle cell lymphoma in an ATM heterozygous woman after occupational exposure to ionising radiation and somatic mutation of the second allele.» *Leuk. Res.* 30 (2006): 1193–1196.
5. Da Col, J. *et al.* «Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma.» *Blood* 111 (2008): 5142–5151.
6. Rizzatti, E.G. *et al.* «Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways.» *Br. J. Haematol.* 130 (2005): 516–526.
7. Fu, L. *et al.* «Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas.» *Blood* 107 (2006): 4540–4548.
8. Jares, P., D. Colomer, e E. Campo. «Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma.» *J. Clin Invest.* 122 (2012): 3416-3423.
9. Swerdlow, S.H. *et al.* «The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms.» *Blood* 127 (2016): 2375-2390.
10. Nygren, L. *et al.* «Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma.» *Blood* 119 (2012): 4215-4223.
11. Pérez-Galàn, P., M. Dreyling, e A. Wiestner. «Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era.» *Blood* 117 (2011): 26-38.
12. Slotta-Huspenina, J. *et al.* «The impact of cyclin D1 mRNA isoforms, morphology and p53 in mantle cell lymphoma: p53 alterations and blastoid morphology are strong predictors of a high proliferation index.» *Haematologica* 97 (2012): 1422–1430.

13. Cheah, C.Y., J.F. Seymour, e M.L. Wang. «Mantle Cell Lymphoma.» *J Clin Oncol.* 34 (2016): 1256-1269.
14. Dreyling, M., S. Ferrero, e O. Hermine. «How I manage mantle cell lymphoma.» *Leukemia* 28 (2014): 2117-2130.
15. Dreyling, M., S. Ferrero, N. Vogt, W. Klapper, e European Mantle Cell Lymphoma Network. «New paradigms in mantle cell lymphoma: is it time to risk-stratify treatment based on the proliferative signature?» *Clin. Cancer Res.* 20 (2014): 5194–5206.
16. Tiemann, M. *et al.* «Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network.» *Br. J. Haematol.* 131 (2005): 29–38.
17. Determann, O. *et al.* «Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group.» *Blood* 111 (2008): 2385-2387.
18. Hoster, E. *et al.* «Confirmation of the Mantle-Cell Lymphoma International Prognostic Index in Randomized Trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network.» *J. Clin. Oncol.* 32 (2014): 1338–1346.
19. Hoster, E. *et al.* «Prognostic value of Ki-67 index, cytology, and growth pattern in mantle-cell lymphoma: results from randomized trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network.» *J. Clin Oncol.* 34 (2016): 1386-1394.
20. Hermine, O. *et al.* «Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma N.» *Lancet* 388 (2016): 565-575
21. Dreyling, M. *et al.* «Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network» *Leuk Lymphoma.* 54(2013):699-707.
22. Halldórsdóttir, AM. *et al* Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 25 (2011): 904-8.

23. Visco, C. *et al.* «Combination of Rituximab, Bendamustine and Citarabine for patients with mantle cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation.» *J. Clin Oncol.* 31 (2013): 1442-1449.
24. Lefrère, F. *et al.* «Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study.» *Leukemia* 16 (2002): 587-593.
25. Khouri, I.F. *et al.* «Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma.» *J. Clin Oncol.* 16 (1998): 3803–3809.
26. Romaguera, J.E. *et al.* «High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine.» *J. Clin Oncol.* 23 (2005): 7013-7023.
27. Geisler, C.H. *et al.* «Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group.» *Blood* 112 (2008): 2687–2693.
28. Kluin-Nelemans, H.C. *et al.* «Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma.» *N Engl J Med* 367 (2012): 520-531.
29. Visco, C. «Rituximab, bendamustine, and low-dose cytarabine as induction therapy in elderly patients with mantle cell lymphoma: a multicentre, phase 2 trial from Fondazione Italiana Linfomi. » *Lancet Haematol.* 4(2017):
30. Rummel, M.J. *et al.* «Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial.» *Lancet* 381 (2013): 1203–1210.
31. Ruan, J. *et al.* «Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma.» *J. Clin. Oncol.* 29 (2011): 690–697.
32. Robak, T. *et al.* «Bortezomib-Based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma.» *N Engl J Med* 372 (2015): 944-953.
33. Ghilmini, M. *et al.* «Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma:

- a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK).» *J. Clin. Oncol.* 23 (2005): 705–711.
34. Lamm, W. *et al.* «Bortezomib combined with rituximab and dexamethasone is an active regimen for patients with relapsed and chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma.» *Haematologica* 96 (2011): 1008–1014.
 35. Weigert, O. *et al.* «A novel regimen combining high dose cytarabine and bortezomib has activity in multiply relapsed and refractory mantle cell lymphoma - long-term results of a multicenter observation study.» *Leuk. Lymphoma* 50 (2009): 716–722.
 36. Gerecitano, J. *et al.* «Phase I trial of weekly and twice-weekly bortezomib with rituximab, cyclophosphamide, and prednisone in relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma.» *Clin. Cancer Res.* 17 (2011): 2493–2501.
 37. Friedberg, J.W. *et al.* «The combination of bendamustine, bortezomib, and rituximab for patients with relapsed/refractory indolent and mantle cell non-Hodgkin lymphoma.» *Blood* 117 (2011): 2807–2812.
 38. Hess, G. *et al.* «Phase III Study to Evaluate Temsirolimus Compared With Investigator's Choice Therapy for the Treatment of Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma.» *J. Clin. Oncol.* 27 (2009): 3822–3829.
 39. Ansell, S.M. *et al.* «Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study.» *Lancet Oncol.* 12 (2011): 361–368.
 40. Renner, C. *et al.* «A multicenter phase II trial (SAKK 36/06) of single-agent everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma.» *Haematologica* 97 (2012): 1085–1091.
 41. Richardson, P.G. *et al.* «Lenalidomide in multiple myeloma.» *Expert Rev. Anticancer Ther.* 6 (2006): 1165-1173.
 42. List, A. *et al.* «Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion.» *N. Engl. J. Med.* 355 (2006): 1456–1465.
 43. Chanan-Khan, A. *et al.* «Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study.» *J. Clin. Oncol.* 24 (2006): 5343–5349.
 44. Habermann, T.M. *et al.* «Lenalidomide oral monotherapy produces a high response rate in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma.» *Br. J. Haematol.* 145 (2009): 344–349.

45. Vose, J.M. *et al.* «Single-agent lenalidomide is active in patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma who received prior stem cell transplantation.» *Br. J. Haematol.* 162 (2013): 639–647.
46. Wiernik, P.H. *et al.* «Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma.» *J. Clin. Oncol.* 26 (2008): 4952–4957.
47. Gandhi, A.K. *et al.* «Lenalidomide inhibits proliferation of Namalwa CSN.70 cells and interferes with Gab1 phosphorylation and adaptor protein complex assembly.» *Leuk. Res.* 30 (2006): 849–858.
48. Verhelle, D. *et al.* «Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells.» *Cancer Res.* 67 (2007): 746–755.
49. Zinzani, P.L. *et al.* «Long-term follow-up of lenalidomide in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: subset analysis of the NHL-003 study.» *Annals of Oncology* 24 (2013): 2892–2897.
50. Trneny, M. *et al.* «Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial.» *Lancet Oncol.* 17 (2016): 319–31.
51. Wang, M. *et al.* «Phase II Study of Yttrium-90-Ibritumomab Tiuxetan in Patients With Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma.» *J. Clin. Oncol.* 27 (2009): 5213–5218.
52. Beaven, A.W. *et al.* «A phase I study evaluating ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]) in combination with bortezomib (Velcade[®]) in relapsed/refractory mantle cell and low grade B-cell non-Hodgkin lymphoma.» *Leuk. Lymphoma* 53 (2012): 254–258.
53. Wang, M.L. *et al.* «Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: Updated safety and efficacy results.» *Blood* 126 (2015): 739–745.
54. Dreyling, M. *et al.* «Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study.» *Lancet* 387 (2016): 770–778.
55. Wang, M.L. *et al.* «Ibrutinib in combination with rituximab in relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a single-centre, open-label, phase 2 trial.» *Lancet Oncol.* 17 (2016): 48–56.

56. Morschhauser, F.A. *et al.* «Obinutuzumab (GA101) monotherapy in relapsed/refractory diffuse large b-cell lymphoma or mantle-cell lymphoma: results from the phase II GAUGUIN study.» *J. Clin. Oncol.* 31 (2013): 2912–2919.
57. Bargou, R. *et al.* «Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody.» *Science* 321 (2008): 974–977.
58. Lin, T.S. *et al.* «Flavopiridol, Fludarabine, and Rituximab in Mantle Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Lymphoproliferative Disorders.» *J. Clin. Oncol.* 28 (2010): 418–423.
59. Leonard, J.P. *et al.* «Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma.» *Blood* 119 (2012): 4597–4607.
60. Davids, M.S. *et al.* «Phase I first-in-human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma.» *J. Clin. Oncol.* 35 (2017): 826-833.
61. Le Gouill, S. *et al.* «Rituximab Maintenance after Autologous Stem Cell Transplantation Prolongs Survival in Younger Patients with Mantle Cell Lymphoma: Final Results of the Randomized Phase 3 LyMa Trial of the Lysa/Goelams Groupash 2016» *Blood* (2016): 128-145.
62. Leonard, JP. *et al.* «Randomized Trial of Lenalidomide Alone Versus Lenalidomide Plus Rituximab in Patients With Recurrent Follicular Lymphoma: CALGB 50401 (Alliance). » *J Clin Oncol.* 31 (2015):3635-40.
63. Blum, KA. *et al.* «Single agent bortezomib in the treatment of relapsed and refractory Hodgkin lymphoma: cancer and leukemia Group B protocol 50206. » *Leuk Lymphoma.* 48 (2007):1313-9.
64. Kato, H. *et al.* «Clinical value of flow cytometric immunophenotypic analysis for minimal residual disease detection in autologous stem-cell products of follicular and mantle cell lymphomas.» *Leukemia* 26 (2012): 166-169.
65. Bruggemann, M., N. Gokbuget, e M. Kneba. «Acute Lymphoblastic Leukemia: monitoring Minimal Residual Disease as a therapeutic principle.» *Semin. Oncol.* 39 (2012): 47–57.
66. Gribben, J.G. *et al.* «All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment.» *Blood* 78 (2001): 3275–3280.

67. Pott, C. *et al.* «Structure of Bcl-1 and IgH-CDR3 rearrangements as clonal markers in mantle cell lymphomas.» *Leukemia* 12 (1998): 1630–1637.
68. Ritgen, M. *et al.* «Quantitative MRD monitoring identifies distinct GVL response patterns after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: results from the GCLLSG CLL3X trial.» *Leukemia* 22 (2008): 1377–1386.
69. Böttcher, S., Ritgen, M. & Kneba, M. in *Lymphoma* (ed. Küppers, R.) 971, 149–174 (Humana Press, 2013).
70. Paiva, B. *et al.* «Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation.» *Blood* 112 (2008): 4017-4023.
71. Böttcher, S. *et al.* «Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations.» *Haematologica* 93 (2008): 551–559.
72. Lodish, H. *et al.* «Molecular Cell Biology.» *W. H. Freeman*, 2000.
73. Rosenquist, R. «Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic Lymphocytic Leukemia: update ERIC recommendations» *Leukemia* 31 (2017):1477-1481.
74. Stamatopoulos, K. *et al.* «Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation.» *Br. J. Hematol* 105 (1999): 190–197.
75. Pott, C. *et al.* «Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma.» *Blood* 106 (2007): 2271–2278.
76. Andersen, N.S. *et al.* «Pre-emptive treatment with rituximab of molecular relapse after autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma.» *J. Clin Oncol.* 27 (2009): 4365–4370.
77. Pott, C. *et al.* «Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study.» *Blood* 115 (2010): 3215–3223.
78. Vandenberghe, E. *et al.* «Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage.» *J. Pathol* 163 (1991): 13–18.

79. Olsson, K. *et al.* «Real-time t(11;14) and t(14;18) PCR assays provide sensitive and quantitative assessments of minimal residual disease (MRD).» *Leukemia* 13 (1999): 1833–1842.
80. van der Velden, V.H.J. *et al.* «Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data.» *Leukemia* 21 (2007): 604–611.
81. Gribben, J.G. *et al.* «Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma.» *Blood* 81 (1993): 3449–3457.
82. Voena, C. *et al.* «A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors.» *Leukemia* 11 (1997): 1793–1798.
83. Ferrero, S. *et al.* «Minimal residual disease detection in lymphoma and multiple myeloma: impact on therapeutic paradigms.» *Hematol. Oncol.* 29 (2011): 167–176.
84. Holland, P.M. *et al.* «Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.» *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991): 7276–7280.
85. Gibson, U.E. *et al.* «A novel method for real time quantitative RT-PCR.» *Genome Res.* 6 (1996): 995–1001.
86. Donovan, J.W. *et al.* «Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia.» *Blood* 95 (2000): 2651–2658.
87. Ladetto, M. *et al.* «Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma.» *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant* 6 (2000): 241–253.
88. van der Velden, V.H.J. *et al.* «Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.» *Leukemia* 17 (2003): 1013–1034.
89. Drandi, D. *et al.* «Minimal residual Disease detection by droplet Digital PCR in Multiple Myeloma, in Mantle Cell Lymphoma and Follicular Lymphoma:

90. Ladetto, M. et al. «Next-generation sequencing and Real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders» *Leukemia* 28 (2014):1299-307.
91. Drandi, D. «Highly sensitive Droplet Digital PCR for MYD88 mutation Detection and Minimal residual Disease monitoring in waldenstrom Macroglobulinemia» in press.
92. Cheminant, M. et al. «Minimal residual disease monitoring by 8-color flow cytometry in mantle cell lymphoma: an EU-MCL and LYSA study.» *Haematologica* 101 (2016): 336-345.
93. Chovancova, J. et al. «Detection of minimal residual disease in mantle cell lymphoma-establishment of novel eight-color flow cytometry approach.» *Cytometry B Clin Cytom.* 88 (2015): 92-100.
94. Pott, C. «Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: technical aspects and clinical relevance.» *Semin Hematol.* 48 (2011): 172-184.
95. Andersen, N.S. et al. «Real-time polymerase chain reaction estimation of bone marrow tumor burden using clonal immunoglobulin heavy chain gene and bcl-1/JH rearrangements in mantle cell lymphoma.» *Exp Hematol* 30 (2002): 703-710.
96. Wu, D. et al. «High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia.» *Sci Transl Med.* 4 (2012): 134ra63.
97. Faham, M. et al. «Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia.» *Blood* 120 (2012): 5173-5180.
98. Martinez-Lopez, J. et al. «Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma.» *Blood* 123 (2014): 3073-3079.
99. Andersen, N.S. et al. «Primary treatment with autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: outcome related to remission pretransplant.» *Eur J Haematol.* 71 (2003): 73-80.
100. Kolstad, A. et al. «Nordic MCL3 study: 90Y-ibritumomab-tiuxetan added to BEAM/C in non-CR patients before transplant in mantle cell lymphoma.» *Blood* 123 (2014): 2953-2959.
101. Albertsson-Lindblad, A. et al. «Lenalidomide-bendamustine-rituximab in untreated mantle cell lymphoma > 65 years, the Nordic Lymphoma Group phase I+II trial NLG-MCL4.» *Blood* 14 (2016): 1824-1820.

102. Armand, P. *et al.* «A phase 2 study of Rituximab-Bendamustine and Rituximab-Cytarabine for transplant-eligible patients with mantle cell lymphoma.» *Br J Haematol.* 173 (2016): 89-95.
103. Callanan, M.B. *et al.* «Predictive power of early, sequential MRD monitoring in peripheral blood and bone marrow in patients with mantle cell lymphoma following autologous stem cell transplantation with or without Rituximab maintenance; interim results from the Lyma-MRD project, conducted on behalf of the Lysa group.» *Blood* 126 (2015)
104. Liu, H. *et al.* «Detection of minimal residual disease following induction immunochemotherapy predicts progression free survival in mantle cell lymphoma: final results of CALGB 59909.» *Haematologica* 97 (2012): 579-585.
105. Cowan, A.J. *et al.* «Pretransplantation Minimal Residual Disease Predicts Survival in Patients with Mantle Cell Lymphoma Undergoing Autologous Stem Cell Transplantation in Complete Remission.» *Biol Blood Marrow Transplant* 22 (2016): 380-385.
106. Hoster, E., e C. Pott. «Minimal residual disease in mantle cell lymphoma: insights into biology and impact on treatment.» *Hematology ASH Educ Program*, 2016: 437-445.
107. Geisler, C.H. *et al.* «Nordic MCL2 trial update: six-year follow-up after intensive immunochemotherapy for untreated mantle cell lymphoma followed by BEAM or BEAC + autologous stem-cell support: still very long survival but late relapses do occur.» *Br J Haematol.* 158 (2012): 355-362.
108. Pott blood 2014
109. Cheson, B.D. *et al.* «Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification.» *J Clin Oncol.* 32 (2014): 3059-3068.
110. Kruger, W.H. *et al.* «Allogeneic stem cell transplantation for mantle cell lymphoma--final report from the prospective trials of the East German Study Group Haematology/Oncology (OSHO).» *Ann Hematol.* 93 (2014): 1587-1597.
111. Kolstad, A. *et al.* «Molecular monitoring after autologous stem cell transplantation and preemptive rituximab treatment of molecular relapse; result from the Nordic Mantle Cell Lymphoma studies (MCL2 and MCL3)

with median follow-up of 8.5 years.» *Biol Blood Marrow Transplant* 23 (2017): 428-435.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Mario Boccadoro che mi ha supportato nel concludere questo percorso e il Dott. Ferrero Simone che ha seguito costantemente questo lavoro fornendo spunti importanti per la stesura di questa tesi.

Ringrazio Mariella, Danielina, Elisa, Barbara, Manuela, Daniela, Fabio, Martina, Marina e Paola per aver contribuito ai risultati di laboratorio e di clinica, ma soprattutto per la pazienza e il tempo dedicatomi.

Un grazie a Daniele per aver mosso i primi passi nella stesura di questo progetto.

Ringrazio mio marito per essere sempre presente, pronto ad ascoltarmi soprattutto nei momenti di difficoltà.

Ringrazio la mia piccola Giada che riesce sempre a farmi sorridere e a mantenermi sveglia e attiva anche quando ti assale la paura, l'ansia e la fatica di ogni giorno,

Ringrazio mia mamma, mia sorella, mio fratello e tutti i miei nipoti che sono sempre vicini e continuano ad essere le persone che credono in me.

Un grazie al mio papà, che se pur non presente nella vita terrena, mi dà la forza di perseguire nel mio operato e nelle mie potenzialità.