

ALMA MATER STUDIORUM

UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA**

Ciclo XXX

Settore concorsuale: 06/D3 - Malattie del sangue, Oncologia e Reumatologia

Settore scientifico-disciplinare: MED/15 - Malattie del sangue

**STUDIO DELL'ATTIVITÀ E DEL PROFILO DI
SICUREZZA DEI FARMACI INIBITORI DELLA VIA DI
SEGNALAZIONE DELLE MAP-CHINASI IN PAZIENTI
CON LEUCEMIA A CELLULE CAPELLUTE**

Presentata dal Dott. Alessandro Broccoli

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Pier-Luigi Lollini

Supervisore
Chiar.mo Prof. Pier Luigi Zinzani

Esame finale anno 2018

**CHÉ NON FA SCIENZA,
SANZA LO RITENERE, AVERE INTESO**
Dante, *Paradiso*, V, 41-42

INDICE

INTRODUZIONE	5
Capitolo 1. LA LEUCEMIA A CELLULE CAPELLUTE	9
1. Cellula di origine	10
2. Genetica e biologia molecolare	11
3. Aspetti clinici	14
4. Laboratorio	16
5. Anatomia patologica	17
6. Quando iniziare la terapia	21
7. Criteri di risposta al trattamento	23
<i>Risposta completa</i>	23
<i>Risposta parziale</i>	24
<i>Risposta minore</i>	24
<i>Non risposta</i>	24
<i>Malattia midollare residua</i>	24
8. La terapia di prima linea con analoghi purinici	25
<i>Pentostatina</i>	25
<i>Cladribina</i>	27
9. Immunoterapia	30
<i>Rituximab</i>	30
<i>Moxetumomab pasudotox</i>	31
10. Malattia refrattaria o in ricaduta	32
11. Lo stato dell'arte	33
12. Leucemia a cellule capellute variante	37
Capitolo 2. LA VIA DI SEGNALAZIONE DELLE MAP-CHINASI	40
1. Ruolo biologico della via delle MAP-chinasi	40
<i>L'innescò del segnale: Ras</i>	41
<i>La famiglia di raf</i>	43
<i>Attivazione degli effettori a valle</i>	43

2. Mutazioni di <i>B-raf</i> nella leucemia a cellule capellute	44
---	----

Capitolo 3. LA TERAPIA CON INIBITORE DI B-RAF 49

1. Vemurafenib	50
<i>Sviluppo clinico di vemurafenib</i>	51
<i>Eventi avversi</i>	52
2. Impiego clinico di vemurafenib nella leucemia a cellule capellute....	53

Capitolo 4. VEMURAFENIB COME AGENTE SINGOLO NEL TRATTAMENTO DELLA LEUCEMIA A CELLULE CAPELLUTE 60

1. Disegno dello studio	60
<i>Obiettivi, dimensione campionaria e aspetti statistici</i>	60
<i>Diagnosi. Criteri di inclusione e di esclusione dei pazienti in studio</i>	61
<i>Dosaggio di vemurafenib e tempistiche di trattamento</i>	64
<i>Modifiche della dose di trattamento</i>	66
<i>Procedure clinico-strumentali previste dallo studio</i>	67
<i>Criteri di risposta</i>	68
2. Caratteristiche dei pazienti arruolati	69
<i>Analisi dei pazienti refrattari alla prima terapia con analogo purinico</i>	70
<i>Analisi dei pazienti in ricaduta dopo analoghi purinici</i>	70
3. Risposta al trattamento	71
4. Analisi della sopravvivenza	73
5. Tossicità e tolleranza	74
6. Aspetti di farmacodinamica	76
7. Sintesi dei risultati clinici e problematiche aperte	78
8. Ulteriori esperienze con vemurafenib impiegato come agente singolo.....	80
9. Ripetizione del trattamento con vemurafenib	82

Capitolo 5. LA COMBINAZIONE DI VEMURAFENIB E RITUXIMAB NEL TRATTAMENTO DELLA LEUCEMIA A CELLULE CAPELLUTE 83

1. Disegno dello studio	85
-------------------------------	----

<i>Obiettivi dello studio</i>	85
<i>Diagnosi. Criteri di inclusione e di esclusione</i>	85
<i>Dosaggio di vemurafenib e tempistiche di trattamento</i>	86
<i>Modifiche della dose di trattamento e gestione della tossicità</i>	88
<i>Procedure clinico-strumentali previste dallo studio</i>	88
<i>Criteri di risposta</i>	90
2. Caratteristiche dei pazienti arruolati	90
3. Risposta al trattamento e analisi della sopravvivenza	90
4. Tossicità e tolleranza	92
5. Vemurafenib come agente singolo e in combinazione con rituximab: risultati a confronto.....	93
Capitolo 6. <i>B-raf</i>^{V600E} COME MARCATORE DI MALATTIA	95
1. Metodi	96
<i>Tipologia dei pazienti in studio e obiettivi</i>	96
<i>Materiale biologico</i>	97
Droplet digital <i>PCR</i>	98
2. Risultati	99
3. Applicazione dei risultati del test in pazienti in <i>follow-up</i>	105
<i>Caso clinico n° 1</i>	106
<i>Caso clinico n° 2</i>	107
4. Possibile ruolo della valutazione di <i>B-raf</i> ^{V600E} nella pratica clinica	109
CONCLUSIONI	110
FIGURE FUORI TESTO	115
BIBLIOGRAFIA	124

INTRODUZIONE

La leucemia a cellule capellute è un'entità peculiare sia per la morfologia degli elementi che la costituiscono – dotati cioè di fini propaggini citoplasmatiche circonferenziali, da cui il nome – sia per le caratteristiche biologiche che la discostano notevolmente dalle sindromi linfoproliferative croniche a ben più elevata incidenza e prevalenza. La prima descrizione di questa patologia risale ad oltre cinquant'anni fa, quando Bertha A. Bouroncle¹ (figura 1 a pag. 6) ha messo in luce le caratteristiche cliniche di una serie di pazienti affetti da quella che chiamò *reticoloendoteliosi leucemica*, solo più tardi riconosciuta come entità a sé stante con il nome di leucemia a cellule capellute². Le prime osservazioni morfologiche, infatti, avevano suggerito che la cellula colpita dall'evento neoplastico fosse di derivazione monocito-macrofagica (reticolo-endoteliale, per impiegare la dizione dell'epoca, ormai però divenuta obsoleta), data la comunanza morfologica con i monociti circolanti nel sangue periferico. Solo successivamente è stata chiarita la reale natura della cellula capelluta (*tricoleucocito*), di fatto attribuendone la derivazione da un linfocito B maturo, post-centro germinativo^{3,4}.

Per almeno vent'anni dalla sua prima descrizione non sono state disponibili terapie specifiche, e in nessun modo è stato possibile intervenire con l'intento di alterare la storia naturale della malattia per via farmacologica (figura 2 a pag. 7). Soltanto la splenectomia era riconosciuta come unico trattamento, con finalità meramente palliative, dato che i pazienti spesso lamentavano una sintomatologia addominale correlata al marcato ingrandimento della milza: l'intervento chirurgico risultava in grado di migliorare in maniera soltanto transitoria i parametri ematologici dei pazienti affetti, e la sopravvivenza mediana dalla diagnosi si attestava a circa 4 anni⁵⁻⁸.

È dei primi anni Ottanta l'impiego del primo farmaco in grado di modificare la storia naturale della malattia, l' α -interferone⁹, con il quale iniziarono a registrarsi le prime risposte complete: a fianco del miglioramento e della normalizzazione del quadro ematologico, si poteva

assistere alla riduzione – e in taluni casi alla scomparsa – dell'infiltrato leucemico a livello del midollo osseo.

Figura 1 – Bertha A. Bouroncle (1919-2013).



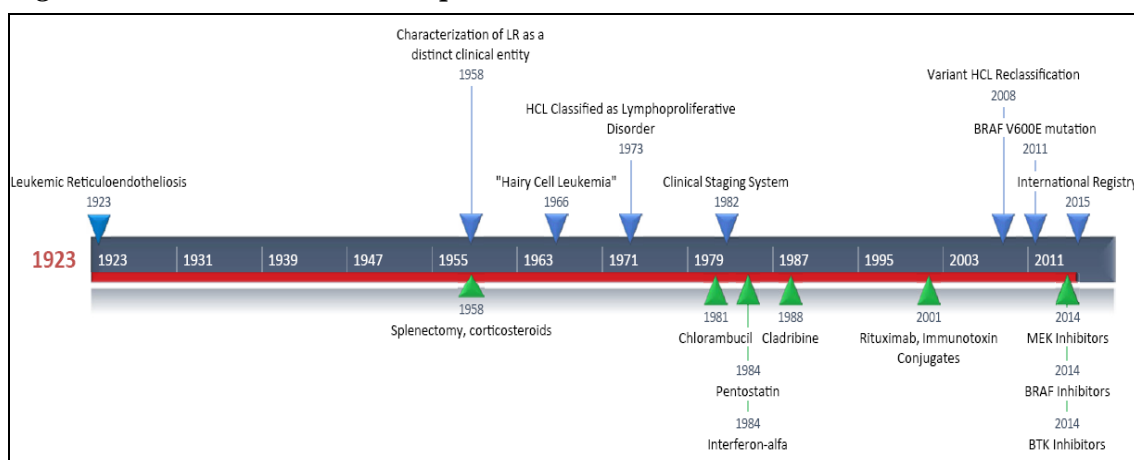
Successivamente, con la dimostrazione che un analogo purinico – la 2'-desossicoformicina (o pentostatina) – poteva determinare un elevato tasso di risposte complete¹⁰, e che un secondo analogo purinico – la 2-clorodesossiadenosina (o cladribina) – era analogamente efficace, potendo peraltro indurre risposte complete estremamente durevoli con un solo ciclo di trattamento e lunghi intervalli di sopravvivenza libera da malattia¹¹, fu sancita la trasformazione di una malattia irrimediabilmente fatale in una forma di leucemia trattabile ed altamente responsiva alle cure, con una sopravvivenza del tutto dignitosa per i pazienti affetti, quasi sovrapponibile all'aspettativa di vita della popolazione sana. La diffusione degli analoghi purinici ha determinato l'abbandono della terapia con interferone, molto meno maneggevole e caratterizzata da tassi di risposta nettamente inferiori, e ha reso la splenectomia un intervento del tutto obsoleto¹². Una più approfondita conoscenza acquisita negli anni successivi circa l'assetto antigenico della cellula leucemica ha consentito inoltre di porre in atto strategie mirate di trattamento, basate sull'impiego degli anticorpi monoclonali, da soli o in combinazione con tossine¹³.

Nonostante gli enormi progressi fatti negli ultimi trent'anni e la possibilità di ottenere risposte cliniche a lungo termine, è stato dimostrato come nel

30-40% dei casi i pazienti in remissione possano andare incontro ad una ricaduta di malattia, richiedendo un nuovo trattamento in capo a 10 anni^{14,15}. Per contro, è altrettanto vero che in alcuni casi la sola terapia di prima linea con analoghi purinici è in grado di garantire remissioni complete di lunghissima durata, con intervalli liberi da trattamento che in alcuni casi possono superare i quindici o vent'anni (condizione in cui è lecito domandarsi se è possibile considerare un paziente effettivamente *guarito*)^{16,17}.

È storia recente la scoperta dell'esistenza di una specifica mutazione a carico di un gene codificante per una proteina coinvolta nel complesso meccanismo di segnalazione intracellulare facente capo alla via delle chinasi attivate da mitogeni (MAP-chinasi). La mutazione del gene *B-raf*¹⁸ che porta alla sintesi di una proteina abnormemente iperattiva – B-Raf V600E – già descritta in alcuni tumori solidi, attualmente viene considerata il *primum movens* nella patogenesi di questa malattia, riscontrandosi già a partire dalla cellula staminale emopoietica¹⁹ e risultando responsabile dell'intero processo leucemogeno. La costante presenza di questa mutazione nell'ambito del clone leucemico (in tutte le fasi di malattia, all'esordio come alla ricaduta) e la sua stretta correlazione con i meccanismi patogenetici, ne fanno da un lato un possibile marcatore di attività della neoplasia, dall'altro un potenziale bersaglio di terapia.

Figura 2 – Leucemia a cellule capellute: la storia.



Chi scrive ha iniziato ad occuparsi dei pazienti con leucemia a cellule capellute nel corso degli ultimi anni della Scuola di Specializzazione in Ematologia, personalmente impegnandosi nella conduzione del primo studio clinico con inibitore di B-Raf, vemurafenib, portato avanti a livello italiano, nell'ambito del quale l'Istituto di Ematologia di Bologna ha giocato un ruolo preponderante con l'arruolamento di 8 pazienti sui 28 previsti. Nel corso degli anni di dottorato, questo studio è giunto alla sua conclusione e alla pubblicazione dei risultati²⁰; a questo studio ne ha fatto seguito un secondo, tuttora in corso, in cui vemurafenib è stato associato all'anticorpo monoclonale anti-CD20, rituximab.

Questo lavoro ha come obiettivi lo studio della mutazione di *B-raf* e della proteina mutante B-Raf sia in termini di *bersaglio terapeutico* in pazienti con malattia attiva, pluritrattata e recidivante, non idonei al ritrattamento con analoghi purinici, sia come possibile *marcatore di malattia attiva* e malattia minima residua, considerato che la presenza della mutazione correla in modo specifico con la presenza di cellule neoplastiche e che la negativizzazione della carica allelica mutata può giocare un ruolo prognostico favorevole. Verranno dunque presentati i risultati dei due studi italiani in cui vemurafenib è stato impiegato in questo contesto clinico e, successivamente, verrà descritto come sia possibile utilizzare la carica allelica del mutante *B-raf*, studiata con reazione polimerasica a catena digitale, come marcatore di malattia in diversi momenti della gestione clinica dei pazienti con leucemia a cellule capellute.

1. LA LEUCEMIA A CELLULE CAPELLUTE

La leucemia a cellule capellute, o leucemia a tricoleucociti, è una sindrome linfoproliferativa cronica, indolente, B linfocitaria, con prevalente interessamento del midollo osseo e della milza.

La prima descrizione di questa malattia fu fatta nel 1923 ad opera di Ewald, che la definì *leukämische reticuloendotheliose*, reticoloendoteliosi leucemica (per via dell'iperplasia del tessuto reticolare a livello degli organi emopoietici, con la presenza di cellule di morfologia reticoloendoteliale – cioè monocitoide – nel sangue periferico)²¹, termine ripreso nel 1958 da Bouroncle e colleghi¹, che di tale patologia fornirono la prima descrizione analitica ed approfondita su 26 pazienti, seguiti presso la Ohio State University negli anni Cinquanta. L'iniziale casistica riportata nel 1958 è stata progressivamente ampliata fino a raccogliere 82 pazienti, seguiti per oltre 20 anni, e quindi descritta dalla stessa Bouroncle in un articolo pubblicato vent'anni più tardi²². I primi ad utilizzare la dizione di *hairy cell leukemia*, leucemia a cellule “capellute” furono tuttavia Schrek e Donnelly nel 1966, volendo in questo modo mettere in risalto l'irregolare morfologia citoplasmatica degli elementi patologici riscontrati nel sangue periferico e nel tessuto midollare².

Trattasi di una patologia rara, che rappresenta circa il 2-3% delle forme leucemiche dell'adulto negli Stati Uniti e nell'Europa occidentale, traducendosi in circa 600 nuovi pazienti diagnosticati annualmente negli Stati Uniti. L'incidenza maggiore si registra nella quinta e sesta decade di età (con una mediana di 52 anni), con una netta – e di fatto non spiegata – preponderanza del sesso maschile, tale per cui il rapporto in termini di prevalenza tra maschi e femmine risulta variabile da 3:1 a 5:1. L'incidenza appare aumentata per gli Ebrei Ashkenaziti, mentre il riscontro è assai raro negli individui di razza africana o asiatica, nonché in età pediatrica e adolescenziale.

Sono stati descritti alcuni rari casi, per lo più aneddotici, di ricorrenza della malattia in membri della stessa famiglia (fratelli e cugini primi)²³⁻²⁵.

1. Cellula di origine

Rimane ancora non ben definita la reale cellula di origine dell'elemento tricoleucocitario nell'ambito della normale filiera ontogenetica linfocitaria: è stato infatti dimostrato come il tricoleucocito sia di fatto una cellula di origine B-linfocitaria, e non un elemento di derivazione monocitaria (ovvero reticoloendoteliale) come la valutazione morfologica (citoplasma abbondante e presenza di nuclei spesso irregolari o lobati) ha di fatto inizialmente suggerito^{3,4}.

I primi studi che hanno sancito la natura linfocitaria delle cellule capellute si sono basati sulla valutazione della mobilità elettroforetica di tali cellule quando esposte a neuroaminidasi, documentandone una migrazione secondo un *pattern* distinto rispetto alle cellule di derivazione monocitaria, suggerendo in questo modo l'esistenza di una peculiare distribuzione di cariche elettriche a livello della membrana dei tricoleucociti²⁶. Successive valutazioni rivolte alla determinazione del profilo fenotipico degli antigeni di membrana hanno messo chiaramente in luce la derivazione B-linfocitaria del tricoleucocito: le cellule capellute mostrano infatti il riarrangiamento dei geni per le immunoglobuline²⁷, ed esprimono gli antigeni pan-B linfocitari CD19, CD20, CD22, nonché immunoglobuline di superficie con caratteristiche monoclonali (prevalentemente di isotipo IgG₃, sebbene altri isotipi possano essere contemporaneamente presenti²⁸⁻³¹). Gli antigeni CD11c, CD25 e CD103 sono allo stesso modo espressi, mentre mancano caratteristicamente gli antigeni CD5 e CD10.

La cellula che più delle altre può rappresentare la controparte normale del tricoleucocito è il linfocito della zona marginale del follicolo linfatico (definito linfocito monocitoide per le caratteristiche morfologiche), un linfocito maturo, post-centro germinativo, ma che ancora non ha subito la maturazione terminale in plasmacellula: ciò è dimostrato dalla presenza del riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline, anche se il livello di ipermutazioni somatiche risulta assai ridotto. Tuttavia, il riscontro di multipli isotipi di catene pesanti contemporaneamente espressi sulla superficie del tricoleucocito (fino al 40% dei casi) può far pensare ad un

meccanismo di maturazione linfocitaria indipendente dal centro germinativo, essendo permesso uno scambio di classe immunoglobulinica alternativo tra isotipi diversi (non-delezionale), e non esclusivo come avviene a livello del centro germinativo. Questo tipo di osservazioni punta a delineare la controparte normale verso un B-linfocito in grado di andare incontro ad una maturazione T-indipendente, con la possibilità cioè di operare uno scambio di classe non dipendente dall'interazione con i linfociti T presenti nel centro germinativo, e tale da poter produrre qualsiasi isotipo di immunoglobulina, non soltanto uno in particolare (con l'eccezione delle IgE, e con la predominanza dell'isotipo IgG₃³⁰). La piccola popolazione di cellule normalmente presenti e dotate di questo tipo di caratteristiche, andando incontro ad un evento oncógeno che ne vada ad alterare il fisiologico meccanismo maturativo, dà origine ad un clone neoplastico che si caratterizza per le alterazioni morfologiche, molecolari ed immunologiche tipiche della leucemia a cellule capellute.

2. Genetica e biologia molecolare

Il genoma della leucemia a cellule capellute è relativamente stabile, in assenza di traslocazioni o aberrazioni cromosomiche particolarmente frequenti. Una possibile eccezione è rappresentata dalle delezioni del braccio lungo del cromosoma 7, tuttavia riscontrabili in meno del 10% dei pazienti³²⁻³⁷. Il gene *TP53* è dimostrato deletato mediante ibridazione *in situ* a fluorescenza in una rilevante percentuale di casi³⁸⁻⁴⁰.

Nell'ambito dell'espansione clonale dei tricoleucociti gioca un ruolo fondamentale la via di segnalazione intracellulare mediata dalle proteine-chinasi attivate da mitogeni (*mitogen activated protein-kinases*, MAP-chinasi)⁴¹, che influenza sia la spinta proliferativa cellulare, sia il controllo della morte apoptotica, che tende ad essere inibita. È stata recentemente dimostrata la presenza di una mutazione a carico del gene *B-raf*, in grado di determinare l'attivazione costitutiva della proteina ad azione chinastica da esso codificata, B-Raf, con conseguente incremento dell'attività delle proteine a valle (MEK ed ERK) ed incrementata trascrizione di geni legati

al controllo della proliferazione cellulare¹⁸. La specifica mutazione descritta si concretizza con la sostituzione di una timina con una adenina in posizione 1799 a livello dell'esone 15 del gene *B-raf*, mappato sul cromosoma 7q34, traducendosi con la presenza di un residuo di acido glutammico (E) in luogo di una valina (V) al *codon* 600 (V600E).

La mutazione è presente in eterozigosi, ad eccezione di quella piccola percentuale di pazienti in cui viene perso l'allele *wild-type* a seguito della delezione di 7q (emizigosi)^{32,35}.

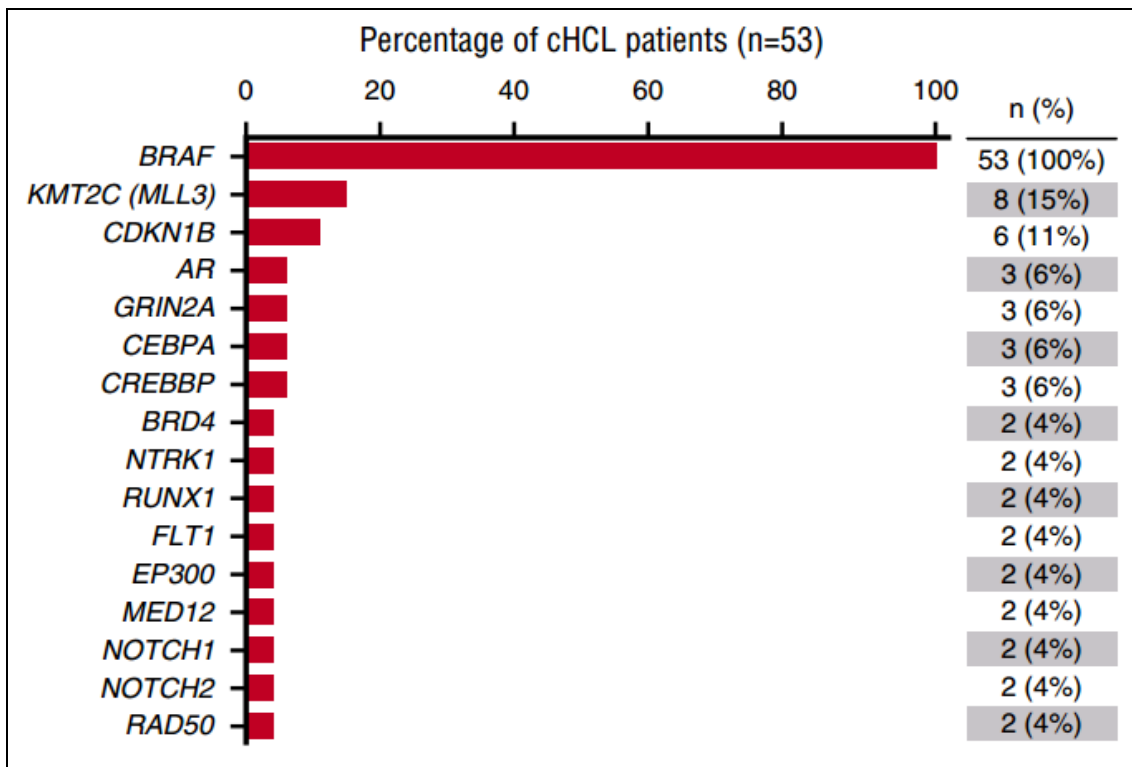
Studi successivi hanno dimostrato che la mutazione è presente nella sostanziale totalità dei casi di leucemia a cellule capellute^{37,42-46}: eccezionalmente, mutazioni non-V600E sono state descritte fino ad ora soltanto in due pazienti, entrambe a livello dell'esone 11 (F468C e D499E)⁴⁷.

In questo senso, la mutazione descritta può essere considerata la lesione genetica caratterizzante la malattia e l'evento patogenetico responsabile della leucemogenesi: è presente a livello clonale in virtualmente tutti i pazienti affetti e in maniera indipendente dalle presentazioni cliniche della malattia (con o senza leucocitosi ed in presenza di gradi variabili di splenomegalia e citopenie); è rappresentata in tutti i distretti coinvolti (sangue periferico, tessuto midollare, linfadenopatie⁴⁸, quando presenti); è riscontrabile nell'intero decorso della malattia e in tutte le sue fasi (diagnosi, ricaduta, malattia refrattaria), anche a distanza di anni dalla prima diagnosi. Infine, come verrà discusso in seguito, si tratta di una lesione specifica per la leucemia a cellule capellute, risultando di fatto assente in neoplasie ematologiche indolenti che clinicamente possono mimare questa malattia, nonché nella stessa leucemia a cellule capellute variante.

Poco si sa sulla possibile compresenza di mutazioni, diverse da quella interessante *B-raf*, che possano con essa cooperare nella genesi della malattia. Recentemente, in una coorte di 53 pazienti (prevalentemente con malattia all'esordio) è stato messo in luce, tramite un approccio di sequenziamento *target* di 585 geni frequentemente mutati in neoplasie ematologiche e tumori solidi, come le lesioni geniche più frequenti dopo le

alterazioni a carico del gene *B-raf* siano quelle interessanti i geni *KMT2C* (*MLL3*), che codifica per una metiltransferasi istonica, e *CDKN1B*, presenti rispettivamente nel 15% e nell'11% dei pazienti presi in esame (figura 1.1)³⁷.

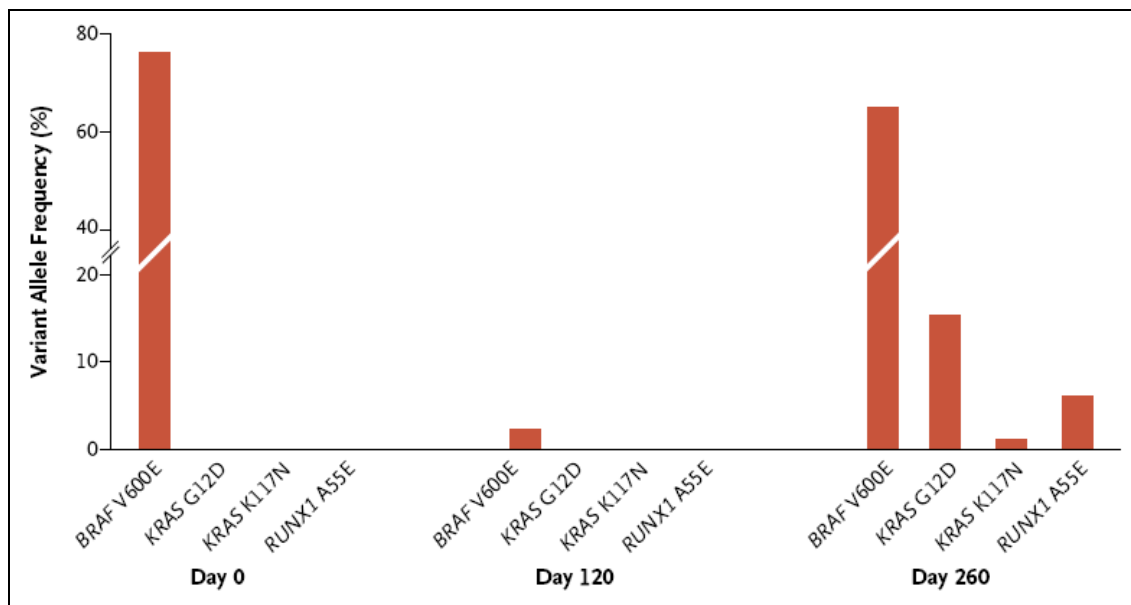
Figura 1.1 – Prevalenza delle mutazioni geniche in una coorte di 53 pazienti con leucemia a cellule capellute³⁷. Sono indicate le sole mutazioni riscontrate in almeno 2 pazienti.



Ulteriori geni mutati in questo contesto, pur riscontrati in una percentuale di casi significativamente minore, sono risultati *BRD4*, *CEBPA*, *CREBBP*, *RUNX1*, *EP300* e *MED12*, nonché *NOTCH1* e *NOTCH2* e alcuni geni implicati nei meccanismi di riparo del DNA (*RAD50*)³⁷. Mutazioni a carico di *K-Ras* (K117N) sono infine state descritte in un paziente risultato refrattario alla terapia con inibitore di B-Raf, vemurafenib, probabilmente in relazione allo sviluppo di resistenza al farmaco (figura 1.2 a pag. 14), in associazione alla mutazione di *RUNX1* (A55E)²⁰. Non esistono tuttavia dati riguardanti l'assetto genomico (e la possibile evoluzione clonale della malattia) in pazienti con leucemia a cellule capellute che mostrino nel

tempo plurime ricadute o risultino refrattari alla terapia con inibitori della via delle MAP-chinasi.

Figura 1.2 – L'assetto mutazionale pre- e post-terapia con inibitore di B-Raf (vemurafenib) in un paziente risultato refrattario al trattamento²⁰. Il saggio è stato eseguito su cellule mononucleate ottenute da sangue periferico.



Il ruolo biologico della via di segnalazione delle MAP-chinasi e il significato clinico proteina B-Raf V600E-mutata nella leucemia a cellule capellute sono descritti in maggiore dettaglio nel capitolo 2.

3. Aspetti clinici

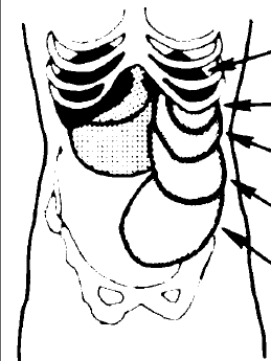
All'esordio della malattia, i pazienti si presentano tipicamente con citopenie periferiche (caratteristicamente con monocitopenia e linfocitosi relativa) e splenomegalia, ed è documentabile la presenza di cellule capellute circolanti nel sangue periferico, in maniera variabile⁴⁹. In almeno metà dei pazienti è presente una pancitopenia, che sul piano clinico si può tradurre con astenia e affaticamento, correlabili a diversi gradi di anemia, ecchimosi diffuse, secondarie alla piastrinopenia, infezioni ricorrenti e di tipo opportunistico (spesso fatali), come conseguenza di una neutropenia profonda e duratura^{22,50}.

La splenomegalia è un segno clinico pressoché costante nei pazienti con leucemia a cellule capellute (figura 1.3)^{22,49}, riflettendo l'infiltrazione di quest'organo da parte del tessuto leucemico. In almeno un quarto dei casi è presente una sintomatologia correlabile all'ingombro splenico addominale, caratterizzata da sazietà precoce, dispepsia, senso di peso o dolore gravativi in ipocondrio sinistro. In molti casi, è il riscontro casuale, in relativo pieno benessere, di una splenomegalia isolata che porta il paziente all'attenzione medica, con messa in luce solo in un secondo momento, nel sangue periferico, delle citopenie che caratterizzano la patologia.

La rottura spontanea della milza, sebbene aumentata di volume, è in realtà un'evenienza alquanto rara, ma tale da richiedere un trattamento urgente: particolare attenzione in termini di presa in considerazione di un trattamento profilattico con splenectomia deve essere riservata ai pazienti splenomegalici con concomitante severa piastrinopenia e fenomeni emorragici attivi.

Figura 1.3 – L'interessamento viscerale nella leucemia a cellule capellute²².

<u>Organ enlargement</u>	<u>Spleen</u>	<u>Liver</u>	<u>Lymph nodes</u>	<u>Skin infiltration</u>
Normal	7%	60%	77%	94%
Slightly	7	21	12	5
Moderately	33	13	11	1
Markedly	26	6		
Tremendously	27			



Più raro è l'interessamento linfonodale a carattere infiltrativo da parte delle cellule capellute: tuttavia, se da un lato è assai poco comune il riscontro di linfonodi superficiali aumentati di volume, e come tali palpabili, d'altro canto è possibile documentare con esami di diagnostica ecografica o tomografica la presenza di adenopatie profonde (particolarmente in sede addominale) dimensionalmente ragguardevoli in almeno un terzo dei pazienti^{48,51,52}.

Manifestazioni cliniche collaterali sono rappresentate dalle patologie autoimmuni, tra cui l'anemia emolitica da anticorpi caldi e le sindromi vasculitiche⁵³⁻⁵⁶; sono state descritte ed osservate anche lesioni ossee a carattere litico, come pure la presenza di lesioni extramidollari determinate da un'insolita infiltrazione tricoleuocitaria di altri tessuti.

L'associazione di questa patologia con un aumentato rischio di sviluppo di seconde neoplasie, inclusa la possibilità di ammalarsi di una patologia linfoproliferativa secondaria, non è attualmente ben chiarito⁵⁷.

4. Laboratorio

Alla valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico, gli elementi patologici (delle dimensioni tra 10-25 µm) si caratterizzano per la presenza di un nucleo eccentrico o centrale, di forma circolare, ovale, o più frequentemente reniforme o convoluta; la cromatina è a zolle, reticolare; il citoplasma è abbondante, lievemente basofilo, generalmente privo di granuli e dotato di fini propaggini filamentose che si dispongono in maniera circonferenziale (incostanti e talora assenti in funzione della porzione di striscio che viene osservata). Occasionalmente è possibile riconoscere inclusioni citoplasmatiche o strutture granulari che corrispondono ai complessi ribosomiali lamellari che ben si osservano all'osservazione in microscopia elettronica (figure 1 e 2 fuori testo)^{22,58}.

Il citoplasma della cellula capelluta contiene l'isoenzima 5 della fosfatasi acida, che resiste alla decolorazione operata dall'acido tartarico: le cellule patologiche pertanto mostrano una specifica positività alla colorazione per la fosfatasi acida tartrato-resistente (*tartrate-resistant acid phosphatase*, TRAP). Una colorazione per la TRAP che coinvolga almeno due cellule con almeno 40 granuli, o con molti granuli disposti a mascherare il nucleo cellulare è tipicamente diagnostica per leucemia a cellule capellute (figura 3 fuori testo)^{59,60}.

A livello immunofenotipico, le cellule capellute mostrano una positività per gli antigeni pan-B linfocitari CD19, CD20 e CD22; manca l'espressione del CD21. Inoltre, esse coesprimono il CD11c, il CD25 e il CD103:

quest'ultimo antigene mostra la maggiore sensibilità e specificità diagnostica. Il CD10 e il CD5 risultano espressi soltanto nel 26% e nel 5% dei casi, rispettivamente, ed in maniera comunque assai debole.

Il profilo immunofenotipico risulta differente nelle forme varianti di leucemia a cellule capellute, che sono discusse in maggiore dettaglio nel paragrafo 12 di questo capitolo.

5. Anatomia patologica

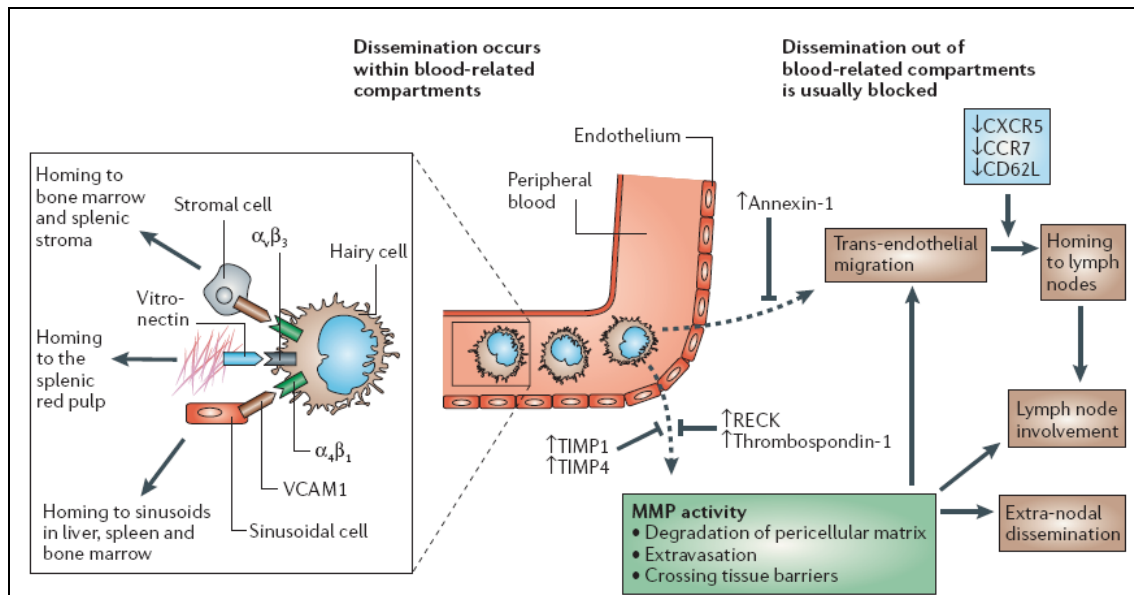
Il modello di infiltrazione tissutale da parte delle cellule capellute, che si caratterizza per il costante interessamento del midollo osseo, della milza e del fegato, e solo in minore misura dei linfonodi e dei siti extranodali, dipende strettamente dall'espressione sulla membrana cellulare delle integrine $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$, i cui ligandi sono rappresentati rispettivamente da VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) e dalla vitronectina. L'interazione tra queste molecole permette ai tricoleucociti di migrare dal torrente ematico allo stroma midollare e splenico, alla polpa rossa della milza e agli spazi perisinusoidali nel fegato, nella milza e nel midollo.

L'iperespressione di TIMP1 e TIMP4 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1 e 4*) e della trombospondina-1, che agiscono in qualità di inibitori delle metalloproteinasi (di quegli enzimi, cioè, che favoriscono il superamento delle membrane basali sottoendoteliali e l'invasività metastatica delle cellule tumorali), probabilmente contribuisce a determinare la scarsa propensione dei tricoleucociti ad invadere i compartimenti extravascolari, quali i linfonodi e gli spazi extranodali. L'annessina A1, abbondantemente espressa dagli elementi neoplastici, sembra a sua volta bloccare la diapedesi transendoteliale (figura 1.4 a pagina 18)⁶¹.

A piccolo ingrandimento, l'infiltrato midollare tricoleucocitario ha una distribuzione interstiziale o diffusa (figura 4 fuori testo), e non risulta organizzato in aggregati linfoidi come avviene nella maggior parte delle neoplasie linfocitarie a piccoli linfociti. Alla diagnosi, il midollo appare per lo più ipercellulato, anche se in una minor percentuale di casi può essere francamente ipocellulato (tale da mimare un'aplasia midollare, figura 5

fuori testo) e caratterizzato da un fine infiltrato interstiziale non visualizzabile alle colorazioni di routine. A maggiore ingrandimento, le cellule capellute appaiono di morfologia circolare, monomorfe, con nuclei ovali, indentati od occasionalmente convoluti, in un abbondante citoplasma, poco tingibile o lievemente rosato, che mantiene i nuclei ben separati e tra loro equidistanti, contribuendo a determinare il classico aspetto “a uovo fritto” (figura 6 fuori testo). Le proiezioni citoplasmatiche non sono generalmente evidenti alle colorazioni standard in ematossilina-eosina.

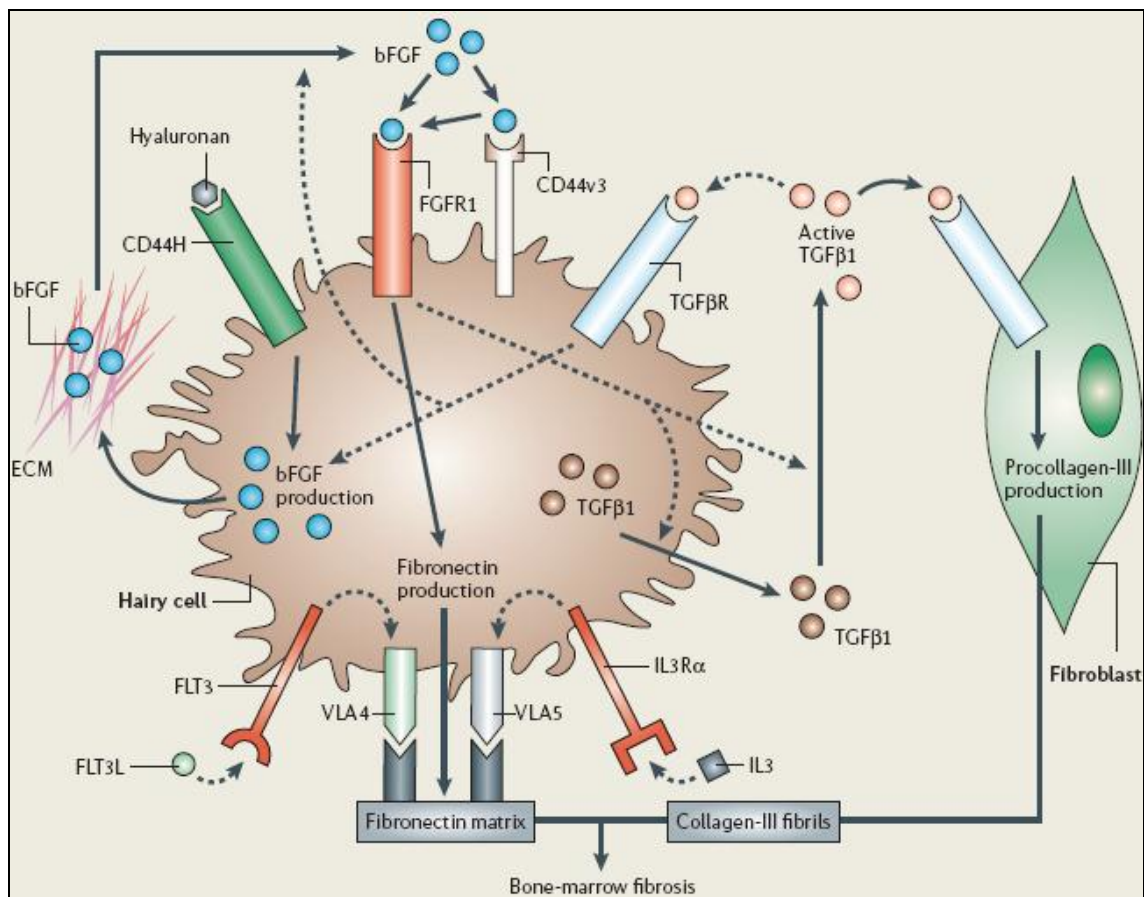
Figura 1.4 – Le caratteristiche di disseminazione e migrazione dei tricoleucociti⁶¹.



La quota di emopoiesi residua è variabile, pur documentandosi generalmente una riduzione della filiera mieloide, spesso in associazione ad un’ aumentata quota di elementi plasmacellulari o mastocitari. Gli elementi emopoietici, inoltre, possono manifestare un grado variabile di displasia. Tali alterazioni quantitative e morfologiche dell’emopoiesi residua sono determinate in maniera diretta dall’ infiltrato sostitutivo (tramite la sostituzione del normale parenchima emopoietico e la distruzione del microambiente midollare normale), o indirettamente tramite la secrezione di citochine, tra cui il *transforming growth factor-β* (TGF-β)⁶².

Nella quasi totalità dei casi è documentabile un ispessimento della trama fibrosa midollare (responsabile della scarsa aspirabilità del midollo osseo al mieloaspirato), secondaria alla produzione di una matrice di fibronectina da parte delle cellule tumorali e alla deposizione di fibre reticoliniche da parte dei fibroblasti midollari (figura 7 fuori testo). La sintesi di fibronectina è promossa dalla secrezione autocrina di fattore di crescita fibroblastico basilico (*basic fibroblast growth factor*, bFGF), che stimola il proprio recettore (FGFR1) e la molecola CD44v3 di superficie. Una volta sintetizzata e deposta nell'ambiente extracellulare, le cellule capellute aderiscono alla fibronectina mediante l'attivazione delle molecole di superficie VLA4 e VLA5. In parallelo, la secrezione di TGF- β da parte del clone neoplastico determina l'attivazione dei fibroblasti midollari, che vengono indotti a produrre collagene (figura 1.5). Non si osserva, diversamente da quanto accade nella mielofibrosi, l'iperplasia dei fibroblasti⁶¹.

Figura 1.5 – La fibrosi midollare nella leucemia a cellule capellute⁶¹.



L'interessamento splenico è pressoché costante; macroscopicamente, la milza si presenta marcatamente ingrandita, con un peso superiore al chilogrammo ed una superficie liscia e di color rosso scuro. La polpa rossa risulta maggiormente infiltrata rispetto alla polpa bianca, che diviene atrofica; le cellule neoplastiche esibiscono una morfologia sovrapponibile a quanto riscontrato a livello del midollo osseo, ed aderiscono alle pareti dei sinusoidi splenici determinandone la lisi e la creazione di piccole aree di microemorragia (definite pseudoseni). Quasi del tutto assente l'emopoiesi extramidollare: la splenomegalia è pertanto secondaria all'infiltrazione tumorale piuttosto che alla metaplasia mieloide, come si osserva invece nella mielofibrosi (figura 8 fuori testo)⁶³.

Anche l'interessamento epatico è relativamente frequente, manifestandosi con epatomegalia di grado variabile almeno nel 40% dei casi. Le cellule capellute tendono a localizzarsi in piccoli aggregati a livello dei sinusoidi epatici e degli spazi portali; anche in quest'organo è possibile riscontrare la presenza di piccole aree emorragiche.

A livello linfonodale, le cellule capellute si dispongono in sede paracorticale, circondando i centri germinativi, in maniera molto simile a quanto avviene nel linfoma della zona marginale.

In immunohistochimica, le cellule capellute risultano positive per il CD20 e il CD79a: tali markers sono in grado di mettere in evidenza molte più cellule neoplastiche di quanto osservabile con la sola colorazione standard. Il DBA.44 è un marcatore sensibile e relativamente specifico per le cellule capellute, ed è in grado di mostrare le propaggini citoplasmatiche caratteristiche di queste cellule; tuttavia, non sempre è in grado di far risaltare l'intera quota di cellule tumorali. La ciclina D1 risulta iperespressa; la reazione immunohistochimica è tuttavia di lieve entità, con carattere focale, diversamente da quanto osservato nel linfoma mantellare. In considerazione, infine, della marcata espressione del gene per l'annessina A1 (*ANXA1*), è stato sviluppato uno specifico anticorpo monoclonale rivolto verso la proteina da esso codificata, ottenendo in questo modo una marcatura sensibile e specifica per la diagnosi (figure 9-10 fuori testo)^{62,63}.

6. Quando iniziare la terapia

Una buona parte dei pazienti con diagnosi di leucemia a cellule capellute non richiede un trattamento immediato: in almeno un quarto dei casi essi sono asintomatici e talora le citopenie riscontrate non sono tali da impattare in maniera significativa sulla cenestesi, sul rischio infettivo o sulla possibile insorgenza di complicanze emorragiche⁶⁴⁻⁶⁶.

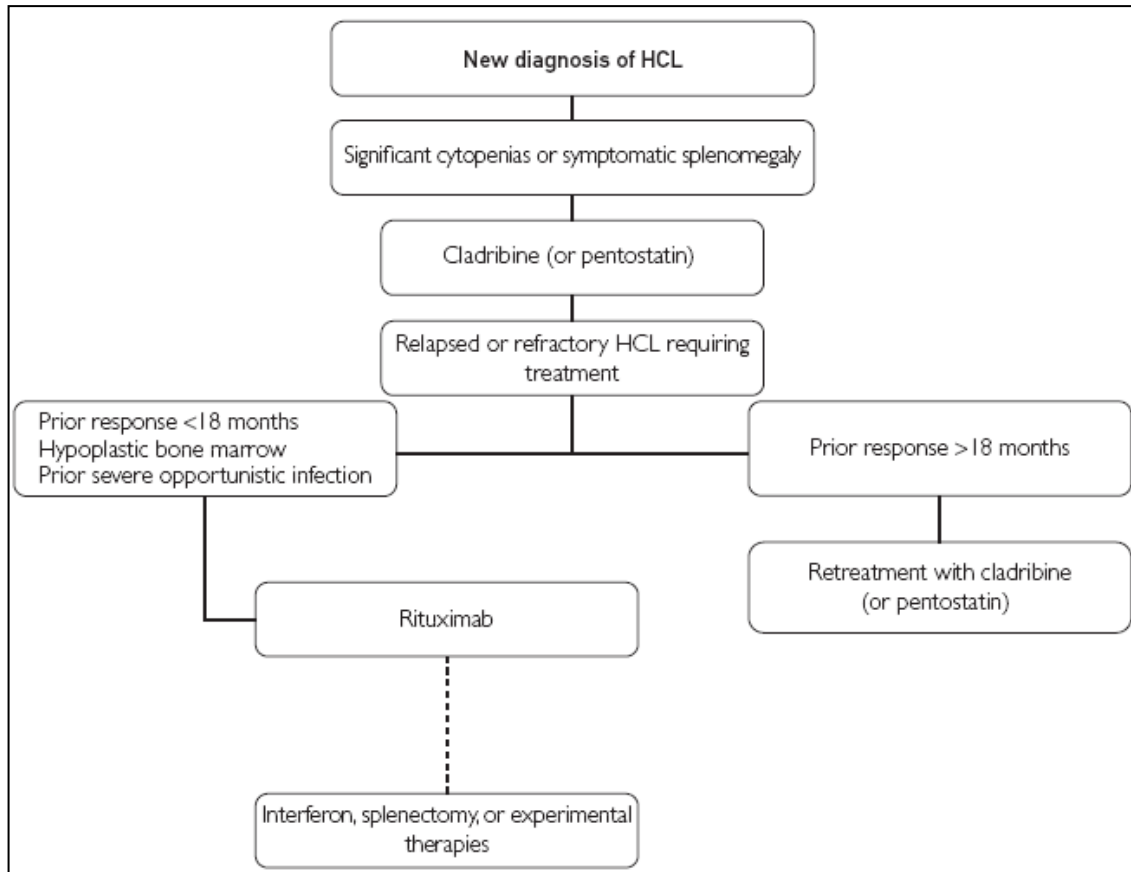
Il monitoraggio clinico e laboratoristico iniziale permette di individuare i pazienti che manifestano un progressivo deterioramento della conta periferica di neutrofili e piastrine e della concentrazione di emoglobina, distinguendoli da coloro i quali mantengono invece un profilo emocromocitometrico accettabile e assolutamente sicuro. Nel primo caso, o qualora si dovesse assistere alla comparsa di una sintomatologia clinica caratterizzata da astenia, affaticamento, ingombro addominale o sindrome dispeptica causata dalla splenomegalia, è importante prendere in considerazione la messa in atto della più appropriata terapia di prima linea. Tale terapia deve essere impostata in anticipo rispetto ad un severo declino dei valori ematologici periferici: questo poiché l'impiego degli analoghi purinici può in un primo tempo peggiorare le citopenie già osservate^{64,65}.

Allo stato attuale, è difficile enucleare dei criteri univoci e standardizzati sulla base dei quali impostare il trattamento di attacco: è sicuramente vero, comunque, che la presenza dei sintomi clinici e dei segni dell'insufficienza midollare giustifica l'inizio della terapia. I pazienti anemici, con concentrazione di emoglobina inferiore a 10 g/dL, i piastrinopenici (piastrine inferiori a 100.000/mmc) e i granulocitopenici (conta assoluta di neutrofili inferiore a 1.000/mmc) sono candidati alla terapia (figura 1.6)⁶⁴.

La valutazione midollare mediante biopsia osteomidollare è necessaria – oltre che per porre diagnosi – per valutare il grado di cellularità prima del trattamento. I pazienti con midollo ipocellulare possono richiedere una riduzione della dose iniziale di analogo purinico, oppure avere una controindicazione assoluta all'impiego dello stesso: questo per evitare il rischio di una mielosoppressione profonda ed eccessivamente prolungata

durante trattamento, con il conseguente incremento delle complicanze correlate alla citopenia.

Figura 1.6 – Algoritmo di trattamento⁶⁶.



Nel paziente che si presenta all'esordio con una manifestazione infettiva, il primo passo terapeutico consiste nel mettere in atto il trattamento antimicrobico più adeguato. In parallelo, tuttavia, risulta fondamentale impostare delle misure terapeutiche che favoriscano una rapida crescita della conta periferica di neutrofilo, necessaria per contrastare l'infezione (che nel paziente granulocitopenico può divenire letale). La prima scelta terapeutica in questo contesto può essere rappresentata dall' α -interferone (sostanzialmente l'unica indicazione attuale all'impiego di questo farmaco), in grado di indurre un iniziale recupero granulocitario, passando poi in seguito – una volta controllata l'infezione – all'impostazione di un trattamento con analoghi purinici⁶⁵. L'impiego del fattore di crescita granulocitario, inoltre, costituisce un'importante misura terapeutica di

supporto da prendere in considerazione nel paziente severamente granulocitopenico ed infetto.

7. Criteri di risposta al trattamento

La risposta clinica a qualsivoglia trattamento attivo sulla malattia viene classificata in quattro categorie, definite risposta completa, risposta parziale, risposta minore e non risposta. L'entità della risposta ematologica è valutata sia sul sangue periferico, in termini di miglioramento o normalizzazione delle citopenie presenti alla diagnosi, sia a carico del midollo osseo mediante biopsia osteomidollare: a questo livello viene determinata la percentuale di infiltrato tricoleucocitario residuo in rapporto alla cellularità tramite studio al microscopio ottico e con colorazione in ematossilina-eosina (o eventualmente in Giemsa). La valutazione immunohistochimica (CD20, ANXA1, DBA.44, PAX5, quest'ultimo con finalità di marcatore delle cellule di linea B-linfocitaria) non fa parte dei criteri attualmente in uso (e validati) per stabilire la profondità della risposta. Accanto alla determinazione della risposta sul piano ematologico, viene inoltre presa in considerazione la variazione dimensionale delle organomegalie, in particolare della splenomegalia. Sulla base della combinazione dei dati clinico-obiettivi, ematologici e morfologici viene assegnata la più idonea categoria di risposta.

I criteri di risposta (denominati criteri *Consensus Resolution*), codificati nel 1987 ed ancora oggi applicati, sono di seguito riportati⁶⁷.

7.1 Risposta completa

Rientrano in questa categoria i pazienti per i quali, dopo terapia, si ha una regressione completa delle organomegalie, con ritorno a dimensioni normali di milza e fegato, e una risposta ematologica completa nel sangue periferico, con emoglobina ≥ 12 g/dL, piastrine $> 100.000/\text{mmc}$ e conta di neutrofili $> 1.500/\text{mmc}$. In aggiunta, non devono essere riscontrate cellule capellute circolanti nel sangue periferico e nel sangue midollare (quando è possibile eseguire il mieloaspirato). Alla biopsia osteomidollare, non

devono essere messe in evidenza cellule capellute. Non rientra nei criteri di risposta, ma è meritevole di segnalazione al momento della refertazione dell'esame midollare, la presenza di una riduzione (ovvero la persistenza) della fibrosi midollare.

7.2 Risposta parziale

Rientrano in questa categoria i pazienti per i quali si osserva una riduzione delle organomegalie di almeno il 50% rispetto alle dimensioni registrate alla diagnosi. È raccomandato esprimere le dimensioni degli organi aumentati di volume in centimetri, partendo dal margine costale di riferimento per quanto riguarda fegato e milza, ovvero registrando il maggiore dei diametri per quanto riguarda linfonodi o altre masse extranodali.

In aggiunta, è necessario ottenere sul piano ematologico periferico la normalizzazione di tutte le citopenie (vedi risposta completa), in presenza di cellule capellute circolanti $\leq 5\%$ dei leucociti. A livello midollare, deve essere documentata una riduzione dell'infiltrato pari ad almeno il 50% della cellularità.

7.3 Risposta minore

Richiede la riduzione della conta di cellule capellute circolanti di almeno il 50% rispetto a quanto documentato alla diagnosi, oppure il miglioramento ematologico in almeno uno dei seguenti parametri: emoglobina, piastrine, conta periferica dei neutrofili, numero di cellule capellute circolanti.

7.4 Non risposta

Si configura tale il non ottenimento di una risposta minore.

7.5 Malattia midollare residua

Non esiste attualmente un consenso nello stabilire quale sia la quota di infiltrato leucemico nel midollo osseo tale da designare univocamente lo stato di malattia midollare residua: appare ragionevole una classificazione che, in presenza di un'adeguata valutazione immunoistochimica (basata

essenzialmente sulla messa in evidenza della CD20 e della DBA.44-positività) eseguita su almeno 500 cellule in tre diversi campi, suddivide la risposta midollare in⁶⁸:

- *risposta completa*: assenza di cellule capellute residue;
- *malattia minima residua*: presenza di $\leq 1\%$ di cellule capellute residue in immunistochimica;
- *residuo di malattia*: presenza di $> 1\%$ di cellule capellute residue alla valutazione immunistochimica.

Tali criteri si applicano pur in presenza di una risposta completa a livello ematologico periferico, splenico, epatico e linfonodale.

La citometria a flusso (che valuti l'espressione di CD20, CD25, CD11c, CD103) e la determinazione molecolare del *burden* allelico di *B-raf*^{V600E} (tramite reazione polimerasica a catena^{44,69,70}, pirosequenziamento^{71,72} o *high-resolution melting analysis*^{45,73}) rappresentano entrambe possibili metodiche di studio della malattia residua, sia su sangue midollare sia su sangue periferico. Non esistono tuttavia valori soglia codificati per stabilire la profondità della risposta e il significato clinico del risultato, come pure risulta attualmente difficile comparare il dato ottenuto in citometria a flusso con quanto rilevato mediante metodiche molecolari⁷⁴.

8. La terapia di prima linea con analoghi purinici

8.1 Pentostatina

La pentostatina, o 2'-desossicoformicina (dCF), è prodotta dal batterio *Streptomyces antibioticus* ed agisce come potente inibitore dell'enzima adenosina deaminasi (ADA)⁷⁵. Questo enzima è coinvolto nel catabolismo dei nucleotidi purinici, determinando la deaminazione dell'adenosina-desossiribosio e la successiva formazione di inosina-desossiribosio, primo metabolita della via biosintetica dell'acido urico. L'inibizione irreversibile dell'ADA porta all'accumulo intracellulare di desossiadenosin-trifosfato (dATP), che a sua volta inibisce l'enzima ribonucleotide reduttasi (che catalizza la formazione di desossiribonucleotidi a partire da ribonucleotidi di- e trifosfato), con successivo blocco della sintesi di DNA e

deregolazione dei meccanismi del riparo. Come conseguenza, si assiste all'attivazione di TP53 e al rilascio del citocromo *c* dai mitocondri, in questo modo iniziando la cascata apoptotica⁷⁶.

Introdotta in clinica come primo analogo purinico per il trattamento della leucemia linfatica cronica, la prima esperienza nell'ambito della leucemia a cellule capellute risale al 1984, pubblicata da Spiers e collaboratori¹⁰. In tale contesto, è stata descritta l'azione del farmaco su due pazienti non precedentemente trattati e severamente citopenici, nei quali si è osservata una rapida scomparsa delle cellule capellute dal torrente circolatorio, una regressione della splenomegalia e la correzione progressiva dell'anemia, della neutropenia e della piastrinopenia, ottenendo una remissione completa (documentata a livello midollare) in entrambi i casi, della durata di 6 e 9 mesi dal termine del trattamento⁷⁷.

I principali studi in pazienti con leucemia a cellule capellute nei quali è stata applicata la pentostatina^{14,15,78,79} hanno registrato tassi di risposta globale superiori al 90%, con risposte mantenute ad almeno 10 anni in circa il 70% dei casi, ed un'incidenza di risposte complete fino all'82%. La lunga durata dei periodi di osservazione riportati in letteratura suggerisce come la pentostatina sia efficace nel far perdurare risposte ematologiche di buona qualità, peraltro con un'efficacia che si mantiene qualora nuovamente utilizzata in caso di malattia in ricaduta.

La pentostatina viene generalmente somministrata per via endovenosa al dosaggio di 4 mg/m² ogni 14 giorni fino all'ottenimento di una risposta completa (o della migliore risposta clinica); successivamente vengono somministrate una o due dosi di consolidamento, allo stesso dosaggio. In caso di severa neutropenia o di manifestazioni infettive ricorrenti, è raccomandato ritardare la somministrazione dei cicli successivi.

Il trattamento con pentostatina è solitamente ben tollerato, pur potendosi osservare mielosoppressione ed immunosoppressione (in maniera tuttavia meno marcata rispetto a quanto osservato con la cladribina, vedi oltre), quest'ultima secondaria ad una riduzione della conta di linfociti B e T. I più comuni effetti avversi correlati al trattamento sono: nausea, vomito, congiuntivite, *rash* cutaneo e reazioni di fotosensibilizzazione. Di

particolare importanza gli effetti avversi sul piano cardiovascolare, primi tra tutti le aritmie (extrasistolia, blocchi atrio-ventricolari) e l'esacerbazione di episodi anginosi.

Risulta controindicato un trattamento con pentostatina in presenza di un'importante compromissione della funzionalità renale (*clearance* della creatinina < 60 mL/min o creatinina sierica > 1,5 mg/dL), essendo il farmaco escreto principalmente tramite questa via. Tuttavia, per valori di *clearance* della creatinina compresi tra 40 e 60 mL/min, è possibile ridurre la dose a 2 mg/m². In ogni caso, la funzionalità renale deve essere monitorata attentamente per l'intera durata del trattamento, favorendo un'adeguata idratazione del paziente in concomitanza di ogni singola somministrazione endovenosa⁶⁵.

8.2 Cladribina

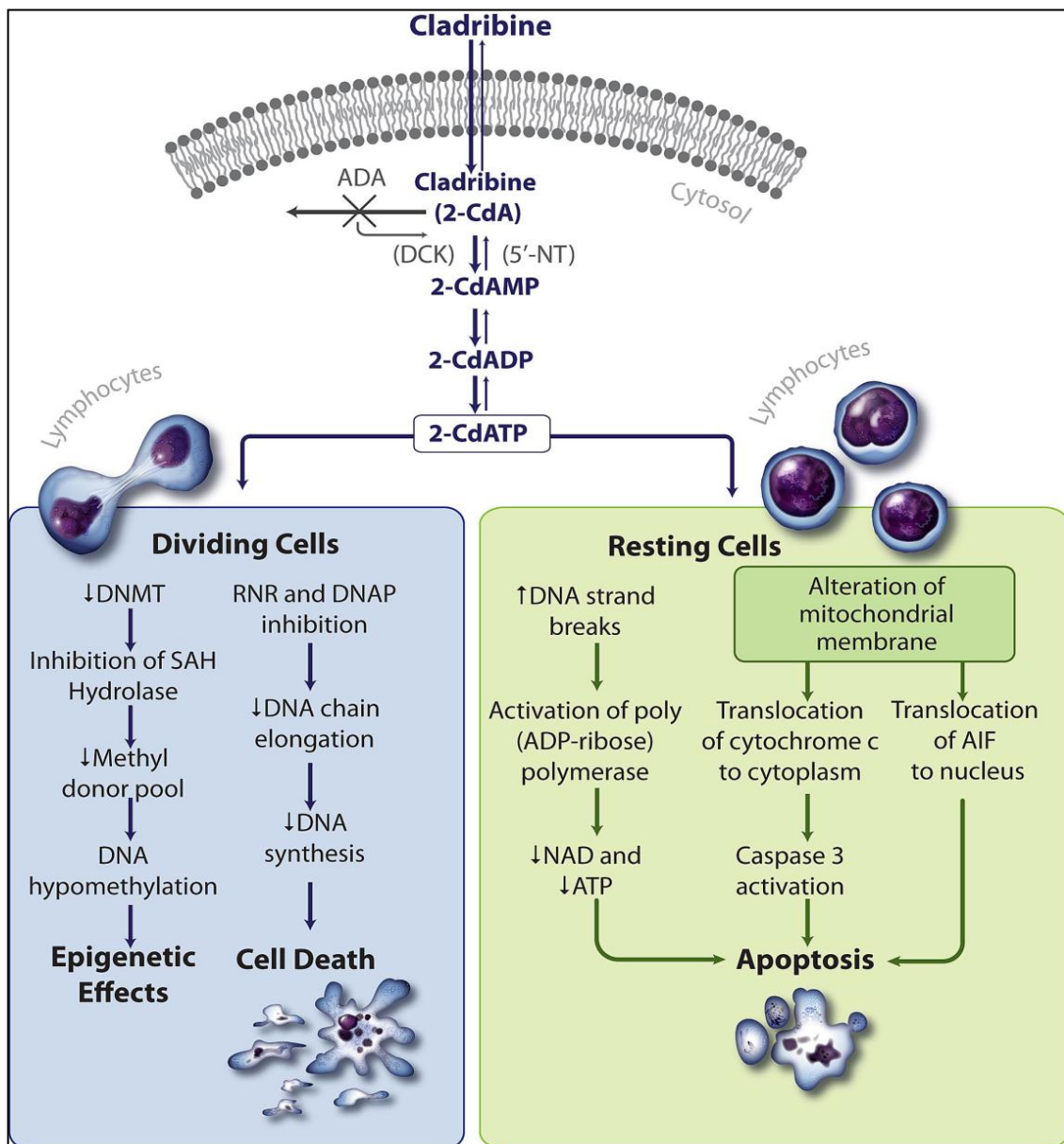
Introdotta come secondo analogo purinico dopo la pentostatina, la cladribina (2-clorodesossiadenosina o 2-CdA) rappresenta attualmente il farmaco chemioterapico di prima scelta nei pazienti affetti da leucemia a cellule capellute all'esordio.

La cladribina risulta resistente all'azione di degradazione esercitata dall'adenosina deaminasi intracellulare, pertanto tende ad accumularsi a livello intracitoplasmatico, dove viene fosforilata nella sua forma attiva, cladribina-trifosfato (2-CdATP), ad opera dell'enzima deossicitidina chinasi (DCK)⁸⁰.

La 2-CdATP esercita il proprio effetto a livello delle cellule linfocitarie e monocitarie, particolarmente ricche dell'enzima CDK (figura 1.7 a pag. 28). A carico delle cellule ciclanti, la 2-CdATP esercita un danno diretto al DNA, sia venendo incorporata come base azotata aberrante, determinando un'interruzione del processo di allungamento del filamento, sia inibendo in maniera diretta l'azione dell'enzima DNA-polimerasi e dei meccanismi del riparo. In parallelo, è stata descritta la capacità di 2-CdATP di inibire l'enzima S-adenilomocisteina (SAH) idrolasi, riducendo in questa maniera il *pool* di radicali metilici intracellulari e determinando un minor tasso di metilazione del DNA (mediando in questo modo tutta una serie di effetti

epigenetici). A carico delle cellule non ciclanti, la 2-CdATP determina alterazioni della struttura della membrana mitocondriale interna, con rilascio nel citoplasma del citocromo *c* e del fattore apoptotico attivante le proteasi (*apoptotic protease-activating factor*, APAF), con conseguente attivazione della caspasi 3 e messa in moto della cascata apoptotica⁸⁰⁻⁸².

Figura 1.7 – Meccanismo d’azione della cladribina a livello delle cellule linfocitarie ciclanti e delle cellule quiescenti⁸².



La prima segnalazione dell’efficacia della cladribina nei pazienti con leucemia a cellule capellute è del 1990, ad opera di Piro e collaboratori¹¹:

essi hanno dimostrato come un singolo ciclo di trattamento endovenoso in infusione continua per 7 giorni consecutivi fosse in grado di indurre una risposta in tutti i 12 pazienti arruolati nello studio, con un tasso di risposta completa del 91,7%, come evidenziato dalla completa normalizzazione del quadro ematologico periferico e dalla scomparsa dell'infiltrato tricoleucocitario midollare. Nessuno dei pazienti arruolati ha mostrato una ricaduta di malattia, ad un *follow-up* mediano di 15,5 mesi, raggiungendo ragguardevoli durate di risposta (la più lunga di 3,8 anni).

Numerosi sono gli studi che hanno provato l'efficacia della cladribina nei pazienti con leucemia a cellule capellute all'esordio o in ricaduta^{14,15,83-89}: un singolo ciclo, corrispondente alla somministrazione del farmaco per 5 o 7 giorni consecutivi, è in grado di determinare una risposta clinica nell'87-100% dei casi, permettendo tassi di risposte complete superiori all'85%, con sopravvivenza libera da progressione variabile dal 72 all'84% a 5 anni, e sopravvivenza globale del 75-87% a 10 anni.

La ripetizione del trattamento con cladribina è possibile nei pazienti in ricaduta, purché sia intercorso un congruo periodo di tempo dal trattamento precedente e non vi sia un'importante ipoplasia midollare che incrementi nel paziente il rischio di profonda mielosoppressione iatrogena. Anche impiegata in seconda o terza linea, la cladribina consente di ottenere tassi di risposta globale ragguardevoli (92-100%), con risposte complete fino al 69% dei casi, ottenendo una sopravvivenza libera da progressione mediana di 9 anni alla prima ricaduta e di 6,5 anni alla seconda ricaduta^{14,15,84,85,87}. La qualità della risposta ottenuta è un chiaro fattore predittivo dell'*outcome* a lungo termine.

Esistono diverse modalità d'impiego della cladribina, che ne permettono l'utilizzo seguendo diversi schemi e differenti vie di somministrazione. Non esiste una linea guida che propenda in favore dell'una o dell'altra modalità, che allo stato dell'arte possono essere ritenute equivalenti in termini di efficacia e di eventi avversi. Lo schema posologico maggiormente utilizzato consiste nell'infusione continua per 7 giorni al dosaggio di 0,1 mg/kg/die; in alternativa, può essere impiegata un'infusione breve (2 ore), per 5 giorni consecutivi, alla dose di 0,14

mg/kg/die, oppure il frazionamento della dose somministrando il medesimo dosaggio (con le medesime modalità di infusione) una volta alla settimana per 5-7 settimane consecutive⁸⁸. La somministrazione sottocutanea di cladribina, recentemente messa a punto, alla dose di 0,1 mg/kg/die (per 5 o 7 giorni) è ugualmente efficace, mostra una ridotta incidenza di eventi infettivi e migliora la compliance del paziente⁸⁹⁻⁹¹.

Il trattamento con cladribina è generalmente ben tollerato; gli effetti avversi principali sono la mielosoppressione, con pancitopenia, la nausea, il vomito e la diarrea, la comparsa di eruzioni cutanee⁹² e l'insorgenza di episodi infettivi. Questi ultimi si verificano in massima parte nel corso dei primi cicli di trattamento (30-50% i picchi di incidenza registrati)⁹³, in corrispondenza della più profonda neutropenia (correlata alla malattia ed aggravata dal trattamento appena iniziato). Rara l'incidenza di infezioni opportunistiche, che si verificano in relazione ad una concomitante depressione dei bracci B e T linfocitario della risposta immune^{50,81}. Reazioni febbrili sono documentate nel 40-69% dei pazienti, come conseguenza di un rilascio citochinico. Episodi di tossicità renale e neurologica, dose-dipendenti, sono stati documentati in maniera occasionale⁸⁰.

9. Immunoterapia

9.1 Rituximab

La marcata positività per il CD20 delle cellule leucemiche fornisce il razionale d'impiego per l'anticorpo monoclonale anti-CD20, rituximab. Le esperienze riguardanti il rituximab nell'ambito della leucemia a cellule capellute prendono in esame piccoli gruppi di pazienti, sia all'esordio, sia pretrattati⁹⁴⁻¹⁰²: il dosaggio impiegato è di 375 mg/m², con somministrazioni settimanali per un totale di 4-8 cicli. È dimostrato che il rituximab, utilizzato come agente singolo, è in grado di determinare tassi di risposta completa variabili tra il 10 e il 60%^{94-97,100}, che possono essere aumentati fino al 100% quando viene messa in atto la combinazione dell'anticorpo monoclonale con un analogo purinico, in maniera

equivalente sia che si tratti della cladribina, sia della pentostatina^{98,99,101,102} (strategia che permette, inoltre, di ottenere elevati tassi di negativizzazione della malattia minima residua, superiori al 90%).

Non esistono dati conclusivi che raccomandino l'impiego del rituximab in prima linea o in un contesto di malattia già sottoposta a precedente trattamento; allo stesso modo, non sono univocamente stabiliti né la posologia (4 infusioni settimanali consecutive, piuttosto che 6 od 8 cicli) né la modalità di somministrazione (in maniera simultanea, ovvero sequenziale, a distanza di 6 mesi) quando utilizzato in associazione ad un analogo purinico.

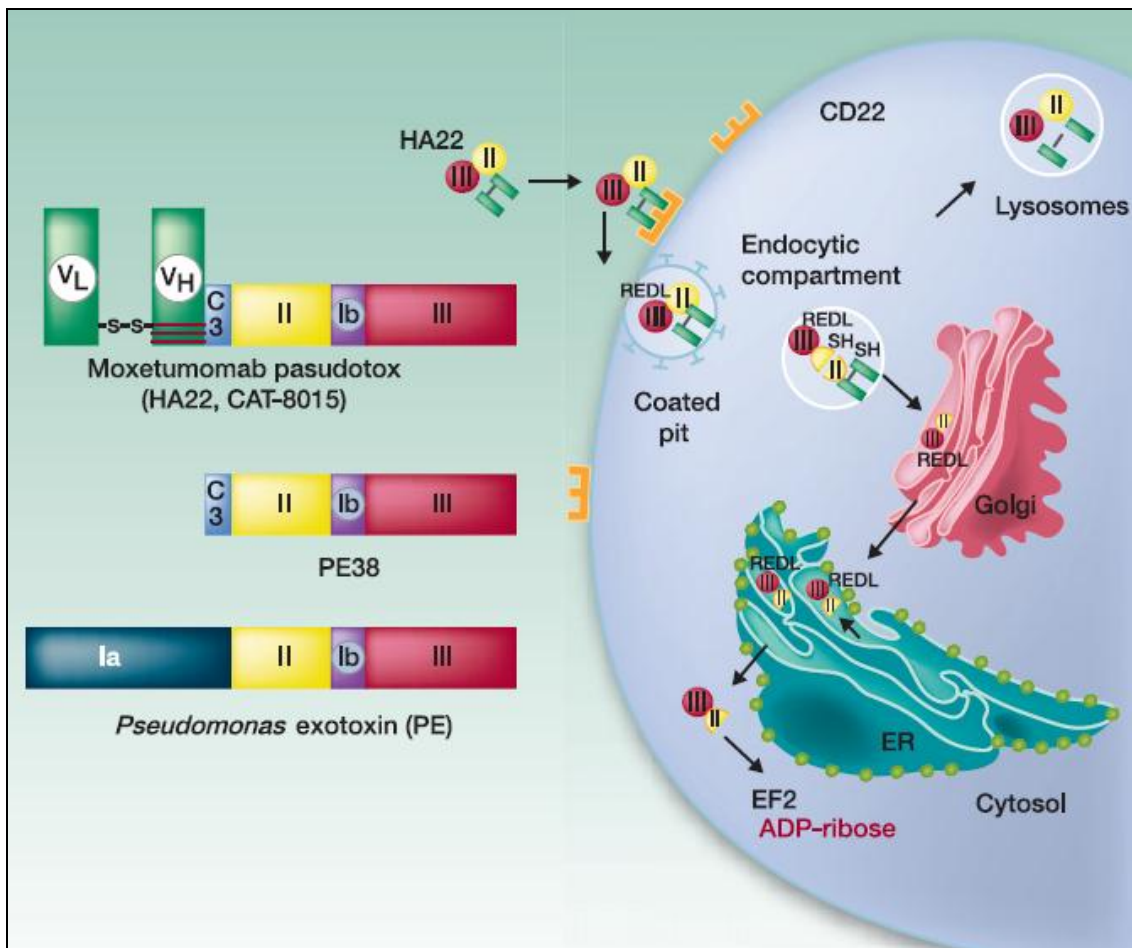
9.2 Moxetumomab pasudotox

È un anticorpo monoclonale rivolto verso l'antigene CD22, particolarmente espresso sulla membrana dei tricoleucociti (compresente sui linfociti B maturi, ma assente sui tessuti normali, sui progenitori B linfocitari e sulle restanti cellule dell'emopoiesi), coniugato con una tossina batterica (derivata dal genere *Pseudomonas*)^{13,103,105}: quando l'anticorpo lega il proprio recettore con un legame ad alta affinità, la tossina viene dismessa all'interno del citoplasma a seguito dell'internalizzazione del complesso anticorpo-recettore; a questo livello, la tossina – dotata di attività ADP-ribosilante – determina la morte cellulare sia inibendo la sintesi proteica, sia inducendo l'apoptosi mediante innesco della cascata delle caspasi (figura 1.8 a pagina 32).

Allo stato dell'arte, esiste un unico studio di fase 1 condotto su 28 pazienti con malattia ricaduta o refrattaria, trattati con dosi di farmaco a scalare da 5 a 50 µg/kg ogni 2 giorni per 3 dosi, ripetendo il ciclo ogni 4 settimane (fino ad un massimo di 16 cicli)¹⁰⁶. In tale contesto di pazienti, si è osservato un tasso di risposta dell'86%, con risposte complete nel 46% dei casi, mantenute nel tempo, in assenza di una tossicità dose-limitante (pur essendo descritti episodi di ipoalbuminemia, edema, incremento delle transaminasi, cefalea, ipotensione, nausea). In considerazione dell'efficacia e della relativa sicurezza di questo farmaco, è in corso uno studio di fase 3 con moxetumomab pasudotox in pazienti con malattia in ricaduta o

refrattaria ad almeno due precedenti linee di trattamento con analoghi purinici¹⁰³.

Figura 1.8 – Meccanismo d’azione di moxetumomab pasudotox a livello delle cellule leucemiche CD22⁺. A sinistra nella figura è rappresentata la struttura dell’immunotossina. PE, esotossina di Pseudomonas; PE38, esotossina risultante dalla rimozione del dominio di legame Ia. Una volta internalizzato l’immunoconiugato, la tossina viene scissa per proteolisi a livello del dominio II. Il residuo di 37 kDa che si genera trasloca attraverso l’apparato di Golgi e il reticolo endoplasmatico. Da qui viene esportato nel citosol, dove agisce tramite ADP-ribosilazione del fattore di allungamento 2 (elongation factor 2, EF2), con conseguente morte cellulare apoptotica.



10. Malattia refrattaria o in ricaduta

Non esiste una linea di comportamento univocamente accettata e standardizzata per i pazienti con leucemia a cellule capellute in ricaduta

dopo precedente terapia. Nella maggior parte dei casi, si impiegano gli stessi presidi terapeutici messi in atto al momento dell'induzione: è possibile infatti ripetere la somministrazione degli analoghi purinici (la stessa cladribina, o in alternativa passare alla pentostatina, o viceversa)^{64-66,75}, ovvero prendere in considerazione una terapia combinata con rituximab o analogo purinico^{98,99,101,102}. Anche l' α -interferone, se non usato in precedenza, la monoterapia con rituximab o eventualmente la splenectomia possono risultare strategie terapeutiche efficaci¹².

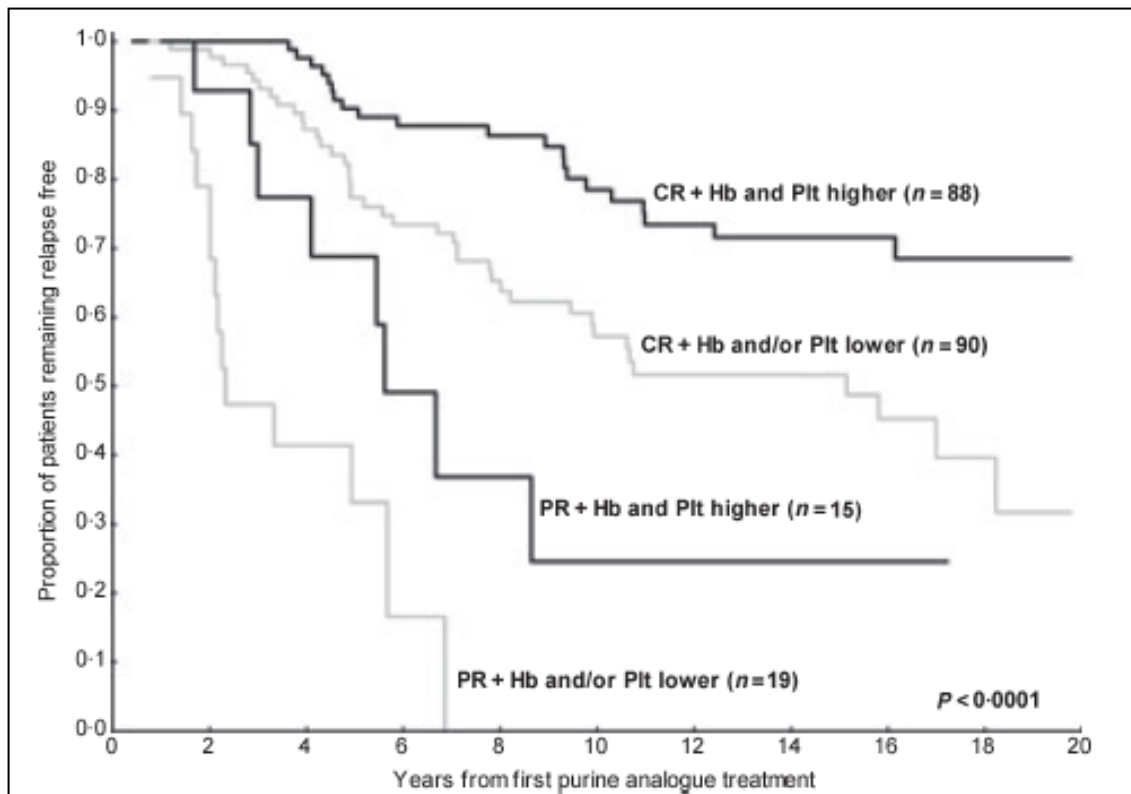
A seguito di una prima linea di trattamento con cladribina, è raccomandato ripeterla allorché la ricaduta si verifichi ad almeno 12-18 mesi dal precedente trattamento, considerando invece l'uso della pentostatina a fronte di ricadute precoci, entro 6 mesi da un precedente trattamento con cladribina. Allo stesso modo, laddove la prima linea sia stata rappresentata dalla pentostatina, questa potrà essere nuovamente impiegata favorevolmente per ricadute ad almeno due anni dalla terapia precedente, riservando la cladribina ad una ricaduta più precoce⁶⁴⁻⁶⁶. Le linee di terapia con analoghi purinici successive alla prima si caratterizzano per tassi e durate di risposta progressivamente decrescenti, peraltro con un incrementato rischio di linfopenia (T-CD4⁺), ipoplasia midollare, citopenie periferiche perduranti, incidenza di infezioni opportunistiche⁶⁶.

11. Lo stato dell'arte

Gli analoghi purinici hanno rivoluzionato il trattamento della leucemia a cellule capellute, non soltanto incidendo sulla storia naturale della malattia stessa, ma determinando elevati tassi di risposta clinica obiettivabile, spesso mantenuta nel tempo ed in maniera continuativa anche per diversi anni^{14,15,78,79,84-87,91}. L'efficacia della cladribina e della pentostatina appaiono sovrapponibili, potendo indurre una risposta completa nel 76-98% dei casi, a fronte peraltro di un profilo di effetti tossici sostanzialmente sovrapponibile^{14,15}: è tuttavia in generale la cladribina ad essere maggiormente utilizzata a livello delle diverse istituzioni ematologiche internazionali, per via della minore durata del trattamento,

della possibilità di impiegare vie di somministrazioni alternative a quella endovenosa⁹⁰, nonché in relazione alla più vasta esperienza maturata nel tempo per quanto riguarda la gestione degli effetti tossici ad essa correlati.

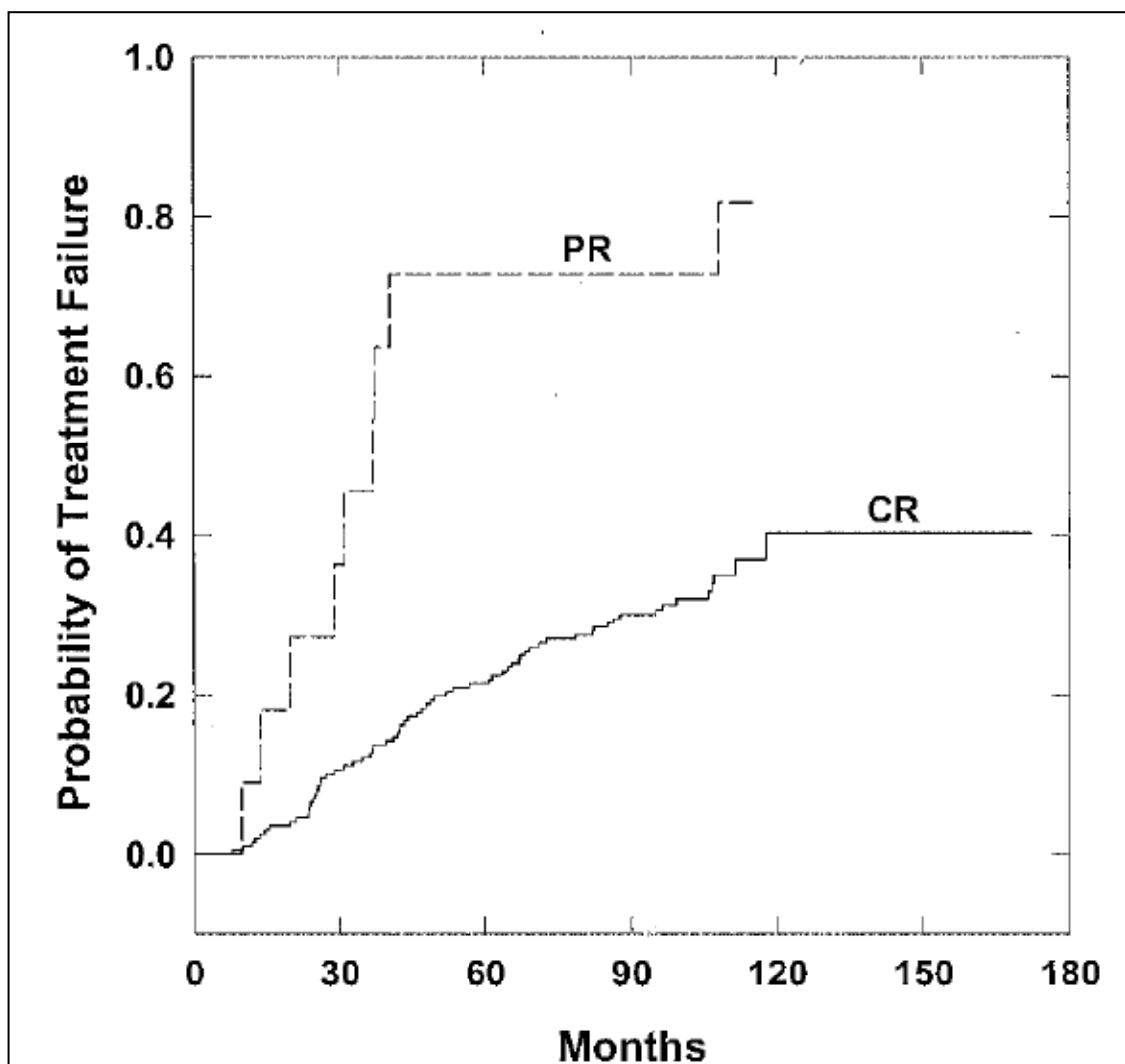
Figura 1.9 – Curve di sopravvivenza libera da ricaduta per pazienti trattati con una prima linea di terapia contenente analoghi purinici. I valori soglia per emoglobina e piastrine (che si intendono pre-trattamento) sono rispettivamente di 10 g/dL e 100.000/mm³^{14,15}.



L'ottenimento di una risposta completa a seguito di adeguato trattamento rappresenta l'obiettivo da perseguire in ciascun paziente con malattia alla diagnosi (figura 1.9): tale aspetto è infatti il maggior parametro prognostico indicatore di una sopravvivenza a lungo termine di buona durata. La sopravvivenza libera da progressione dei pazienti che ottengono una risposta completa è 5 volte maggiore di coloro che ottengono soltanto una risposta parziale (20 anni almeno per i primi, contro i 4 anni circa per i secondi, $p < 0,0001$)^{14,15}. I pazienti che ottengono e mantengono una risposta completa per almeno 5 anni, inoltre, mostrano una riduzione del rischio di ricaduta di almeno il 25% a 15 anni^{14,15}. È talora possibile

ottenere remissioni complete di lunga durata, superiori anche a 15 anni, con una sola linea di terapia¹⁷, sebbene rimanga attualmente impossibile stabilire prima del trattamento se sussistano particolari caratteristiche cliniche o biologiche che possano essere predittive di un esito talmente favorevole.

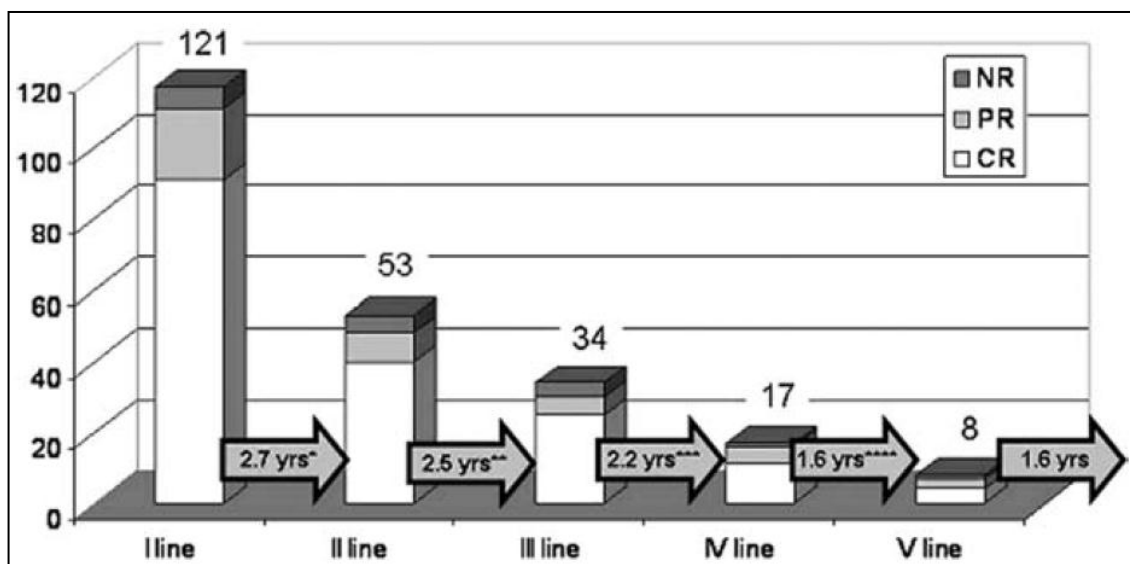
Figura 1.10 – Curve di probabilità di fallimento terapeutico (time-to-treatment failure) in pazienti trattati con cladribina in prima linea; la differenza tra i pazienti in risposta completa (CR) e risposta parziale (PR) è statisticamente significativa ($p < 0,0005$)⁸⁵.



La ricaduta di malattia dopo l'ottenimento di una precedente risposta è tuttavia un evento non infrequente (figura 1.10), che si realizza in almeno il 30-40% dei pazienti nell'arco dei primi 10 anni dalla terapia di prima

linea⁸⁵, con una mediana di sopravvivenza libera da ricaduta inferiore a 7 anni, e con curve di sopravvivenza a lungo termine che non raggiungono mai un *plateau*. Ciò è indicativo della persistenza di una quota di malattia minima residua anche dopo trattamento efficace, ed in ultima analisi è un segno che la leucemia a cellule capellute può essere ben controllata nel tempo, ma non definitivamente eliminata.

Figura 1.11 –Tipologia di risposta e durata della risposta per linee di trattamento successive (casistica dell’Istituto “Seràgnoli” di Bologna)¹⁶. NR, non risposta; PR, risposta parziale; CR, risposta completa. Nelle frecce tra ciascuna colonna è indicata la durata mediana di risposta. I ranges di risposta, in anni, sono i seguenti: (*) 0,52-14,88; () 0,23-9,39; (***) 0,67-8,39; (****) 0,64-1,98.**



Alcuni pazienti mostrano ricadute successive alla prima, e pur essendo in grado di ottenere nuovamente una risposta più o meno profonda tramite successivo trattamento, l’intervallo libero da malattia si fa progressivamente più breve (figura 1.11)¹⁶: i pazienti divengono refrattari agli analoghi purinici, mostrano controindicazioni maggiori al loro impiego, manifestano gli effetti avversi del precedente massiccio trattamento, vanno incontro ad infezioni di entità severa o a manifestazioni emorragiche maggiori. Considerata l’età di incidenza della leucemia a cellule capellute nella popolazione generale – tra i 50 e i 55 anni – risulta chiaro come siano necessari ulteriori sforzi nel mettere in campo strategie terapeutiche innovative, efficaci e mirate ad un’azione attiva sulla malattia

minima residua, rivolte a tutti quei pazienti che risultano resistenti o mostrano ricadute subentranti dopo l'impiego della terapia convenzionale.

12. Leucemia a cellule capellute variante

La leucemia a cellule capellute variante è un'entità clinico-patologica a sé stante, descritta per la prima volta da Cawley e collaboratori¹⁰⁷ nel 1980, che globalmente comprende circa il 10-20% dei pazienti con una diagnosi iniziale di leucemia a cellule capellute. Tende ad interessare generalmente il paziente adulto-anziano, con un'età mediana all'esordio di circa 71 anni, in assenza di una chiara predilezione di sesso.

Da un punto di vista clinico, i pazienti si presentano con splenomegalia e leucocitosi, in assenza di neutropenia o monocitopenia; il midollo osseo è ipercellulare e facilmente aspirabile. Morfologicamente, le cellule neoplastiche mostrano caratteristiche intermedie tra il tricoleucocito classico e il prolinfocito, essendo dotate di un citoplasma abbondante, intensamente basofilo, provvisto di propaggini circonferenziali, e di un nucleo centrale, per lo più tondeggiante od occasionalmente indentato, con cromatina finemente dispersa ed evidenti nucleoli. Dimensionalmente, i tricoleucociti della forma variante appaiono più piccoli rispetto alla forma classica, mostrano un maggiore rapporto nucleo-citoplasmatico e sono privi dei complessi ribosomiali lamellari; la reazione citochimica per la fosfatasi acida tartrato-resistente è generalmente negativa (figura 11 fuori testo).

L'immunofenotipo della cellula leucemica differisce da quello classico in quanto risultano variabilmente espressi il CD11c e il CD103, mentre manca l'espressione del CD25 e del CD123; allo stesso modo, risulta negativa la reazione immunoistochimica per l'annessina A1.

In Giappone, dove generalmente l'incidenza della leucemia a cellule capellute è assai più rara che nei Paesi occidentali, è stata descritta un'ulteriore forma variante, definita "variante giapponese"^{108,109}. Tale variante è epidemiologicamente più rappresentata nel sesso femminile, e si caratterizza per la presenza di elementi cellulari dotati di propaggini

citoplasmatiche villose, citoplasma abbondante e scarsamente tingibile, nuclei circolari, ipercromatici e con incostanti nucleoli.

Tabella 1.1 –Differenze immunofenotipiche tra la forma di leucemia a cellule capellute (HCL) classica e la forma variante.

	HCL classica	HCL variante
Immunoglobuline di superficie	±	±
CD5	-	-
CD10	-	-
CD11c	+ (99% dei casi)	+
CD19	+	+
CD20	+	+
CD22	+	+
CD23	±	-
CD25 (IL2R-a)	+ (100% dei casi)	- (0% dei casi)
CD37	+	?
CD103	+	+ (100% dei casi)
CD123 (IL3R)	+ (100% dei casi)	± (40% dei casi)

È importante differenziare le forme varianti di leucemia a cellule capellute dalla forma classica in quanto le prime tendono a rispondere in maniera insoddisfacente alla terapia convenzionale, compresa la splenectomia, sia che si impieghino l'α-interferone, ovvero gli analoghi purinici¹¹⁰. Il decorso clinico della malattia è aggressivo, con una mediana di sopravvivenza di circa 9 anni, con sopravvivenza a 15 anni inferiore al 15%. Le poche risposte ottenute tendono ad essere di breve durata^{111,113}. Un'altra importante differenza risiede nell'aspetto biologico: le forme varianti di leucemia a tricoleucociti non presentano mutazioni a livello del gene *B-raf*. Tale aspetto assume la valenza di criterio diagnostico per dirimere la diagnosi differenziale¹¹⁴. La mutazione maggiormente caratterizzante, presente tuttavia in una percentuale di casi variabile tra il 30% e il 48%, è a carico del gene *MAP2K1*^{37,115-117}, che codifica per la chinasi MEK1, immediatamente a valle di B-Raf. Ad essa seguono

mutazioni a livello dei geni *KMT2C* (*MLL3*), riscontrate nel 25% dei casi circa, *CCND3* e *U2AF1*, ognuna riscontrabile nel 13% dei casi, nonché mutazioni di *TP53* (queste ultime segnalate in circa un terzo dei casi descritti)³⁷.

Sulla scorta di tali differenze in termini di presentazione immunofenotipica, comportamento clinico e sostanziale refrattarietà ai trattamenti convenzionalmente impiegati nella terapia della leucemia a cellule capellute classica, la forma variante è attualmente classificata nel gruppo dei linfomi/leucemie B-linfocitari con coinvolgimento splenico (non ulteriormente classificabili) nella vigente classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità¹¹⁸.

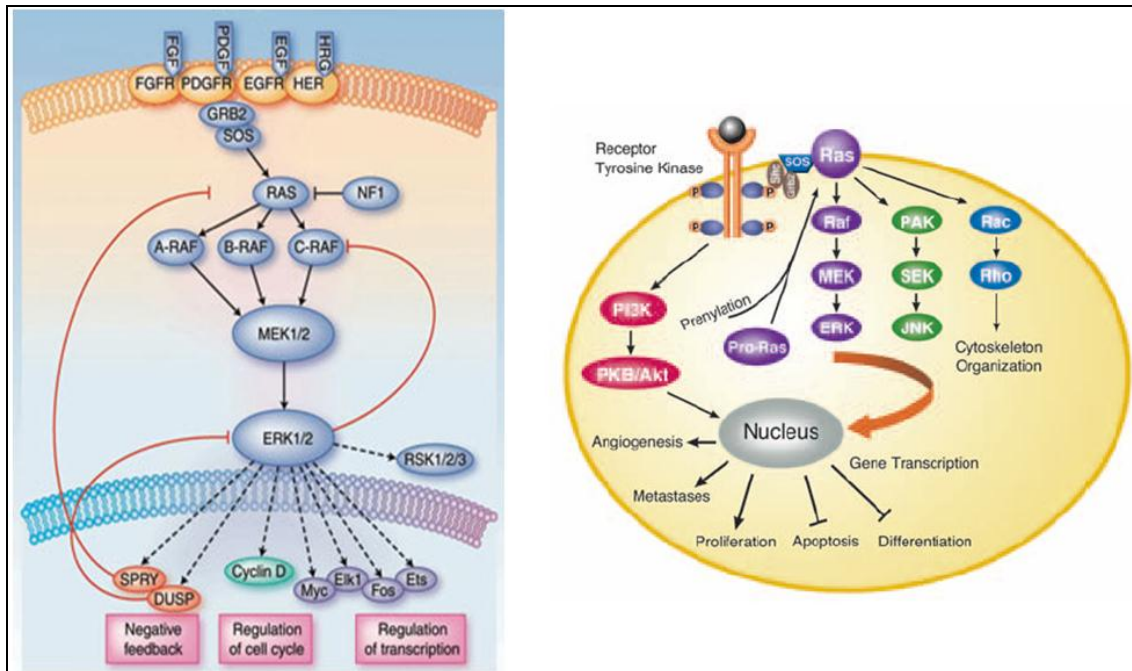
2. LA VIA DI SEGNALAZIONE DELLE MAP-CHINASI

La via di segnalazione intracellulare delle proteine-chinasi attivate da mitogeni (*mitogen activated protein-kinases*, MAP-chinasi) gioca un ruolo importante nella regolazione della trasmissione dei segnali proliferativi che, innescati a seguito della stimolazione di recettori cellulari di membrana (dotati di attività tirosino-chinasica), raggiungono il nucleo della cellula attraverso l'interposizione di molecole proteiche citoplasmatiche che fungono da elementi di trasduzione mediante reazioni a cascata di fosforilazione. In particolare, tali proteine assumono una configurazione attivata nel momento in cui vengono fosforilate da una proteina a monte (una chinasi), divenendo a loro volta in grado di attivare, mediante lo stesso meccanismo (che determina a sua volta anche un'amplificazione del messaggio trasmesso), ulteriori proteine effettrici a valle; la defosforilazione, che avviene ad opera di fosfatasi, è invece il processo tramite cui gli elementi di trasduzione vengono disattivati¹¹⁹⁻¹²¹.

1. Ruolo biologico della via delle MAP-chinasi

Numerosi geni che codificano per gli elementi proteici che entrano a far parte di questa via di segnalazione possono essere colpiti da mutazioni che determinano alterazioni della struttura delle proteine codificate, con conseguente acquisizione da parte di esse di una funzione aberrante, costitutivamente attivata, non più regolata dal fine bilancio tra stato di fosforilazione e defosforilazione. In altre parole, viene a crearsi un meccanismo di trasduzione del segnale indipendente dagli stimoli proliferativi extracellulari captati dai recettori di membrana, rendendo la cellula in cui le mutazioni sono avvenute potenzialmente in grado di proliferare e svilupparsi in maniera del tutto autonoma, creando in questo senso il terreno adatto alla trasformazione in senso neoplastico di un tessuto^{119,121}.

Figura 2.1 – La via di segnalazione delle MAP-chinasi. A sinistra: schematizzazione dell’attivazione a cascata delle proteine-chinasi dalla membrana cellulare al nucleo. A destra, azione di Ras su numerose vie di trasduzione del segnale ed effetti cellulari indotti dall’attivazione di tali vie di segnalazione^{119,120}.

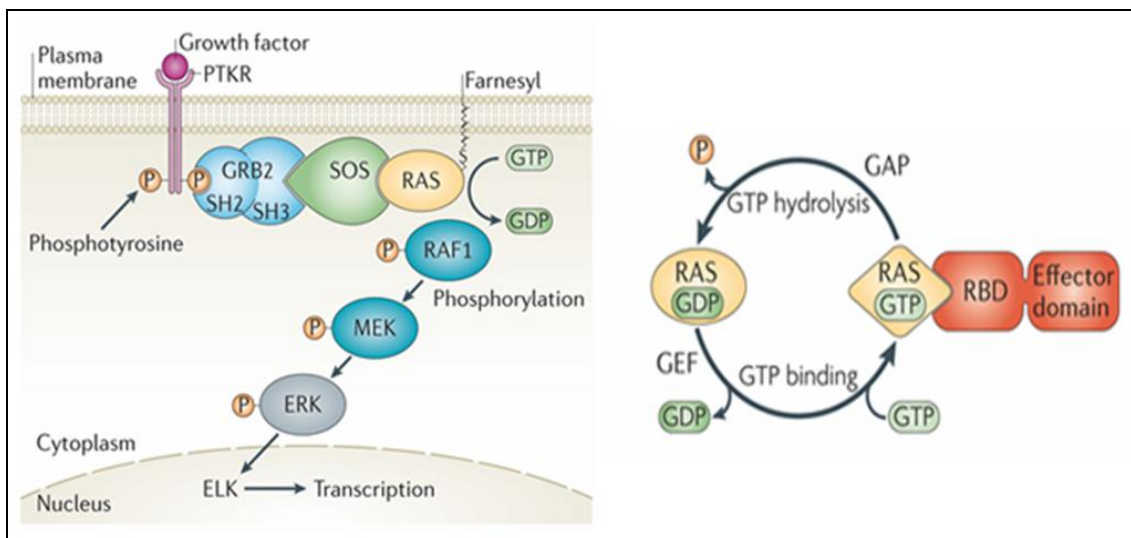


1.1 L’innesco del segnale: Ras

Il primo elemento effettore nella via di segnalazione delle MAP-chinasi è la proteina Ras, dotata di attività serina-treonina chinasi, la cui attivazione avviene in maniera sequenziale all’autofosforilazione del recettore per il fattore di crescita situato sulla membrana cellulare, che si realizza in virtù dell’attività tirosino-chinasi di cui esso è dotato. Ras appartiene ad una superfamiglia di molecole dotate di attività GTP-asi, in grado di trasmettere segnali verso numerose vie di segnalazione intracellulare, MAP-chinasi *in primis*, regolando numerose funzioni cellulari tra cui il differenziamento, l’apoptosi, la proliferazione, l’angiogenesi, la migrazione cellulare attraverso l’espressione di particolari geni (figura 2.1)¹¹⁹. Esistono tre proto-oncogeni *ras* che codificano per quattro isoforme della proteina Ras, tutte di 21 kDa (p21^{ras}: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A e K-Ras4B, queste ultime derivanti dallo *splicing* alternativo del medesimo gene, *K-ras*) e tutte localizzate in prossimità della membrana cellulare. Nel comparto citoplasmatico, il propeptide Ras va incontro ad una serie di modificazioni post-traduzionali a carico dell’estremità carbossi-terminale (farnesilazione,

isoprenilazione) che ne incrementano l'idrofobicità e ne consentono l'ancoraggio alla membrana plasmatica. È a questo livello che Ras esplica la propria attività GTP-asi, passando dalla forma attiva (legante il guanosi-trifosfato, GTP) alla forma inattiva (dopo idrolisi del GTP in guanosi-difosfato, GDP). L'attivazione di Ras è determinata da una serie di proteine, definite *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) che, interagendo con il recettore di membrana, favoriscono il rilascio del GDP, determinando il successivo legame con il GTP (figura 2.2)^{120,122}. Il conseguente cambiamento conformazionale di Ras permette l'interazione con gli elementi effettori a valle, segnatamente con Raf, che viene reclutato dal citoplasma e avvicinato alla membrana cellulare. Il legame con le molecole effettrici dura fintanto che il GTP non viene completamente idrolizzato a GDP, riportando Ras nel suo stato di inattività.

Figura 2.2 – A sinistra: il reclutamento di Ras a livello della membrana plasmatica è determinato dalla farnesilazione e dall'interazione con il recettore dotato di attività tirosino-chinasica. L'interposizione di proteine quali GRB2 e SOS favorisce l'attivazione di Ras, inducendone il legame con il GTP. A destra: è schematizzato il legame tra Ras-GTP e gli elementi effettori (tra cui Raf)¹²².



Una volta che il complesso proteico Ras-Raf è traslocato nei pressi della membrana plasmatica, Ras attiva la funzione serina-treonina chinasi di Raf attraverso una serie di fosforilazioni, che determinano successivi cambi conformazionali di Raf stesso.

1.2 La famiglia di raf

La famiglia genica di *raf* è formata da tre proto-oncogeni, *A-raf*, *B-raf* e *C-raf*, situati rispettivamente sui cromosomi Xp11, 7q32 e 3p25, che codificano per tre proteine a localizzazione citoplasmatica (A-Raf, B-Raf e C-Raf), variabili tra i 68 e i 74 kDa, caratterizzate da regioni di regolazione altamente conservate e da un dominio catalitico (serina-treonina chinasi) all'estremità carbossi-terminale. Le isoforme di Raf presentano una distribuzione tessuto-specifica: se da un lato C-Raf presenta un'espressione ubiquitaria in numerosi tessuti umani, A-Raf è prevalentemente espressa a livello del tessuto urogenitale (rene, ovaio, prostata, epididimo), mentre B-Raf si riscontra in special modo nei tessuti nervoso, splenico, testicolare ed emopoietico.

La regolazione dell'attività chinasi delle proteine Raf è un processo complesso, che richiede più fosforilazioni da parte di Ras in più punti della molecola, sia nella porzione regolatoria sia a carico del dominio catalitico, in maniera assai differenziata in funzione dell'isoforma presa in considerazione. In condizioni basali, l'isoforma B-Raf risulta maggiormente fosforilata rispetto alle isoforme A-Raf e C-Raf, di fatto possedendo un'attività chinasi intrinseca 15-20 volte superiore, ed una maggiore capacità di attivare l'effettore a valle, MEK1/2.

1.3 Attivazione degli effettori a valle

La modificazione conformazionale indotta dalle fosforilazioni attivatrici di Raf rende accessibile il dominio catalitico all'ATP, consentendo la messa in atto del meccanismo fosforilativo su residui di serina e treonina a livello delle molecole a valle. MEK1 e MEK2 sono le molecole immediatamente attivate da Raf¹²³: in particolare, MEK1 è attivato da tutte le isoforme di Raf, mentre MEK2 può essere attivato soltanto dall'azione fosforilativa di B-Raf e C-Raf. Ancora più a valle, e ad opera di MEK1/2, avviene l'attivazione di ERK1 e ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases*) che, traslocando all'interno del nucleo cellulare, agiscono regolando la trascrizione di geni che codificano per fattori di trascrizione nucleari, quali Elk-1, Fos, Jun, AP-1 e Myc. In conseguenza di ciò, si assiste al controllo

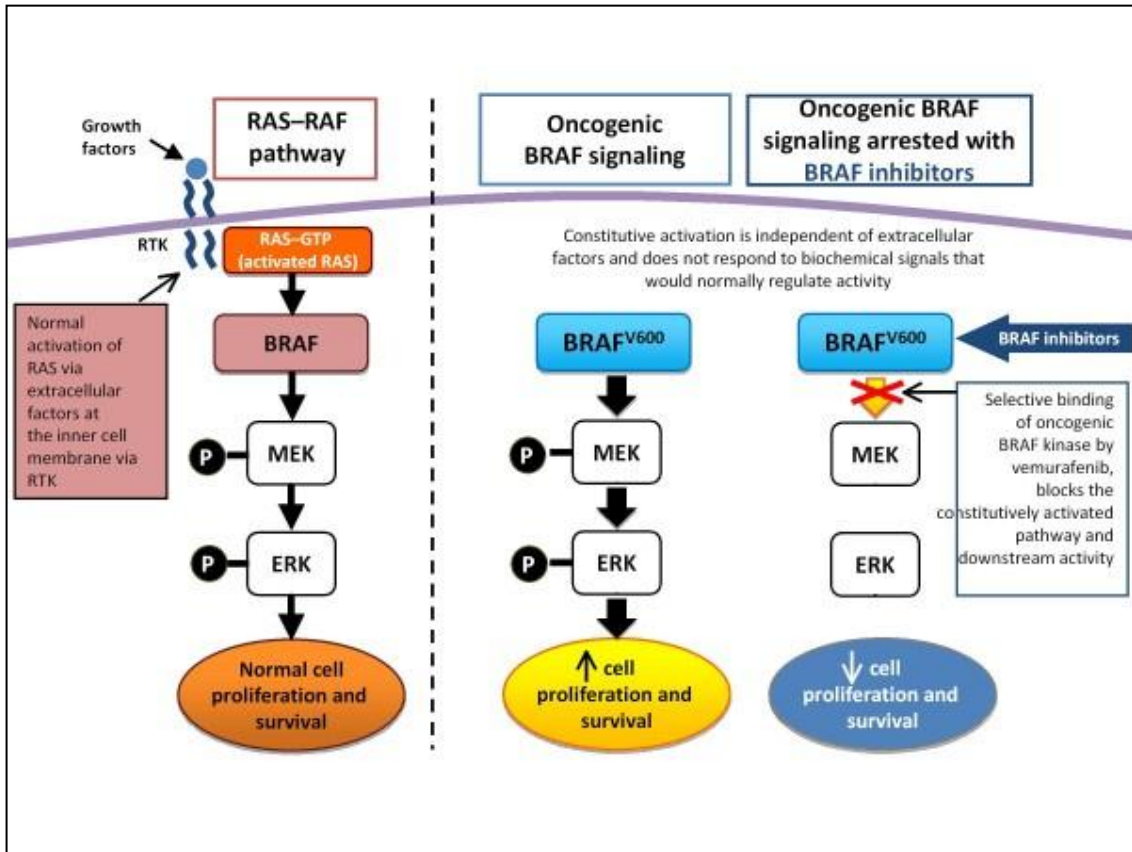
di elementi chiave nella regolazione del ciclo cellulare (aumento dell'espressione di ciclina D1 e ciclina E, riduzione dell'espressione di p27, inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti)¹²⁴, della proliferazione e sopravvivenza cellulare, dell'invasione tissutale, dell'angiogenesi.

2. Mutazioni di *B-raf* nella leucemia a cellule capellute

Mutazioni puntiformi (ma anche delezioni, amplificazioni e riarrangiamenti) che coinvolgono *raf* portano alla traduzione di proteine mutanti costitutivamente attivate, che alterando il meccanismo di segnalazione membrana-nucleo rendono la cellula portatrice svincolata dalla regolazione proliferativa e maturativa dettata dall'azione dei fattori di crescita. Alterazioni nella struttura di *raf* sono state documentate in un'ampia serie di neoplasie umane (vedi capitolo 3 per maggiori dettagli)¹²⁵: se inizialmente i primi sforzi sono stati rivolti in maniera predominante allo studio del gene *C-raf*, più recentemente sono state identificate mutazioni ricorrenti a carico di *B-raf*, attualmente considerate come le aberrazioni genetiche prevalenti nell'ambito della via di segnalazione delle MAP-chinasi^{126,127}.

L'analisi della sequenza del gene *B-raf* ha consentito di portare alla luce almeno 30 mutazioni missenso, tali da determinare nella più parte dei casi una sostituzione aminoacidica a carico del dominio chinasi della proteina B-Raf. In particolare, la sostituzione di una timina con una adenina in posizione 1799, a carico dell'esone 15 del gene, porta a codificare per l'acido glutammico in luogo dell'aminoacido valina al *codon* 600, il che determina l'attivazione costitutiva del dominio chinasi della molecola. La modificazione conformazionale secondaria alla sostituzione aminoacidica sopra descritta, con l'inserzione di un residuo polare, mima l'azione attivatrice causata dalla fosforilazione di B-Raf, mediata a monte da Ras. Il mutante B-Raf V600E risulta essere una molecola con elevata attività chinasi, 12,5 volte maggiore rispetto alla forma *wild-type*, divenendo in grado di stimolare la fosforilazione di ERK aggirando l'azione regolatrice di Ras (figura 2.3 alla pagina seguente)^{18,32,37,40,128,129}.

Figura 2.3 – Il ruolo di B-Raf V600E nel signaling aberrante della via delle MAP-chinasi.



La mutazione di *B-raf* sopra descritta è stata riscontrata da Tiacci e collaboratori¹⁸ mediante *whole-exome sequencing* a carico delle cellule CD19⁺ presenti nel sangue periferico di 48 pazienti con leucemia a cellule capellute. In 30 pazienti è stato possibile stabilire il grado di zigosità della mutazione: in 26 pazienti è stata documentata la presenza di tale mutazione in eterozigosi, mentre in 4 pazienti è stata dimostrato un evento clonale in omozigosi o emizigosi.

La ricerca della mutazione in campioni cellulari ottenuti da pazienti affetti da sindromi linfoproliferative croniche, B linfocitarie, diverse dalla leucemia a cellule capellute, ad essa clinicamente affini (linfoma della zona marginale splenico “a linfociti villosi”, linfoma splenico non altrimenti specificato) o del tutto disgiunte (leucemia linfatica cronica, linfoma follicolare, linfoma diffuso a grandi cellule, linfoma mantellare, linfoma di Burkitt) ha dato esito negativo, confermando la spiccata correlazione della

lesione genetica con la specifica patologia linfoproliferativa (tabella 2.1)^{18,40}.

Tabella 2.1 – Prevalenza della forma mutante B-Raf V600E in pazienti affetti da leucemia a cellule capellute e da sindromi linfoproliferative croniche¹⁸.

Patologia	Casi (n = 243)		
	Analizzati	Mutati	% mutazione
Leucemia a cellule capellute	48	48	100
Linfoma marginale splenico	22	0	0
Linfoma splenico, NAS	16	0	0
Leucemia linfatica cronica	21	0	0
Linfoma follicolare	35	0	0
Linfoma diffuso a grandi c.	71	0	0
Linfoma mantellare	18	0	0
Linfoma di Burkitt	12	0	0

NAS, non altrimenti specificato o inclassificabile.

A completamento di queste osservazioni, è stata studiata la correlazione tra la presenza del mutante V600E di B-Raf e l'effettiva attivazione della via di segnalazione delle MAP-chinasi, mediante valutazione dello stato fosforilativo di ERK e MEK, sia mediante Western blot (si veda la figura 3.1 a pag. 54)¹⁸, sia tramite immunoistochimica per la forma fosforilata di ERK (P-ERK)¹²⁸. La positività in immunoistochimica di P-ERK è stata dimostrata su sezioni istologiche da biopsia osteomidollare in maniera specifica e localizzata a carico dei tricoleucociti (con l'eccezione delle cellule endoteliali e di alcune cellule stromali disperse nel parenchima midollare), con messa in evidenza di un *pattern* di positività citoplasmatica, talora in associazione ad una positività nucleare (figura 12 fuori testo). Lo studio immunoistochimico per P-ERK è risultato invece negativo quando condotto su campioni prelevati da pazienti affetti da altre sindromi linfoproliferative croniche B linfocitarie, ad espressione leucemica o linfomatosa (compresa la leucemia a cellule capellute variante), in questo modo corroborando la restrizione del meccanismo patogenetico MAP-

chinasi-mediato alla sola leucemia a cellule capellute classica (tabella 2.2 a pagina 48).

Questi ultimi riscontri confermano come la proteina mutante B-Raf V600E sia in grado di attivare in maniera costitutiva la via di segnalazione delle MAP-chinasi nei pazienti affetti da leucemia a cellule capellute^{18,41,126-129}, di fatto consentendo di concludere che:

- il riscontro della presenza di mutazioni di *B-raf* permette di porre diagnosi di leucemia a cellule capellute, differenziando tale patologia da altre sindromi linfoproliferative croniche ad espressione clinica sovrapponibile, nonché dalla stessa tricoleucemia variante^{18,128};
- uno studio immunohistochimico che documenti la positività per P-ERK di fatto permette di confermare indirettamente la presenza del mutante V600E di B-Raf¹²⁸;
- la via di segnalazione delle MAP-chinasi ha un ruolo preminente nella patogenesi della leucemia a cellule capellute, sostenendo la trasformazione leucemica e la sopravvivenza clonale^{18,41,127};
- l'impiego di un inibitore di B-Raf V600E può ristabilire il normale meccanismo di segnalazione intracellulare, riducendo lo stato di fosforilazione di ERK e MEK e bloccando la spinta leucemogena^{20,126};
- la valutazione mediante metodiche di biologia molecolare della mutazione del gene *B-raf* in diversi momenti della storia clinico-terapeutica dei pazienti affetti da leucemia a cellule capellute può rappresentare uno strumento per la determinazione della profondità di risposta e per il monitoraggio clinico nel corso del *follow-up* post-trattamento.

Questi ultimi due punti vengono descritti in maggiore dettaglio nei capitoli seguenti dell'elaborato, dal momento che fanno riferimento all'argomento principale attorno a cui questa tesi ruota e nel cui ambito è stato sviluppato il progetto di ricerca, sia nella sua parte clinica, sia nella sua componente di laboratorio.

Tabella 2.2 – Espressione di P-ERK in immunoistochimica e della forma mutante B-Raf V600E in pazienti affetti da leucemia a cellule capellute e altre sindromi linfoproliferative croniche, B linfocitarie¹²⁸.

Patologia	P-ERK		B-Raf V600E	
	Analizzati	Positivi	Analizzati	Positivi
HCL	37	35 (*)	37	37
SMZL	40	0	40	0
HCL-variante	2	0	1	0
SLLU	2	0	2	0
BLPD-NOS	7	0	7	2 (**)

HCL, leucemia a cellule capellute; SMZL, linfoma della zona marginale ad insorgenza splenica; SLLU, linfoma splenico, non altrimenti specificato o inclassificabile; BLPD-NOS: sindrome linfoproliferativa cronica B linfocitaria CD5-negativa non ulteriormente classificabile. (*) Due casi di leucemia a cellule capellute negativi per P-ERK a seguito di denaturazione antigenica secondaria alla metodica di fissazione del campione osteomidollare. (**) Due rari casi di sindrome linfoproliferativa cronica, non ulteriormente specificata, B-Raf V600E-positiva.

3. LA TERAPIA CON INIBITORE DI B-Raf

La scoperta di mutazioni oncogene del gene *B-raf* ha messo in luce il ruolo centrale rivestito dalla molecola B-Raf da esso codificata nell'ambito delle vie di trasduzione del segnale che controllano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. È stato dimostrato come le forme mutanti di B-Raf, segnatamente a livello del *codon* V600, caratterizzate nella più parte dei casi dalla sostituzione dell'aminoacido valina con un residuo di acido glutammico, siano frequentemente riscontrabili in un'ampia varietà di neoplasie^{119,125,130-144}: melanoma maligno (55-68% dei casi), carcinoma anaplastico della tiroide (83% dei casi), carcinoma papillifero della tiroide (36-69% dei casi), carcinoma sieroso dell'ovaio a basso grado (63% dei casi), carcinoma del colon-retto (4-14% dei casi), per citare soltanto le patologie più frequentemente coinvolte.

Tabella 3.1 – Mutazioni puntiformi di B-raf e ras e patologie neoplastiche^{119,125,130-144}.

Neoplasia	Frequenza di mutazioni (%)	
	<i>B-raf</i>	<i>ras</i>
Melanoma ^{125,130}	55-68	16
Carcinoma anaplastico della tiroide ¹³¹	83	— (*)
Carcinoma papillifero della tiroide ^{132,133}	35,8-69	25
Colangiocarcinoma ¹³⁴	0-21	56
Carcinoma del colon-retto ¹³⁵	4-16	36
Carcinoma dell'esofago ¹³⁶	15	— (*)
Leucemia acuta mieloide ¹³⁷	4	23
Carcinomi della testa e del collo ^{138,139}	3-4,8	23
Carcinoma del polmone (NSCLC) ¹⁴⁰	2-3	22
Carcinoma gastrico ¹⁴¹	2	— (*)
Carcinoma ovarico, basso grado ¹⁴²	63	23
Carcinoma ovarico mucinoso ¹⁴³	0	50
Linfomi non-Hodgkin ¹⁴⁴	2	— (*)

NSCLC: carcinoma del polmone non a piccole cellule.

(*) frequenza di mutazioni non nota.

Tali neoplasie, peraltro, mostrano frequentemente anche mutazioni di *ras*, che tuttavia appaiono escludere mutuamente la concomitante presenza di mutazioni a carico di *B-raf*. Questi riscontri corroborano l'importanza e la centralità della via di segnalazione delle MAP-chinasi nella patogenesi e nel mantenimento di numerose neoplasie maligne.

Nell'ambito delle patologie neoplastiche ematologiche, è documentata la presenza del mutante B-Raf V600E anche in pazienti affetti da sindromi istiocitotiche sistemiche, tra cui l'istiocitosi a cellule di Langerhans^{145,146} e la malattia di Erdheim Chester¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, pur trattandosi di una mutazione non invariabilmente presente in tutti i pazienti.

Come recentemente dimostrato¹⁸, e successivamente confermato^{43-45,69-73}, tutti i pazienti affetti da leucemia a cellule capellute sono portatori della forma mutante V600E di B-Raf: essa rappresenta l'elemento critico per l'attivazione di questa via di segnalazione intracellulare, di fatto rappresentando un potenziale interessante bersaglio di terapia.

1. Vemurafenib

Vemurafenib (PLX-4032) è una molecola a basso peso molecolare, somministrabile per via orale, capace di inibire in maniera selettiva la forma attivata di B-Raf, che manifesta un'attività enzimatica a tipo serina-treonina chinasi. Studi biochimici e cellulari *in vitro* hanno documentato un'elevata selettività di vemurafenib per la forma mutante V600E di B-Raf. La concentrazione inibente (IC₅₀) per la forma mutante V600E di B-Raf è 44 nM, equivalente per l'isoforma C-Raf, ma 3 volte inferiore a quella necessaria per ottenere un'equivalente inibizione di B-Raf *wild-type* (110 nM). Testato su un pannello di 58 chinasi, vemurafenib mostra una IC₅₀ inferiore a 1 µM soltanto nei confronti di un'altra chinasi (BRK chinasi), oltre a B-Raf¹⁵⁰.

In modelli murini di melanoma B-Raf V600E-mutato, il trattamento con vemurafenib ha dimostrato la parziale o completa regressione del tumore in maniera dose-dipendente, e ha consentito allo stesso modo il miglioramento della sopravvivenza degli animali¹⁵¹.

1.1 Sviluppo clinico di vemurafenib

Il primo studio di fase 1, che ha coinvolto 55 pazienti affetti da neoplasia solida, prevalentemente melanoma, è stato rivolto alla determinazione della dose efficace di farmaco e alla valutazione dei principali parametri di farmacocinetica¹⁵². Sono state impiegate dosi a scalare di vemurafenib, variabili da 160 mg a 1.120 mg/bid, stabilendo nel dosaggio di 960 mg/bid quello raccomandato per i successivi studi di fase 2. Il *trial* è stato esteso ad ulteriori 32 pazienti affetti da melanoma metastatico, nei quali è stato possibile determinare l'emivita media del farmaco, approssimativamente di 90 ore (*range*: 30-145 ore): la somministrazione di 960 mg/bid ha permesso di esporre tutti i pazienti in terapia a livelli di farmaco relativamente costanti, una volta raggiunto lo stato stazionario (entro il 15° giorno di trattamento). Nei 32 pazienti con melanoma trattati nella fase di estensione del *trial*, tutti caratterizzati dalla presenza della forma mutante V600E di B-Raf, si è registrato un tasso di risposte dell'81% (26 pazienti su 32), con risposte complete in 2 casi e risposte parziali negli altri 24 casi, ed una sopravvivenza libera da progressione superiore a 7 mesi¹⁵².

Nel successivo studio multicentrico di fase 2 (BRIM-2)¹⁵³, 132 pazienti con melanoma metastatico, positivi per il mutante V600E di B-Raf, già precedentemente trattati, hanno ricevuto vemurafenib alla dose di 960 mg/bid ottenendo un tasso di risposta del 52% ed una sopravvivenza libera da progressione di 6,7 mesi. Il 77% e il 58% dei pazienti sono risultati vivi rispettivamente a 6 e 12 mesi.

Lo studio multicentrico di fase 3 (BRIM-3)¹⁵⁴ ha visto coinvolti 675 pazienti affetti da melanoma metastatico alla diagnosi, B-Raf V600E-positivo, randomizzati nel braccio di trattamento ($n = 337$), costituito dalla somministrazione di vemurafenib alla dose di 960 mg/bid, o nel braccio di controllo ($n = 338$), in cui si prevedeva la somministrazione endovenosa di dacarbazina, alla dose di 1.000 mg/m^2 , al giorno 1 ogni 3 settimane. Il tasso di risposta è risultato del 48% per i pazienti trattati con vemurafenib e del 5% per i pazienti allocati nel braccio di controllo, con una sopravvivenza globale dell'84% a 6 mesi per i pazienti sottoposti a trattamento nel braccio sperimentale e del 64% per coloro che hanno ricevuto la dacarbazina. In

questo studio, il trattamento con vemurafenib è stato associato ad una riduzione del 63% del rischio relativo di morte se confrontato con la dacarbazina ($p < 0,001$).

Sulla scorta dei dati presentati negli studi di fase 1-3¹⁵²⁻¹⁵⁴, l'impiego di vemurafenib in monoterapia è stato approvato per il trattamento di pazienti adulti affetti da melanoma metastatico o non resecabile, caratterizzato dalla presenza del mutante V600E di B-Raf (approvazione della *Food and Drug Administration* ottenuta nell'agosto 2011; approvazione dell'*European Medicines Agency* ottenuta nel febbraio 2012). Recentemente (novembre 2017), vemurafenib è stato approvato nei pazienti con malattia di Erdheim Chester¹⁵⁵⁻¹⁵⁶. Alcune esperienze relative all'uso di vemurafenib in pazienti con istiocitosi a cellule di Langerhans pluritrattati sono recentemente comparse in letteratura¹⁵⁷.

1.2 Eventi avversi

I principali eventi avversi registrati nell'ambito dei *trials* clinici di vemurafenib nei pazienti con melanoma metastatico sono stati: artralgia, *fatigue*, *rash* cutaneo, reazioni di fotosensibilizzazione, nausea, alopecia e prurito. L'uso di vemurafenib è stato associato, inoltre, alla nuova insorgenza di lesioni cutanee, tra cui carcinomi a cellule squamose e cheratoacantomi, e allo sviluppo di melanomi maligni *de novo*. Tutte le lesioni cutanee descritte sono state escisse chirurgicamente in maniera radicale, e in nessuno dei pazienti affetti sono stati eseguiti aggiustamenti della dose. Gli eventi avversi descritti si sono dimostrati lievi o moderati (grado 2-3) e generalmente transitori, anche in pazienti trattati per lunghi periodi (fino ad un massimo di 15 mesi di trattamento continuo). Gli eventi avversi di grado 3 sono stati favorevolmente risolti interrompendo temporaneamente la somministrazione del farmaco, ovvero riducendone la dose. Per quanto riguarda l'incidenza e la gradazione degli eventi avversi documentati nell'ambito degli studi registrativi, si rimanda ai corrispondenti studi *in extenso* già pubblicati¹⁵³⁻¹⁵⁴.

2. Impiego clinico di vemurafenib nella leucemia a cellule capellute

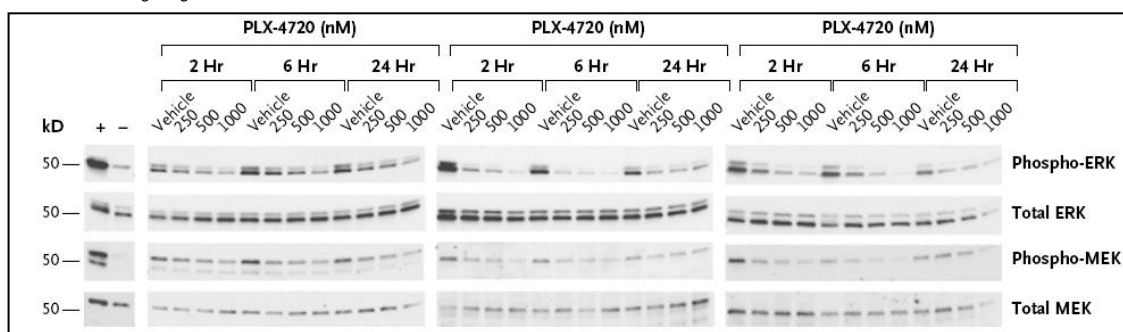
Circa il 40% dei pazienti con leucemia a cellule capellute trattati in prima linea con analoghi purinici va incontro a una ricaduta, spesso così precocemente da precludere una successiva immediata applicazione della terapia antitumorale convenzionale⁸⁵. Inoltre, tali agenti possono determinare profonda mielosoppressione e immunosoppressione, esponendo il paziente ad infezioni sistemiche, spesso anche letali.

Per questi motivi, vi è la chiara esigenza di nuovi approcci terapeutici, segnatamente per quella fetta di pazienti non responsivi agli analoghi purinici, in ricaduta precoce dopo precedente trattamento o per i quali sussistono controindicazioni a una successiva linea di terapia antitumorale¹⁰³. Gli interessanti risultati clinici ottenuti con l'impiego di vemurafenib nell'ambito del melanoma metastatico pluritrattato o nella malattia di nuova insorgenza, quando non resecabile chirurgicamente o quando già metastatica all'esordio¹⁵²⁻¹⁵⁴, hanno posto le basi per lo studio estensivo del ruolo di vemurafenib come terapia mirata nei pazienti affetti da leucemia a cellule capellute che presentano segni clinici e laboratoristici e sintomi indicativi di malattia attiva, posto il ruolo fondante dell'azione di B-Raf mutante nella patogenesi^{18,41,127}, come ampiamente discusso.

Studi *in vitro* eseguiti incubando le cellule ottenute dai pazienti affetti da leucemia a cellule capellute con specifici inibitori di B-Raf (PLX-4720 e PLX-4032, quest'ultima sigla rappresentante vemurafenib) hanno dimostrato come le concentrazioni di MEK ed ERK fosforilate (P-MEK e P-ERK, ved. figura 3.1), che ricordiamo essere i bersagli della fosforilazione operata da B-Raf immediatamente a valle di esso nella cascata di segnalazione delle MAP-chinasi, decrescano progressivamente man mano che viene aumentata la dose dell'inibitore (250 nM, 500 nM e 1.000 nM in figura): ciò non solo a riprova della marcata attivazione (costitutiva) della via di segnalazione B-Raf-MEK-ERK in condizioni basali nei pazienti affetti da leucemia a cellule capellute, ma anche a conferma del potenziale ruolo terapeutico degli inibitori di B-Raf, che agiscono riducendo la trasduzione del segnale dalla membrana cellulare al

nucleo, come dimostrato dalla riduzione della quota di proteine P-MEK e P-ERK¹⁸.

Figura 3.1 – Analisi in Western blot che dimostra lo stato di fosforilazione di ERK e MEK in cellule di tre pazienti affetti da leucemia a cellule capellute sottoposte a trattamento in vitro con inibitore di B-Raf (PLX-4720). Si noti come la concentrazione delle forme fosforilate decresca in funzione del dosaggio dell'inibitore (250 nM, 500 nM, 1.000 nM) rispetto alle condizioni basali (vehicle), e come rimangano invece costanti nel tempo le concentrazioni totali delle proteine ERK e MEK non fosforilate¹⁸.

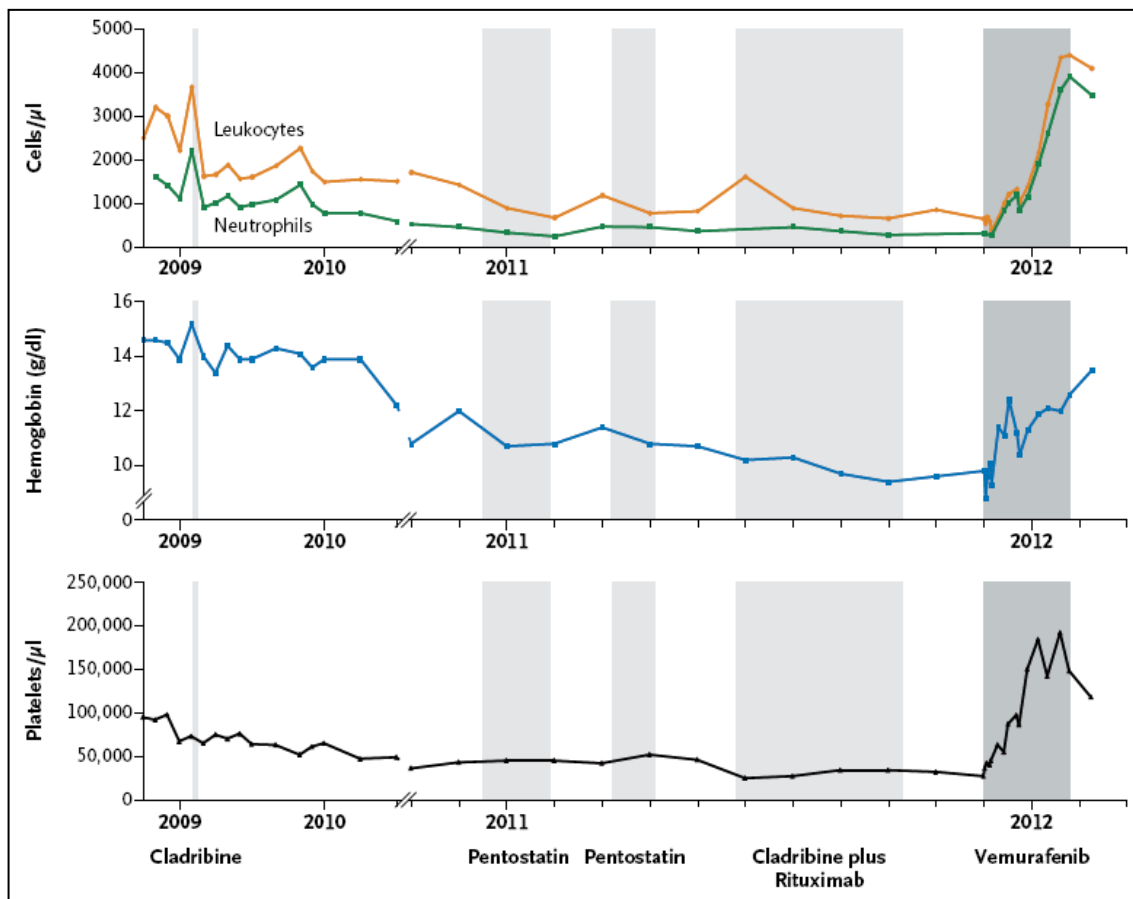


La mole di informazioni disponibile circa gli effetti tossici del trattamento con vemurafenib nei pazienti affetti da melanoma metastatico spinge a pensare che anche nei pazienti con leucemia a cellule capellute la tossicità possa essere limitata e transitoria, con effetti avversi facilmente gestibili. L'assenza di mielotossicità¹⁵⁴ e di effetti a carico della controparte linfocitaria normale¹⁵⁸ rendono il farmaco ulteriormente interessante nell'ambito della terapia della leucemia a cellule capellute.

Esperienze cliniche preliminari in pazienti con malattia refrattaria o in ricaduta (tabella 3.2 a pag. 57)¹⁵⁹⁻¹⁶⁴, una volta confermata la presenza del mutante V600E di B-Raf, fanno riferimento all'impiego di dosi differenti, variabili tra 240 mg/bid (in 4 delle 5 esperienze riportate^{159,160,162,163}, in una delle quali è stata tuttavia usata una singola dose iniziale di carico di 960 mg e il dosaggio è stato poi successivamente aumentato dapprima a 720 mg/die, quindi a 960 mg/bid, come dosaggio massimo¹⁵⁹) e 960 mg/bid¹⁶¹, su periodi di trattamento compresi tra le 3 settimane (in uno dei 5 reports, al termine delle quali le somministrazioni sono state sospese per via della comparsa di artralgie¹⁶¹) e i 2 mesi.

In tutte le esperienze segnalate, il trattamento con vemurafenib ha permesso un rapido miglioramento dei valori ematologici periferici, sia in termini di concentrazione emoglobinica e conta piastrinica, sia di riduzione della quota di tricoleucociti circolanti (figure 3.2, più sotto, e 3.3 a pag. 56), sia infine di riduzione delle dimensioni spleniche, quando presente splenomegalia, con effetti evidenti già dai primi giorni di trattamento e dimostrazione di risposte cliniche oggettive dopo periodi di tempo variabili tra i 20 e i 60 giorni di terapia.

Figura 3.2 – Un esempio delle modificazioni ematologiche periferiche indotte dal trattamento con vemurafenib e confronto con i dati emocromocitometrici ottenuti nel corso delle precedenti linee di terapia convenzionale¹⁵⁹.



In 4 dei casi riportati è stato possibile documentare una risposta completa emato-midollare^{159,161-163} (in un caso soltanto sul piano ematologico periferico in quanto non è stata eseguita una rivalutazione midollare al termine del trattamento, ma solo a distanza di qualche mese¹⁶¹), mentre in

un caso di paziente pesantemente pluritrattato e con malattia diagnosticata almeno 17 anni prima si è raggiunto un quadro di risposta parziale, con completa normalizzazione del quadro periferico pur persistendo un modesto infiltrato tricoleucocitario a livello midollare¹⁶⁰.

Figura 3.3 – Il trattamento con vemurafenib determina la rapida scomparsa delle cellule leucemiche circolanti (citofluorimetria con marcatura CD19/CD103) e una evidente riduzione della quota di cellule positive per la mutazione di B-raf^{v602}.

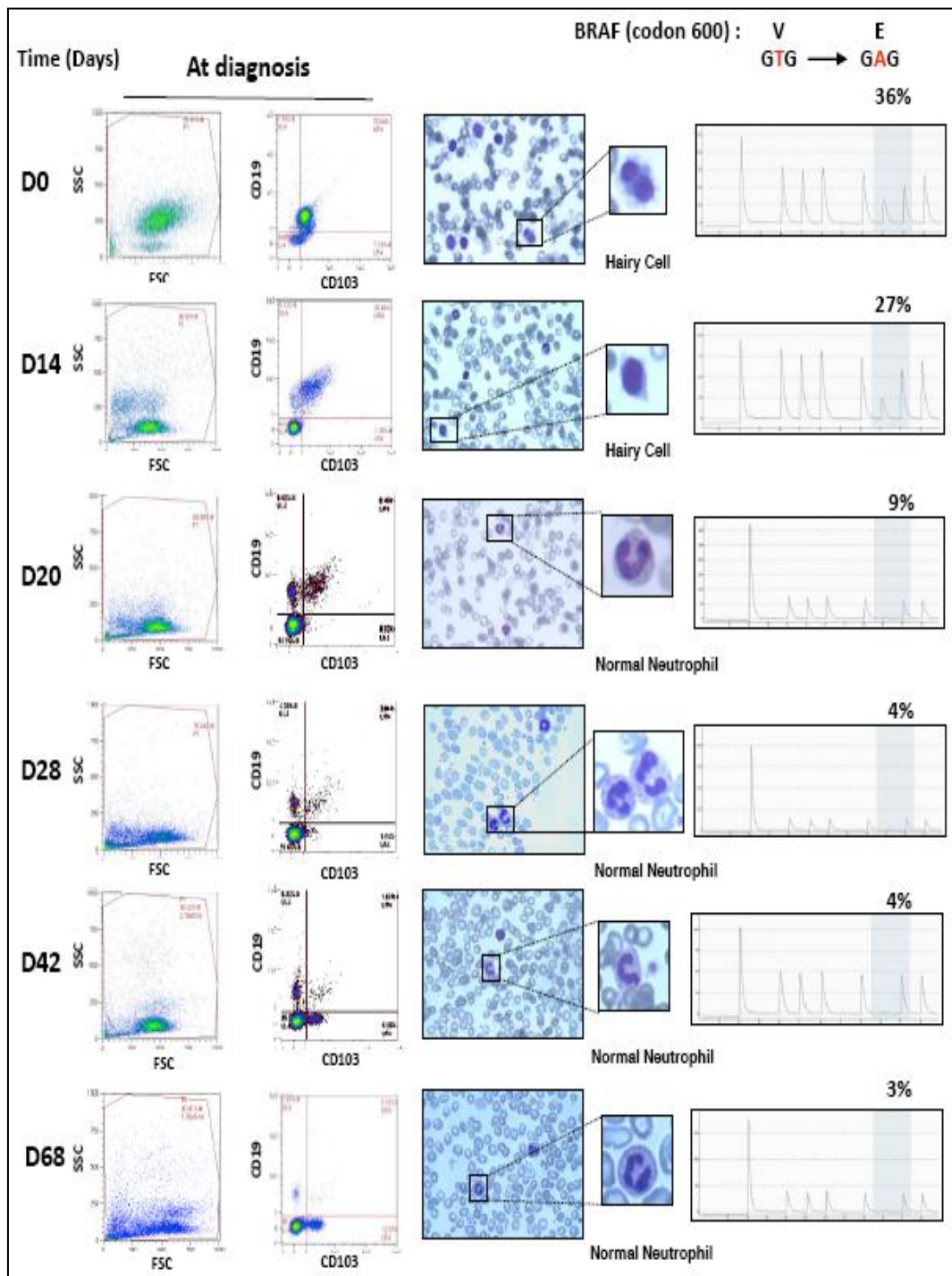


Tabella 3.2 - Sintesi delle esperienze cliniche con vemurafenib pubblicate (al di fuori degli studi clinici).

Autore	Diagnosi	Linee preced.	Vemurafenib	Durata	Risposta	Follow-up	Eventi avversi
Dietrich ^{159,164}	2009	4	240 mg/bid (<i>dose escalated</i>)	56 gg	RC	RC a 6 mesi	Artralgie
Follows ¹⁶⁰	1995	5	240 mg/bid	58 gg	RP	Ricaduta a 60 gg	Iperbilirubinemia
Munoz ¹⁶¹	1985	14	960 mg/bid	21 gg	RC ematologica	RP a 4 mesi	Artralgie gr. 2
Peyrade ¹⁶²	1989	3	240 mg/bid	56 gg	RC	—	—
Samuel ¹⁶³	1991	2	240 mg/bid	> 60 gg	RC	—	Alopecia

RC, risposta completa; RP, risposta parziale; gr, grado sec. CTCAE.

In due delle esperienze pubblicate è stato studiato lo stato di attivazione della via di segnalazione delle MAP-chinasi prima e durante trattamento con vemurafenib^{163,164}, sia determinando l'attività chinastica di B-Raf nelle cellule circolanti (mediante incorporazione di ³²P)¹⁶³, sia valutando l'entità della fosforilazione di ERK e MEK nel sangue periferico e su tessuto ottenuto da biopsia osteomidollare¹⁶⁴. È stata dimostrata una riduzione del 75% dell'attività chinastica di B-Raf nel sangue periferico già a partire dal primo giorno di trattamento, fino a valori residui del 10% circa dopo 8 giorni di terapia (figura 3.4)¹⁶³.

Per quanto riguarda la dimostrazione dello stato fosforilativo di ERK e di MEK, sono stati ottenuti risultati tra loro contrastanti, e congrui solo in parte con quanto già precedentemente dimostrato (ved. figura 3.1 a pag. 54)^{18,163,164}. In particolare, non è stato possibile determinare sul sangue periferico – in parallelo con la riduzione dell'attività di B-Raf – una riduzione della fosforilazione di ERK e MEK nell'ambito delle cellule leucemiche (figura 3.4)¹⁶³; al contrario, su tessuto midollare è stato possibile riscontrare, già a partire dal 6° giorno di somministrazione di vemurafenib, la completa abolizione della fosforilazione di ERK e la conseguente interruzione della trasduzione del segnale proliferativo sulla via di segnalazione delle MAP-chinasi, pur ancora in presenza di un infiltrato di cellule capellute, CD20⁺ (figura 3.5 a pag. 59)¹⁶⁴.

Figura 3.4 – A sinistra, decremento dell'attività chinastica di B-Raf in concomitanza con l'inizio e la prosecuzione del trattamento con vemurafenib. A destra, la valutazione in Western blot non dimostra alcuna riduzione dello stato fosforilativo di ERK e di MEK¹⁶³.

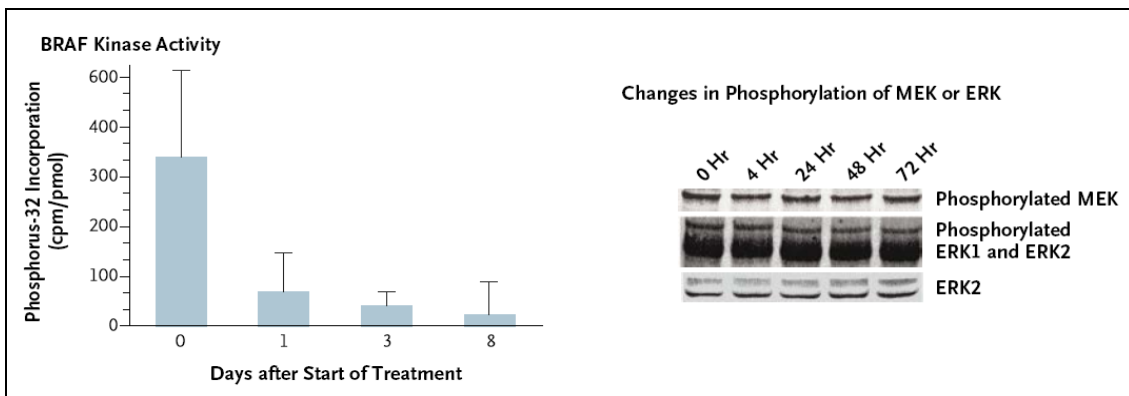
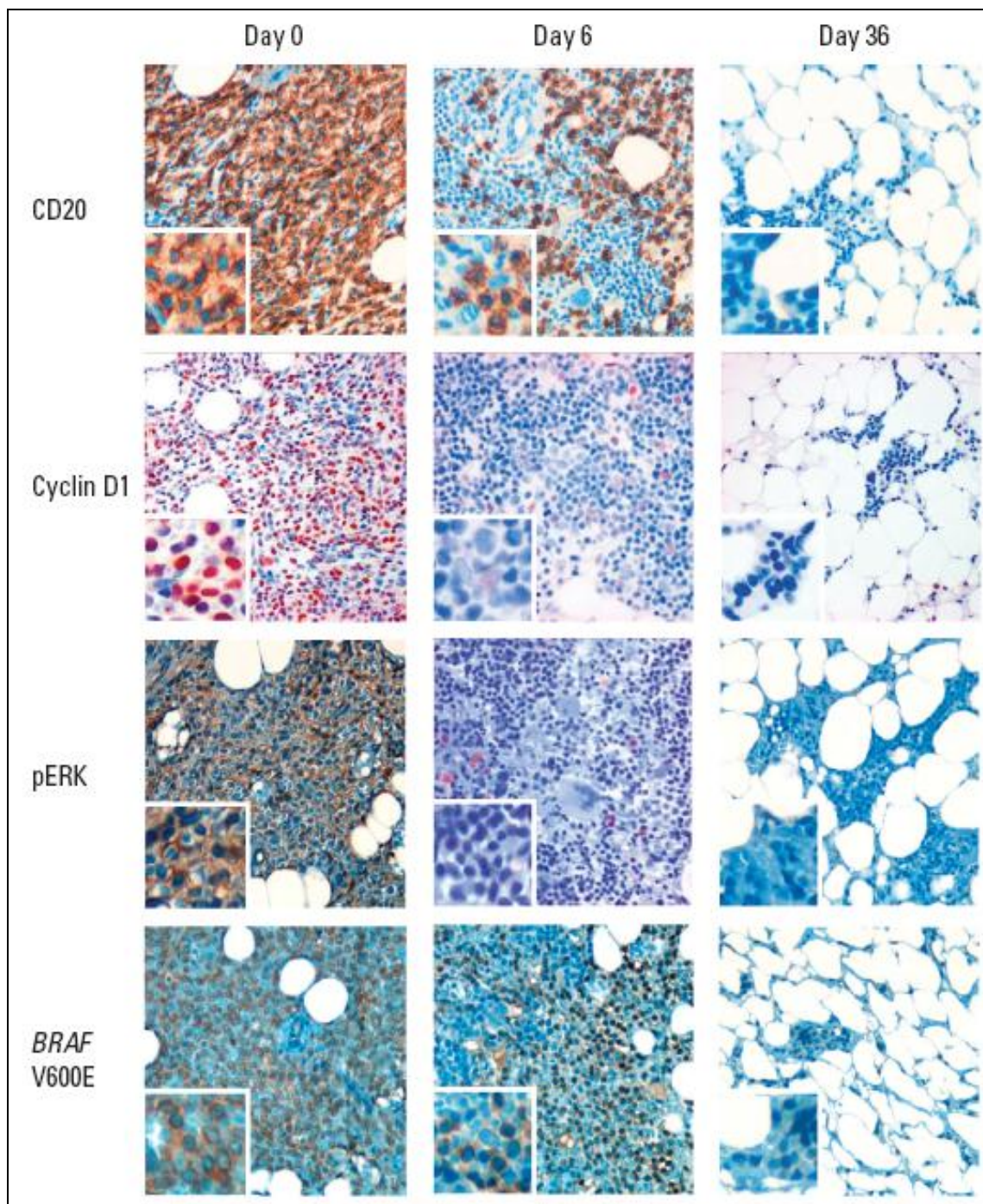


Figura 3.5 – Sezioni di tessuto midollare in cui si dimostra la positività in immunohistochimica per CD20, P-ERK (ERK fosforilato) e V600E B-Raf prima del trattamento con vemurafenib e ai giorni 6 e 36 di terapia. Si noti la completa abolizione del segnale immunohistochimico per P-ERK già a partire dal 6° giorno di terapia, pur persistendo a livello midollare ancora una discreta quota di tricoleucociti CD20⁺ 164.



4. VEMURAFENIB COME AGENTE SINGOLO NEL TRATTAMENTO DELLA LEUCEMIA A CELLULE CAPELLUTE

Allo scopo di valutare gli effetti del trattamento con vemurafenib, impiegato come agente singolo, nei pazienti affetti da leucemia a cellule capellute caratterizzata dalla presenza della mutazione V600E di B-Raf e ricaduta o refrattaria a precedente trattamento, è stato condotto uno studio multicentrico, di fase 2, sul territorio italiano (codice dello studio: HCL-PG01; EudraCT 2011-005487-13), pubblicato sul *New England Journal of Medicine* nella seconda metà del 2015²⁰. L'Istituto di Ematologia "Lorenzo e Ariosto Seràgnoli" di Bologna ha partecipato a questo studio con l'arruolamento di 8 pazienti affetti da leucemia a cellule capellute, pluritrattati, con diagnosi posta tra il 1982 e il 2007, con attuale necessità di terapia.

1. Disegno dello studio

1.1 Obiettivi, dimensione campionaria e aspetti statistici

Obiettivo principale dello studio è stata la determinazione dell'effetto anti-tumorale della molecola, accanto alla valutazione della sicurezza del trattamento, alla determinazione del periodo necessario ad ottenere una risposta clinica e della durata di risposta una volta sospeso il trattamento con vemurafenib.

L'*endpoint* principale dello studio è stato fissato nell'ottenimento di un tasso di risposte complete di almeno il 30% al termine della somministrazione del farmaco, dopo 8, 12 o 16 settimane di trattamento. Come *endpoints* secondari sono stati presi in esame: il monitoraggio degli eventi avversi (in termini di tipologia, incidenza, severità e relazione con il farmaco in studio) e delle alterazioni dei parametri laboratoristici; la misurazione del *time-to-response* (dal momento dell'inizio del trattamento al momento in cui si è documentata una risposta obiettiva); la misurazione

della durata della risposta, con monitoraggio clinico dei pazienti per 2 anni dal termine del trattamento, in termini di parametri ematologici periferici ed infiltrato tricoleucocitario midollare.

È stato fissato in 25 il numero di pazienti da arruolare, in un arco di tempo massimo di due anni. L'ipotesi nulla (p_0 , indicativa di non efficacia del trattamento in esame) è stata definita come un tasso di risposte complete al termine del trattamento in oggetto inferiore od uguale al 10% ($p_0 = 0,1$), mentre l'ipotesi alternativa (p_1 , indicativa di efficacia del farmaco) ha previsto la presenza di un tasso di risposte complete al termine del trattamento di almeno il 30% ($p_1 = 0,3$). Considerata la dimensione campionaria di 25 pazienti, con la possibilità di valutare l'entità delle risposte complete ottenute nei primi 15 pazienti arruolati, questo studio è risultato caratterizzato da una probabilità dell'80% di accettare l'ipotesi alternativa, quand'essa fosse vera, e del 95% di accettare l'ipotesi nulla, quand'essa fosse vera.

In termini operativi, il farmaco sarebbe stato considerato non efficace, portando di conseguenza ad un'interruzione dell'arruolamento, qualora nei primi 15 pazienti arruolati fossero state osservate meno di 2 risposte complete al termine delle settimane di somministrazione previste. In caso contrario, l'arruolamento sarebbe proceduto fino al raggiungimento dell'obiettivo di pazienti prefissato ($n = 25$). Al termine dell'arruolamento, ed una volta completata la somministrazione del farmaco in studio, questo sarebbe stato considerato non efficace nel caso in cui il numero di risposte complete osservate fosse stato inferiore a 6. Al contrario, se il numero di risposte complete fosse stato pari o superiore a 6, il farmaco sarebbe stato considerato efficace.

1.2 Diagnosi. Criteri di inclusione e di esclusione dei pazienti in studio

Ai fini dell'arruolamento, è stata richiesta la conferma della diagnosi di leucemia a cellule capellute sia dal punto di vista morfologico sia immunofenotipico (co-espressione dei marcatori di membrana CD11c, CD25, CD103, e/o positività per annessina-A1), secondo i criteri espressi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nella Classificazione dei tumori

dei tessuti ematopoietico e linfoide (all'epoca risultando ancora vigente la classificazione WHO-2008)¹⁶⁵. In parallelo, si è resa necessaria la dimostrazione della presenza della mutazione V600E di B-Raf tramite reazione polimerasica a catena allele-specifica.

I pazienti afferenti allo studio sono risultati affetti da leucemia a cellule capellute, nella sua variante classica, refrattaria ad un trattamento precedente con analoghi purinici (nessuna risposta, o ricaduta entro un anno), o in ricaduta dopo una precedente terapia con analoghi purinici, purché la ricaduta fosse avvenuta dopo almeno un anno, ma entro due anni, dal trattamento (se questo era il primo), oppure si fosse presentata entro 4 anni dal precedente trattamento (se questo rappresentava almeno una seconda linea). Una ricaduta accompagnata da una marcata ipoplasia midollare (definita come il riscontro di una cellularità emopoietica, valutata alla biopsia osteomidollare, inferiore al 20%), tale da precludere un ulteriore trattamento con analoghi purinici, ha fatto sì che il paziente fosse comunque eleggibile, indipendentemente dalla tempistica della ricaduta (anche se oltre 2 anni dal primo ciclo o oltre 4 anni da un ciclo successivo). Sono rientrati nello studio anche i pazienti che, dopo almeno due cicli di trattamento (dei quali almeno uno con analoghi purinici), hanno presentato la persistenza di malattia midollare pari o superiore al 30% della cellularità (configurando in questo senso un elevato rischio di ricaduta ematologica), e coloro i quali hanno manifestato severi effetti avversi durante un precedente trattamento con analoghi purinici (in termini di profonda e prolungata mielosoppressione, complicanze infettive, insufficienza renale, anemia emolitica autoimmune, sindromi vasculitiche).

In ogni caso, ai fini del trattamento, è stato necessario dimostrare l'attività della malattia in termini ematologici, documentando cioè la necessità clinica di una nuova ed imminente linea di terapia. I criteri per determinare tale condizione sono stati codificati in:

- conta assoluta di granulociti neutrofili $< 1.500/\text{mmc}$;
- concentrazione di emoglobina $< 11 \text{ g/dL}$;
- piastrine $< 100.000/\text{mmc}$;
- presenza di splenomegalia massiva o sintomatica;

- presenza di infezioni opportunistiche ricorrenti correlate alla citopenia;
- persistenza di malattia midollare pari o superiore al 30% della cellularità dopo precedente trattamento.

Hanno costituito ulteriori criteri di inclusione: l'età superiore a 18 anni; l'assenza di trattamento specifico per leucemia a cellule capellute nelle 12 settimane precedenti l'arruolamento (con completa risoluzione di tutti gli eventuali effetti avversi correlati ad un trattamento precedente); un *performance status* (ECOG) non superiore a 2; la presenza di un'adeguata funzionalità renale ed epatica (definite come: creatinina ≤ 2 mg/dL; AST, ALT, fosfatasi alcalina $\leq 2,5$ volte il valore massimo di riferimento; bilirubina totale $\leq 1,5$ volte il valore massimo di riferimento; valori maggiori sono risultati accettabili solo se correlati alla severità della patologia ematologica); l'assenza di condizioni (psicologiche, familiari, sociali, geografiche) tali da condizionare la corretta e necessaria adesione alle procedure previste dallo studio; l'accettazione di metodiche di contraccezione (nel paziente maschile e nelle donne in età fertile) per tutta la durata dello studio e per almeno 6 mesi dal termine dell'assunzione del farmaco.

L'arruolamento è inoltre risultato condizionato dalla firma del consenso informato prima dell'esecuzione di ogni procedura prevista dallo studio.

Costituivano criteri di esclusione: un precedente trapianto allogenico di midollo osseo; una storia di neoplasia maligna nei due anni precedenti (eccetto: carcinoma a cellule squamose della cute, carcinoma *in situ* della cervice uterina, melanoma cutaneo B-Raf V600E positivo); una concomitante terapia antitumorale o la somministrazione di un farmaco sperimentale nell'ambito di un *trial* clinico; una nota ipersensibilità a vemurafenib od altro B-Raf-inibitore; la gravidanza e l'allattamento; la presenza di sindrome da malassorbimento (vomito ricorrente, shunt biliare, resezione intestinale) o l'incapacità ad inghiottire farmaci in compresse; la presenza di morbidità cardiovascolari nei 6 mesi precedenti l'arruolamento, tra cui: infarto miocardico, angina instabile, scompenso cardiaco sintomatico, patologia cerebrovascolare o attacco ischemico transitorio,

embolia polmonare, ipertensione arteriosa non controllata; una nota sindrome del QT lungo, la presenza (anche anamnestica) di aritmia ventricolare o sopraventricolare di grado superiore a 2 (*Common terminology criteria for adverse events*, CTCAE)¹⁶⁶ o il riscontro di un intervallo QTc superiore o pari a 450 msec all'arruolamento; la presenza di epatite attiva o il riscontro di HIV-positività; la concomitante esistenza di condizioni morbose gravi, acute o croniche, tali da favorire l'insorgenza di eventi avversi correlati all'assunzione del farmaco in studio, ovvero da interferire con l'interpretazione dei risultati.

1.3 Dosaggio di vemurafenib e tempistiche di trattamento

Vemurafenib, in compresse per uso orale da 240 mg l'una, è stato somministrato alla dose di 960 mg/bid (4 compresse, 2 volte al giorno), tutti i giorni senza interruzioni, per un massimo di 16 settimane consecutive (con una pausa di due settimane prevista dopo le prime 8 settimane di trattamento). La scelta del dosaggio è derivata da quanto riportato in precedenti studi di fase 1-3 precedentemente condotti su pazienti affetti da melanoma^{152,154}.

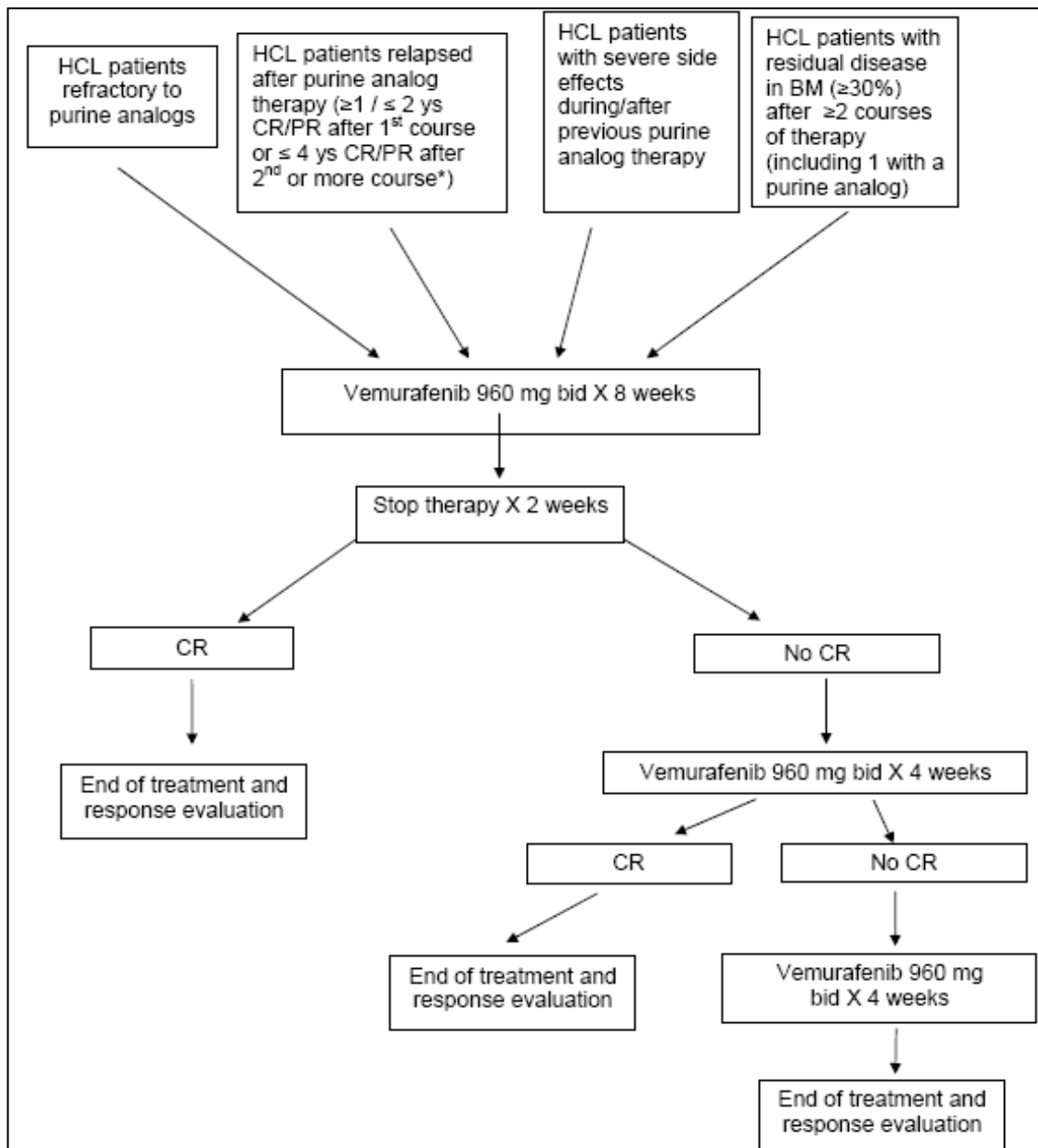
Il trattamento è stato continuato ininterrottamente per 8 settimane (a meno della comparsa di eventi avversi), al termine delle quali è avvenuta la rivalutazione dello stato di malattia (nel corso di due settimane di pausa, ovvero il tempo necessario a completare il *restaging* della malattia).

I pazienti che hanno ottenuto una risposta completa (si veda oltre per la definizione dei criteri di risposta) dopo le prime 8 settimane hanno sospeso il percorso di trattamento e sono entrati in monitoraggio longitudinale.

I pazienti non in risposta completa dopo 8 settimane hanno continuato il trattamento per ulteriori 4 settimane, al termine delle quali è avvenuta nuovamente la ristadiazione: i pazienti a questo punto in risposta completa (12 settimane di terapia) hanno sospeso il trattamento, entrando in monitoraggio longitudinale, mentre i pazienti non in risposta completa alla 12^a settimana hanno continuato il farmaco per ulteriori 4 settimane, fino a completare le 16 settimane di trattamento (figura 4.1 a pagina 65).

Una volta concluso il trattamento (dopo 8, 12 o 16 settimane), ciascun paziente ha iniziato un percorso di monitoraggio longitudinale (di durata prevista di 2 anni), con visite ogni 3 mesi (comprendenti valutazione clinica, obiettiva ed esecuzione di ecografia addominale) e ripetizione della biopsia osteomidollare ogni 6 mesi. Sono entrati in monitoraggio con analogia tempistica anche i pazienti che hanno interrotto il trattamento prima del suo completamento, per qualsivoglia ragione (tossicità, eventi avversi severi, ritiro del consenso, ecc.).

Figura 4.1 – Schema di trattamento. HCL, leucemia a cellule capellute; CR, risposta completa; PR, risposta parziale; BM, midollo osseo.



1.4 Modifiche della dose di trattamento

Modifiche della dose di trattamento o interruzioni del trattamento stesso si sono rese necessarie in caso di comparsa di effetti avversi; la gestione di tali evenienze è stata regolata sulla base del grado di tossicità riscontrata, come di seguito dettagliato. Non è stata presa in considerazione la tossicità ematologica, in quanto i pazienti in trattamento si caratterizzavano già di per sé per neutropenia, anemia o piastrinopenia in ragione della patologia ematologica da cui risultavano affetti.

In caso di tossicità di grado 2 (non tollerabile) o 3, è stata prescritta l'interruzione del trattamento, protratta fino a completa risoluzione dell'evento avverso (o a regressione ad un grado 1 di tossicità), con successiva ripresa ad un dosaggio inferiore, ridotto con decrementi di 240 mg/bid fino a 480 mg/bid. Possibile il re-incremento della dose dopo una precedente riduzione per evento avverso solo nel caso in cui fosse evidente un chiaro beneficio clinico correlabile all'incrementato dosaggio, in assenza di reali rischi legati alla sua tossicità. Il trattamento ha richiesto l'interruzione e la definitiva sospensione in occasione della terza comparsa di un evento avverso configurante una tossicità di grado 2 (non tollerabile) o 3, ovvero in caso di seconda ricorrenza di una tossicità di grado 4.

Tabella 4.1 – Riduzioni di dose in funzione del grado di tossicità.

Grado 1 Grado 2 (tollerabile)	Nessuna modifica della dose.
Grado 2 (non tollerabile) Grado 3	Interruzione fino a risoluzione o rientro al grado 1. Ripresa al dosaggio di 720 mg/bid o 480 mg/bid (nel caso di prima o seconda riduzione di dose, rispettivamente).
Grado 4	Interruzione fino a risoluzione o rientro al grado 1. Ripresa a dosaggio dimezzato (480 mg/bid). Sospensione definitiva alla successiva comparsa di eventi avversi di questa gravità.

La comparsa di lesioni cutanee in corso di trattamento, particolarmente di carcinomi a cellule squamose della cute, ha richiesto un'attenta valutazione dermatologica specialistica, con messa in atto dei provvedimenti del caso (resezione radicale delle eventuali lesioni carcinomatose riscontrate nell'intento di voler procedere con la somministrazione di vemurafenib).

1.5 Procedure clinico-strumentali previste dallo studio

L'attività antineoplastica di vemurafenib è stata valutata in maniera costante sia durante l'assunzione del farmaco, sia al termine del trattamento, in parallelo con la registrazione di qualsiasi evento avverso che abbia mostrato una possibile correlazione con il farmaco in studio.

Le strategie adottate per la determinazione e il monitoraggio temporale della risposta, nonché per la ricerca della malattia minima residua dopo trattamento sono elencate di seguito, con le rispettive tempistiche:

- esame clinico ed emocromocitometrico (con valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico) con contestuale valutazione dei parametri biochimici sieroematici ed urinari, eseguito settimanalmente durante il trattamento e prima dell'assunzione del farmaco in studio, a 4 settimane dal termine del trattamento e quindi ogni 3 mesi durante il monitoraggio longitudinale;
- ecografia addominale, finalizzata alla valutazione pre-trattamento e al monitoraggio (dopo 2, 4, 6, 8, 12 e 16 settimane di trattamento, quindi ogni 3 mesi) della splenomegalia e delle eventuali epatomegalia o linfadenopatie retroperitoneali o addominali profonde;
- mieloaspirato (all'arruolamento; dopo le settimane 4 e 8 di trattamento; dopo le eventuali settimane 12 e 16 di trattamento; ogni 6 mesi durante il monitoraggio longitudinale) con valutazione morfologica, citofluorimetrica e ricerca della mutazione B-Raf V600E;
- biopsia osteomidollare (contestuale al mieloaspirato) per la valutazione morfologica ed immunohistochimica;

- monitoraggio della malattia minima residua su sangue periferico (dopo le settimane 1, 2, 4, 6 e 8 di trattamento; dopo due settimane dall'ultima dose di trattamento; dopo le eventuali settimane 12 e 16 di trattamento; ogni 3 mesi durante il monitoraggio longitudinale), previa quantificazione dei tricoleucociti circolanti al momento dell'arruolamento, mediante citofluorimetria e ricerca della mutazione B-Raf V600E.

In associazione alle procedure eseguite per il monitoraggio dell'attività antineoplastica, è stato adottato un percorso di sorveglianza dermatologico-ginecologica volto alla ricerca di lesioni precancerose o indicative di carcinoma a cellule squamose della cute e della cervice uterina, nonché un protocollo di studio radiologico con tomografia computerizzata (TC) totale corporea con mezzo di contrasto finalizzato alla ricerca/esclusione di lesioni carcinomatose squamocellulari non cutanee di recente insorgenza.

1.6 Criteri di risposta

La risposta al trattamento è stata codificata in risposta completa (RC), risposta parziale (RP), risposta minima (RM) o non risposta (NR) sulla base di criteri clinici, ematologici e morfologici (con qualche lieve differenza rispetto ai criteri di risposta di riferimento secondo *Consensus Resolution*⁶⁷).

- La *risposta completa* è stata definita a livello ematologico periferico dalla presenza di: conta assoluta di neutrofili $> 1.500/\text{mmc}$, emoglobina $\geq 11 \text{ g/dL}$, piastrine $> 100.000/\text{mmc}$ per almeno un mese, con indipendenza trasfusionale o dall'utilizzo di fattori di crescita. Sul piano clinico e morfologico, la risposta completa si è configurata con la regressione completa della splenomegalia e delle eventuali epatomegalia e/o linfadenopatie (all'esame fisico ed ecografico o radiologico TC) e con l'assenza di cellule capellute nel sangue periferico e nel midollo osseo.
- La *risposta parziale* ha previsto il miglioramento delle citopenie esistenti di almeno il 50% dei valori iniziali, con una riduzione di almeno il 50% della conta di cellule capellute nel sangue periferico e

dell'infiltrato midollare leucemico ed una riduzione di almeno il 50% della splenomegalia, dell'epatomegalia e delle linfadenopatie rispetto ai valori basali.

- La *risposta minima* ha previsto il miglioramento delle citopenie esistenti di almeno il 25% dei valori iniziali, ma non oltre il 50%, con una riduzione di almeno il 25%, ma non oltre il 50%, della conta di cellule capellute nel sangue periferico o dell'infiltrato midollare leucemico ed una riduzione di almeno il 25%, ma non superiore al 50%, della splenomegalia, dell'epatomegalia e delle linfadenopatie rispetto ai valori basali.
- Il quadro si è caratterizzato come *non risposta* nei casi restanti.

2. Caratteristiche dei pazienti arruolati

L'arruolamento, che ha visto coinvolti 8 centri di Ematologia sul territorio italiano, si è completato nell'arco di 11 mesi, dal giugno 2012 al maggio 2013, più precocemente rispetto al periodo inizialmente stimato di due anni. Sono stati arruolati 28 pazienti, 3 in più rispetto alla dimensione campionaria prevista, per via dell'imponente numero di pazienti con leucemia a cellule capellute pluritrattati, in recidiva o ricaduta e bisognosi di trattamento presenti nei centri italiani partecipanti allo studio. Tale estensione di 3 pazienti, tuttavia, non ha comportato alterazioni nell'iniziale valutazione statistica e nella definizione degli obiettivi dello studio, in termini quantitativi.

L'età mediana al momento dell'arruolamento è risultata essere di 57 anni (*range*: 27-84). Il numero di linee terapeutiche precedentemente eseguite è risultato variabile tra 1 e 12, con un valore mediano di 3. Tutti i pazienti hanno almeno eseguito una linea di terapia contenente un analogo purinico, tra cui cladribina o pentostatina, da solo od eventualmente in associazione con rituximab. In 19 pazienti, l'analogo purinico è stato ripetuto almeno una volta, e in 19 di essi questo ha rappresentato l'ultima linea di trattamento prima dell'arruolamento (cladribina in 14 pazienti, pentostatina in 5 pazienti). L' α -interferone è stato impiegato in 11 pazienti, ripetuto in 5

di essi almeno una volta e rappresentando l'ultima terapia prima del vemurafenib in 4 casi; il rituximab è stato utilizzato in 14 pazienti, in 5 casi in associazione ad un analogo purinico e in 4 casi ripetuto almeno una volta. In 7 casi, esso ha rappresentato l'ultima linea di terapia prima dell'arruolamento nel protocollo: in 4 di essi, esso è risultato associato con un analogo purinico. Otto pazienti sono stati sottoposti a splenectomia.

Nel corso della storia terapeutica della loro malattia, 6 pazienti sono risultati refrattari alla prima terapia con analogo purinico ricevuta (*primary refractory*); 21 pazienti hanno mostrato una ricaduta precoce o ripetute ricadute dopo una o più linee contenenti analoghi purinici; un paziente (di anni 81) ha mostrato una severa tossicità midollare alla prima linea di trattamento contenente pentostatina, tale da precludere un successivo impiego di analoghi purinici.

2.1 Analisi dei pazienti refrattari alla prima terapia con analogo purinico

Trattasi di 6 pazienti che non hanno ottenuto alcuna risposta (*primary refractory*) dopo la prima terapia con analogo purinico ricevuta (cladribina in 5 casi). In 4 casi, l'analogo purinico è stato somministrato come prima linea di terapia, mentre nei restanti casi esso ha rappresentato una seconda linea di trattamento, rispettivamente dopo splenectomia e dopo l'impiego di α -interferone.

Due dei pazienti che hanno ricevuto l'analogo purinico in prima linea sono stati immediatamente avviati a terapia con vemurafenib. In due casi di refrattarietà alla cladribina è stata impiegata la pentostatina con successo, come agente singolo o in associazione a rituximab, ottenendo risposte della durata di 20 e 56 mesi, rispettivamente.

2.2 Analisi dei pazienti in ricaduta dopo analoghi purinici

Dei 21 pazienti in ricaduta precoce o con ripetute ricadute dopo una o più linee contenenti analoghi purinici, 15 hanno mostrato una risposta all'ultimo analogo purinico ricevuto nel corso della propria storia di trattamento, configurando una durata mediana di risposta di 27 mesi (*range*: 17-111 mesi). Quindici pazienti hanno ricevuto un analogo

purinico come ultima linea di trattamento (pentostatina in 13 casi, in 2 di questi associata a rituximab); di questi, 10 hanno ottenuto una risposta clinica della durata mediana di 26,5 mesi (*range*: 17-35 mesi). In relazione all'ultima terapia ricevuta, soltanto 11 pazienti hanno dimostrato una risposta clinica, configurando una durata mediana di risposta di 26 mesi (*range*: 17-35 mesi).

3. Risposta al trattamento

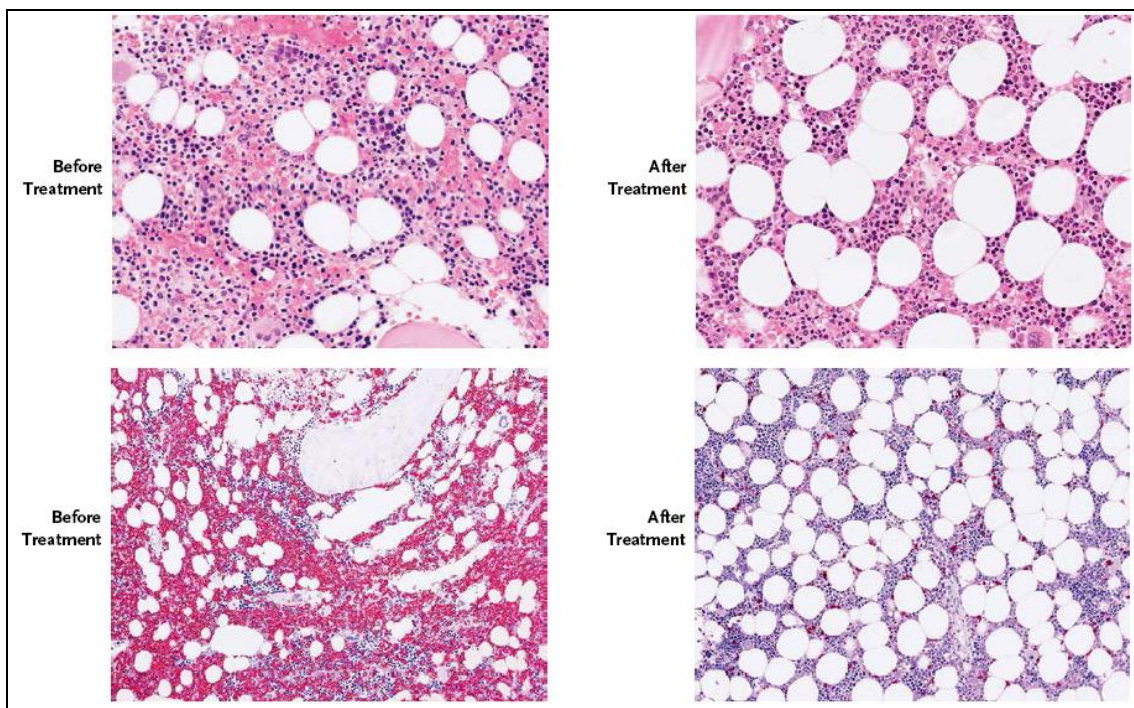
Dei 28 pazienti arruolati, 26 sono risultati idonei per la valutazione della risposta finale. Due pazienti, infatti, sono usciti dallo studio nel corso della prima settimana di trattamento a causa di un infarto miocardico acuto (giudicato non correlato al trattamento in corso) e di una pancreatite acuta (considerata correlata al farmaco sperimentale).

Dei 26 pazienti valutabili, 25 (96,1%) hanno ottenuto una risposta clinica, consistente in una risposta completa in 9 casi (34,6%) e in una risposta parziale in 16 casi (61,5%). Un paziente (3,9%) non ha ottenuto alcuna risposta dopo 16 settimane di trattamento. La risposta clinica è stata ottenuta (*time-to-response*) dopo una mediana di 8 settimane (*range*: 4-12) di trattamento per i pazienti che hanno ottenuto una risposta completa, e di 10 settimane (*range*: 4-16) per coloro che hanno ottenuto una risposta parziale.

Tra i 9 pazienti in risposta completa, 4 (44,4%) hanno normalizzato sia i parametri ematologici periferici sia il quadro midollare entro le prime 4 settimane di trattamento, configurando pertanto un quadro di risposta completa estremamente precoce. Tra questi pazienti si annoverano, peraltro, un paziente considerato *primary refractory* ad un precedente trattamento con pentostatina ed un paziente di 84 anni, trattato con 5 linee precedenti, non responsivo all'ultima terapia con α -interferone. I restanti 5 pazienti hanno ottenuto la risposta completa dopo 8 settimane (4 pazienti, 44,4%) e dopo 12 settimane (1 paziente, 11,1%) di terapia con vemurafenib.

È da notare, in ogni caso, che in tutti i pazienti in risposta completa emato-midollare (si ricorda che questa è stata valutata in termini morfologici con colorazione del tessuto midollare in ematossilina-eosina) è stato possibile documentare un piccolo residuo di cellule CD20⁺ (tricoleucociti), sempre inferiore al 10%, nella biopsia osteomidollare ottenuta al termine del trattamento (figura 4.2).

Figura 4.2 – Studio osteomidollare in un paziente dello studio prima del trattamento e dopo 8 settimane di terapia. Il pannello superiore fa riferimento alla valutazione in ematossilina-eosina, mentre nel pannello inferiore è mostrata la colorazione in immunohistochimica per il CD20. Dal raffronto dei campioni pre- e post-terapia in ematossilina-esosina, si diagnostica una risposta completa midollare dopo 8 settimane di trattamento (scomparsa dell'infiltrato tricoleucocitario). In immunohistochimica, l'infiltrato CD20⁺, che prima del trattamento rappresenta almeno il 75% della cellularità, non scompare del tutto, rappresentando a 8 settimane meno del 10% della cellularità esaminata.



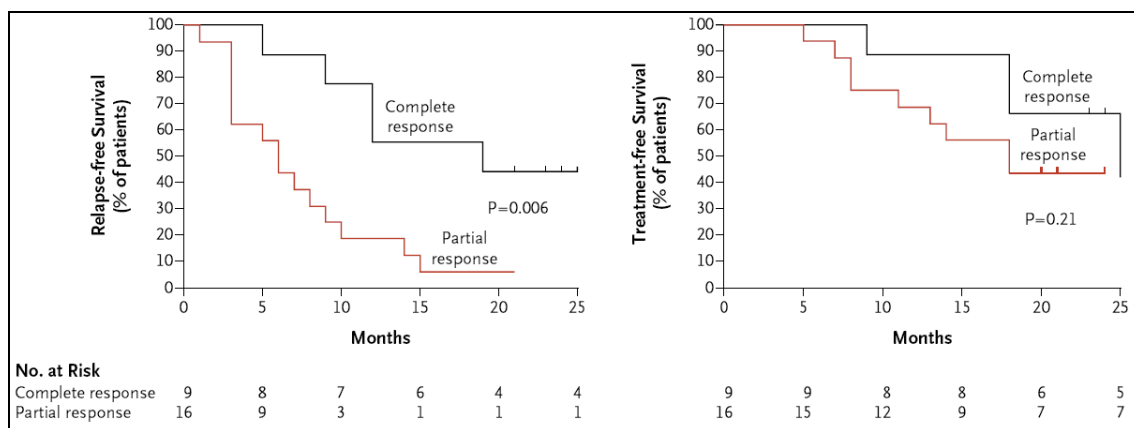
Nell'ambito dei 16 pazienti in risposta parziale, 2 (12,5%) hanno ottenuto la risposta dopo 4 settimane di trattamento e 5 (31,3%) dopo 8 settimane di trattamento. In questi pazienti, il trattamento è stato protratto fino alla 16^a settimana senza ottenere ulteriore miglioramento del quadro emato-midollare. Rientrano in questo gruppo i rimanenti 4 pazienti considerati

primary refractory alla prima terapia ricevuta con analogo purinico, nonché l'unico paziente che ha mostrato severa mielotossicità al precedente trattamento con pentostatina.

4. Analisi della sopravvivenza

Il *follow-up* mediano dei 25 pazienti in risposta è di 23 mesi (*range*: 7-28), calcolato a partire dalla data dell'ultima somministrazione di vemurafenib. La mediana di intervallo libero da ricaduta (*relapse-free survival*) è risultata di 9 mesi, significativamente più lunga per i pazienti che hanno ottenuto una risposta completa rispetto a coloro che hanno raggiunto soltanto una risposta parziale (19 mesi *versus* 6 mesi, rispettivamente, $p = 0,006$). Nell'ambito dei 26 pazienti valutabili, la durata mediana dell'intervallo libero da trattamento (*treatment-free survival*) è risultata di 21,5 mesi, in assenza di significative differenze tra gruppi di pazienti con diversa profondità di risposta (25 e 18 mesi, rispettivamente per i pazienti in risposta completa e in risposta parziale, $p = 0,21$).

Figura 4.3 – Sopravvivenza libera da ricaduta (sinistra) e intervallo libero da trattamento (destra) nei 25 pazienti che hanno ottenuto una risposta al trattamento.



Venti pazienti hanno mostrato una ricaduta di malattia nell'ambito del periodo di osservazione post-trattamento: 5 di essi sono ricaduti dopo aver raggiunto una risposta completa e 15 dopo l'ottenimento di una risposta parziale. Ad una mediana di 15 mesi di osservazione (*range*: 4-18), 7 di essi non hanno richiesto un nuovo trattamento, dal momento che non si

configuravano citopenie periferiche tali da richiede un immediato intervento. Più nello specifico, tali pazienti hanno mantenuto una concentrazione mediana di emoglobina di 14,2 g/dL (*range*: 12,4-17,5), una conta periferica di granulociti neutrofili di 1.122/mm³ (*range*: 938-1.724) ed una conta piastrinica di 86.000/mm³ (*range*: 63.000-269.000). Per contro, in 13 dei 20 pazienti ricaduti, le citopenie periferiche si sono dimostrate rapidamente ingravescenti, con necessità di un nuovo trattamento antileucemico entro un intervallo mediano di 5 mesi (*range*: 0-16) dall'ultima dose di vemurafenib ricevuta.

Cinque pazienti non hanno mostrato una ricaduta di malattia nel corso del *follow-up* previsto dallo studio: tra essi, 4 in risposta completa e 1 in risposta parziale. In particolare, tra i 4 pazienti in risposta completa, 3 hanno mostrato l'assenza di tricoleucociti alla biopsia osteomidollare fino a due anni dal termine del trattamento, mentre uno di essi – pur a fronte di una persistenza di piccolo infiltrato leucemico midollare – ha mantenuto un quadro di risposta ematologica periferica a due anni dal termine del trattamento.

Non sono state registrate differenze significative, in termini di *relapse-free survival* e *treatment-free survival* tra pazienti che sono andati incontro o meno a riduzione di dose per via dell'insorgenza di effetti avversi (14 e 11 mesi, rispettivamente). Tra i pazienti splenectomizzati in precedenza, tuttavia, è stato possibile dimostrare un più breve intervallo libero da ricaduta ed una minore sopravvivenza libera da trattamento rispetto ai pazienti non splenectomizzati (6 *versus* 11 mesi, $p = 0,04$ e 11 *versus* 25 mesi, $p = 0,01$, rispettivamente).

5. Tossicità e tolleranza

Il trattamento con vemurafenib è risultato ben tollerato. Tra gli eventi avversi segnalati, riscontrati nella totalità dei pazienti trattati, emergono i dolori articolari, peraltro ben controllati con basse dosi di terapia steroidea, quando necessaria, ed in ogni caso reversibili e di lieve entità. È stato documentato un caso di pancreatite di grado 3 nel corso della prima

settimana di trattamento, che ha portato al ritiro del consenso da parte del paziente (risultato per tale motivo non valutabile ai fini della risposta). Da segnalare diversi episodi di tossicità cutanea, caratterizzati dalla presenza di *rash*, reazioni di fotosensibilizzazione, comparsa di papillomi cutanei, ipercheratosi o disestesia palmo-plantare. Sono inoltre stati osservati due carcinomi basocellulari ed un melanoma superficiale, tutti sottoposti a resezione radicale. In nessun paziente si è osservata mielosoppressione correlabile al trattamento in atto.

La tabella 4.2 riporta le tossicità registrate di grado superiore a 2. Non sono stati riportati eventi avversi di grado superiore a 3.

Tabella 4.2 – Profilo di tossicità di vemurafenib nell'intera popolazione in studio valutabile per la tossicità (28 pazienti).

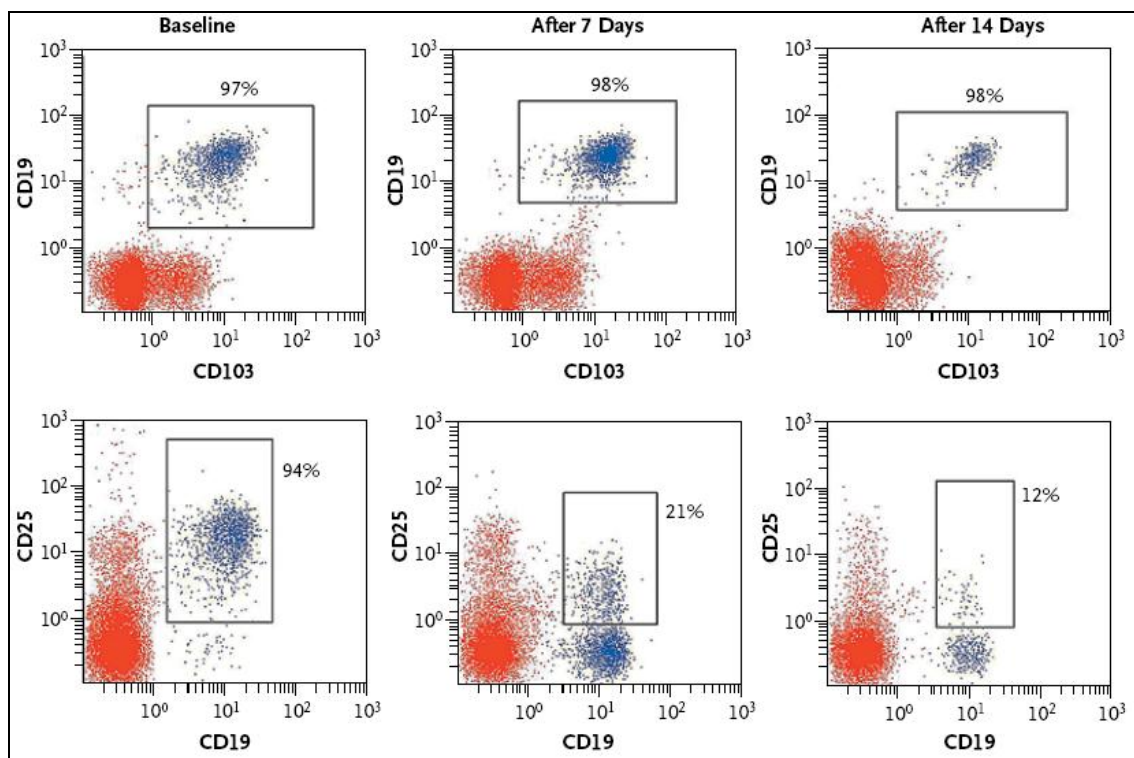
Evento avverso	Grado 2	Grado 3	Totale
Artralgia	10 (36%)	2 (7%)	12 (43%)
<i>Rash</i> o eritema	11 (39%)	2 (7%)	13 (46%)
Carcinoma basocellulare	2 (7%)	0	2 (7%)
Melanoma cutaneo superficiale	0	1 (4%)	1 (4%)
Papilloma cutaneo	2 (7%)	0	2 (7%)
Fotosensibilizzazione	2 (7%)	0	2 (7%)
Ipercheratosi	3 (11%)	0	3 (11%)
Panniculite	2 (7%)	0	2 (7%)
Pancreatite	1 (4%)	2 (7%)	3 (11%)
Incremento enzimi pancreatici	1 (4%)	1 (4%)	2 (7%)
Iperbilirubinemia	2 (7%)	1 (4%)	3 (11%)
Incremento transaminasi	1 (4%)	0	1 (4%)
Disestesia palmo-plantare	2 (7%)	0	2 (7%)
Cefalea	1 (4%)	0	1 (4%)
Incremento creatinina	2 (7%)	0	2 (7%)
Cheratosi seborroica	2 (7%)	0	2 (7%)
Astenia	1 (4%)	0	1 (4%)
Dolore muscolo-scheletrico	1 (4%)	0	1 (4%)
Dolore addominale	1 (4%)	0	1 (4%)

La dose iniziale di vemurafenib è stata ridotta in 15 pazienti (per una durata complessiva di almeno 3 settimane), portando il farmaco a 720 mg/bid (una riduzione di dose) in 9 casi, a 480 mg/bid (due riduzioni di dose) in 3 casi e a 240 mg/bid (tre riduzioni di dose) in 3 casi. Gli eventi tossici che hanno portato alla riduzione del dosaggio sono stati: *rash* cutaneo (6 pazienti), incremento della creatinemia o delle concentrazioni sieriche di bilirubina, artralgie, pancreatite, disestesia palmo-plantare.

6. Aspetti di farmacodinamica

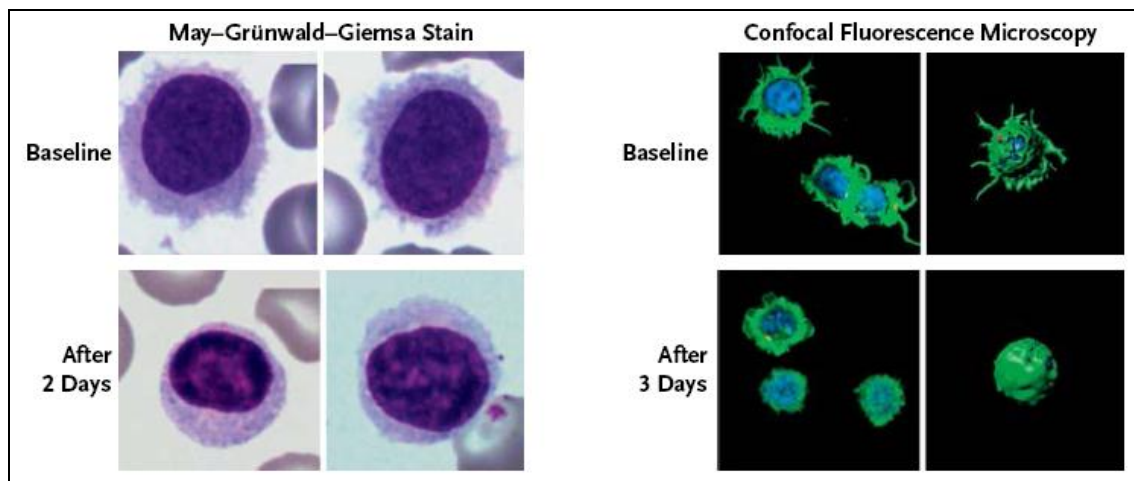
I tricoleucociti esposti all'azione di vemurafenib *in vitro* dimostrano la riduzione dell'espressione dell'antigene di superficie CD25 e perdono le caratteristiche protrusioni filamentose citoplasmatiche⁴². Il dato citofluorimetrico di ridotta espressione del CD25 da parte delle cellule leucemiche dei pazienti in corso di trattamento con vemurafenib è stato riportato in 15 dei 19 casi in studio valutati in questo senso (79%, figura 4.4), pur persistendo il restante fenotipo leucemico, CD19⁺, CD103⁺.

Figura 4.4 – Dati citofluorimetrici in un paziente in trattamento con vemurafenib (vedere testo per spiegazione).



In parallelo, è stato possibile osservare al microscopio ottico e al microscopio a fluorescenza la perdita delle protrusioni citoplasmatiche dei tricoleucociti in un caso esordito con marcata leucocitosi (figura 4.5) già a partire dal secondo giorno di trattamento. Ciò conferma il ruolo della mutazione di *B-raf* nel determinare il fenotipo morfologico della cellula leucemica, oltre alle restanti caratteristiche biologiche della stessa.

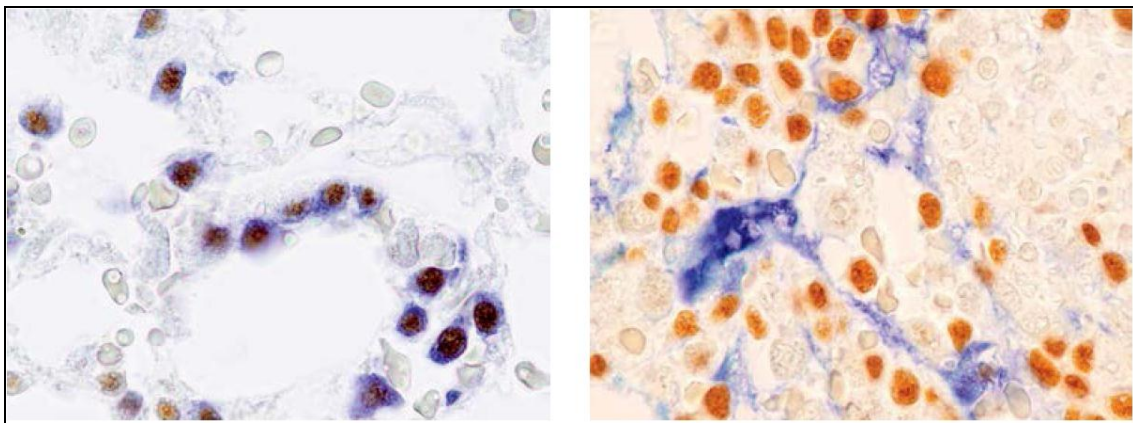
Figura 4.5 – La morfologia dei tricoleucociti si modifica rapidamente in corso di esposizione a vemurafenib, con perdita delle caratteristiche proiezioni citoplasmatiche già a partire dal secondo giorno di trattamento (May-Grünwald-Giemsa). Il dato è ancor più evidente in microscopia confocale a fluorescenza.



In 13 dei 26 pazienti in studio è stata valutata su tessuto midollare, mediante immunohistochimica, l’infiltrazione di cellule leucemiche positive per ERK fosforilato (P-ERK) al termine del trattamento con vemurafenib (in concomitanza all’espressione di PAX5, che evidenzia i tricoleucociti residui). Sei pazienti, tutti in risposta parziale, nonostante la prolungata esposizione a vemurafenib (16-20 settimane), hanno mostrato la persistenza di un infiltrato leucemico midollare PAX5-positivo e P-ERK-positivo. In 7 pazienti (di cui 2 in risposta completa e 5 in risposta parziale) non è stata invece dimostrata la positività per P-ERK, sebbene fosse confermata la persistenza di un piccolo infiltrato di cellule leucemiche PAX5-positive (figura 4.6 a pag. 78). I pazienti con attività P-ERK residua hanno mostrato una sopravvivenza libera da progressione di malattia di 8 mesi (*range*: 5-13), mentre nei pazienti negativi per P-ERK tale valore è risultato di 13

mesi (*range*: 8-24), con una significatività statistica ($p = 0,004$). La presenza di attività P-ERK residua al termine del trattamento, pertanto, è un probabile indicatore di malattia resistente al trattamento con vemurafenib, documentando cellule leucemiche in grado di riattivare la via di segnalazione a valle di B-Raf (MEK-ERK-dipendente) attraverso meccanismi alternativi¹⁶⁷.

Figura 4.6 – Sezioni ottenute da biopsia osteomidollare in pazienti in risposta clinica almeno parziale al termine del trattamento, con reazione immunoistochimica per P-ERK (blu) e PAX5 (marrone). Nel pannello a sinistra, si evidenzia la coespressione di P-ERK e PAX5 a carico dei tricoleucociti residui. Nel pannello a destra, i tricoleucociti residui non mostrano attività P-ERK (la colorazione in blu non è concomitante alla colorazione marrone; risultano P-ERK-positivo alcune cellule stromali non leucemiche, assunte come controllo interno positivo).



7. Sintesi dei risultati clinici e problematiche aperte

Vemurafenib, somministrato per via orale e come agente singolo, alla dose di 960 mg/bid, per una durata di 16-18 settimane, è in grado di modificare il fenotipo leucemico e di indurre rapide risposte a livello del sangue periferico (risoluzione delle citopenie) e del tessuto midollare (riduzione, in alcuni casi fino alla quasi completa scomparsa dei tricoleucociti) in pazienti con leucemia a cellule capellute pluritratate, ricaduti dopo analoghi purinici o ad essi refrattari e non in grado di ricevere ulteriore trattamento con questi agenti. I tassi di risposta sono assolutamente rilevanti, con il 96,1% di risposte globali, aspetto che dimostra la centralità dell'alterazione

molecolare a carico di B-Raf come principale meccanismo patogenetico²⁰. Per contro, risulta alquanto ridotto il tasso di risposte complete (34,6% dei casi): ciò può dipendere da almeno tre ordini di fattori:

- selezione, sulla base dei criteri di arruolamento, di una popolazione di pazienti a prognosi sfavorevole, in quanto precedentemente pluritrattata e con malattia plurirecidivante;
- possibile insufficiente durata di trattamento, tale da non determinare una completa ablazione del clone leucemico in tutti i pazienti;
- sviluppo di meccanismi di resistenza a vemurafenib, come dimostrato dalla persistente attività di P-ERK al termine del trattamento in parte dei pazienti responsivi, che si traduce in una riattivazione della via di MEK-ERK indipendentemente dal *signaling* B-Raf mediato¹⁶⁷.

In aggiunta a quanto sopra detto, è da segnalare che dose e durata di trattamento impiegati nello studio sono stati mutuati dai precedenti studi effettuati su melanoma metastatico e non resecabile¹⁵²⁻¹⁵⁴: non sono a tutt'oggi noti i risultati di trattamenti con vemurafenib di più lunga durata (da valutare con estrema cautela, dal momento che una maggiore durata di trattamento può aprire il campo ad eventi tossici – anche di natura neoplastica – di possibile notevole rilevanza sul piano clinico), mentre sono già pubblicati alcuni dati relativi a dosaggi differenti (si veda in proposito al paragrafo 8).

Infine, sulla base di quanto osservato, risulta ragionevole impiegare vemurafenib in associazione ad altre molecole:

- delle quali si conosce il profilo di attività e sicurezza nei pazienti con leucemia a cellule capellute, come l'anticorpo anti-CD20 rituximab⁹⁴⁻¹⁰⁰, in questo modo sfruttando due meccanismi d'azione tra loro differenti e probabilmente complementari (alla terapia di combinazione si fa specificamente riferimento nel capitolo 5);
- che agiscano sulla stessa via di segnalazione delle MAP-chinasi, di concerto a vemurafenib, andando ad inibire il *signaling* a valle, con la finalità di potenziare la risposta clinica o ridurre i fenomeni di resistenza/attivazione paradossa di MEK-ERK.

Gli inibitori di MEK (trametinib, selumetinib, cobimetinib)^{168,169} hanno già un ruolo in popolazioni di pazienti con melanoma metastatico e, sulla base del meccanismo d'azione che in questi contesti essi possiedono, trovano un razionale d'impiego nei pazienti con leucemia a cellule capellute pluritrattati e multirecidivanti.

8. Ulteriori esperienze con vemurafenib impiegato come agente singolo

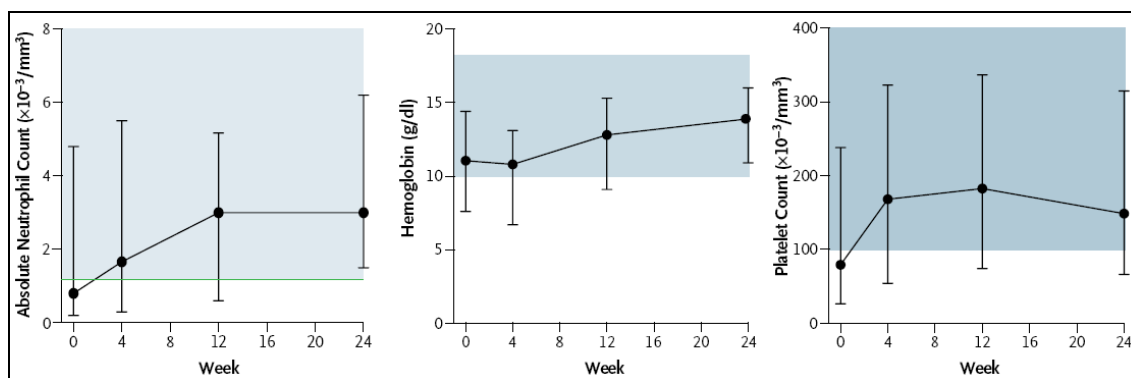
Lo studio pubblicato sul *New England Journal of Medicine* di cui si è discusso in questo capitolo²⁰ ha raccolto, oltre all'esperienza italiana sui 28 pazienti descritti, un'analogha esperienza condotta negli Stati Uniti (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York; Hofstra North Shore-Long Island School of Medicine, New York; Dana-Farber Cancer Institute, Boston; Scripps Clinic, La Jolla; Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center, Chicago; Ohio State University, Columbus) su 26 pazienti con leucemia a cellule capellute refrattari ad analoghi purinici, in ricaduta precoce (tra 1 e 2 anni) dopo trattamento con cladribina o pentostatina o con plurime ricadute di malattia. Le modalità di trattamento sono risultate sovrapponibili allo studio italiano, con utilizzo di vemurafenib alla dose di 960 mg/bid per 12 settimane di terapia consecutive (al termine delle quali veniva valutato il tasso di risposta), con possibile estensione della finestra terapeutica per ulteriori 12 settimane nei pazienti con malattia residua (documentata morfologicamente su tessuto midollare, in aggiunta alla valutazione immunoistochimica per CD20, PAX5, DBA.44 e citochimica per la fosfatasi acida tartrato-resistente).

L'età mediana dei pazienti è risultata di 62 anni (*range*: 44-88), con una mediana di 3 precedenti linee di terapia (*range*: 1-8), tra cui la splenectomia in 5 pazienti (19% dei casi).

La risposta dopo 12 settimane di trattamento è risultata del 100%, valutata su 24 pazienti che – al momento dell'analisi dei dati – avevano ricevuto il trattamento per almeno 12 settimane (mediana di trattamento di 18 settimane). Il 42% dei pazienti (10 su 24 valutabili) ha ottenuto una risposta completa, mentre il 58% (14 su 24 pazienti) ha ottenuto una risposta

parziale. Ad un anno dal termine del trattamento, la sopravvivenza libera da progressione è risultata del 71%, con una sopravvivenza globale del 91%. Sette pazienti dei 24 valutabili hanno mostrato una progressione di malattia, 3 di essi dopo aver ottenuto una risposta completa. Anche in questo studio, il trattamento con vemurafenib ha permesso un miglioramento ematologico periferico – fino alla completa risoluzione delle citopenie – nel corso delle prime settimane di trattamento (figura 4.7), a fronte di un profilo di sicurezza sostanzialmente sovrapponibile a quanto già descritto per lo studio italiano²⁰.

Figura 4.7 – Andamento temporale della concentrazione di neutrofili (primo grafico a sinistra), di emoglobina (grafico al centro) e di piastrine (grafico a destra) nel sangue periferico in corso di trattamento con vemurafenib²⁰.



Uno studio indipendente, pubblicato nel 2016 su *Blood*¹⁷⁰ e coinvolgente 11 centri ematologici europei, ha raccolto la casistica di 21 pazienti affetti da leucemia a cellule capellute trattati con vemurafenib al di fuori di studi clinici, con dosi variabili da 240 mg/die a 960 mg/bid. Ad eccezione di due pazienti che hanno ricevuto vemurafenib in prima linea, questo studio ha preso in considerazione pazienti pretrattati, con una media di 3 precedenti trattamenti, ed in fase di malattia attiva con necessità di terapia. Diciassette pazienti hanno ricevuto vemurafenib al dosaggio di 240 mg/bid, in 5 casi incrementato ai dosaggi di 480 mg/bid, 720 mg/bid e 960 mg/bid a discrezione del curante. La durata del trattamento è risultata variabile tra 8 e 38 settimane. In 20 pazienti (95% dei casi) si è osservata una risposta ematologica; in 15 pazienti è risultata disponibile anche la valutazione osteomidollare, configurando un quadro di risposta completa (secondo i

criteri *Consensus Resolution*⁶⁷) in 6 casi. La sopravvivenza libera da eventi è risultata di 17 mesi, non influenzata né dalla dose di farmaco ricevuta né dalla durata del trattamento. La sopravvivenza globale a 12 mesi si è attestata all'88%, con 3 decessi (uno solo di essi legato alla progressione di malattia). L'intervallo libero da trattamento è risultato di 14 mesi. In pazienti trattati al dosaggio di 240 mg/bid, è stato possibile osservare su tessuto midollare la completa assenza di P-ERK (in maniera metodologicamente affine a quanto descritto per lo studio italiano e documentato in figura 4.6), in tal senso mettendo in luce l'efficacia farmacodinamica del trattamento anche quando eseguito a dosaggi inferiori rispetto a quelli in precedenza descritti. Il profilo di tossicità del trattamento a dosi ridotte non è risultato particolarmente dissimile da quanto già riportato¹⁷⁰.

9. Ripetizione del trattamento con vemurafenib

Alcuni pazienti arruolati nello studio italiano e nello studio statunitense sono stati sottoposti a nuovo trattamento con vemurafenib al momento della perdita della risposta: complessivamente, 17 pazienti tra i due studi hanno intrapreso un nuovo trattamento, con l'ottenimento di 2 risposte complete e 5 risposte parziali. Due pazienti hanno sospeso il trattamento rispettivamente per tossicità cutanea (fotosensibilizzazione) e per progressione di malattia. Non è disponibile alcuna valutazione per quanto riguarda i restanti casi²⁰.

Sei pazienti presi in considerazione nello studio retrospettivo con vemurafenib a dosaggio ridotto sono andati incontro ad un nuovo trattamento con vemurafenib (con l'aggiunta di rituximab in un caso), sempre a dosaggio ridotto: in tutti i casi si è ottenuto un miglioramento delle citopenie periferiche, con una risposta parziale emato-midollare in due casi¹⁷⁰.

5. LA COMBINAZIONE DI VEMURAFENIB E RITUXIMAB NEL TRATTAMENTO DELLA LEUCEMIA A CELLULE CAPELLUTE

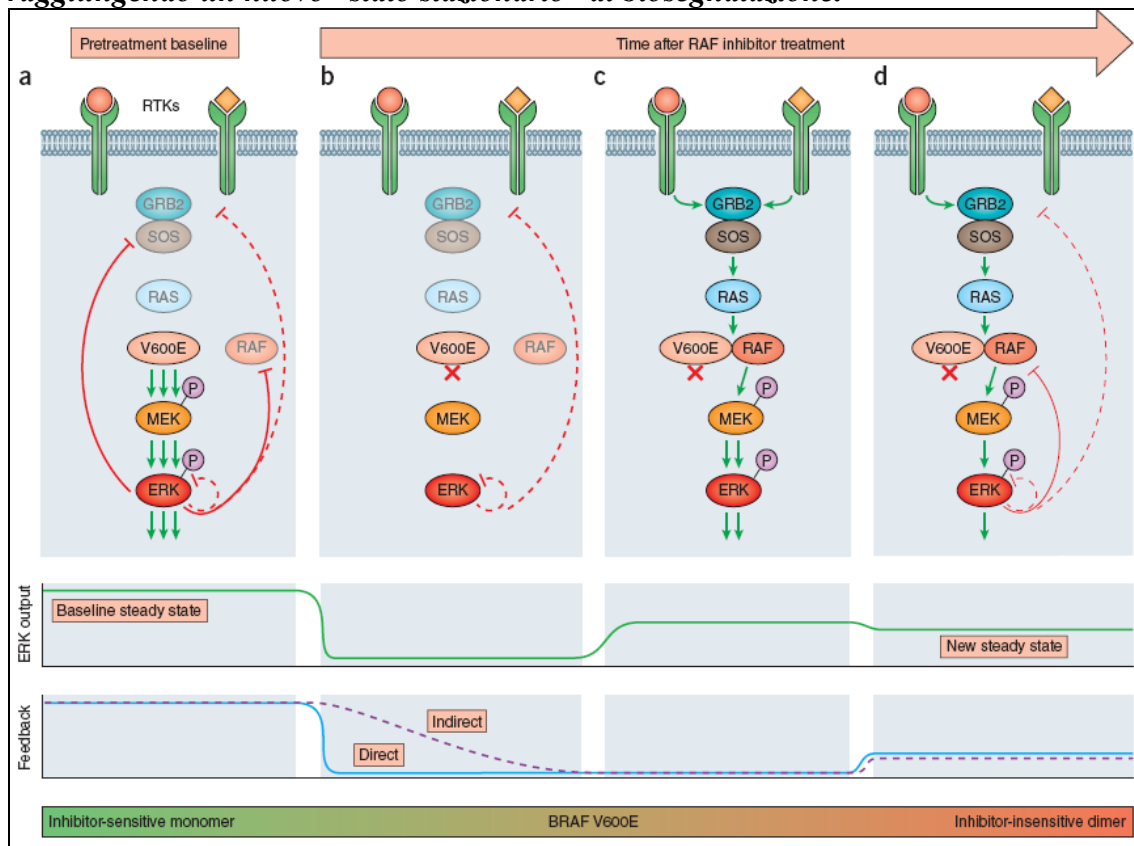
I risultati in termini di efficacia e sopravvivenza scaturiti dallo studio italiano e statunitense, che ha visto impiegato vemurafenib come agente singolo nel trattamento di pazienti affetti da leucemia a cellule capellute ricaduti o refrattari dopo analoghi purinici, mettono in luce come il farmaco sia particolarmente attivo in questo contesto di pazienti, a fronte tuttavia di una breve durata di risposta, che risulta tendenzialmente inferiore all'anno, specificamente in quei pazienti che non hanno ottenuto una risposta completa²⁰. La ricaduta di malattia dopo un trattamento con B-Raf inibitore è probabilmente correlata alla persistenza di una quota di cellule leucemiche ancora positive per la forma fosforilata di ERK (P-ERK) a livello midollare, segno della possibile riattivazione dei meccanismi di segnalazione MEK-ERK-mediati indipendentemente dalla presenza di una proteina B-Raf funzionante a monte (figura 4.6 a pagina 78)^{20,167}.

L'elevata espressione dell'antigene CD20 sulle cellule tricoleucocitarie ha motivato l'utilizzo dell'anticorpo anti-CD20, rituximab, in contesti di malattia in ricaduta⁹⁴⁻¹⁰². È stata altresì dimostrata l'efficacia della combinazione di rituximab con gli analoghi purinici sia in pazienti di nuova diagnosi^{101,171} sia in contesti di malattia recidivante^{102,171}, come pure è nota l'attività clinica di un regime di combinazione con rituximab e bendamustina in pazienti con malattia in ricaduta, in grado di reindurre una risposta completa in circa il 60% dei casi¹⁷².

È ipotizzabile che una terapia di combinazione basata sull'impiego di rituximab e vemurafenib possa potenziare l'attività clinica dell'inibitore di B-Raf già documentata in monoterapia: da un lato bloccando il principale meccanismo che favorisce la leucemogenesi e contribuisce a mantenere il fenotipo leucemico, dall'altro potenzialmente intervenendo su quella quota di tricoleucociti P-ERK-positivi che permangono nel tessuto midollare dopo il trattamento con vemurafenib, in tal senso cercando di aggirare i

meccanismi di resistenza che nel corso della terapia vengono ad instaurarsi (figura 5.1)¹⁶⁷.

Figura 5.1 – Sintesi grafica dei meccanismi di resistenza a vemurafenib attualmente noti. In corso di trattamento con B-Raf inibitore, la via di segnalazione MEK-ERK-dipendente può essere ripristinata a seguito della biosintesi di nuove molecole di B-Raf non più sensibili all'inibitore (venendo inizialmente meno il feed-back esercitato da ERK su B-Raf stesso). Ciò può spiegare la persistenza di ERK fosforilato (P-ERK) anche in pazienti sottoposti a trattamento con vemurafenib. Solo in un secondo momento si ripristina un certo grado di feed-back negativo su B-Raf mediato da ERK, raggiungendo un nuovo “stato stazionario” di biosegnalazione.



Allo scopo di valutare gli effetti del trattamento combinato con vemurafenib e rituximab nei pazienti affetti da leucemia a cellule capellute ricaduta o refrattaria a precedente trattamento, è stato portato avanti uno studio di fase 2, con arruolamento sul territorio italiano (codice dello studio: HCL-PG03; EudraCT 2014-003046-27). Anche a questo studio, come avvenuto per il precedente, l'Istituto di Ematologia “Lorenzo e Ariosto Seràgnoli” di Bologna ha apportato il suo contributo.

1. Disegno dello studio

1.1 Obiettivi dello studio

Obiettivo principale dello studio è stata la determinazione dell'effetto anti-tumorale della combinazione vemurafenib e rituximab. Tra gli obiettivi principali sono stati annoverati: la valutazione del profilo di sicurezza del trattamento, la determinazione del periodo necessario ad ottenere una risposta clinica, la durata di risposta una volta sospeso il trattamento.

L'*endpoint* principale dello studio è stato fissato nell'ottenimento di un tasso di risposte complete di almeno il 60% al termine del periodo di trattamento, supponendo che la combinazione farmacologica vemurafenib + rituximab potesse risultare in grado di migliorare i tassi di risposte complete già osservati nello studio con vemurafenib impiegato come agente singolo (34,6%)²⁰. Come *endpoints* secondari sono stati presi in esame: il monitoraggio degli eventi avversi (in termini di tipologia, incidenza, severità e relazione con il farmaco in studio) e delle alterazioni dei parametri laboratoristici; la misurazione del *time-to-response* (dal momento dell'inizio del trattamento al momento in cui si è documentata una risposta obiettiva); la misurazione della durata della risposta (nei pazienti almeno in risposta parziale) e della sopravvivenza libera da progressione (*progression-free survival*), con monitoraggio clinico dei pazienti per 2 anni dal termine del trattamento, in termini di parametri ematologici periferici ed infiltrato tricoleucocitario midollare.

1.2 Diagnosi. Criteri di inclusione e di esclusione

Ai fini dell'arruolamento, è stata richiesta la conferma della diagnosi di leucemia a cellule capellute, forma classica (tramite criteri morfologici e citofluorimetrici) secondo quanto espresso dall'allora vigente classificazione WHO-2008¹⁶⁵, contemporaneamente confermando la presenza della mutazione V600E di B-Raf tramite reazione polimerasica a catena allele-specifica.

Come nel precedente studio²⁰, per essere eleggibili i pazienti dovevano risultare:

- refrattari ad un trattamento precedente con analoghi purinici (nessuna risposta, o ricaduta entro un anno);
- in ricaduta dopo una precedente terapia con analoghi purinici: dopo almeno un anno, ma entro due anni, dal trattamento (se questo era il primo), oppure entro 4 anni dal precedente trattamento (se questo rappresentava almeno una seconda linea);
- in ricaduta (indipendentemente dalla tempistica) con ipoplasia midollare (definita come il riscontro di una cellularità emopoietica, valutata alla biopsia osteomidollare, inferiore al 20%), condizione tale da precludere un ulteriore trattamento con analoghi purinici;
- refrattari o in ricaduta con persistenza di malattia midollare pari o superiore al 30% della cellularità dopo almeno due cicli di trattamento;
- privi di indicazione ad un nuovo trattamento con analoghi purinici per via di severi effetti avversi riscontrati durante precedente terapia (profonda e prolungata mielosoppressione, complicanze infettive, insufficienza renale, anemia emolitica autoimmune, sindromi vasculitiche).

Ai fini del trattamento è stata richiesta la dimostrazione dell'attività della malattia in termini ematologici, documentando cioè la necessità clinica di una nuova ed imminente linea di terapia (almeno uno dei criteri tra: conta assoluta di granulociti neutrofili < 1.500/mmc; concentrazione di emoglobina < 11 g/dL; piastrine < 100.000/mmc; presenza di splenomegalia massiva o sintomatica; presenza di infezioni opportunistiche ricorrenti correlate alla citopenia).

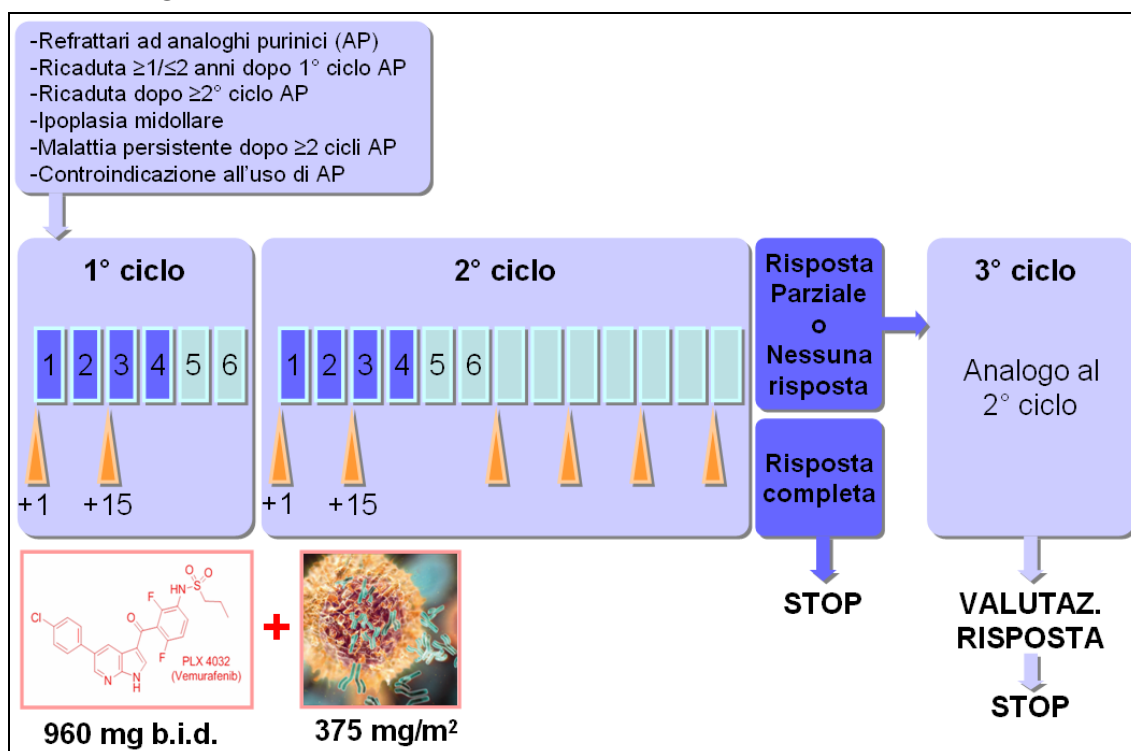
Per quanto riguarda i restanti criteri di inclusione ed esclusione in studio, si rimanda a quanto già specificato nel capitolo 4 relativamente allo studio con vemurafenib come agente singolo.

1.3 Dosaggio di vemurafenib e tempistiche di trattamento

Il protocollo di trattamento ha preso in considerazione l'erogazione di due cicli, ognuno di 6 settimane totali, seguiti da un periodo di mantenimento di 7 settimane. Nel corso del primo ciclo, vemurafenib, in compresse per uso

orale da 240 mg l'una, è stato somministrato alla dose di 960 mg/bid (4 compresse, 2 volte al giorno), tutti i giorni senza interruzioni, per 4 settimane consecutive, seguite da 2 settimane di sospensione. Le somministrazioni di rituximab sono avvenute ai giorni 1 e 15 del ciclo (1° giorno rispettivamente della 1^a e della 3^a settimana), al dosaggio standard di 375 mg/m². Nel corso del secondo ciclo, il trattamento con vemurafenib e rituximab ha ricalcato le medesime tempistiche del primo ciclo. Il solo rituximab è stato somministrato, con le medesime modalità, al giorno 1 delle settimane 1, 3, 5 e 7 successive alla 6^a settimana del secondo ciclo (figura 5.2).

Figura 5.2 – Schema di trattamento. I rettangoli in celeste più scuro indicano le settimane (1-4) di somministrazione ininterrotta di vemurafenib. Le punte di freccia indicano le giornate di somministrazione di rituximab.



La rivalutazione è stata eseguita a distanza di 4 settimane dall'ultima dose di rituximab. I pazienti in risposta completa hanno sospeso definitivamente il trattamento, mentre i pazienti in risposta parziale o non in risposta hanno ricevuto un terzo ciclo di trattamento (stesse modalità descritte per il secondo ciclo, comprese 7 settimane di mantenimento con rituximab).

Nessun paziente, indipendentemente dalla risposta, ha ricevuto vemurafenib per oltre 12 settimane e, più in generale, è rimasto in trattamento per oltre 3 cicli.

Una volta concluso il trattamento (dopo 2 o 3 cicli), ciascun paziente ha iniziato un percorso di monitoraggio longitudinale (di durata prevista di 2 anni).

1.4 Modifiche della dose di trattamento e gestione della tossicità

Modifiche della dose di vemurafenib o interruzioni del trattamento con vemurafenib stesso si sono rese necessarie in caso di comparsa di effetti avversi; la gestione di tali evenienze è stata regolata sulla base del grado di tossicità riscontrata, come dettagliato in tabella 4.1 a pagina 66, a cui si rimanda. Non previsti dal protocollo aggiustamenti di dose o posologia di rituximab (per la gestione degli eventi avversi si è fatto riferimento a quanto descritto nel riassunto delle caratteristiche del prodotto).

La comparsa di lesioni cutanee in corso di trattamento, particolarmente di carcinomi a cellule squamose della cute, ha richiesto un'attenta valutazione dermatologica specialistica, con messa in atto dei provvedimenti del caso (resezione radicale delle eventuali lesioni carcinomatose riscontrate nell'intento di voler procedere con la somministrazione di vemurafenib).

1.5 Procedure clinico-strumentali previste dallo studio

L'attività antineoplastica della combinazione vemurafenib + rituximab è stata valutata in maniera costante sia durante l'assunzione del farmaco, sia al termine del trattamento, in parallelo con la registrazione di qualsiasi evento avverso che abbia mostrato una possibile correlazione con il farmaco in studio.

Come già descritto nel capitolo 4 relativamente allo studio con vemurafenib come agente singolo, le procedure adottate per la determinazione della risposta sono state:

- esame clinico, emocromocitometrico (con valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico), biochimico sierico;

- ecografia addominale, finalizzata alla valutazione pre-trattamento e al monitoraggio della splenomegalia e delle eventuali epatomegalia o linfadenopatie retroperitoneali o addominali profonde;
- mieloaspirato con valutazione morfologica, citofluorimetrica e ricerca della mutazione B-Raf V600E e biopsia osteomidollare (eseguita contestualmente al mieloaspirato) per la valutazione morfologica ed immunoistochimica.

La tabella 5.1 riassume le tempistiche di ciascuna procedura clinica e strumentale prevista dallo studio.

Tabella 5.1 – Procedure previste dallo studio.

Procedura	Durante trattamento	Follow-up
Laboratorio	Dopo le settimane 1, 2, 3, 4, 6 del 1° ciclo e 2, 4, 6 del 2° (e 3°) ciclo; a 3 e 7 settimane dal termine del 2° (e 3°) ciclo	Ad un mese dall'ultima dose di rituximab; ogni 3 mesi a seguire
Ecografia addominale	Al termine di ogni ciclo; 7 settimane dal termine del 2° (e 3°) ciclo	Ad un mese dall'ultima dose di rituximab; ogni 3 mesi a seguire
Biopsia midollare	Al termine di ogni ciclo; a 4 settimane dall'ultima infusione di rituximab del 2° (e 3°) ciclo	Ogni 6 mesi
Citofluorimetria sangue periferico	Dopo le settimane 1, 2, 4 del 1° ciclo; al termine di ciascun ciclo; dopo la 2 ^a settimana del 2° (e 3°) ciclo; a 4 settimane dall'ultima infusione di rituximab del 2° (e 3°) ciclo	Ogni 3 mesi

1.6 Criteri di risposta

La risposta al trattamento è stata codificata in risposta completa (RC), risposta parziale (RP), risposta minima (RM) o non risposta (NR) sulla base di criteri clinici, ematologici e morfologici del tutto analoghi a quanto già espresso nel paragrafo 1.6 del capitolo 4 (pagg. 68-69).

2. Caratteristiche dei pazienti arruolati

Sono stati arruolati 31 pazienti provenienti da 10 istituzioni ematologiche sul territorio italiano. L'età mediana all'arruolamento è risultata di 59 anni (*range*: 35-81). Il numero di linee precedenti di terapia eseguite è stato di 3 (*range*: 1-14), con 8 dei 31 pazienti (26%) risultati refrattari alla prima linea con analogo purinico (*primary refractory*). Sono stati arruolati anche pazienti risultati refrattari ad un precedente trattamento con rituximab e pazienti in ricaduta dopo un pregresso trattamento con vemurafenib (nell'ambito dello studio descritto al capitolo 4²⁰).

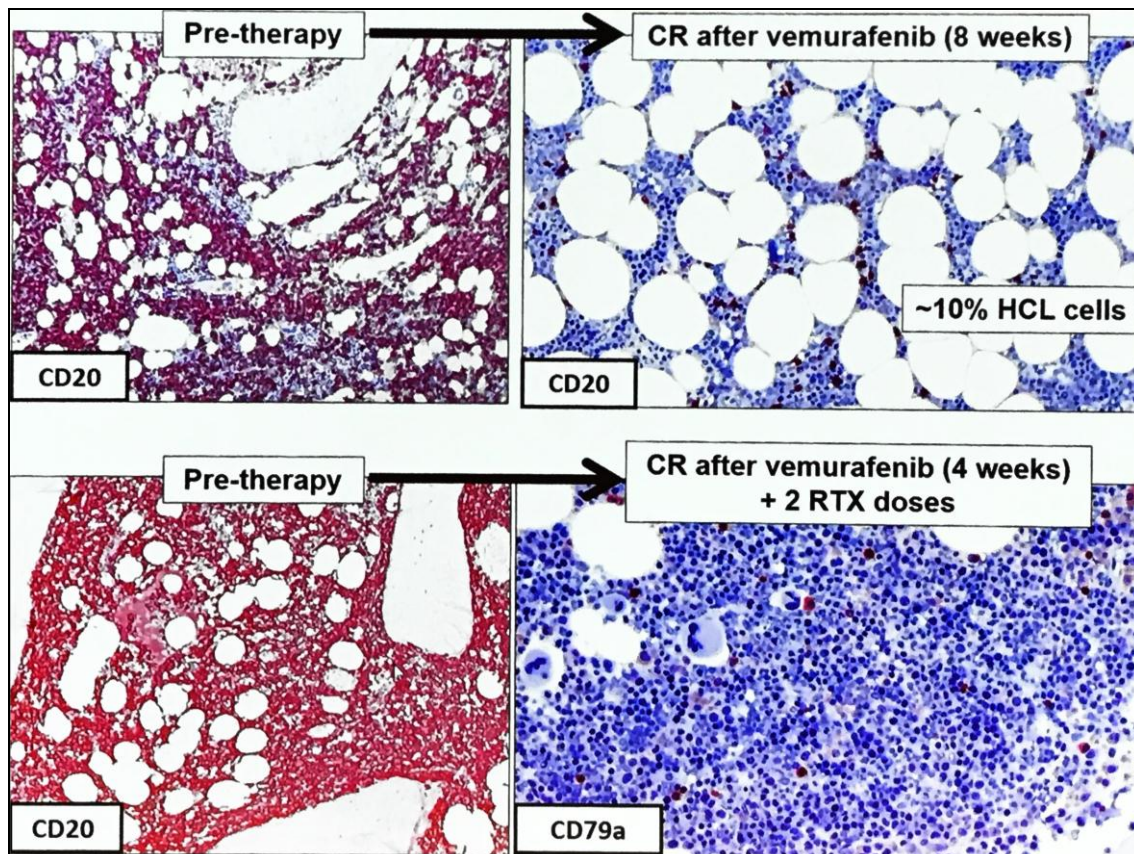
3. Risposta al trattamento e analisi della sopravvivenza

Dei 31 pazienti arruolati, 25 sono attualmente idonei per la valutazione della risposta finale. Tutti hanno ottenuto una risposta clinica, e più specificamente una risposta completa (100%). In particolare, 5 di essi hanno raggiunto la normalizzazione delle conte periferiche e la negativizzazione dell'infiltrato midollare dopo essere risultati in precedenza refrattari al solo rituximab, mentre 7 hanno ottenuto la risposta completa a seguito della ricaduta dopo un precedente trattamento con vemurafenib, avendo con l'agente singolo ottenuto, rispettivamente, una risposta parziale (5 pazienti) e una risposta completa (2 pazienti).

La risposta completa è stata ottenuta dopo il primo ciclo di vemurafenib + rituximab (in corrispondenza della prima valutazione midollare in corso di trattamento) nel 73% dei pazienti valutabili per la risposta (figura 5.3 a pagina 91). Ventitré pazienti sono risultati valutabili per la malattia minima residua (citofluorimetria + ricerca della mutazione di *B-raf* su sangue

midollare e sangue periferico): 14 di essi (65%) hanno ottenuto una negativizzazione della malattia minima residua (*minimal residual disease*, MRD) al termine del trattamento, in 8 casi già al termine del secondo ciclo di terapia (prima dell'inizio del primo periodo di mantenimento con rituximab).

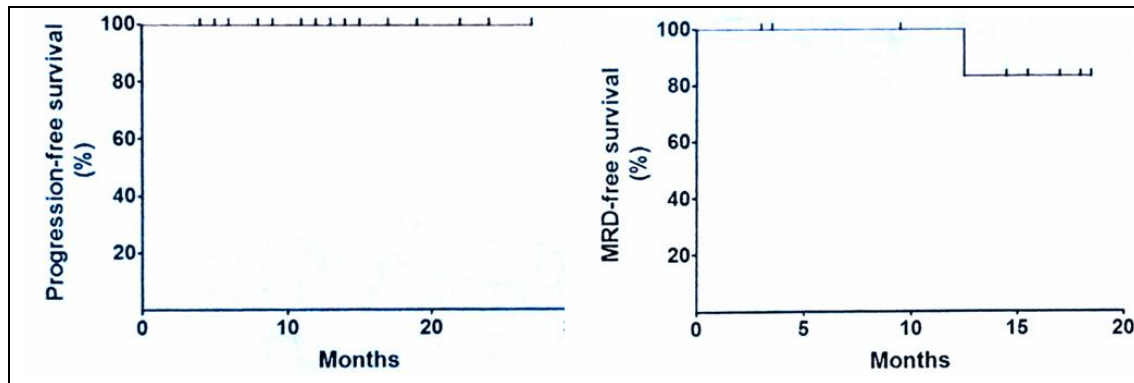
Figura 5.3 – Confronto tra pazienti in risposta completa su midollo osseo dopo trattamento con vemurafenib e vemurafenib + rituximab. La colorazione immunoistochimica in entrambi i pannelli di sinistra si riferisce alla valutazione midollare pre-trattamento. Nel pannello a destra in alto si nota la persistenza di un infiltrato CD20⁺ pari a circa il 10% della cellularità, riferibile a tricoleucociti residui (si ricorda che la risposta è definita completa su midollo osseo colorato in ematossilina-eosina). Nel pannello in basso a destra, l'infiltrato tricoleucocitario è assente (colorazione per CD79a, marcatore B-linfocitario), configurando una risposta completa anche sul piano immunoistochimico.



Ad un *follow-up* mediano di 14 mesi (*range*: 5-27), la sopravvivenza libera da progressione (intesa come mantenimento di una crasi ematica periferica caratterizzata da un valore di piastrine $\geq 100.000/\text{mmc}$, una conta di

neutrofili $\geq 1.500/\text{mmc}$, una concentrazione emoglobinica $\geq 11 \text{ g/dL}$) è risultata del 100% per quanto riguarda i 25 pazienti valutabili per la risposta (dati proiettati a 30 mesi). Tra i 10 pazienti valutabili in *follow-up* per la malattia minima residua, l'80% di essi è risultato libero da malattia minima residua (*MRD-free*) a 20 mesi (figura 5.4).

Figura 5.4 – Sopravvivenza libera da progressione (sinistra) e intervallo libero da malattia minima residua (destra) nei 25 pazienti valutabili per la risposta.



4. Tossicità e tolleranza

Gli effetti tossici del trattamento combinato non sono risultati differenti da quanto già osservato per il trattamento con il solo vemurafenib. Si è trattato di eventi avversi di grado inferiore o uguale a 3, senza alcun episodio di grado 4.

In particolare, si è confermata l'assenza di mielotossicità dei due agenti in combinazione, a fronte di eventi avversi extraematologici prevalentemente di grado 1-2 e completamente reversibili. Non sono ancora noti i dati relativi alle riduzioni di dose di vemurafenib in relazione all'instaurarsi di eventi avversi.

I dolori articolari sono stati registrati nel 32% dei pazienti, in maniera sostanzialmente sovrapponibile a quanto riscontrato nel precedente studio²⁰. Confermata la tossicità cutanea di vemurafenib, con eritema/*rash*, reazioni di fotosensibilizzazione, comparsa di papillomi cutanei o cheratoacantomi, ipercheratosi o disestesia palmo-plantare. Non osservate fino ad ora neoplasie cutanee (melanomatose o non-melanomatose).

Rilevante l'incidenza di iperbilirubinemia (85% dei casi), unicamente laboratoristica e prevalentemente di grado 1-2, autolimitantesi, come pure l'incremento degli enzimi pancreatici (37% dei casi), in assenza di quadri clinici indicativi di pancreatite acuta.

La tabella 5.2 riassume gli aspetti tossici riscontrati nei 31 pazienti in trattamento.

Tabella 5.2 – Profilo di tossicità della combinazione vemurafenib + rituximab nell'intera popolazione in studio valutabile per la tossicità (31 pazienti).

Evento avverso	Grado 1-2	Grado 3	Totale
Artralgia	32%	0	32%
Rash o eritema	26%	5%	31%
Papilloma cutaneo	26%	0	26%
Fotosensibilizzazione	21%	0	21%
Ipercheratosi	11%	0	11%
Incremento enzimi pancreatici	32%	5%	37%
Iperbilirubinemia	74%	11%	85%
Disestesia palmo-plantare	5%	0	5%
Cefalea	5%	0	5%
Astenia	11%	0	11%
Nausea	11%	0	11%
Alopecia	16%	0	16%
Cheratoacantoma	11%	0	11%

5. Vemurafenib come agente singolo e in combinazione con rituximab: risultati a confronto

La combinazione vemurafenib + rituximab è risultata di facile impiego, sicura sul fronte degli eventi avversi extraematologici, efficace in termini di miglioramento delle citopenie periferiche e di ottenimento di risposte cliniche di elevata qualità, corroborate dal dato molecolare. Ancora troppo breve il *follow-up* dei pazienti valutabili per la risposta, nonostante siano comunque rilevanti intervalli liberi da malattia che ormai superano l'anno

in almeno la metà dei pazienti (tenendo conto il vissuto terapeutico della maggior parte di essi).

La messa in opera di meccanismi d'azione differenti, da un lato il blocco della spinta leucemogena e proliferativa operata da vemurafenib, dall'altro l'effetto citotossico anti-CD20 di rituximab, con possibile azione sui tricoleucociti P-ERK-positivi residui, facilita la *clearance* delle cellule leucemiche dall'ambiente midollare e favorisce l'ottenimento di risposte profonde, fino alla negativizzazione della malattia minima residua in una consistente percentuale di casi.

La tabella 5.3 compendia i risultati ottenuti con vemurafenib, impiegato come agente singolo e in combinazione con rituximab, negli studi clinici di fase 2 attualmente pubblicati.

Tabella 5.3 – Studi clinici di fase 2 contemplanti l'utilizzo di vemurafenib come agente singolo e vemurafenib in combinazione con rituximab.

	Vemurafenib		Vemurafenib + rituximab
	Studio italiano ²⁰	Studio USA ²⁰	
Pazienti arruolati	28	26	31
Pazienti valutabili	26	24	25
Pregresse terapie (mediana)	3	3	3
Refrattarietà ultima linea	56%	41%	–
Risposta globale	96%	100%	100%
Risposte complete	35%	42%	100%
Risposte parziali	61%	58%	0
<i>Hairy cells</i> midollari residue	~ 10%	~ 5%	~ 0-5%
Mediana <i>follow-up</i>	23 mesi	12 mesi	14 mesi
<i>Relapse-free survival</i> mediana	9 mesi	20 mesi	Non ragg.
Tasso di ricaduta	77%	29%	0

6. *B-raf*^{V600E} COME MARCATORE DI MALATTIA

Le ipotesi di lavoro che stanno alla base dell'attività di ricerca più prettamente laboratoristica ruotano attorno al fatto che la mutazione V600E di *B-raf* è sempre ed invariabilmente presente nei pazienti con leucemia a cellule capellute, risultando assente in patologie clinicamente affini (ad esempio, linfomi splenici)^{18,40,43-45,69-73,127}. Sulla base di tale osservazione, è possibile postulare che:

- il riscontro della mutazione correla con la presenza di cellule neoplastiche, indipendentemente dalla fase di malattia (esordio, prima ricaduta, successive ricadute);
- l'assenza di mutazione al termine di un qualsiasi trattamento che abbia un impatto sulla storia naturale della malattia indica uno stato di risposta molecolare completa alla terapia, possibile predittore di lunga sopravvivenza;
- l'assenza di mutazione nei pazienti a lungo responsivi è un marcatore di prognosi favorevole.

L'aspetto innovativo di questa parte del progetto si basa sull'attuale assenza di un approccio molecolare alla diagnosi e al monitoraggio dell'efficacia della terapia nei pazienti con leucemia a cellule capellute, dal momento che – come in più occasioni ricordato nei precedenti capitoli – gli attuali criteri per stabilire la risposta al trattamento si fondano sulla valutazione morfologica in ematossilina-eosina di un campione ottenuto da biopsia osteomidollare (*Consensus Resolution*⁶⁷) in associazione allo studio immunohistochimico per il CD20, marcatore delle cellule leucemiche⁶⁸, quest'ultimo tuttavia non in grado di stratificare in maniera univoca pazienti caratterizzati da prognosi diversa e da differente comportamento clinico (*long-responders versus* pazienti con frequenti ricadute)^{16,17}.

A livello istituzionale è stato messo a punto un protocollo esplorativo, rivolto a tutti i pazienti con diagnosi di leucemia a cellule capellute afferenti all'Istituto di Ematologia di Bologna, finalizzato a correlare la quota di allele mutato – determinata mediante studio *droplet digital polymerase chain reaction* (PCR) ed espressa in termini di abbondanza

frazionale – in ciascuna fase del trattamento (esordio di malattia, rivalutazione post-trattamento, *follow-up*, ricaduta di malattia) con la risposta al trattamento medesimo, quest'ultima stabilita sul piano emocromocitometrico ed obiettivo, oltre che in immunoistochimica su tessuto midollare¹⁷³. La valutazione è stata eseguita in tutti i pazienti in terapia standard di prima linea (su sangue periferico e midollare, quando disponibile, prima e dopo il trattamento antileucemico e nel corso del *follow-up* almeno annualmente) e nei pazienti considerati *long-responders*, vale a dire senza necessità di ulteriore trattamento ad almeno 5 anni da una prima linea di terapia con analoghi purinici.

1. Metodi

1.1 Tipologia dei pazienti in studio e obiettivi

Sono stati presi in considerazione i pazienti afferenti all'Istituto di Ematologia di Bologna nel periodo ottobre 2015 – settembre 2017, affetti da leucemia a cellule capellute all'esordio o in ricaduta e sottoposti a terapia di prima linea o successiva (sia con analoghi purinici, sia con agenti biologici). Sono inoltre stati presi in considerazione i pazienti con malattia in remissione completa continua da almeno 5 anni dopo una sola linea di terapia con cladribina che, nel corso del periodo in oggetto, sono stati sottoposti a visita ematologica specialistica di *follow-up* longitudinale.

Lo studio molecolare condotto ha avuto come finalità quella di mettere a punto un saggio di laboratorio, immediatamente traslabile nella pratica clinica, in grado di:

- discriminare da un punto di vista molecolare i pazienti in risposta completa dopo trattamento (pazienti molecolarmente negativi *versus* pazienti con malattia minima residua ancora positiva);
- individuare nella mutazione *B-raf*^{V600E} un marcatore di malattia attiva utile da monitorare nel corso del *follow-up* in pazienti giudicati in risposta completa.

Al fine di correlare il valore di abbondanza frazionale determinato tramite la metodica della *droplet digital* PCR (si vedano i paragrafi 1.2 e 1.3 per i

dettagli procedurali) con la sua rilevanza in termini di decisione diagnostica, si è cercato di contestualizzare il risultato numerico nell'ambito della situazione clinica in cui il test veniva eseguito (ad esempio: remissione completa ematologica e morfologica dopo trattamento; riscontro di citopenie in corso di *follow-up* post-terapia nella necessità di effettuare un inquadramento diagnostico; monitoraggio dello stato di malattia in pazienti in lunga risposta emato-midollare).

1.2 Materiale biologico

Ogni paziente considerato eleggibile per la valutazione sulla base dei criteri descritti al paragrafo 1.1 è stato sottoposto al prelievo di 20 mL di sangue periferico in EDTA. I pazienti con malattia all'esordio e in fase di rivalutazione post-trattamento sono stati inoltre sottoposti a biopsia osteomidollare (necessaria per la conferma diagnostica e per la valutazione della risposta midollare al termine del trattamento) e a mieloaspirato. Tramite il mieloaspirato (quando effettuabile, dato che la fibrosi reticolinica che spesso accompagna la malattia può dare esito a *punctio sicca*) si è ottenuto sangue midollare (fino ad un massimo di 6 mL in EDTA per paziente) idoneo allo studio molecolare e alla valutazione morfologica mediante colorazione in May-Grünwald-Giemsa.

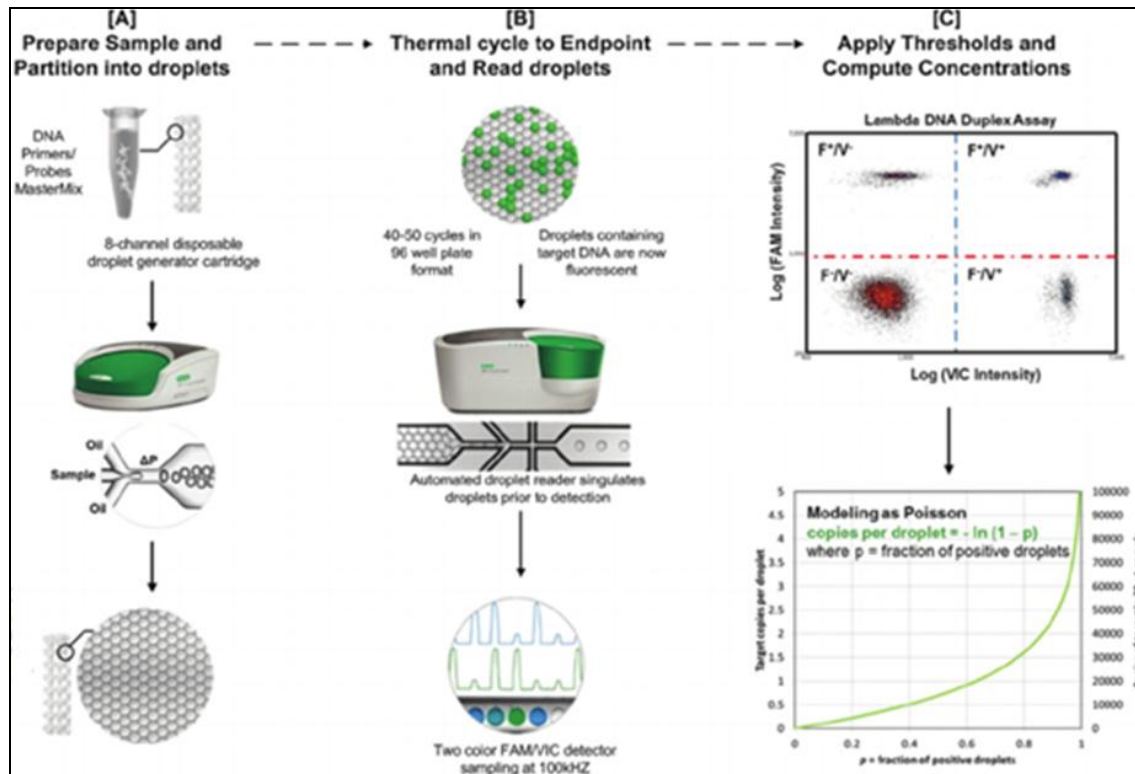
Le cellule mononucleate presenti nel sangue periferico e nel sangue midollare sono state separate mediante gradiente di densità, previa centrifugazione, e risospese in guanidinio isotiocianato (GITC), con conservazione a -20°C fino al momento dell'analisi.

L'estrazione del DNA dalle cellule mononucleate è stata effettuata in maniera automatizzata utilizzando il kit Maxwell[®] 16 LEV DNA Blood Kit (Promega). Le cellule risospese in GITC sono state dapprima lisate con l'aggiunta di *lysis buffer* e proteinasi K forniti dal kit, ad una temperatura di 56°C per 20 minuti. Successivamente, i campioni sono stati caricati sulle cartucce e inseriti nello strumento Maxwell[®] 16 System (Promega), che permette la separazione degli acidi nucleici mediante legame con particelle di silice magnetizzata. Il DNA, eluito in un *buffer* di eluizione, è stato quantificato mediante Nanodrop[™].

1.3 Droplet digital PCR

La *droplet digital* PCR (ddPCR, Bio-Rad, CA, USA) è una piattaforma sviluppata per fornire una migliore sensibilità e precisione nella quantificazione di molecole di DNA target rispetto ai sistemi di quantificazione generalmente in uso come la *real time* PCR (figura 6.1).

Figura 6.1 – Droplet digital PCR.



La metodica si basa sulla formazione di circa 20.000 gocce di emulsione (*droplets*). In ognuna di esse avviene una reazione di amplificazione individuale del DNA genomico al quale si lega un *primer* fluorescinato specifico per la sequenza *wild-type* del gene o uno specifico per la sequenza mutata di interesse. Il software fornito con lo strumento è in grado di misurare il numero di *droplets* positive o negative per ogni fluoroforo in ciascun campione e inoltre normalizza la frazione di *droplets* positive grazie all'algoritmo di Poisson, permettendo di determinare la concentrazione iniziale di molecole di DNA *target* espressa in copie/ μ L.

I campioni di DNA ottenuti dopo estrazione (vedasi paragrafo 1.2) sono stati diluiti fino ad ottenere una concentrazione di 30 ng/ μ L. A questo

punto, si è proceduto con la generazione di *droplets* mediante il QX200™ Droplet Generator a partire da una miscela contenente:

- 3µL di DNA;
- i *primers* e i *probes* fluorescinati specifici per l'allele *wild-type* e mutato (ddPCR Mutation Detection Assays, Bio-Rad);
- la ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad), contenente i nucleotidi e la polimerasi;
- l'olio Droplet Generation Oil for Probes (Bio-Rad) necessario per ottenere le gocce di emulsione.

Una volta ottenute le *droplets* e trasferite nei pozzetti, è stata avviata una reazione polimerasica con amplificazione del DNA contenuto in ogni singola *droplet*. Secondo questa metodica, in pratica, in ogni goccia è avvenuta una reazione di PCR specifica per il tipo di saggio utilizzato, in funzione della presenza o meno di allele mutato, *wild-type* o entrambi.

Al termine della reazione polimerasica, le *droplets* sono state aspirate e lette mediante lo strumento QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) a seguito dell'emissione di fluorescenza dopo eccitazione laser. Secondo tale procedura, le *droplets* sono state suddivise in base al contenuto in DNA: *droplets* vuote, *droplets* contenenti il solo allele mutato, *droplets* contenenti il solo allele *wild-type*, *droplets* contenenti entrambi gli alleli.

L'analisi statistica e l'applicazione dell'algoritmo di Poisson è stata effettuata tramite software QuantaSoft (Bio-Rad). L'analisi informatica ha permesso di ottenere i grafici di sintesi dei risultati e il valore di abbondanza frazionale dell'allele mutato.

2. Risultati

Sulla base dei criteri di eleggibilità descritti al paragrafo 1.1, sono stati individuati 22 pazienti, tutti maschi (aspetto giustificato dall'assoluta predilezione della malattia per il sesso maschile). Su tale campione, in funzione delle diverse fasi di malattia e dei differenti distretti di campionamento (sangue periferico e/o sangue midollare) sono state eseguite 38 misurazioni in *droplet digital* PCR. Dieci pazienti sono stati

valutati all'esordio, 5 pazienti alla ricaduta di malattia (in uno di essi sono state eseguite due misurazioni dell'abbondanza frazionale in due momenti diversi prima del ritrattamento) e 7 nel corso del *follow-up* in qualità di *long-responders*.

Il grafico in figura 6.2 (pag. 101) mostra il *burden* allelico di *B-raf*^{V600E} espresso in termini di abbondanza frazionale percentuale ottenuto a carico di ogni distretto anatomico (sangue periferico o midollare) e in corrispondenza dei diversi momenti della valutazione. La figura 6.3 (pag. 102) mostra gli stessi valori su scala logaritmica. La tabella 6.1 sintetizza i risultati in termini di risposta molecolare.

Tabella 6.1 – Caratteristiche dei pazienti valutati e risposta molecolare.

Pazienti analizzati	22
Pazienti maschi	100%
Misurazioni totali eseguite	38
Pazienti in remissione completa da > 5 anni	7 (*)
- di cui molecolarmente negativi su sangue periferico	4
Pazienti valutati all'esordio	10
- con valutazione su sangue periferico/midollare	9/3
Pazienti valutati alla ricaduta	5
- con valutazione su sangue periferico/midollare	5/5
Pazienti valutati alla risposta	5 (**)
- con valutazione su sangue periferico/midollare	4/4
- di cui molecolarmente negativi su sangue periferico	3 (***)
Pazienti con valutazione pre + post-terapia	5
- di cui pazienti con malattia all'esordio	4 (°)
- di cui pazienti con malattia in ricaduta	1 (°°)

(*) Secondo i criteri *Consensus Resolution*⁶⁷.

(**) Trattasi di pazienti con malattia sintomatica (all'esordio o in ricaduta) e sempre valutati anche pre-terapia.

(***) Pazienti in risposta molecolare completa su sangue periferico dopo terapia di prima linea con cladribina sottocute.

(°) Sottoposti a terapia di prima linea con cladribina sottocute.

(°°) Sottoposto a terapia di salvataggio con moxetumomab pasudotox.

Figura 6.2 – Burden allelico di $B\text{-raf}^{V600E}$ espresso in termini di abbondanza frazionale.

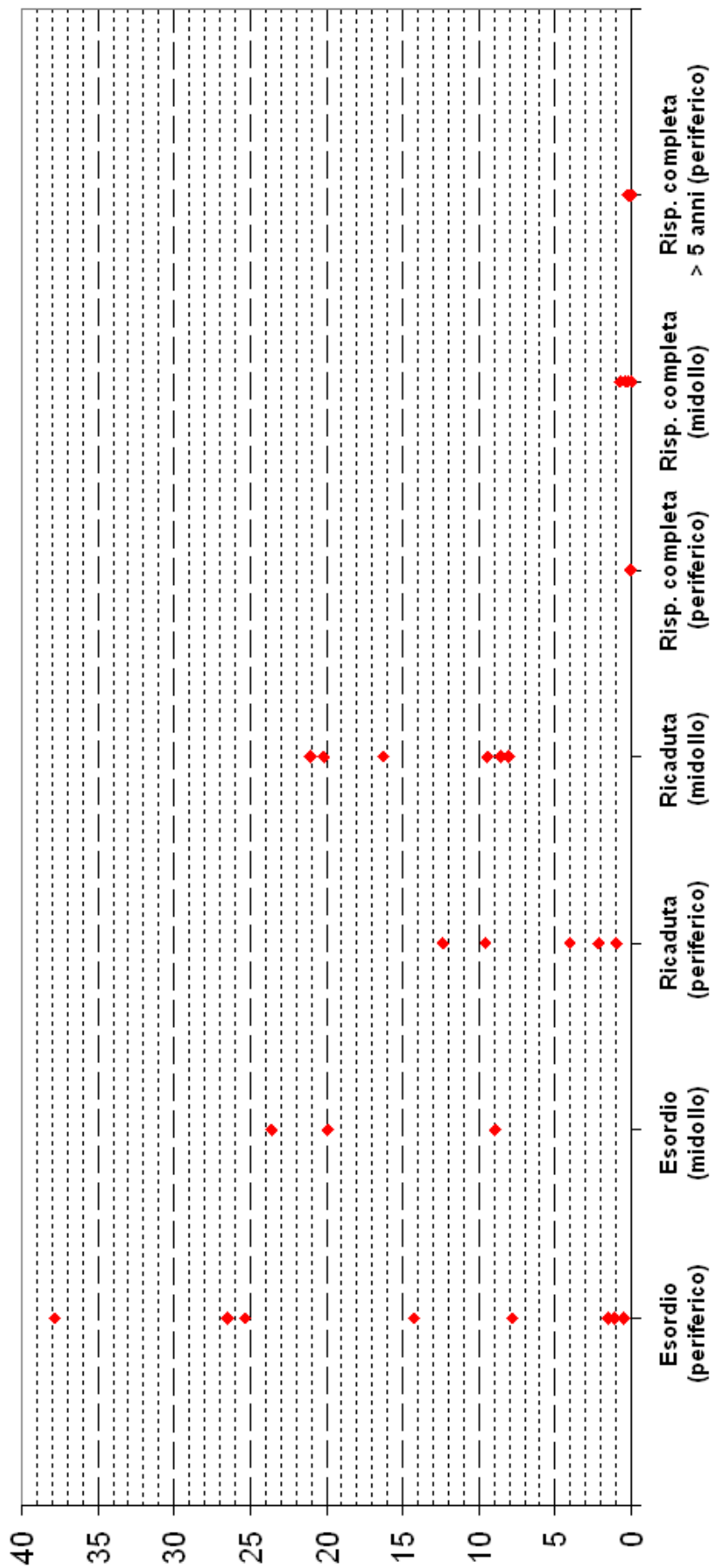
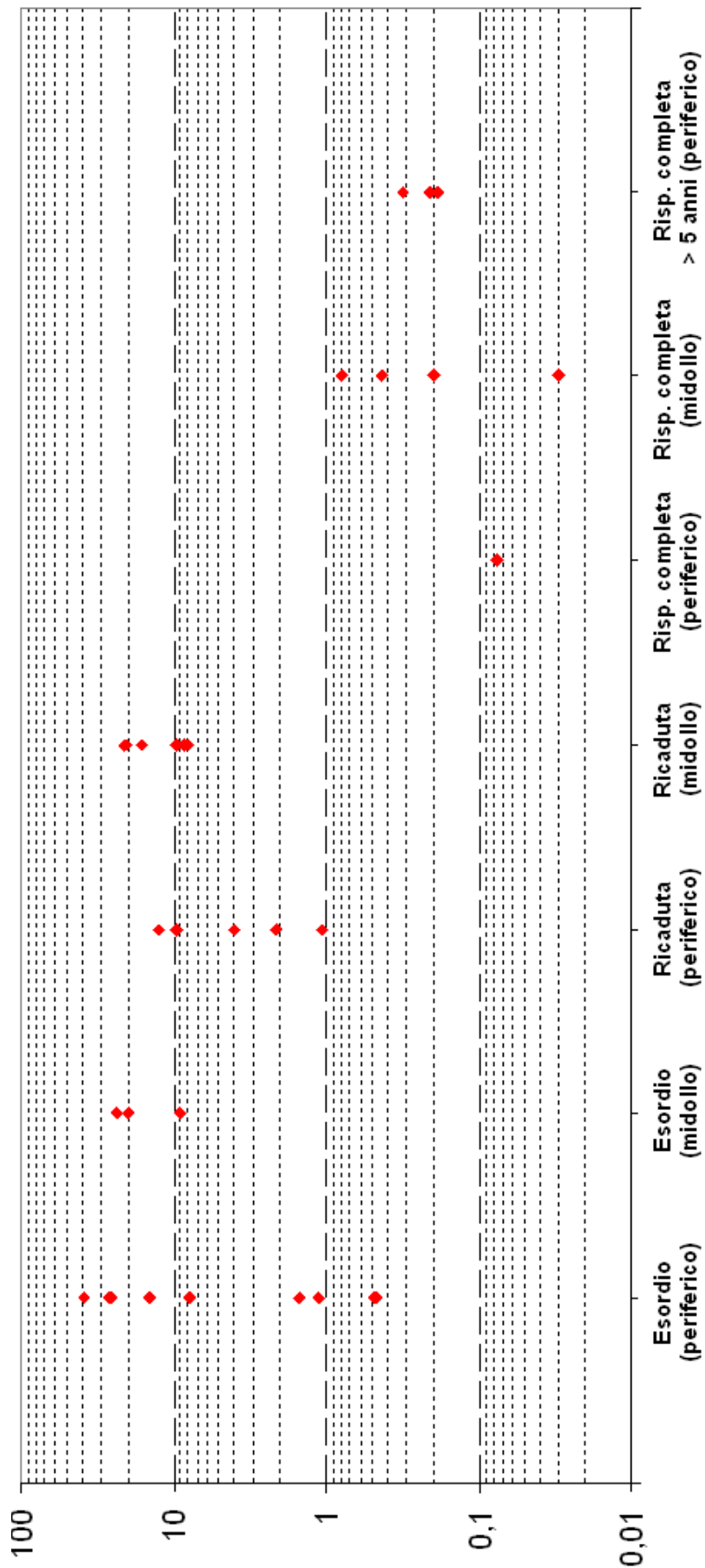


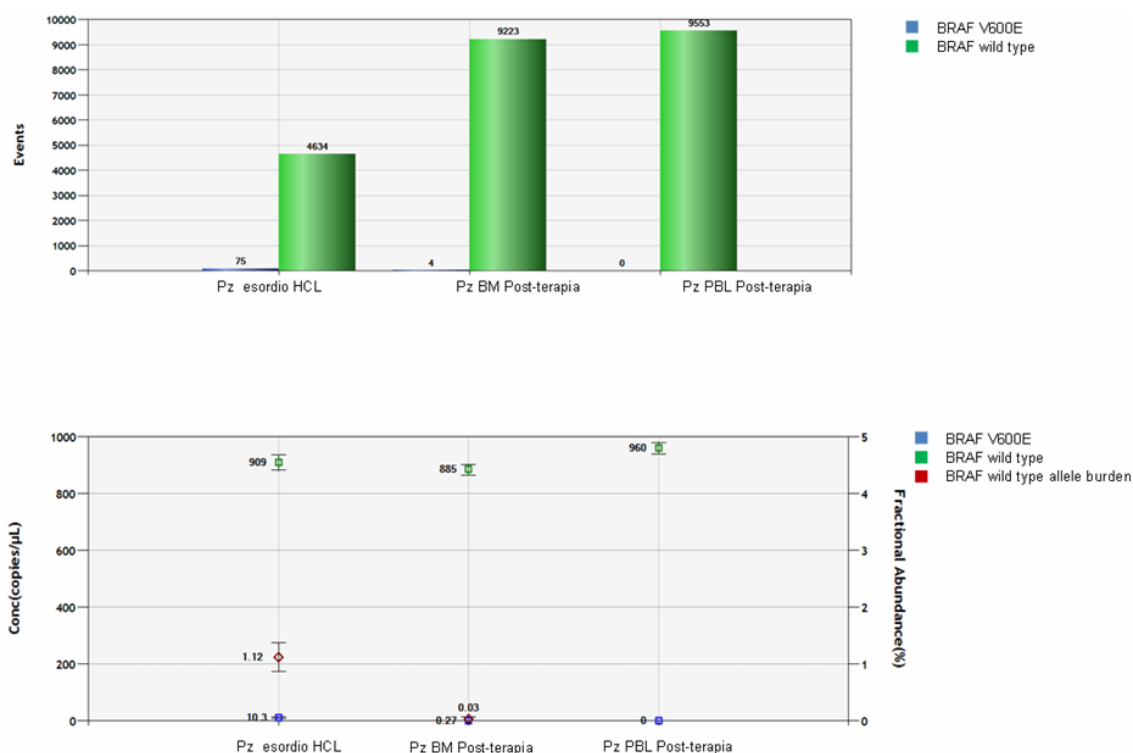
Figura 6.3 – Burden allelico di $B\text{-raf}^{V600E}$ espresso in termini di abbondanza frazionale. Il grafico non riporta i pazienti nei quali il burden allelico della mutazione è zero.



In riferimento alla figura 6.3 (pag. 102), è da notare come il valore dell'1% separi i pazienti con malattia attiva e sintomatica all'esordio o in ricaduta e con necessità di trattamento (abbondanza frazionale > 1%) dai pazienti in risposta completa post-trattamento o *long-responders*, secondo i criteri *Consensus Resolution* (abbondanza frazionale < 1%). Questo tipo di osservazione, ancorché preliminare, fornisce una chiave interpretativa del risultato numerico del test, trasferibile sul piano clinico e da confrontare con i dati emocromocitometrico ed istologico necessari a confermare la diagnosi di risposta completa o di ricaduta. I casi clinici che verranno presentati più avanti permettono di inquadrare il valore di abbondanza frazionale ottenuto dal test nel più ampio contesto che si sta osservando, in questo modo conferendo ad esso un ruolo nell'interpretazione dei fatti sul piano clinico.

Di 5 pazienti (4 con malattia all'esordio, 1 con malattia in ricaduta) che hanno ricevuto un trattamento antileucemico (i 4 pazienti all'esordio con cladribina sottocute, il paziente in ricaduta con anticorpo monoclonale anti-CD22 coniugato con tossina di *Pseudomonas*) e hanno ottenuto una risposta completa emato-midollare (secondo i criteri *Consensus Resolution*) è disponibile la rivalutazione molecolare post-trattamento. Tre di essi (con malattia all'esordio) hanno ottenuto la completa negativizzazione post-trattamento della carica allelica di *B-raf*^{V600E} su sangue periferico, pur persistendo una positività (sempre inferiore allo 0,5%) sul sangue midollare (figura 6.4 a pagina 104). Due pazienti (uno con malattia all'esordio e il paziente con malattia in ricaduta), pur raggiunta la remissione completa morfologica ed immunoistochimica, hanno mantenuto una positività su sangue periferico (risposta molecolare non completa). Un paziente con malattia all'esordio, sottoposto a trattamento di prima linea, ha presentato una progressione della tricoleucemia al termine dell'induzione (con *exitus*), mantenendo un'evidente positività del marcatore molecolare su sangue periferico (vedi paragrafo 3, caso clinico n° 1). Dei restanti pazienti in trattamento, attualmente non risulta disponibile il dato molecolare in quanto ancora in corso la terapia antitumorale.

Figura 6.4 – Burden allelico (colonne e quadratini azzurri) e abbondanza frazionale (quadratini rossi) del mutante $B\text{-raf}^{V600E}$ in un paziente sottoposto a terapia di induzione con cladribina sottocute per malattia all'esordio. Ottenimento di una risposta molecolare completa su sangue periferico (abbondanza frazionale pari a zero) con minima persistenza della mutazione su sangue midollare. PBL, sangue periferico (peripheral blood); BM, sangue midollare (bone marrow). Le colonne e i quadratini verdi indicano la quota di allele $B\text{-raf}$ wild-type.



Tra i 7 pazienti giudicati in remissione completa di lunga durata (almeno 5 anni, *range* 5-12 anni), 4 risultano molecularmente negativi per la mutazione $B\text{-raf}^{V600E}$ su sangue periferico al momento dell'analisi. Per gli altri 3, persiste un valore di abbondanza frazionale < 1% (media 0,24%). La risposta molecolare completa, osservabile in questi pazienti, potrebbe avere il significato di marcatore di assoluta buona prognosi, in un contesto già di per sé favorevole.

La tabella 6.2 a pag. 105 riporta i valori medi di abbondanza frazionale percentuale dell'allele $B\text{-raf}^{V600E}$ riscontrati nei diversi momenti di osservazione e sui due distretti di campionamento. Si noti come, tra i pazienti in risposta clinica emato-midollare, il valore di abbondanza frazionale risulti al disotto dell'1%, come precedentemente discusso.

Tabella 6.2 – Abbondanza frazionale (valore medio) di *B-raf*^{V600E} nel sangue periferico e midollare dei pazienti valutati in funzione dei diversi momenti della storia di malattia.

Malattia all'esordio, sangue periferico ($n = 9$)	12,82%
Malattia all'esordio, sangue midollare ($n = 3$)	17,47%
Malattia in ricaduta, sangue periferico ($n = 5$)	5,85%
Malattia in ricaduta, sangue midollare ($n = 6$)	13,96%
Risposta completa, sangue periferico ($n = 4$) (*)	0,02% (**)
Risposta completa, sangue midollare ($n = 4$) (*)	0,36%
Risposta completa > 5 anni, sangue periferico	0,10% (*)

(*) Trattasi di pazienti in risposta completa secondo i criteri *Consensus Resolution*⁶⁷.

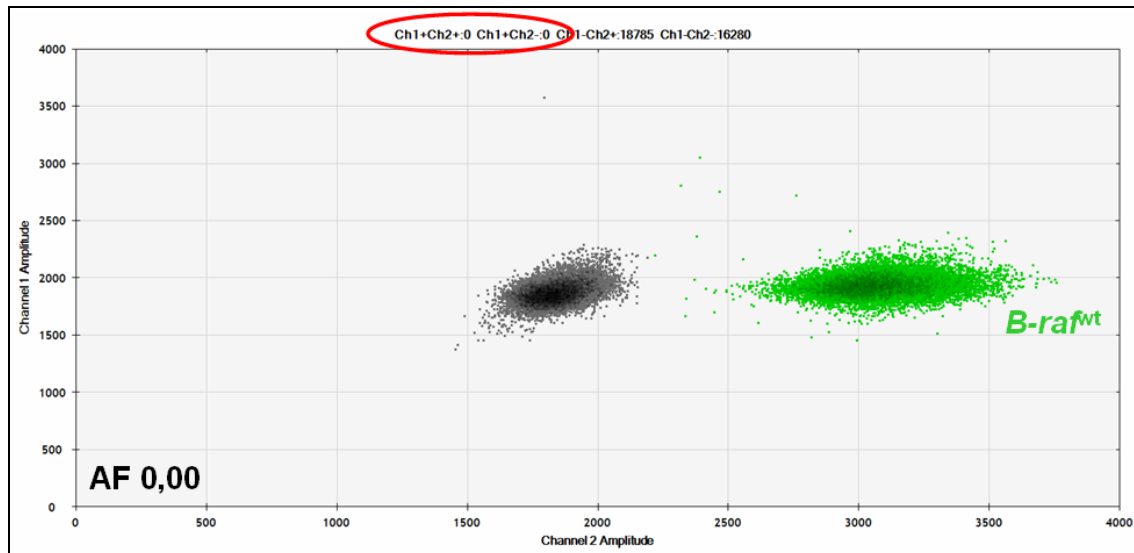
(**) Comprende tre pazienti in risposta molecolare completa.

3. Applicazione dei risultati del test in pazienti in *follow-up*

I pazienti che ottengono una remissione completa dopo una sola linea di trattamento e sono in grado di mantenerla nel tempo per almeno 5 anni rappresentano circa il 30% dei pazienti della nostra casistica istituzionale¹⁶. Non esistono dati pubblicati sui possibili fattori predittivi di una risposta di così lunga durata e particolarmente favorevole ad una sola linea di terapia¹⁷. È ipotizzabile che tali pazienti abbiano raggiunto una risposta particolarmente profonda, al di là di quanto osservabile soltanto morfologicamente alla biopsia osteomidollare. In altre parole, potrebbe trattarsi di pazienti in risposta molecolare completa, mantenuta nel tempo: in tal senso, la messa in luce dell'assenza della mutazione *B-raf*^{V600E}, supposta essere un chiaro segno di malattia attiva, in un momento qualsiasi di un lungo *follow-up*, potrebbe rappresentare un indicatore di ottima prognosi. Di fatto, in 4 dei 7 pazienti da noi valutati e considerati *long-responders*, non è rilevabile la mutazione di *B-raf* nel sangue periferico (figura 6.5). Un maggior numero di valutazioni in questo contesto di pazienti è chiaramente d'obbligo per corroborare l'esattezza dell'ipotesi, come pure sarebbe auspicabile mettere in pratica protocolli di sorveglianza nel tempo dei pazienti che divengono molecolarmente negativi (sul sangue periferico) alla prima rivalutazione di malattia al termine della terapia

(almeno a 3 mesi di distanza)¹⁷³ per validare prospetticamente in senso prognostico il significato della risposta completa molecolare.

Figura 6.5 – Paziente con risposta completa mantenuta per oltre 5 anni e con assenza di allele mutato *B-raf*^{V600E} nel sangue periferico. AF, abbondanza frazionale.



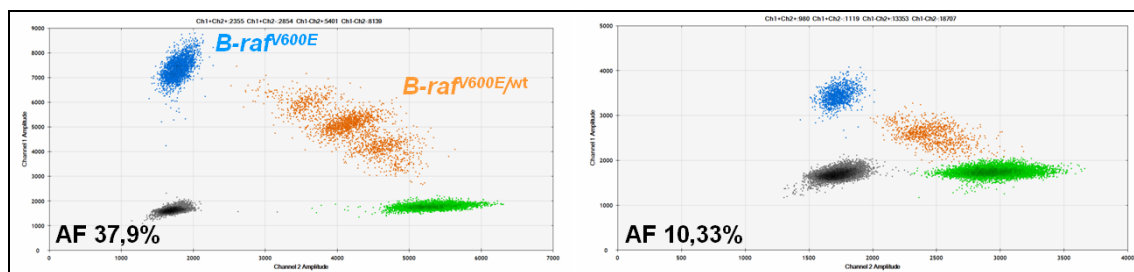
La positività del test, per contro, facilita l'interpretazione dei risultati ottenuti dall'esame emocromocitometrico o dalla valutazione clinica del paziente nel corso del *follow-up*, e permette di inquadrare nel contesto della malattia eventuali citopenie che dovessero manifestarsi.

3.1 Caso clinico n° 1

In uno dei pazienti con malattia all'esordio di cui si è parlato nel paragrafo 2, si osservava la persistenza di una profonda pancitopenia al termine del trattamento di prima linea con cladribina sottocute, probabilmente indicativa di persistenza di malattia o di recupero ematologico particolarmente lento. La valutazione su sangue periferico dell'abbondanza frazionale dell'allele *B-raf*^{V600E} risultava paragonabile in termini di ordine di grandezza a quanto osservato all'esordio di malattia (10,33% e 37,90%, rispettivamente, figura 6.6 a pagina 107). Il successivo decorso clinico del paziente si complicava – aspetto assai insolito in un paziente con leucemia a cellule capellute – con uno stato anasarcatico e una perforazione intestinale, con necessità di intervento chirurgico di resezione di 9 cm di

intestino tenue. All'esame istologico del pezzo operatorio si repertava un'ulcera di 1 cm di diametro associata alla presenza di un linfoma non-Hodgkin, T linfocitario, compatibile con una forma epiteliotropa monomorfa (secondo la classificazione WHO 2017, inquadrata come linfoma T-linfocitario associato ad enteropatia nella precedente classificazione WHO 2008).

Figura 6.6 – Caso clinico n°1. Persistenza dell'allele mutato B-raf^{V600E} nel sangue periferico del paziente al termine della terapia antitumorale (scatter azzurro e arancione). Il grafico di sinistra mostra la situazione pre-trattamento; il grafico di destra mostra il quadro post-terapia. AF, abbondanza frazionale.



Il tessuto neoplastico risultava positivo per il mutante V600E di B-Raf, evidenziabile sia tramite pirosequenziamento, sia mediante immunocistochimica (Broccoli A, comunicazione personale. *Hairy Cell Leukemia Foundation annual conference*. Columbus, 20 ottobre 2017). La positività per il mutante V600E di B-Raf non è stata mai descritta in linfomi T-linfocitari di questo tipo. La persistente positività del test molecolare su sangue periferico in questo contesto può rendere ragione della compresenza di due neoplasie sincrone, la prima refrattaria al trattamento, la seconda all'esordio. L'esistenza di una correlazione tra le due malattie è certamente ipotizzabile, ma i rapporti patogenetici tra esse restano al momento non chiariti (figura 13 fuori testo).

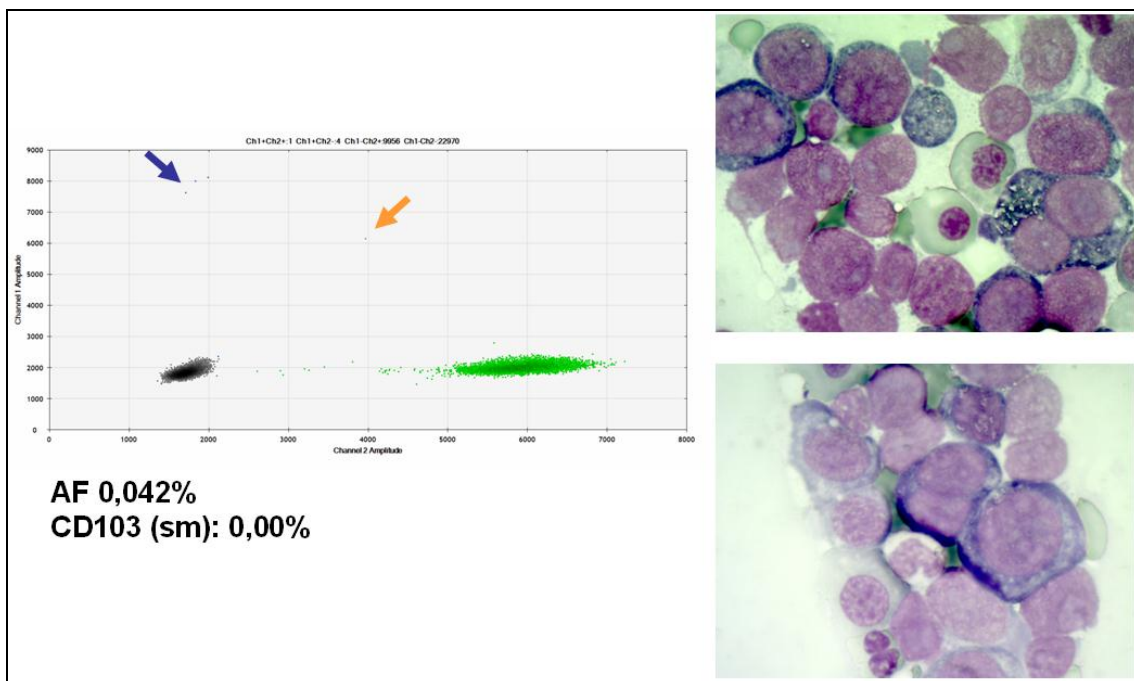
3.2 Caso clinico n° 2

Trattasi di un paziente affetto da leucemia a cellule capellute diagnosticata negli anni Novanta e sottoposto a multiple linee di trattamento, tra cui interferone, analoghi purinici, vemurafenib e moxetumomab pasudotox, quest'ultimo eseguito come ultima linea di trattamento. A seguito della

terapia con moxetumomab, il paziente aveva ottenuto uno stato di remissione completa, secondo i criteri *Consensus Resolution* (non disponibile la valutazione molecolare). Nel corso del *follow-up*, ad oltre un anno dall'ottenimento della remissione, il paziente ha sviluppato una severa piastrinopenia, in assenza di ulteriori significative alterazioni della crasi ematica, inizialmente interpretata come ripresa di malattia (dunque sottoposta a trattamento di salvataggio con rituximab). La valutazione molecolare per la ricerca della mutazione di *B-raf* eseguita su sangue midollare ha messo in evidenza un'abbondanza frazionale dello 0,042% (valore insolitamente basso per una leucemia a cellule capellute in ricaduta con severa citopenia periferica). Sullo stesso materiale, risultava assente l'espressione del CD103 in citofluorimetria.

La valutazione morfologica (su mieloaspirato e su tessuto ottenuto da biopsia osteomidollare) consentiva di porre diagnosi di leucemia acuta mieloide secondaria, morfologicamente identificabile con una forma eritroblastica (figura 6.7).

Figura 6.7 – Caso clinico n°2. Leucemia acuta mieloide secondaria in paziente pluritrattato per leucemia a cellule capellute. È negativa la determinazione di *B-raf*^{V600E} su sangue midollare.



4. Possibile ruolo della valutazione di *B-raf*^{V600E} nella pratica clinica

La valutazione molecolare di *B-raf*^{V600E} ha un'applicabilità immediata nel contesto clinico, purché sempre correlata ai parametri ematologici e midollari del paziente. L'esperienza istituzionale maturata su 22 pazienti (38 misurazioni complessive) evidenzia come esista una differenza in termini di abbondanza frazionale dell'allele mutato tra i pazienti con malattia attiva (esordio o ricaduta) e pazienti in risposta, individuando come in questi ultimi i valori di abbondanza frazionale siano < 1% (valore che potrebbe essere utilizzato come soglia di discriminazione tra pazienti con malattia attiva e pazienti con malattia minima residua). Resta da chiarire quale interpretazione dare a valori di abbondanza frazionale nell'intorno dell'1% (che dovranno essere contestualizzati nell'ambito della storia clinica del paziente). In ogni caso, sembra chiaro che tra i pazienti con malattia attiva e i pazienti in remissione la differenza dei valori di abbondanza frazionale dell'allele mutato sia di almeno due (ed in alcuni casi tre) logaritmi.

Esempi di applicazione del saggio molecolare nella storia dei pazienti con leucemia a cellule capellute possono essere: la diagnostica differenziale della malattia all'esordio (esclusione di malattia in pazienti con sindromi leucemiche che possono mimare il comportamento della leucemia a cellule capellute, nel momento in cui il riscontro della mutazione fosse negativo sul sangue periferico); la diagnosi di malattia in ricaduta (aumento progressivo dell'abbondanza frazionale della mutazione nel corso del *follow-up*, anche in assenza di alterazioni dei parametri ematologici del paziente, che in virtù dell'alterazione molecolare dovranno essere più strettamente monitorati); la categorizzazione della profondità della risposta (con introduzione del nuovo concetto di *risposta molecolare* su sangue periferico nei pazienti con risposta completa emato-midollare), con possibili ricadute prognostiche.

CONCLUSIONI

Nel campo delle emopatie neoplastiche, la leucemia a cellule capellute costituisce un chiaro esempio di come la ricerca traslazionale, farmacologica e clinica abbiano nel tempo registrato significativi passi avanti, incidendo in maniera rilevante sulla storia naturale della malattia attraverso l'induzione di un numero sempre maggiore di risposte cliniche di buona qualità e di lunga durata, in tal senso rendendo favorevolmente controllabile una patologia un tempo gravata da prognosi severa e per la quale non si poteva disporre di adeguate opzioni di terapia.

Se da un lato l'utilizzo degli analoghi purinici ha consentito di approdare a traguardi terapeutici particolarmente favorevoli, d'altro canto non può essere trascurata quella parte di pazienti che, sperimentando ricadute successive, con intervalli di tempo liberi da malattia progressivamente minori e con una probabilità decrescente di ottenere una nuova remissione di qualità soddisfacente, diviene refrattaria ai farmaci convenzionalmente impiegati^{14,16}. È proprio in questo ambito di pazienti, pesantemente pretrattati, con malattia di vecchia diagnosi, ma in recrudescenza, attiva e sintomatica, che si è focalizzato l'interesse nel mettere a punto nuove strategie di intervento e si è snodato il percorso di studio di dottorato di ricerca.

Il riscontro della peculiare mutazione del gene *B-raf* in tutti i casi di leucemia a cellule capellute¹⁸, la documentazione dell'azione aberrante e leucemogena del suo prodotto proteico, B-Raf^{18,41,127}, e la possibilità di ripristinare una fisiologica funzione di *signaling* intracellulare impiegando molecole inibitrici del funzionamento anomalo della proteina alterata^{42,126}, hanno costituito un poderoso rationale scientifico per la conduzione di studi clinici in cui un inibitore di B-Raf, vemurafenib, è stato impiegato come agente singolo²⁰ o in associazione all'anticorpo monoclonale anti-CD20, rituximab, in pazienti con malattia in ricaduta, pesantemente pretrattati e giudicati non idonei ad un successivo trattamento con farmaci antitumorali. Studi clinici, attivi sul territorio italiano, nell'ambito dei quali

l'Istituto di Ematologia bolognese ha avuto un ruolo di primo piano, contribuendo all'arruolamento di una significativa quota di pazienti. Non solo, ma la peculiare prevalenza della mutazione di *B-raf*^{V600E} in tutti i casi di leucemia a cellule capellute e in tutte le fasi di malattia^{18,37,128}, ne ha suggerito il possibile impiego come marcatore di attività clinica, spingendoci a mettere a punto un saggio molecolare atto a quantificare l'abbondanza frazionale dell'allele mutato, correlandone il valore con i dati clinici, emocromocitometrici e istologici a disposizione per ogni singolo paziente nel peculiare momento in cui la misurazione è stata effettuata.

Vemurafenib come agente singolo è efficace in contesti di malattia ricaduta e resistente e non altrimenti trattabile, inducendo risposte obiettive in almeno il 96% dei pazienti, con risposte complete nel 35% dei casi circa²⁰. Il dato si affianca al rapido – e sostanzialmente costante – miglioramento ematologico a livello del sangue periferico in tempi assai brevi dall'inizio del trattamento, con una riduzione significativa – superiore al 50% – dell'infiltrato leucemico midollare nella quasi totalità dei pazienti. Risposte ancor più profonde sono ottenute combinando vemurafenib e rituximab, mettendo in atto cioè due strategie complementari: la prima finalizzata a contrastare la crescita e la proliferazione delle cellule leucemiche minando direttamente il meccanismo che sostiene la leucemogenesi, la seconda rivolta in maniera mirata alle cellule residue, nelle quali cioè è avvenuto il ripristino di un segnale proliferativo e anti-apoptotico pur in presenza dell'inibizione di B-Raf^{20,167}.

Parallelamente ai dati di efficacia, si è osservato come la terapia con vemurafenib sia sicura, priva in assoluto di eventi tossici sul piano ematologico e caratterizzata da effetti avversi di lieve entità, transitori e facilmente controllabili con la terapia domiciliare o la riduzione di dose del farmaco. La formulazione orale, in compresse, la buona tolleranza al trattamento, la gestione del paziente tramite visite ambulatoriali, rendono questa terapia di facile attuazione anche nel paziente anziano, senza ridurne l'efficacia. *Caveat* importante, tuttavia, il possibile sviluppo di neoplasie cutanee, con anche alcuni casi di melanoma: ciò probabilmente in seguito

all'emergenza di cloni vemurafenib-insensibili nell'ambito di lesioni pre-neoplastiche, in una malattia – il melanoma – che con la leucemia a cellule capellute condivide la lesione genetica di base (anche se l'espressione della proteina aberrante è più eterogenea nel contesto del tessuto patologico)^{125,130}.

Gli interessanti risultati ottenuti nei primi studi di fase 2 confermano il ruolo patogenetico della via di segnalazione delle MAP-chinasi nella tricoleucemia e suggeriscono futuri approfondimenti terapeutici riguardo al ruolo dell'inibizione terapeutica di B-Raf. Interessanti strategie terapeutiche attualmente oggetto di uno studio attivo sul territorio nazionale sono rappresentate dalla messa in campo di nuovi anticorpi monoclonali anti-CD20, quali obinutuzumab (attualmente approvato nel trattamento della leucemia linfatica cronica), e dall'impiego concomitante dell'inibitore di B-Raf e di un inibitore di MEK (cobimetinib). Ciò sulla scorta di dati di efficacia recenti pubblicati in pazienti con melanoma^{168,169,174}.

Rimangono tuttavia ancora numerosi problemi aperti che richiedono di essere esaminati in maniera attenta:

- attualmente non è noto il dosaggio più idoneo del farmaco, come non è nota la più adeguata durata del trattamento per quanto riguarda i pazienti con leucemia a cellule capellute: è probabile che la ridotta percentuale di risposte complete nei pazienti in cui il farmaco viene utilizzato come agente singolo sia dovuta all'incompleta ablazione del clone leucemico per via di una durata di trattamento insufficiente in una rilevante quota di pazienti;
- per contro, prolungare il trattamento oltre quanto finora descritto (12-16 settimane, prendendo i due studi di fase 2 presentati in questo elaborato) potrebbe incrementare l'incidenza di eventi avversi, prevalentemente di natura neoplastica cutanea, esponendo il paziente ad un rischio di seconda neoplasia che potrebbe divenire inaccettabile;
- inoltre, pur trattandosi di esperienze retrospettive e non di veri e propri *trials* clinici, vi è evidenza di efficacia del trattamento anche

impiegando dosaggi inferiori ai canonici 960 mg/bid, ed eventualmente per periodi di trattamento più prolungati¹⁷⁰;

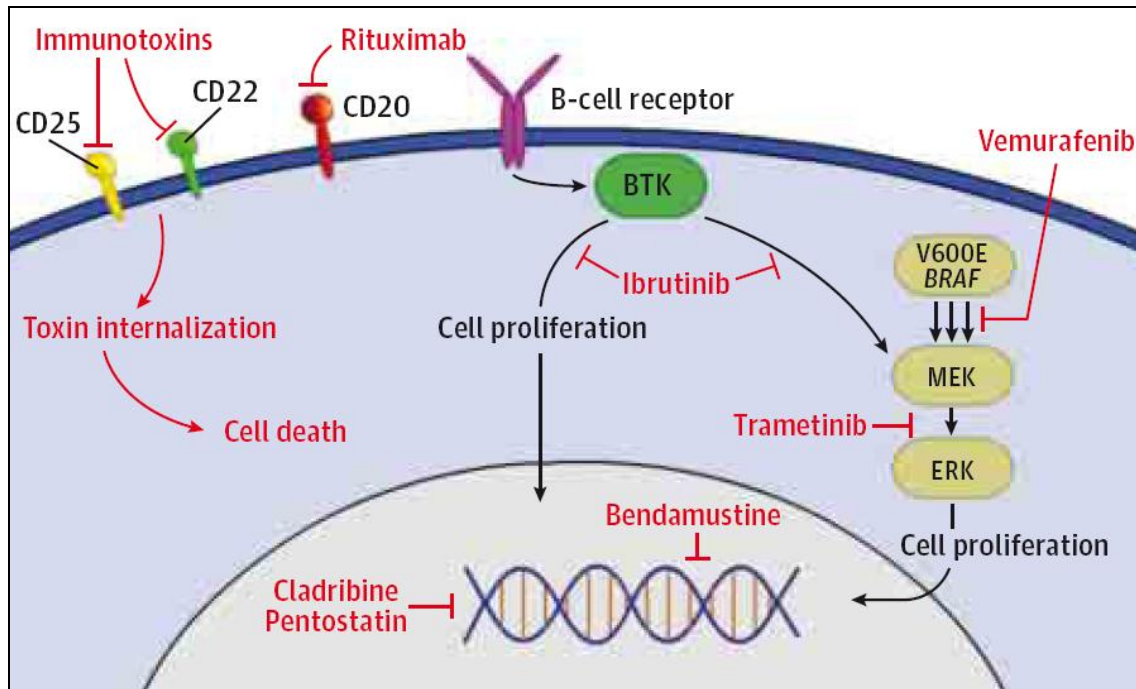
- infine, va accertato il migliore posizionamento del farmaco nell'ambito del trattamento globale della leucemia a cellule capellute (terapia di combinazione con analoghi purinici nella malattia all'esordio; terapia del paziente ricaduto/refrattario non più idoneo a chemioterapia antitumorale; terapia di mantenimento della prima remissione o di remissioni successive alla prima), nonché la più idonea combinazione con farmaci attivi sulla stessa via di segnalazione o su *pathways* analogamente rilevanti nella leucemia a cellule capellute.

Il nostro studio, nella sua parte laboratoristica, ha voluto inoltre gettare luce sulla possibilità di studiare la malattia minima residua dopo trattamento (indipendentemente dalla linea di terapia effettuata e dalla tipologia di agenti impiegati), nell'ottica di introdurre il concetto di *risposta molecolare* nell'ambito dei criteri di risposta attualmente utilizzati⁶⁷. Ciò è stato fatto mettendo a punto un saggio di *droplet digital* PCR allestito su cellule mononucleate da sangue periferico (nelle quali si collocano i tricoleucociti), a fronte del fatto che la lesione molecolare *B-raf*^{V600E} è un marcatore stabile di malattia lungo tutto il suo decorso³⁷, quando la malattia è presente (ipotizzando dunque che la riduzione del *burden* allelico sia un metodo di misurazione della riduzione della taglia di malattia stessa).

Lo sforzo nel correlare il valore di abbondanza frazionale di *B-raf*^{V600E} con i parametri clinici dei pazienti ha portato a considerare *in risposta e con malattia quiescente* i pazienti con un'abbondanza frazionale < 1% sul sangue periferico, fino ad individuare pazienti in cui il *burden* allelico risulta chiaramente negativizzato: tra questi, pazienti in risposta completa dopo trattamento (alla prima rivalutazione dopo terapia efficace¹⁷³) e pazienti in remissione completa duratura, da almeno 5 anni^{16,17}. La negativizzazione della malattia minima residua potrebbe pertanto essere considerata un indicatore di assoluta buona prognosi nel contesto di una malattia dal caratteristico comportamento recidivante, e la valutazione

molecolare su sangue periferico divenire uno strumento utile per lo studio longitudinale del paziente in *follow-up*, evitando la ripetizione di esami midollari se non al solo momento in cui appare necessario intraprendere una successiva linea di terapia.

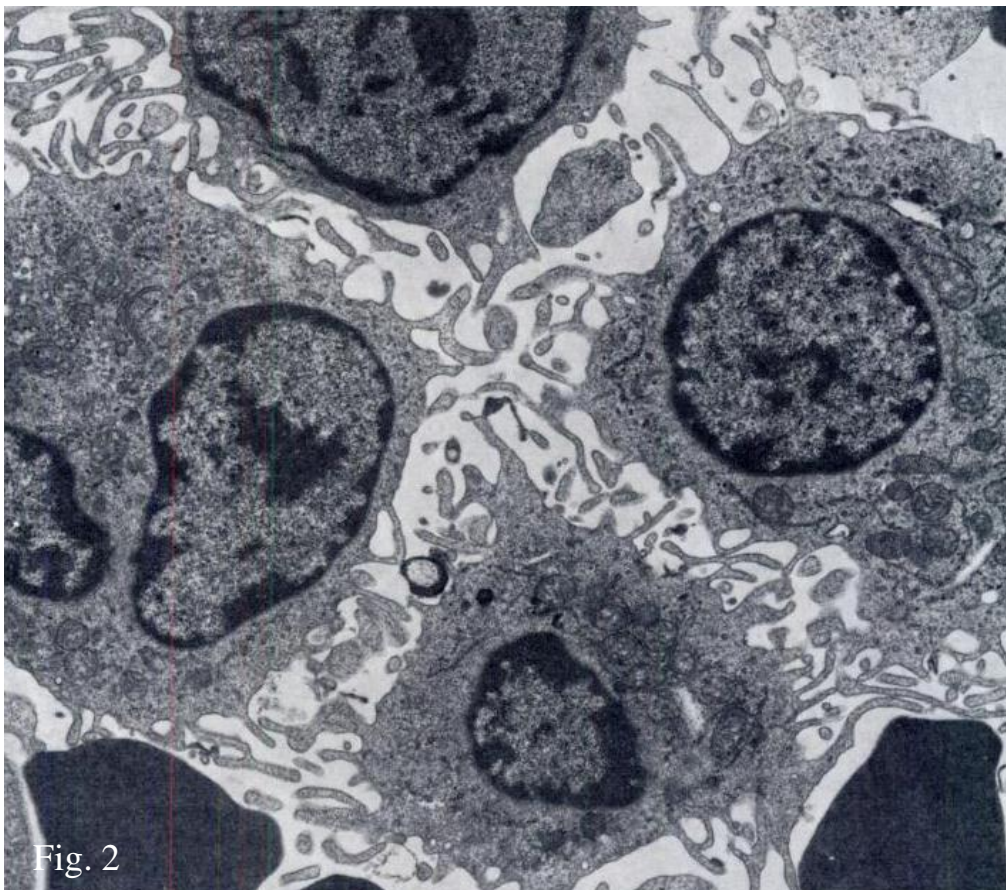
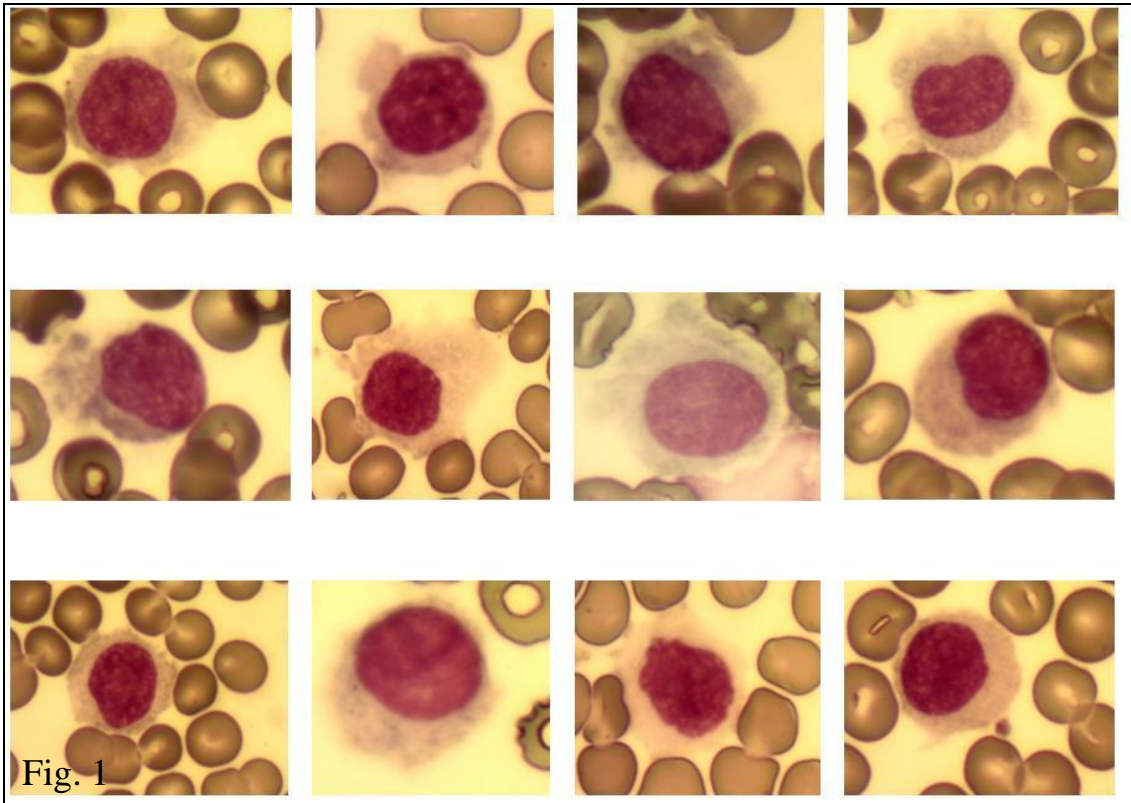
Figura 1 – Nuovi e vecchi farmaci e bersagli terapeutici nel trattamento della leucemia a cellule capellute.



L'inibizione farmacologica di B-Raf è stata il primo passo verso l'apertura di nuovi orizzonti per quanto riguarda il trattamento di pazienti considerati privi di opzioni terapeutiche. La comunità scientifica (figura 14 fuori testo) è infatti impegnata nello studio di strategie alternative di trattamento della malattia in ricaduta dopo gli analoghi purinici e dopo gli stessi inibitori di B-Raf (figura 1)¹⁷⁵. Stanno emergendo le prime evidenze sull'uso di inibitori di tirosin-chinasi (ibrutinib, come già avviene nella leucemia linfatica cronica¹⁷⁶) e si sta valutando l'opportunità di portare alla clinica molecole rivolte verso antigeni particolarmente espressi in questa malattia (come ad esempio il CD123).

Ancora una volta, la leucemia a cellule capellute si dimostra un fertile terreno per l'innovazione in oncoematologia.

FIGURE FUORI TESTO



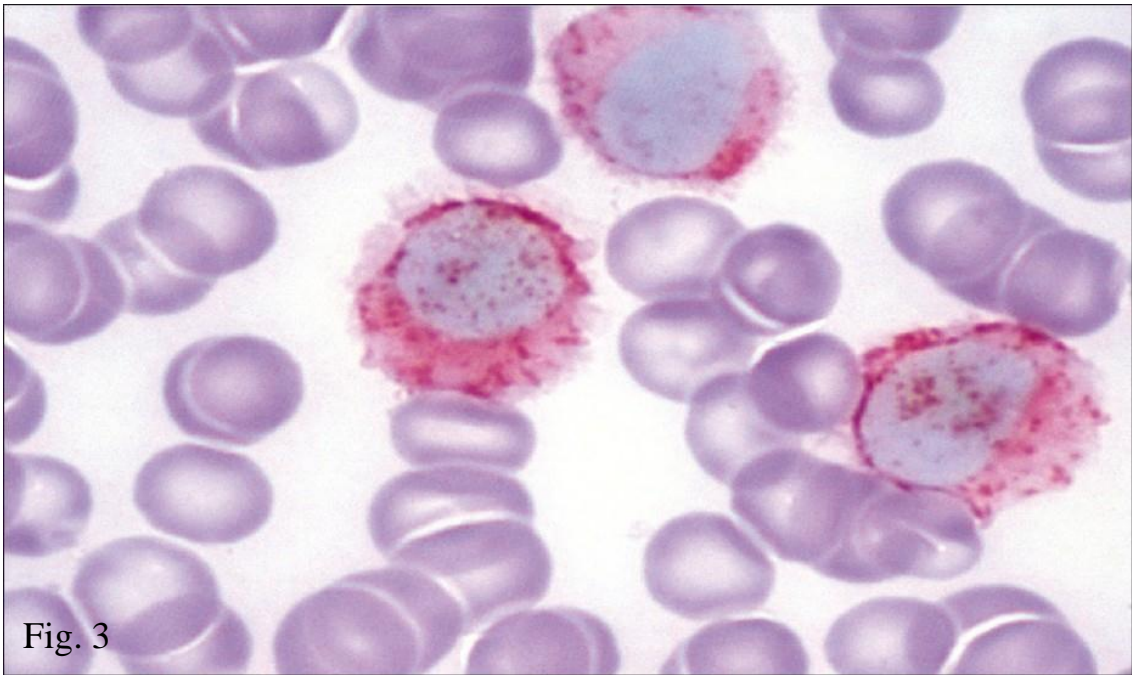


Fig. 3

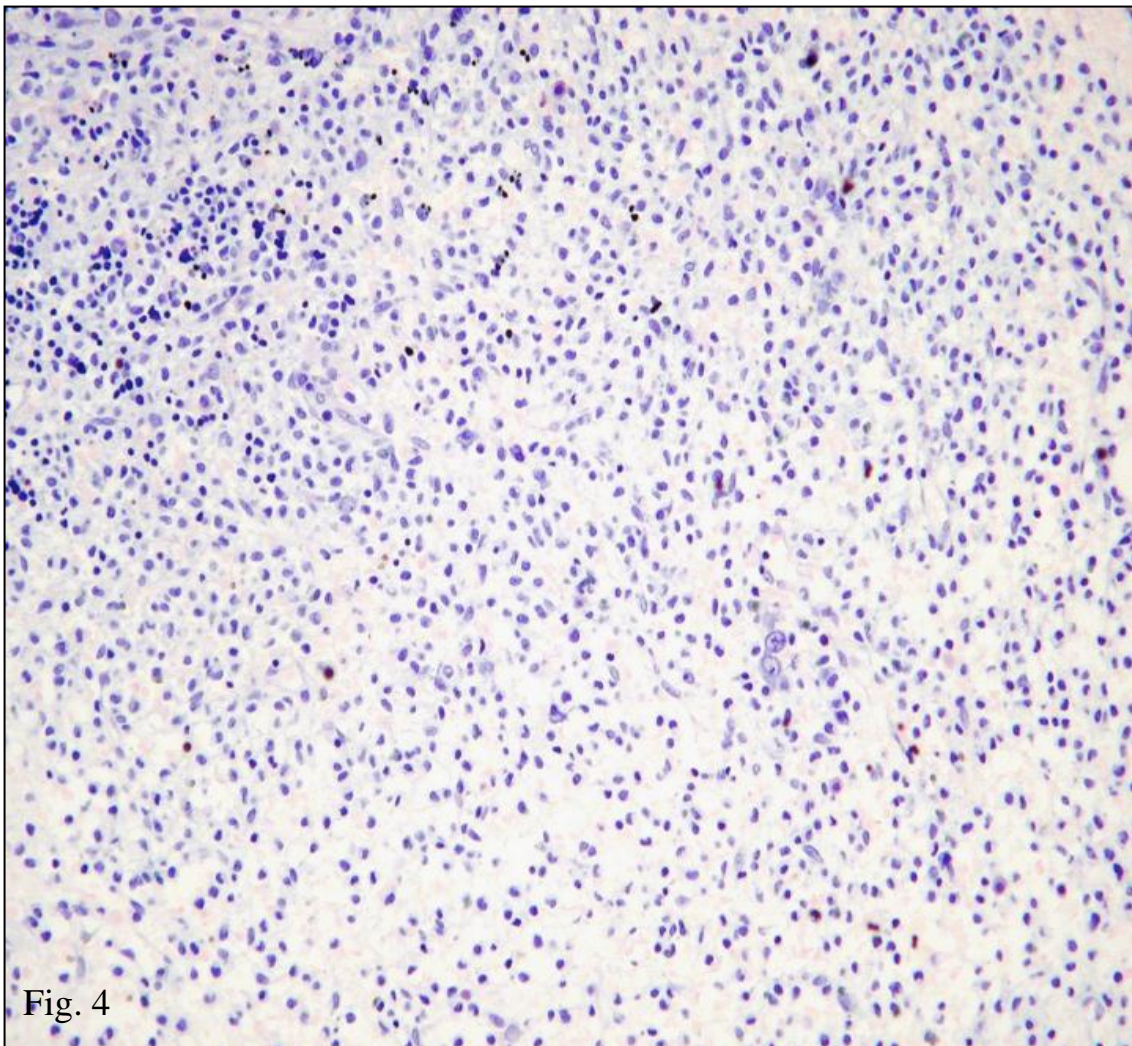


Fig. 4

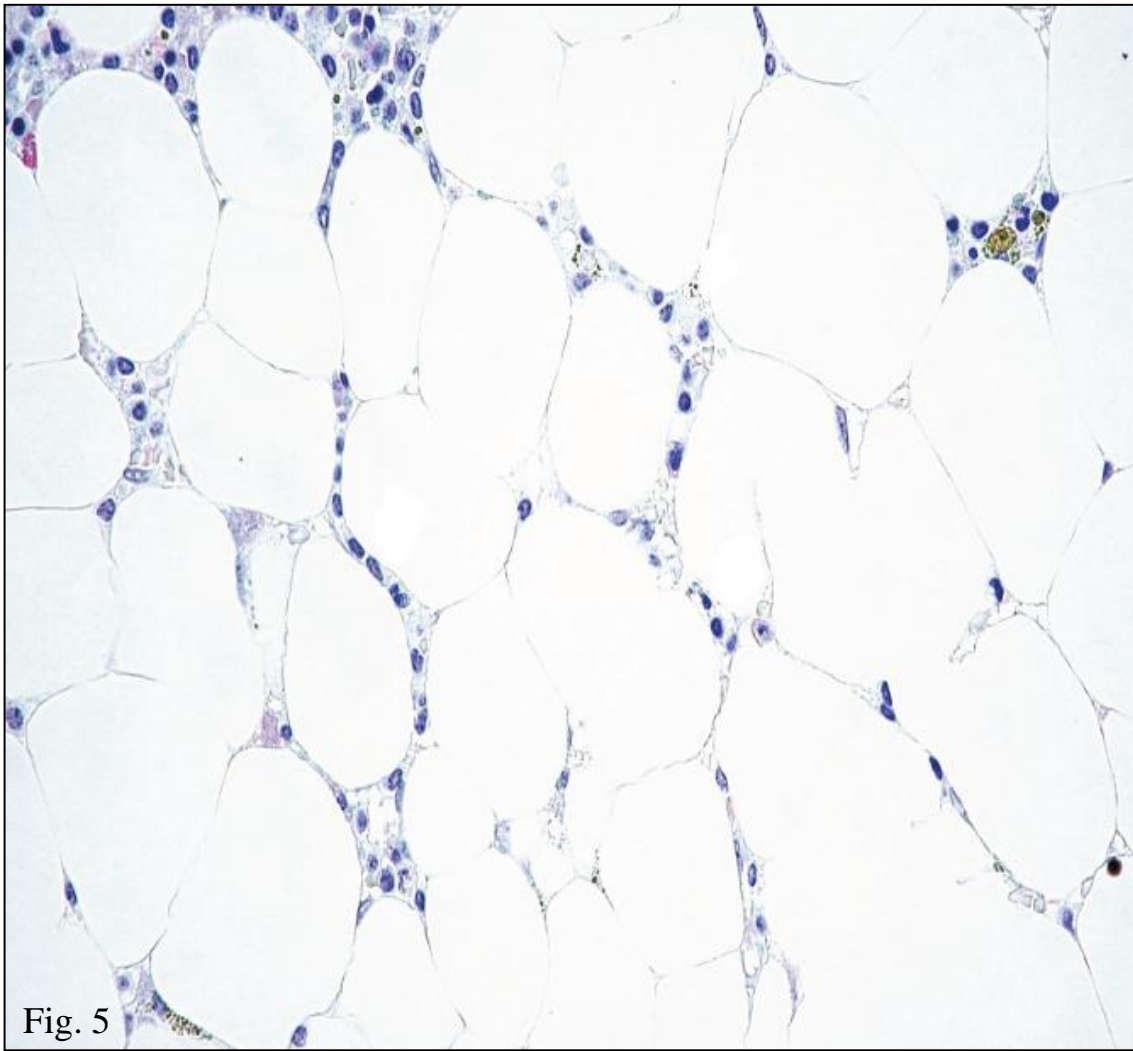


Fig. 5

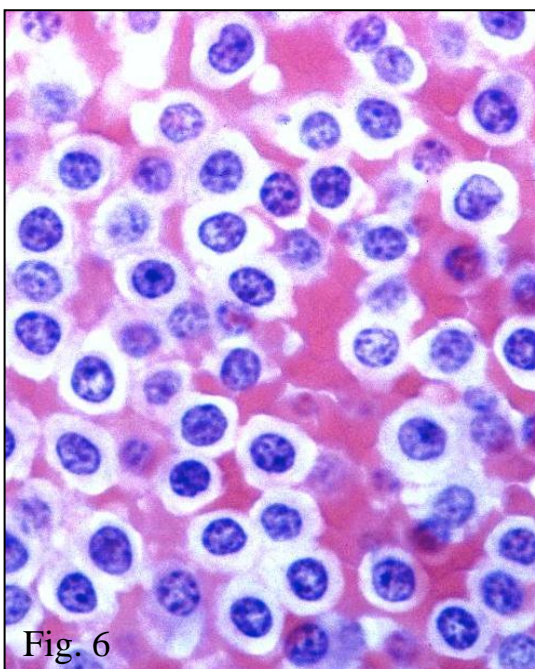


Fig. 6

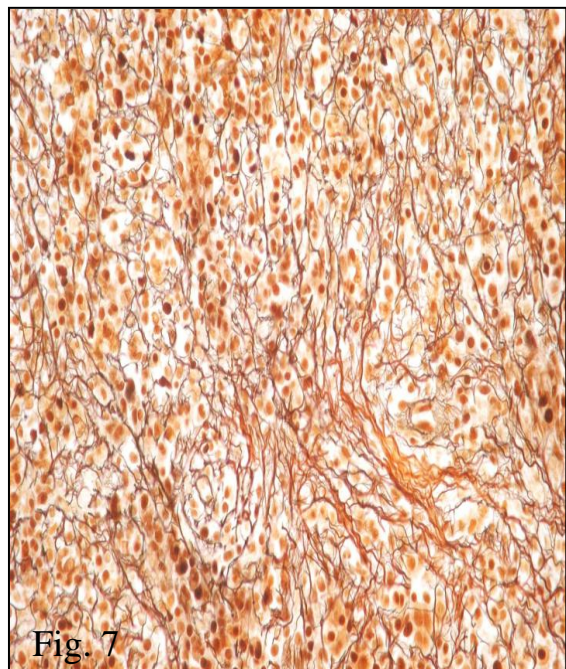


Fig. 7

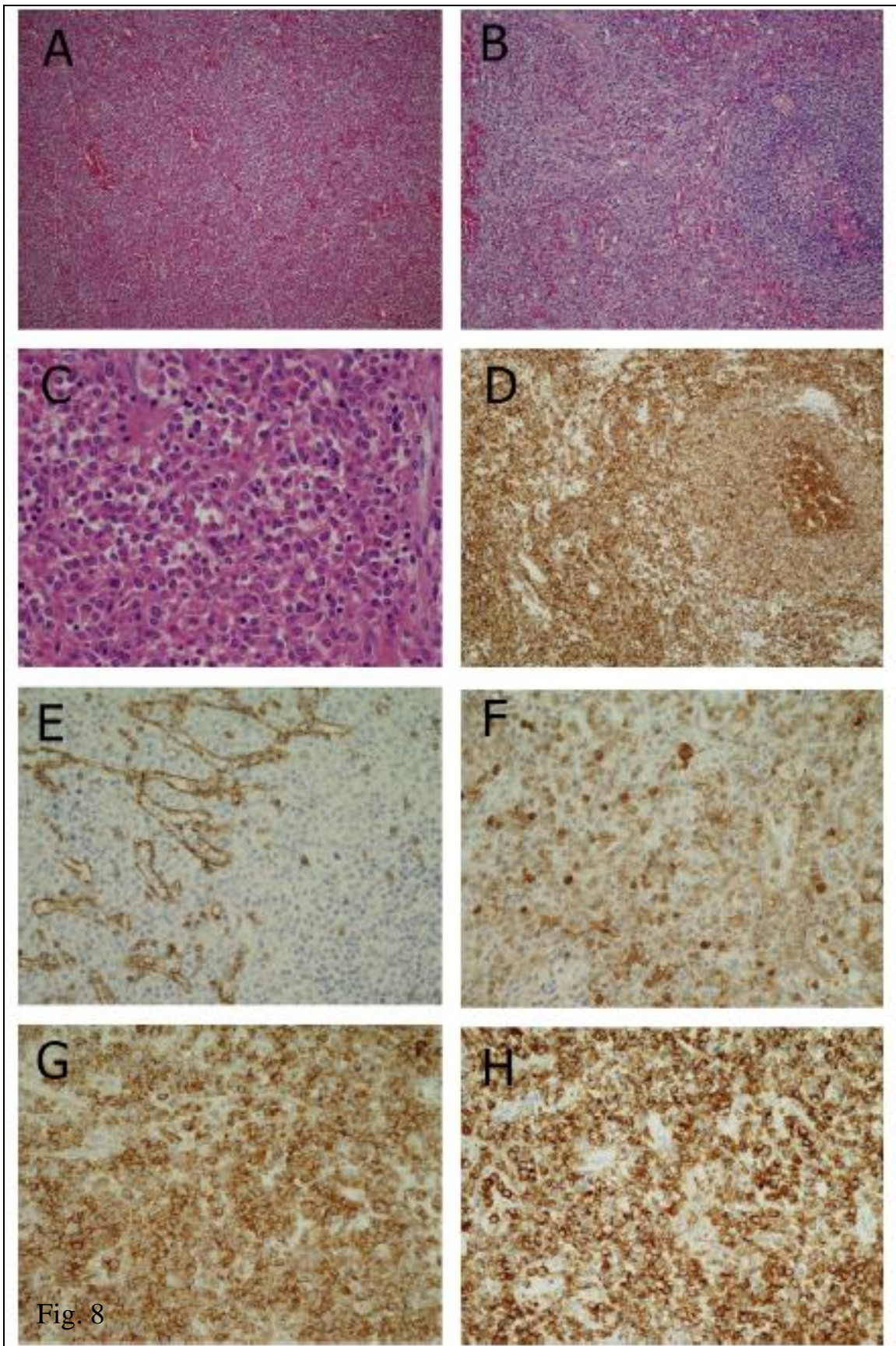


Fig. 8

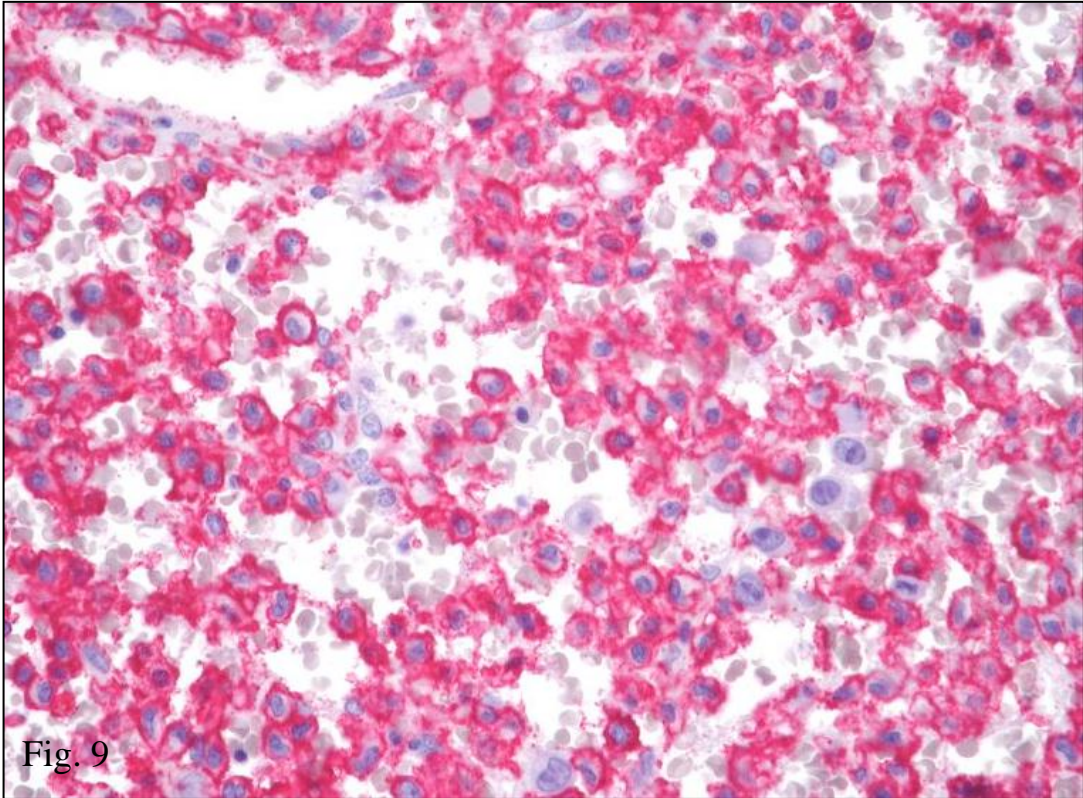


Fig. 9

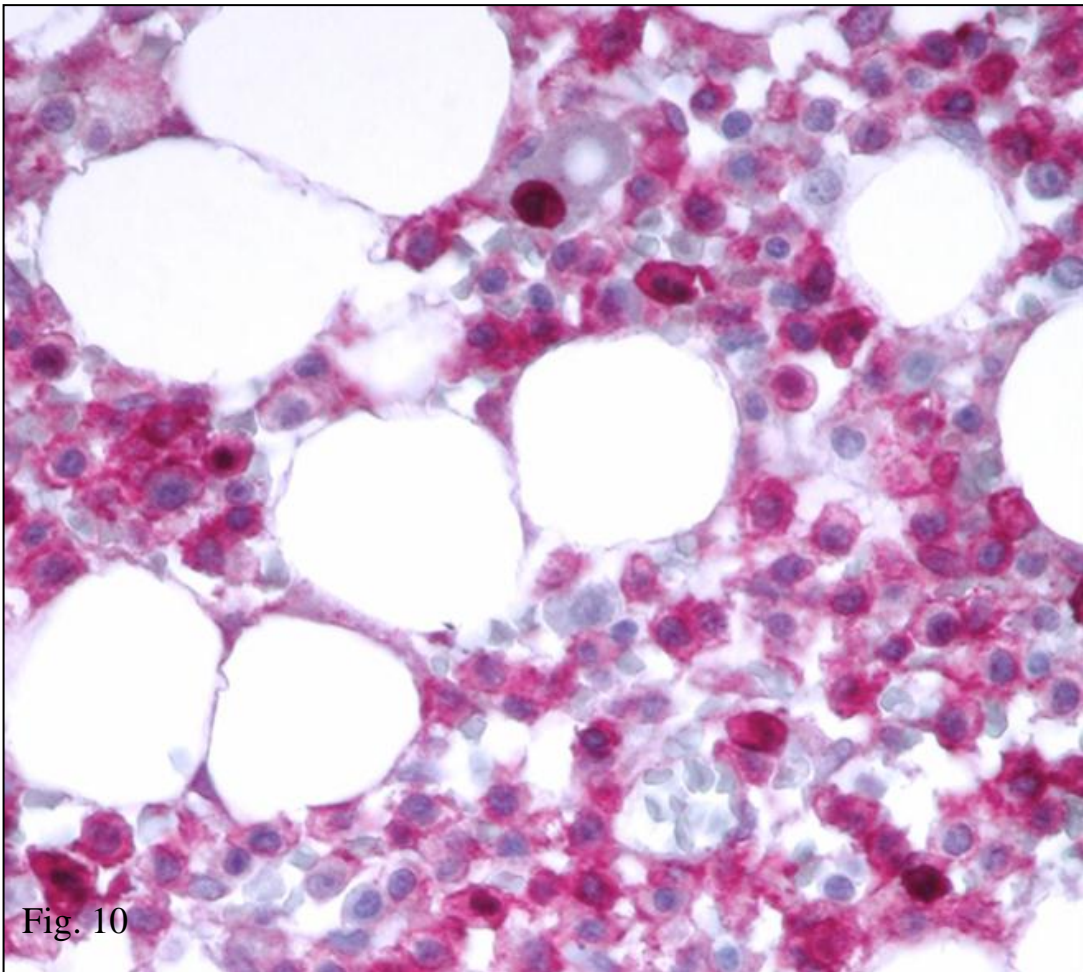
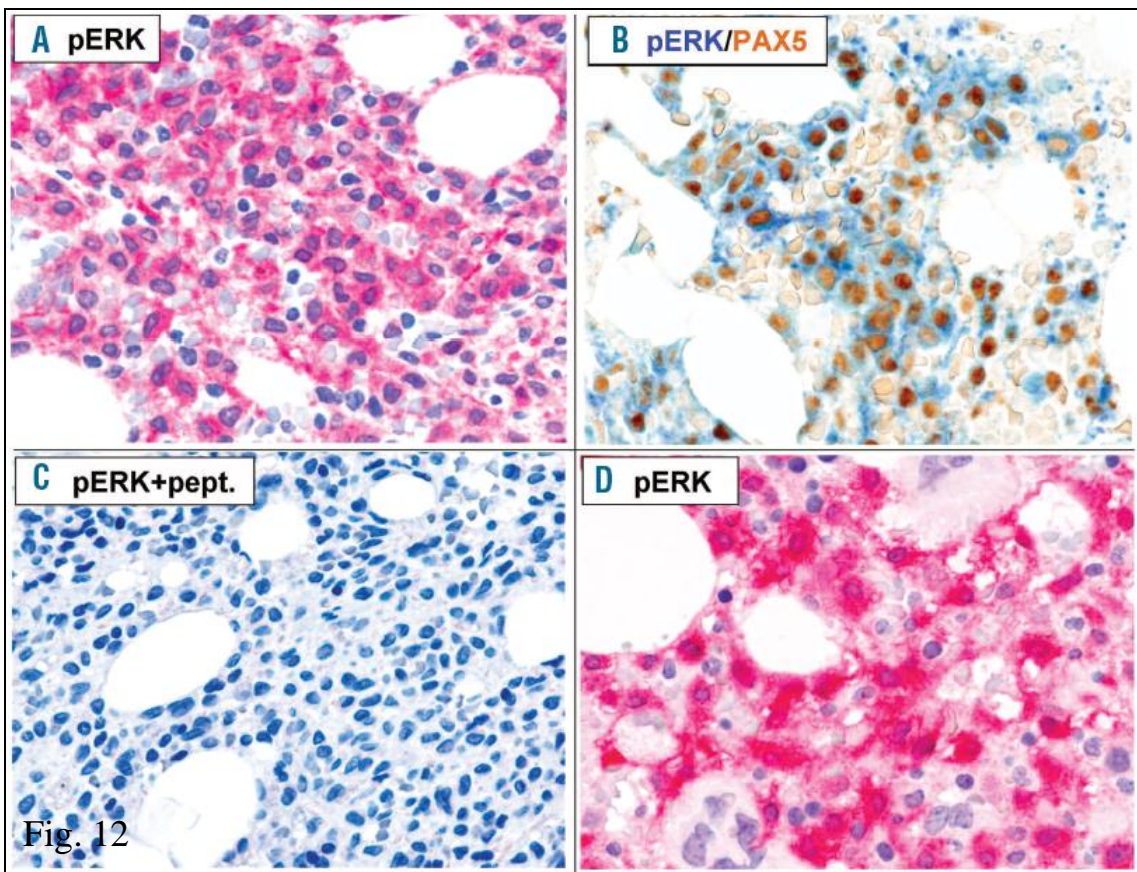
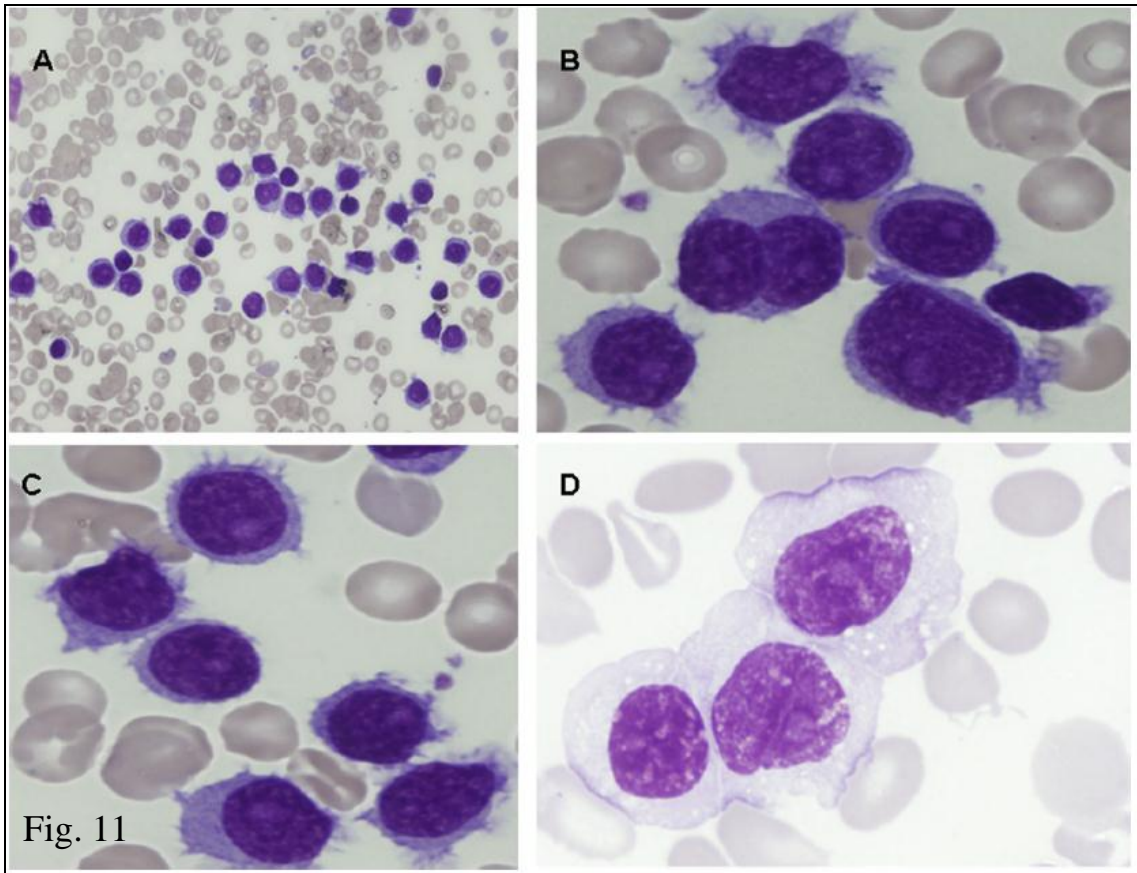


Fig. 10



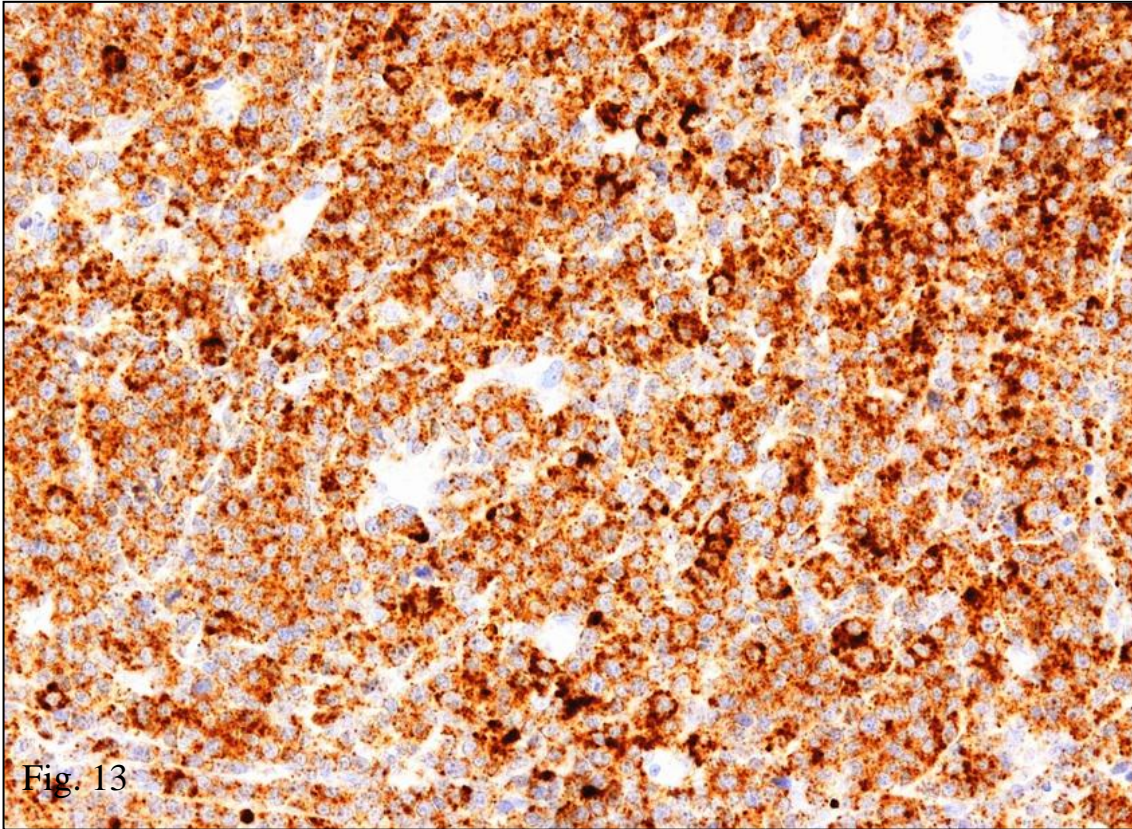


Fig. 13



Fig. 14

Figura 1 – La morfologia delle cellule capellute allo striscio di sangue periferico e midollare (microscopio ottico, colorazione May-Grünwald-Giemsa). Foto dell’Autore.

Figura 2 – La cellula capelluta al microscopio elettronico²²: si notino le granulazioni citoplasmatiche costituite dai complessi ribosomiali lamellari.

Figura 3 – Colorazione citochimica delle cellule capellute per la fosfatasi acida resistente all’inibizione dell’acido tartarico.

Figura 4 – Midollo osseo: interessamento diffuso.

Figura 5 – Midollo osseo ipocellulato con infiltrato tricoleucocitario interstiziale.

Figura 6 – Midollo osseo: il caratteristico aspetto “a uovo fritto” (spiegazione nel testo).

Figura 7 – Midollo osseo: colorazione per le fibre reticoliniche.

Figura 8 – Morfologia splenica in paziente affetto da leucemia a cellule capellute. La milza mostra la tipica infiltrazione della polpa rossa, in associazione a lacune ematiche (di sangue stravasato) ed occasionali foci di polpa bianca intatti (pannelli A-C). L’infiltrazione tricoleucocitaria è evidenziata dalla reazione immunostochimica per CD20 (pannello D). La colorazione per CD8 mette in evidenza le cellule disposte a delimitare le aree di polpa rossa (pannello E). Le cellule neoplastiche sono inoltre positive per annessina A1 (pannello F), CD25 (pannello G) e CD11c (pannello H)⁶³.

Figure 9-10 – Reazione immunostochimica per CD20 (figura 9) e annessina A1 (figura 10).

Figura 11 – Leucemia a cellule capellute variante. Striscio di sangue periferico (microscopio ottico, colorazione May-Grünwald-Giemsa) in due casi. Il quadro, a basso ingrandimento, è monomorfo; i linfociti neoplastici hanno un diametro quasi doppio rispetto ad un linfocito normale (pannello A). A maggiore ingrandimento, sono evidenti le propaggini citoplasmatiche circonfenziali, la cromatina a zolle e la presenza di prominenti nucleoli (pannelli B-C). Un tricoleucocito ha nucleo bilobato e binucleolato (pannello B). In un secondo caso, i tricoleucociti appaiono privi di propaggini capellute; presentano ampio citoplasma poco tingibile e mantengono una cromatina a zolle, in un nucleo con evidenti nucleoli (pannello D)¹¹³.

Figura 12 – Espressione di P-ERK nella leucemia a cellule capellute (sezioni di midollo osseo). Diffuso infiltrato leucemico con positività citoplasmatica per P-ERK (pannello A). Conferma della positività per P-ERK (colorazione blu, citoplasmatica) e PAX5 (colorazione bruna, nucleare) nelle cellule leucemiche (pannello B). Negatività immunoistochimica previa incubazione del campione con il fosfopeptide ERK, riconosciuto dallo specifico anticorpo anti-P-ERK (pannello C). Espressione di P-ERK nucleo-citoplasmatica (pannello D)¹²⁸.

Figura 13 – Linfoma non-Hodgkin, T-linfocitario, epiteliotropo monomorfo, B-Raf-positivo in immunoistochimica per il mutante V600E, sviluppatosi come complicanza in un paziente affetto da leucemia a cellule capellute non responsiva a terapia con cladribina.

Figura 14 – La Hairy Cell Leukemia Community. Columbus, 21 ottobre 2017.

BIBLIOGRAFIA

1. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood*, 1958; 13: 609-630.
2. Schrek R, Donnelly J. Hairy cells in blood lymphoreticular neoplastic disease and 'flagellated' cells of normal lymph nodes. *Blood*, 1966; 27: 199.
3. Basso K, Liso A, Tiacci E, et al. Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B-cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *J Exp Med*, 2004; 199: 59-68.
4. Kitagawa Y, Brahmachary M, Tiacci E, et al. A microRNA signature specific for hairy cell leukemia and associated with modulation of the MAPK-JNK pathways. *Leukemia*, 2012; 26: 2564-2567.
5. Jansen J, Hermans J. Splenectomy in hairy cell leukemia. A retrospective multicenter analysis. *Cancer*, 1981; 47: 2066-2076.
6. Golomb HM, Vardiman JW. Response to splenectomy in 65 patients with hairy cell leukemia: an evaluation of spleen weight and bone marrow involvement. *Blood*, 1983; 61: 349-352.
7. Damasio E, Spriano M, Repetto M, et al. Hairy cell leukemia: a retrospective study of 235 cases by the Italian Cooperative Group (ICGHCL) according to Jansen's clinical staging system. *Acta Hematol*, 1984; 72: 326-334.
8. Magee MJ, McKenzie S, Filippa DA, et al. Hairy cell leukemia. Durability of response to splenectomy in 26 patients and treatment of relapse with androgens in six patients. *Cancer*, 1985; 56: 2557-2562.
9. Quesada JR, Reuben J, Manning JT, et al. Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*, 1984; 310: 15-18.
10. Spiers AS, Parekh SJ, Bishop MB. Hairy-cell leukemia: induction of complete remission with pentostatin (2'-deoxycoformycin). *J Clin Oncol*, 1984; 2: 1336-1342.

11. Piro LD, Carrera CJ, Carson DA, et al. Lasting remissions in hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine. *N Engl J Med*, 1990; 322: 1117-1121.
12. Habermann TM, Rai K. Historical treatments of hairy cell leukemia, splenectomy and interferon: past and current uses. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52 (suppl. 2): 18-20.
13. Kreitman RJ. Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *BioDrugs*, 2009; 23: 1-13.
14. Dearden CE, Else M, Catovsky D. Long-term results for pentostatin and cladribine treatment of hairy cell leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52 (suppl. 2): 21-24.
15. Else M, Dearden CE, Matutes E, et al. Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis. *Br J Haematol*, 2009; 145: 733-740.
16. Zinzani PL, Pellegrini C, Stefoni V, et al. Hairy cell leukemia. Evaluation of the long-term outcome in 121 patients. *Cancer*, 2010; 116: 4788-4792.
17. Zinzani PL, Stefoni V, Broccoli A, et al. Is it really possible to cure hairy cell leukemia patients only with frontline therapy? *Ann Hematol*, 2014.
18. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*, 2011; 364: 2305-2315.
19. Chung SS, Kim E, Park JH, et al. Hematopoietic stem cell origin of BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. *Sci Transl Med*, 2014; 6: 238ra71
20. Tiacci E, Park JH, De Carolis L, et al. Targeting mutant BRAF in relapsed or refractory hairy cell leukemia. *N Engl J Med*, 2015; 373: 1733-1747.
21. Ewald O. Die leukämische reticuloendotheliose. *Deutsches Arch Klin Med*, 1923; 142: 222-228.

22. Bouroncle BA. Leukemic reticuloendotheliosis (hairy cell leukemia). *Blood*, 1979; 53: 412-436.
23. Wylys RF, Greene MH, Palretke M, et al. Hairy cell leukemia in three siblings: an apparent HLA-linked disease. *Cancer*, 1982; 49: 538-542.
24. Egli FL, Koller B, Furrer J. Hairy cell leukemia and glucose-6-phosphatase dehydrogenase deficiency in two brothers. *N Engl J Med*, 1990; 322: 1159.
25. Colovic MD, Jankovic GM, Wiernik PH. Hairy cell leukemia in first cousins and review of the literature. *Eur J Haematol*, 2011; 67: 185-188.
26. Petty HR, Ware BR, Liebes FL, et al. Electrophoretic mobility distributions distinguish hairy cells from other mononuclear blood cells and provide evidence for the heterogeneity of normal monocytes. *Blood*, 1981; 57: 250-255.
27. Korsmeyer SJ, Greene WC, Cossman J, et al. Rearrangement and expression of immunoglobulin genes and expression of Tac antigen in hairy cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 4522.
28. Golomb HM, Davis S, Wilson C, et al. Surface immunoglobulins on hairy cells of 55 patients with hairy cell leukemia. *Am J Hematol*, 1982; 12: 397-401.
29. Burns GF, Cawley JC, Worman CP, et al. Multiple heavy chain isotypes on the surface of the cells of hairy cell leukemia. *Blood*, 1978; 52: 1132-1147.
30. Kluin-Nelemans HC, Krouwels MM, Jansen JH, et al. Hairy cell leukemia preferentially expresses the IgG3-subclass. *Blood*, 1990; 75: 972-975.
31. Forconi F, Sahota SS, Raspadori D, et al. Tumor cells of hairy cell leukemia express multiple clonally related immunoglobulin isotypes via RNA splicing. *Blood*, 2001; 98: 1174-1181.
32. Haglund U, Juliusson G, Stellan B, et al. Hairy cell leukemia is characterized by clonal chromosome abnormalities clustered to specific regions. *Blood*, 1994; 83: 2637-2645.

33. Sambani C, Trafalis DT, Mitsoulis-Mentzikoff C, et al. Clonal chromosome rearrangements in hairy cell leukemia: personal experience and review of literature. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001; 129: 138-144.
34. Dierlamm J, Stefanova M, Wlodarska I, et al. Chromosomal gains and losses are uncommon in hairy cell leukemia: a study based on comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001; 128: 164-167.
35. Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Østergaard M, et al. A narrow deletion of 7q is common to HCL, and SMZL, but not CLL. *Eur J Haematol*, 2004; 72: 390-402.
36. Rinaldi A, Kwee I, Young KH, et al. Genome-wide high resolution DNA profiling of hairy cell leukemia. *Br J Haematol*, 2013; 162: 566-569.
37. Durham BH, Getta B, Dietrich S, et al. Genomic analysis of hairy cell leukemia identifies novel recurrent genetic alterations. *Blood*, 2017; 130: 1644-1648.
38. Villianatou K, Brito-Babapulle V, Matutes E, et al. p53 gene deletion and trisomy 12 in hairy cell leukemia and its variant. *Leuk Res*, 1999; 23: 1041-1045.
39. Konig EA, Kusser WC, Day C, et al. p53 mutations in hairy cell leukemia. *Leukemia*, 2000; 14: 706-711.
40. Tiacci E, Pettirossi V, Schiavoni G, et al. Genomics of hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*, 2017; 35: 1002-1010.
41. Kamiguti AS, Harris RJ, Slupsky JR, et al. Regulation of hairy-cell survival through constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene*, 2003; 22: 2272-2284.
42. Pettirossi V, Santi A, Imperi E, et al. BRAF inhibitors reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity. *Blood*, 2015; 125: 1207-1216.
43. Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, et al. The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood*, 2012; 119: 188-191.

44. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood*, 2012; 119: 192-195.
45. Blombery P, Wong SQ, Hewitt CA, et al. Detection of BRAF mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders. *Haematologica*, 2012; 97: 780-783.
46. Langabeer SE, O'Brien D, Liptrot S, et al. Correlation of the BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia with morphology, cytochemistry and immunophenotype. *Int J Lab Hematol*, 2012; 34: 417-421.
47. Tschernitz S, Flossbach L, Bonengel M, et al. Alternative BRAF mutations in BRAF V600E-negative hairy cell leukemias. *Br J Hematol*, 2014; 165: 529-533.
48. Okada K, Kunitomi A, Sakai K, et al. Hairy cell leukemia with systemic lymphadenopathy: detection of BRAF mutations in both lymph node and peripheral blood specimens. *Intern Med*, 2015; 54: 1397-1402.
49. Goodman GR, Bethel KJ, Saven A. Hairy cell leukemia: an update. *Curr Opin Hematol*, 2003; 10: 258-266
50. Kraut EH, Neff JC, Bouroncle BA, et al. Immunosuppressive effects of pentostatin. *J Clin Oncol*, 1990; 8: 848-855.
51. Hakimian D, Tallman MS, Hogan DK, et al. Prospective evaluation of internal adenopathy in a cohort of 43 patients with hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*, 1994; 12: 268-272.
52. Mercieca J, Matutes E, Moskovic E. Massive abdominal lymphadenopathy in hairy cell leukemia: a report of 12 cases. *Br J Haematol*, 1992; 82: 547.
53. Ventura F, Rocha J, Pereira T, et al. Sweet syndrome as the presenting symptom of hairy cell leukemia. *Dermatol Online J*, 2009; 15: 12.
54. Viens D, St-Hilaire E, Beauregard P, et al. Successful treatment of warm antibody (IgG/C3 positive) autoimmune hemolytic anemia in

- hairy-cell leukemia with 2-CdA in the elderly. *Leuk Lymphoma*, 2008; 49: 1424-1426.
55. Vankalakunti M, Joshi K, Jain S, et al. Polyarteritis nodosa in hairy cell leukemia: an autopsy report. *J Clin Pathol*, 2007; 60: 1181-1182.
 56. Broccoli A, Gandolfi L, Pellegrini C, et al. Leukocytoclastic vasculitis associated with hairy cell leukemia at diagnosis: a case report and review of the literature. *Tumori*. 2016; 102: S124-127.
 57. Hisada M, Chen BE, Jaffe ES, et al. Second cancer incidence and cause-specific mortality among 3104 patients with hairy cell leukemia: a population-based study. *J Natl Cancer Inst*, 2007; 99: 215-222.
 58. Bessis M. Blood smears reinterpreted. Berlin-Heidelberg: Springer International; 1977: 200-201.
 59. Yam LT, Janckila AJ, Li CY, et al. Cytochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase: fifteen years' experience. *Leukemia*, 1987; 1: 285-288.
 60. Li CY, Yam LT, Lam KW. Studies of acid phosphatase isoenzymes in human leukocytes: demonstration of isoenzyme specificity. *J Histochem Cytochem*, 1970; 18: 901-910.
 61. Tiacci E, Liso A, Piris M, et al. Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukemia. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6: 437-448.
 62. Hasserjian RP. Hairy cell leukaemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, et al, eds. Hematopathology (ed 1st). Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011: 247-255.
 63. Wotherspoon A, Attygalle A, Teixeira Mendes LS. Bone marrow and splenic histology in hairy cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2015; 28: 200-207.
 64. Grever MR. How I treat hairy cell leukemia. *Blood*, 2010; 115: 21-28.
 65. Grever MR, Lozanski G. Modern strategies for hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*, 2011; 29: 583-590.

66. Naik RR, Saven A. My treatment approach to hairy cell leukemia. *Mayo Clin Proc*, 2012; 87: 67-76.
67. Consensus resolution: proposed criteria for evaluation of response to treatment in hairy cell leukemia. *Leukemia*, 1987; 1: 405.
68. Noel P. Definition of remission, minimal residual disease, and relapse in hairy cell leukemia bone marrow biopsy histology and immunohistology specimens. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52 (suppl. 2): 62-64.
69. Schnittinger S, Bacher U, Haferlach T, et al. Development and validation of a real-time quantification assay to detect and monitor BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. *Blood*, 2012; 119: 3151-3154.
70. Szankasi P, Reading NS, Vaughn CP, et al. A quantitative allele-specific PCR test for the BRAF V600E mutation using a single heterozygous control plasmid for quantitation. *J Mol Diagn*, 2013; 15: 248-254.
71. Verma S, Greaves WO, Ravandi F, et al. Rapid detection and quantitation of BRAF mutations in hairy cell leukemia using a sensitive pyrosequencing assay. *Am J Clin Pathol*, 2012; 138: 153-156.
72. Laurini JA, Aoun P, Iqbal J, et al. Investigation of the BRAF V600E mutation by pyrosequencing in lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*, 2012; 138: 877-883.
73. Boyd EM, Bench AJ, van't Veer MB, et al. High resolution melting analysis for detection of BRAF exon 15 mutations in hairy cell leukaemia and other lymphoid malignancies. *Br J Haematol*, 2011; 155: 609-612.
74. Rider T, Powell R, Gover R, et al. Molecular detection of BRAF-V600E is superior to flow cytometry for disease evaluation in hairy cell leukaemia. *Hematol Oncol*, 2014; 32: 158-161.
75. Maevis V, Mey U, Schmidt-Wolf G, et al. Hairy cell leukemia: short review, today's recommendations and outlook. *Blood Cancer J*, 2014; 4, e184-e194.

76. Dillman RO. Pentostatin (Nipent) in the treatment of chronic lymphocyte leukemia and hairy cell leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2004; 4: 27-36.
77. Spiers AS, Parekh SJ. Complete remission in hairy cell leukaemia achieved with pentostatin. *Lancet*, 1984; 1: 1080-1081.
78. Flinn IW, Kopecky KJ, Foucar MK, et al. Long-term follow-up of remission duration, mortality, and second malignancies in hairy cell leukemia patients treated with pentostatin. *Blood*, 2000; 96: 2981-2986.
79. Maloisel F, Benboubker L, Gardembas M, et al. Long-term outcome with pentostatin treatment in hairy cell leukemia patients. A French retrospective study of 238 patients. *Leukemia*, 2003; 17: 45-51.
80. Spurgeon S, Yu M, Phillips JD, et al. Cladribine: not just another purine analogue? *Exp Opin Invest Drugs*, 2009; 18: 1169-1181.
81. Torrey ML, Sigal DS, Saven A. Development of cladribine at Scripps for hairy cell leukemia and current results. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52 (suppl. 2): 29-33.
82. Sigal DS, Miller HJ, Schram ED, et al. Beyond hairy cell: the activity of cladribine in other hematologic malignancies. *Blood*, 2010; 116: 2884-2896.
83. Cheson BD, Sorensen JM, Vena DA, et al. Treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine via the Group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: a report of 979 patients. *J Clin Oncol*, 1998; 16: 3007-3015.
84. Saven A, Burian C, Koziol JA, et al. Long-term follow up of patients with hairy cell leukemia after cladribine treatment. *Blood*, 1998; 92: 1918-1926.
85. Goodman GR, Burian C, Koziol JA. Extended follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with cladribine. *J Clin Oncol*, 2003; 21: 891-896.
86. Jehn U, Bartl R, Dietzfelbinger H, et al. An update: 12-year follow-up of patients with hairy cell leukemia following treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Leukemia*, 2004; 18: 1476-1481.

87. Chadha P, Rademaker AW, Mandiratta P, et al. Treatment of hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA): long-term follow-up of the Northwestern University experience. *Blood*, 2005; 106: 241-246.
88. Robak T, Jamroziak K, Gora-Tybor J, et al. Cladribine in a weekly versus daily schedule for untreated active hairy cell leukemia: final report from the Polish Adult Leukemia Group (PALG) of a prospective, randomized, multicenter trial. *Blood*, 2007; 109: 3672-3675.
89. Zenhäusern R, Schmitz SH, Solenthaler M, et al. Randomized trial of daily versus weekly administration of 2-chlorodeoxyadenosine in patients with hairy cell leukemia: a multicenter phase III trial (SAKK 32/98). *Leuk Lymphoma*, 2009; 50: 1501-1511.
90. Lauria F, Cencini E, Forconi F. Alternative methods of cladribine administration. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52(suppl. 2); 34-37.
91. Juliusson G, Samuelsson H. Hairy cell leukemia: epidemiology, pharmacokinetics of cladribine, and long-term follow-up of subcutaneous therapy. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52 (suppl. 2): 46-49.
92. Ganzel C, Gatt ME, Maly A, et al. High incidence of skin rash in patients with hairy cell leukemia treated with cladribine. *Leuk Lymphoma*, 2012; 53: 1169-1173.
93. Kraut E. Infectious complications in hairy cell leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52 (suppl. 2): 50-52.
94. Hagberg H, Lundholm L. Rituximab, a chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody, in the treatment of hairy cell leukaemia. *Br J Haematol*, 2001; 115: 609-611.
95. Lauria F, Lenoci M, Annino L, et al. Efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies (Mabthera) in patients with progressed hairy cell leukemia. *Haematologica*, 2001; 86: 1046-1050.
96. Nieva J, Bethel K, Saven A. Phase 2 study of rituximab in the treatment of cladribine-failed patients with hairy cell leukemia. *Blood*, 2003; 102: 810-813.

97. Thomas DA, O'Brien S, Bueso-Ramos C, et al. Rituximab in relapsed or refractory hairy cell leukemia. *Blood*, 2003; 102: 3906-3911.
98. Forconi F, Toraldo F, Sozzi E, et al. Complete molecular remission induced by concomitant cladribine-rituximab treatment in a case of multi-resistant hairy cell leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2007; 48: 2441-2443.
99. Cervetti G, Galimberti S, Andreazzoli F, et al. Rituximab as treatment for minimal residual disease in hairy cell leukemia: extended follow-up. *Br J Haematol*, 2008; 143: 296-298.
100. Zenhäusern R, Simcock M, Gratwohl A, et al. Rituximab in patients with hairy cell leukemia relapsing after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine (SAKK 31/98). *Haematologica*, 2008; 93: 1426-1428.
101. Ravandi F, O'Brien S, Jorgensen J, et al. Phase 2 study of cladribine followed by rituximab in patients with hairy cell leukemia. *Blood*, 2011; 118: 3818-3823.
102. Else M, Dearden CE, Matutes E, et al. Rituximab with pentostatin or cladribine: an effective combination treatment for hairy cell leukemia after disease recurrence. *Leuk Lymphoma*, 2011; 52: 75-78.
103. Kreitman RJ. Hairy cell leukemia – New genes, new targets. *Curr Hematol Malig Rep*, 2013; 8: 184-195.
104. Kreitman RJ, Pastan I. Antibody fusion proteins: anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox. *Clin Cancer Res*, 2011; 17: 6398-6405.
105. Kreitman RJ, Pastan I. Immunoconjugates in the management of hairy cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2015; 28: 236-245.
106. Kreitman RJ, Tallman MS, Robak T, et al. Phase I trial of anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox (CAT-8015 or HA22) in patients with hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*, 2012; 30: 1822-1828.

107. Cawley JC, Burns GF, Hayhoe FG. A chronic lymphoproliferative disorder with distinctive features: a distinct variant of hairy-cell leukaemia. *Leuk Res*, 1980; 4: 547-559.
108. Machii T, Tokumine Y, Inoue R, et al. Predominance of a distinct subtype of hairy cell leukemia in Japan. *Leukemia*, 1993; 7: 181-186.
109. Katayama I, Mochino T, Homma T, et al. Hairy cell leukemia: a comparative study of Japanese and non-Japanese patients. *Semin Oncol*, 1984; 11 (suppl. 2): 486-492.
110. Robak T. Hairy-cell leukemia variant: recent view on diagnosis, biology and treatment. *Cancer Treat Rev*, 2011; 37: 3-10.
111. Matutes E, Wotherspoon A, Brito-Babapulle V, et al. The natural history and clinico-pathological features of the variant form of hairy cell leukemia. *Leukemia*, 2001; 15: 184-186.
112. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. The variant form of hairy-cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2003; 16: 41-56.
113. Matutes E, Martínez-Trillos A, Campo E. Hairy cell leukaemia-variant: disease features and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2015; 28: 253-263.
114. Shao H, Calvo KR, Grönborg M, et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res*, 2013; 37: 401-409.
115. Hockley SL, Morgan GJ, Leone PE, et al. High-resolution genomic profiling in hairy cell leukemia-variant compared with typical hairy cell leukemia. *Leukemia*, 2011; 25: 1189-1192.
116. Waterfall JJ, Arons E, Walker RL, et al. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias. *Nat Genet*, 2014; 46: 8-10.
117. Mason EF, Brown RD, Szeto DP, et al. Detection of activating MAP2K1 mutations in atypical hairy cell leukemia and hairy cell leukemia variant. *Leuk Lymphoma*, 2017; 58: 233-236.
118. Piris MA, Foucar K, Mollejo M, et al. Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of

- Haematopoietic and Lymphoid tissues (ed 4th revised). Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017: 229-231.
119. Beeram M, Patnaik A, Rowinski EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 6771-6790.
 120. Weinberg RA. The biology of cancer (ed 2nd). New York: Garland Sciences; 2014.
 121. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG, et al. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 1998; 74: 49-139.
 122. Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, et al. Regulating the regulator: post-translational modifications of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011; 13: 39-51.
 123. Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, 1998; 17: 1447-1455.
 124. Kerkhoff E, Rapp UR. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*, 1998; 17: 1457-1462.
 125. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002; 417: 949-954.
 126. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta*, 2003; 1653: 25-40.
 127. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 2004; 116: 855-867.
 128. Tiacci E, Schiavoni G, Martelli MP, et al. Constant activation of the RAF-MEK-ERK pathway as a diagnostic and therapeutic target in hairy cell leukemia. *Haematologica*, 2013; 98: 635-639.
 129. Falini B, Martelli MP, Tiacci E. BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia: from bench to bedside. *Blood*, 2016; 128: 1918-1927.
 130. Pollock PM, Meltzer PS. A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. *Cancer Cell*, 2002; 2: 5-7.

131. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88: 5399-5404.
132. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signalling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 2003; 63: 1454-1457.
133. Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 95: 625-627.
134. Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2003; 52: 706-712.
135. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 2002; 418: 934.
136. Sommerer F, Vieth M, Markwarth A, et al. Mutations of BRAF and KRAS2 in the development of Barrett's adenocarcinoma. *Oncogene*, 2004; 23: 554-558.
137. Lee JW, Soung YH, Park WS, et al. BRAF mutations in acute leukemias. *Leukemia*, 2004; 18: 170-172.
138. Cohen MS, Hussain HB, Moley JF. Inhibition of medullary thyroid carcinoma cell proliferation and RET phosphorylation by tyrosine kinase inhibitors. *Surgery*, 2002; 132: 960-967.
139. Weber A, Langhanki L, Sommerer F, et al. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene*, 2003; 22: 4757-4759.
140. Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, 2002; 62: 6997-7000.
141. Lee SH, Lee JW, Soung YH, et al. BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene*, 2003; 22: 6942-6945.

142. Singer G, Oldt R III, Cohen Y, et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 95: 484-486.
143. Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolny F, et al. Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2003; 90: 378-381.
144. Lee JW, Yoo NJ, Soung YH, et al. BRAF mutations in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*, 2003; 89: 1958-1960.
145. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, et al. Recurrent *BRAF* mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*, 2010; 116: 1919-1923.
146. Berres ML, Merad M, Allen CE. Progress in understanding the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis: back to Histiocytosis X? *Br J Haematol*, 2015; 169: 3-13.
147. Haroche J, Charlotte F, Arnaud L, et al: High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood*, 2012; 120: 2700-2703.
148. Emile JF, Charlotte F, Amoura Z, et al: BRAF mutations in Erdheim-Chester disease. *J Clin Oncol*, 2013; 31: 398.
149. Cangi MG, Biavasco R, Cavalli G, et al: BRAFV600E-mutation is invariably present and associated to oncogene-induced senescence in Erdheim-Chester disease. *Ann Rheum Dis*, 2015; 74: 1596-1602.
150. Bollag G, Hirth P, Tsai J, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, 2010; 467: 596-599.
151. Yang H, Higgins B, Kolinski K, et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res*, 2010; 70: 5518-5527.
152. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 2010; 363: 809-819.
153. Ribas A, Kim KB, Schuchter LM, et al. BRIM-2: an open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated

- patients with BRAF V600E mutation-positive metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 2011 suppl.; 29: abstr 8509.
154. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 2011; 364: 2507-2516.
 155. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, et al. Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the *BRAF* V600E mutation. *Blood*, 2013; 121: 1495-1500.
 156. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, et al. Reproducible and sustained efficacy of targeted therapy with vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-mutated Erdheim-Chester disease. *J Clin Oncol*, 2015; 33: 411-418.
 157. Gandolfi L, Adamo S, Pileri A, et al. Multisystemic and multiresistant Langerhans cell histiocytosis: a case treated with BRAF inhibitor. *J Natl Compr Canc Netw*, 2015; 13: 715-718.
 158. Comin-Anduix B, Chodon T, Sazegar H, et al. The oncogenic BRAF kinase inhibitor PLX4032/RG7204 does not affect the viability or function of human lymphocytes across a wide range of concentrations. *Clin Cancer Res*, 2010; 16: 6040-6048.
 159. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, et al. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*, 2012; 366: 2038-2040.
 160. Follows GA, Sims H, Bloxham DM, et al. Rapid response of biallelic BRAF V600E mutated hairy cell leukaemia to low dose vemurafenib. *Br J Haematol*, 2013; 161: 150-153.
 161. Munoz J, Schlette E, Kurzrock R. Rapid response to vemurafenib in a heavily pretreated patient with hairy cell leukemia and a BRAF mutation. *J Clin Oncol*, 2013; 31: e351-352.
 162. Peyrade F, Ré D, Ginet C, et al. Low-dose vemurafenib induces complete remission in a case of hairy-cell leukemia with a V600E mutation. *Haematologica*, 2013; 98: e20-22.
 163. Samuel J, Macip S, Dyer MJS. Efficacy of vemurafenib in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*, 2014; 370: 286-288.

164. Dietrich S, Hüllelin J, Hundemer M, et al. Continued response off treatment after BRAF inhibition in refractory hairy cell leukemia. *J Clin Oncol* 2013; 31: e300-303.
165. Foucar K, Falini B, Catovski D, et al. Hairy cell leukaemia. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid tissues (ed 4th). Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008: 188-190.
166. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), version 3.0, Cancer therapy evaluation program, DCTD, NCI, NIH, DHHS, 2006.
167. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med*, 2013; 19: 1401-1409.
168. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*, 2012; 367: 107-114.
169. Catalanotti F, Solit DB, Pulitzer MP, et al. Phase II trial of MEK inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with BRAFV600E/K-mutated melanoma. *Clin Cancer Res*, 2013; 19: 2257-2264.
170. Dietrich S, Pircher A, Endris V, et al. BRAF inhibition in hairy cell leukemia with low-dose vemurafenib. *Blood*, 2016; 127: 2847-2855.
171. Chihara D, Kantarjian H, O'Brien S, et al. Long-term durable remission by cladribine followed by rituximab in patients with hairy cell leukaemia: update of a phase II trial. *Br J Haematol*, 2016; 174: 760-766.
172. Burotto M, Stetler-Stevenson M, Arons E, et al. Bendamustine and rituximab in relapsed and refractory hairy cell leukemia. *Clin Cancer Res*, 2013; 19: 6313-6321.
173. Grever M, Abdel-Wahab O, Andritsos LA, et al. Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with classic hairy cell leukemia. *Blood*, 2017; 129: 553-560.

174. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600E mutations. *N Engl J Med*, 2012; 367: 1694-1703.
175. Sarvaria A, Topp Z, Saven A. Current therapy and new directions in the treatment of hairy cell leukemia. *JAMA Oncol*, 2016; 2: 123-129.
176. Sivina M, Kreitman RJ, Arons E, et al. The bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) blocks hairy cell leukaemia survival, proliferation and B cell receptor signalling: a new therapeutic approach. *Br J Haematol*, 2014; 166: 177-188.