



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"MEDICINA MOLECOLARE"**

CICLO XXXIII

COORDINATORE Prof. Di Virgilio Francesco

**IL RUOLO DEL CARIOTIPO COMPLESSO NELLA
STRATIFICAZIONE PROGNOSTICA DELLA
LEUCEMIA LINFATICA CRONICA**

Settore Scientifico Disciplinare MED/15

Dottorando

Dott. Cavallari Maurizio

Tutore

Prof. Cuneo Antonio

Anni 2017/2020

INDICE

INTRODUZIONE	7
PARTE PRIMA	
LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: ASPETTI CLINICO-BIOLOGICI, LO STATO DELL'ARTE	8
1.1 DEFINIZIONE E NOTE EPIDEMIOLOGICHE	9
1.2 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO	9
1.3 PATOGENESI	10
1.3.1 La cellula d'origine	10
1.3.2 Microambiente	12
1.3.3 Alterazioni genetiche ricorrenti	13
1.3.3.1 Iperespressione di BCL2 e delezione 13q14	13
1.3.3.2 Mutazione di TP53 e delezione 17p13 (aberrazioni di TP53)	13
1.3.3.3 Inattivazione di ATM e delezione 11q22-23	14
1.3.3.4 Attivazione della via di segnale di NOTCH1	14
1.3.3.5 Trisomia 12	15
1.3.3.6 Alterazione dei meccanismi di splicing	16
1.3.3.7 Attivazione della via di NF-kB	16
1.3.3.8 Alterazioni epigenetiche	17
1.3.3.9 Telomeri	17
1.4 STORIA NATURALE	17
1.4.1 Linfocitosi B monoclonale tipo LLC	18
1.4.2 Sindrome di Richter	18
1.5 MANIFESTAZIONI CLINICHE	19
1.6 DIAGNOSI	20
1.7 PROGNOSI	21
1.7.1 Marcatori prognostici clinici	22
1.7.1.1 Stadio di malattia	22
1.7.1.2 Età e sesso	23
1.7.2 Marcatori prognostici citofluorimetrici	23
1.7.2.1 CD38	23
1.7.2.2 ZAP-70	23
1.7.2.3 CD49d	23
1.7.3 Marcatori prognostici laboratoristici	24
1.7.3.1 Tempo di raddoppiamento linfocitario	24
1.7.3.2 Lattico deidrogenasi (LDH)	24
1.7.3.3 b2-microglobulina	24
1.7.3.4 Timidin chinasi (TK)	24
1.7.4 Marcatori prognostici citogenetici	24
1.7.4.1 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	24
1.7.5 Marcatori prognostici genetico – molecolari	25
1.7.5.1 Stato mutazionale IGHV	25
1.7.5.2 Mutazioni di TP53	25
1.7.5.3 Attività telomerasica e lunghezza dei telomeri	26
1.7.5.4 Mutazioni di NOTCH1 e SF3B1	26
1.7.5.5 MicroRNA	26
1.7.6 International Prognostic Index (CLL-IPI)	26
PARTE SECONDA	
IL RUOLO DEL CARIOTIPO COMPLESSO	28
2.0 INTRODUZIONE: IL CARIOTIPO COMPLESSO NELLA LLC	29

2.1 CONTRIBUTO SPERIMENTALE: In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI (Allegato 1)	
2.1.1 Razionale dello studio	32
2.1.2 Pazienti e metodi	32
2.1.3 Risultati	33
2.1.4 Discussione	35
2.1.5 Conclusioni	36
2.2 REVISIONE DELLA LETTERATURA: Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia (Allegato 2)	
2.2.1 Razionale dello studio	37
2.2.2 Metodi	37
2.2.3 Risultati	38
2.2.3.1 Il CK come conseguenza della instabilità genomica	38
2.2.3.2 Il CK è più frequente nelle LLC con caratteristiche clinico-biologiche sfavorevoli	39
2.2.3.3 Il CK è un forte fattore di rischio avverso nell'epoca della chemioimmunoterapia	43
2.2.3.4 Il CK è un fattore prognostico negativo nelle LLC ad alto rischio	45
2.2.3.5 Il CK può rappresentare un marcatore prognostico sfavorevole nell'era della target therapy	46
2.2.3.6 Cariotipo complesso e Sindrome di Richter	48
2.2.4 Prospettive	48
2.2.5 Nuove metodiche di identificazione della complessità cromosomica	49
2.3 CONTRIBUTO SPERIMENTALE: In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics (Allegato 3)	
2.3.1 Razionale dello studio	50
2.3.2 Materiali e Metodi	50
2.3.2.1 Pazienti	50
2.3.2.2 Analisi citogenetica	50
2.3.2.3 Stato mutazionale IGHV e analisi di gene expression profile (GEP)	50
2.3.2.4 Analisi statistica	51
2.3.3 Risultati	51
2.3.3.1 Pazienti ed outcome	51
2.3.3.2 Gene expression profiling (GEP)	52
2.3.4 Discussione	52
2.3.5 Conclusioni	54
2.4 CONTRIBUTO SPERIMENTALE: Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact	
2.4.1 Razionale dello studio	55
2.4.2 Pazienti e Metodi	55
2.4.2.1 Pazienti	55
2.4.2.2 Analisi citogenetica	55
2.4.2.3 Analisi immunogenetica	56
2.4.2.4 Analisi dello stato mutazionale di TP53	56
2.4.2.5 Analisi statistica	56
2.4.3 Risultati	57
2.4.3.1 CK nella LLC: caratteristiche principali ed associazioni	57
2.4.3.2 Il cariotipo complesso non è sempre sfavorevole: il caso delle LLC +12, +19	58
2.4.3.3 Non tutti i CK sono uguali: alta complessità e bassa complessità	59
2.4.3.4 CK, aberrazioni di TP53 e stato mutazionale IGHV: un modello integrato	63
2.4.4 Discussione	63
2.4.5 Conclusioni	65

2.5 CONTRIBUTO SPERIMENTALE: The combination of complex karyotype subtypes and IGHV mutational status identifies new prognostic and predictive groups in chronic lymphocytic leukaemia (Allegato 4)	
2.5.1 Razionale dello studio	67
2.5.2 Metodi	67
2.5.2.1 Disegno dello studio	67
2.5.2.2 Analisi del cariotipo	67
2.5.2.3 Stato mutazionale IGHV	68
2.5.2.4 Citogenetica mediante FISH e mutazioni di TP53	68
2.5.2.5 Trattamento	68
2.5.2.6 Analisi statistica	68
2.5.3 Risultati	69
2.5.3.1 Caratteristiche dei pazienti	69
2.5.3.2 L'impatto prognostico dei sottotipi di CK e la combinazione con lo stato mutazionale IGHV	70
2.5.3.3 Impatto predittivo del CK e la combinazione allo stato mutazionale IGHV	72
2.5.4 Discussione	73
2.5.5 Conclusioni	75
2.6 CONTRIBUTO SPERIMENTALE: In chronic lymphocytic leukaemia, SLAMF1 deregulation is associated with genomic complexity and independently predicts a worse outcome (Allegato 5)	
2.6.1 Razionale dello studio	77
2.6.2 Pazienti e metodi	77
2.6.2.1 Pazienti	77
2.6.2.2 Studi biologici	78
2.6.2.3 SLAMF1 e droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)	78
2.6.2.4 Analisi statistica	78
2.6.3 Risultati	79
2.6.4 Discussione	81
2.6.5 Conclusioni	82
2.7 CONCLUSIONI	83
PARTE TERZA	
LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: IL TRATTAMENTO	84
3.1 CONSIDERAZIONI PRELIMINARI E INDICAZIONE AL TRATTAMENTO	85
3.2 TRATTAMENTO	86
3.2.1 Terapia di prima linea	87
3.2.1.1 Terapia di prima linea in assenza di aberrazioni di TP53	87
3.2.1.2 Terapia di prima linea in presenza di aberrazioni di TP53	88
3.2.2 Terapia del paziente recidivato o refrattario	90
3.2.3 Resistenza, progressione e sequenza di trattamento	91
3.2.4 Risposta al trattamento	93
3.2.5 Nuove strategie terapeutiche	93
3.3 CONTRIBUTO SPERIMENTALE: Efficacy of bendamustine and rituximab in unfit patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia. Indirect comparison with ibrutinib in a real-world setting. A GIMEMAERIC and US study (Allegato 6)	
3.3.1 Razionale dello studio	96
3.3.2 Metodi	96
3.3.2.1 Pazienti	96
3.3.2.2 BR nei pazienti unfit	97
3.3.2.3 Confronto indiretto con ibrutinib	97
3.3.2.4 Analisi statistica	97

3.3.3 Risultati	97
3.3.3.1 Trattamento con BR nei pazienti unfit	97
3.3.3.2 Efficacia	98
3.3.3.3 Sicurezza	99
3.3.3.4 Confronto tra BR del dataset GIMEMA/ERIC e ibrutinib del dataset statunitense	101
3.3.4 Discussione	103
3.3.5 Conclusioni	105
Bibliografia	106
ALLEGATI: Pubblicazioni scientifiche	122
Allegato 1. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, Formigaro L, Lista E, Urso A, Guardalben E, Liberatore C, Faraci D, Saccenti E, Bassi C, Lupini L, Bardi MA, Volta E, Tammiso E, Melandri A, Negrini M, Cavazzini F, Cuneo A. <i>Blood</i> . 2017; 129:3495-3498.	
Allegato 2. Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia. Cavallari M, Cavazzini F, Bardi A, Volta E, Melandri A, Tammiso E, Saccenti E, Lista E, Quaglia FM, Urso A, Laudisi M, Menotti E, Formigaro L, Dabusti M, Ciccone M, Tomasi P, Negrini M, Cuneo A, Rigolin GM. <i>Oncotarget</i> . 2018;9:34398-34412.	
Allegato 3. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. Rigolin GM, Saccenti E, Guardalben E, Cavallari M, Formigaro L, Zagatti B, Visentin A, Mauro FR, Lista E, Bassi C, Lupini L, Quaglia FM, Urso A, Bardi MA, Bonaldi L, Volta E, Tammiso E, Ilari C, Cafforio L, Melandri A, Cavazzini F, Negrini M, Semenzato G, Trentin L, Foà R, Cuneo A. <i>Br J Haematol</i> . 2018;181:229–233.	
Allegato 4. The combination of complex karyotype subtypes and IGHV mutational status identifies new prognostic and predictive groups in chronic lymphocytic leukaemia. Visentin A, Bonaldi L, Rigolin GM, Mauro FR, Martines A, Frezzato F, Imbergamo S, Scmazzone E, Pravato S, Bardi MA, Cavallari M, Volta E, Cavazzini F, Nanni M, Del Giudice I, Facco M, Guarini A, Semenzato G, Robin Foà, Cuneo A, Trentin L. <i>Br J Canc</i> . 2019; 121:150–156.	
Allegato 5. In chronic lymphocytic leukaemia, SLAMF1 deregulation is associated with genomic complexity and independently predicts a worse outcome. Rigolin GM, Saccenti E, Melandri A, Cavallari M, Urso A, Rotondo F, Betulla A, Tognolo L, Bardi MA, Rossini M, Tammiso E, Bassi C, Cavazzini F, Negrini M, Cuneo A. <i>Br J Haematol</i> . 2020 Jun 24. Online ahead of print.	
Allegato 6. Efficacy of bendamustine and rituximab in unfit patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia. Indirect comparison with ibrutinib in a real-world setting. A GIMEMA-ERIC and US study. Cuneo A, Mato AR, Rigolin GM, Piciocchi A, Gentile M, Laurenti L, Allan JN, Pagel JM, Brander DM, Hill BT, Winter A, Lamanna N, Tam CS, Jacobs R, Lansigan F, Barr PM, Shadman M, Skarbnik AP, Pu JJ, Sehgal AR, Schuster SJ, Shah NN, Ujjani CS, Roeker L, Orlandi EM, Billio A, Trentin L, Spacek M, Marchetti M, Tedeschi A, Ilariucci F, Gaidano G, Doubek M, Farina L, Molica S, Di Raimondo F, Coscia M, Mauro FR, de la Serna J, Medina Perez A, Ferrarini I, Cimino G, Cavallari M, Cucci R, Vignetti M, Foà R, Ghia P, the GIMEMA, European Research Initiative (ERIC) on CLL, US study group. <i>Cancer Med</i> . 2020;9:8468-8479.	

INTRODUZIONE

La leucemia linfatica cronica (LLC) è la più comune forma leucemica della popolazione occidentale (NCI, 2020). Si tratta di una patologia dalle caratteristiche biologiche eterogenee, che ne rendono il decorso clinico altamente variabile con quadri che spaziano dalla asintomaticità a un decorso rapidamente progressivo. La prognosi di questa malattia ha subito un notevole miglioramento nell'ultimo lustro, a seguito dell'introduzione di farmaci mirati (*target therapy*), estremamente efficaci, che hanno permesso di raggiungere una sopravvivenza a 5 anni dell'86% (SEER, 2020). Alla luce di questo notevole incremento della sopravvivenza, è molto rilevante l'identificazione di marcatori prognostici e predittivi che permettano un'adeguata stratificazione del rischio dei pazienti e che portino alla migliore scelta terapeutica. Sono stati identificati numerosi parametri clinico-biologici con valenza prognostica in grado di stimare la sopravvivenza globale (*overall survival – OS*), il tempo al primo trattamento (*time to first treatment – TTFT*) e la sopravvivenza libera da progressione (*progression free survival – PFS*), altri invece sono stati riconosciuti quali parametri predittivi, in quanto sono in grado di prevedere la risposta ad uno specifico trattamento.

La definizione di questi parametri assume un significato sempre più importante, al fine di definire un trattamento il più possibile personalizzato (*patient tailored treatment*), con l'obiettivo di ottenere i migliori risultati in termini di *outcome*.

Proprio queste osservazioni hanno rappresentato il *primum movens* per sviluppare la linea di ricerca del mio dottorato nel corso di questo triennio (2017-2020), con particolare interesse alle caratteristiche citogenetiche dei pazienti affetti da LLC, forte dell'*expertise* del nostro centro su questa metodica, e della possibilità di avvalerci di prestigiose collaborazioni con altri centri ematologici italiani, attraverso il Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto (GIMEMA), ed europei, con il gruppo ERIC (European Research Initiative on CLL).

Nella prima parte della mia tesi verrà presentata brevemente la patologia, quindi verranno presentati gli studi prodotti durante il mio corso di studio.

PARTE PRIMA

LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: ASPETTI CLINICO-BIOLOGICI

LO STATO DELL'ARTE

1.1 DEFINIZIONE E NOTE EPIDEMIOLOGICHE

La LLC è una neoplasia a cellule B mature caratterizzata dalla presenza nel sangue periferico e negli organi linfoidei di piccoli linfociti B clonali CD5 e CD23 positivi (Swerdlow, 2016). È considerata un'unica entità clinica con il linfoma linfocitico, che ne rappresenta la controparte nodale. Costituisce circa l'1% di tutte le neoplasie e il 38% delle leucemie dell'adulto, rappresentando la forma leucemica più comune in occidente (NCI, 2020), mentre è piuttosto rara nelle etnie orientali ed afro-americane (Figura 1.1). La malattia prevale nel sesso maschile, con un rapporto di 1.5:1, e l'età mediana alla diagnosi è di 70 anni. Risulta piuttosto infrequente al di sotto dei 50 anni e virtualmente assente nei bambini (Figura 1.1). L'incidenza globale è di 5 nuovi casi ogni 100.000 abitanti l'anno e la mortalità è di 1.2/100.000 abitanti con una aspettativa di vita globale a 5 anni dell'86% (SEER, 2020).

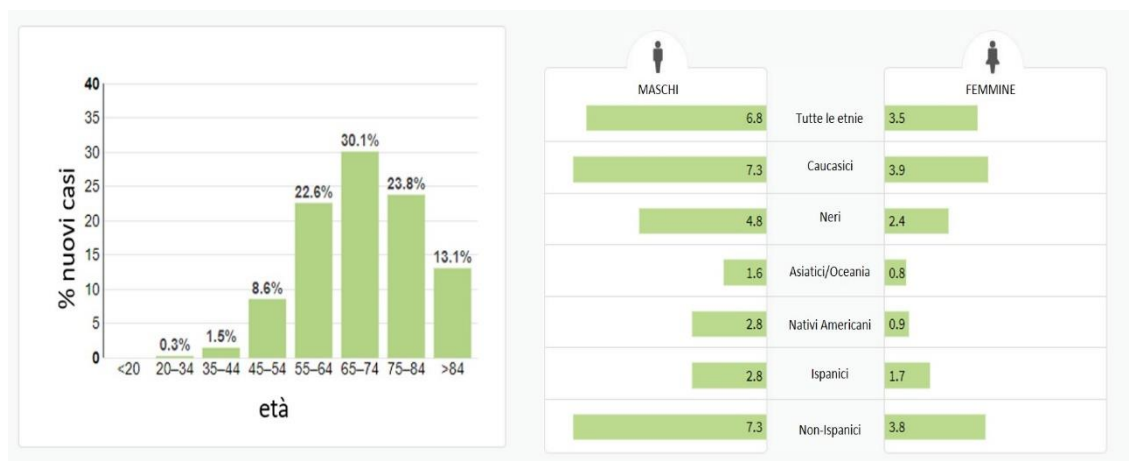


Figura 1.1 Distribuzione dei nuovi casi di LLC per gruppi di età (sinistra) e incidenza per 100.000 abitanti per razza/etnia e sesso (destra) negli USA. Dati da <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>

1.2 EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

Nella LLC non esiste un vero e proprio agente eziologico, mentre sono stati identificati dei fattori di rischio che predispongono allo sviluppo della malattia. La differenza di incidenza tra la popolazione occidentale e quella orientale, e il mantenimento di questa differenza dopo migrazione geografica, ha permesso di identificare una *predisposizione genetica* alla malattia. Nonostante la LLC sia una malattia sporadica, fino al 10% dei pazienti presenta familiari di primo grado affetti da malattie ematologiche, per cui la *familiarità* è considerata un fattore di rischio (Goldin, 2004). Ad oggi non sono stati identificati geni predisponenti lo sviluppo della malattia, tuttavia studi di associazione genome-wide (GWAS) hanno

identificato vari polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) di suscettibilità (es. *DAPK1*, *IRF4*), ciascuno dei quali caratterizzato da un modesto potenziale leucemogeno (Raval, 2007; Crowther-Swanapoel, 2010; Slager, 2010; Berndt, 2013; Speedy, 2014). Numerosi agenti ambientali sono stati oggetto di studio quali potenziali agenti eziologici della LLC (es. insetticidi, solventi, radiazioni ionizzanti, infezioni virali), tuttavia nessuno di questi ha mostrato correlazioni significative con lo sviluppo della malattia (Kipps, 2017).

1.3 PATOGENESI

La LLC è una malattia dinamica che si sviluppa come conseguenza di complessi eventi biologici e genetici. La sequenza di eventi leucemogeni vedrebbe inizialmente l'interazione del linfocita con l'antigene, quindi uno stato di attivazione cellulare, conseguenti alterazioni genetiche e interazioni microambientali che determinano selezione e sostentamento clonale. La sequenza leucemogena non seguirebbe sempre esattamente lo stesso percorso, per cui la malattia che ne deriverà potrà presentare caratteristiche biologiche e decorso clinico variabili.

1.3.1 La cellula d'origine

La cellula di origine della LLC è ancora oggi oggetto di discussione, non essendo chiaramente riconoscibile una controparte normale. Le caratteristiche immunofenotipiche la riconducono ad un linfocita B per la presenza in superficie di immunoglobuline (sIg), CD19 e CD20 associati a CD23, CD5 e CD200. Grazie agli studi sullo stato mutazionale della porzione variabile della catena pesante delle immunoglobuline (IGHV) sono state identificate due forme di cellula leucemica: la non mutata (IGHV-U) e la mutata (IGHV-M), in relazione all'omologia di sequenza rispetto alla germinale (rispettivamente maggiore o minore del 98%) (Chiorazzi, 2005). Studi di *gene expression profiling* (GEP) hanno trovato una corrispondenza tra le cellule leucemiche e le cellule B memoria CD27+, indipendentemente dallo stato mutazionale IGHV (Klein, 2001). Queste cellule B memoria esisterebbero sia in forma mutata che non mutata, come succede nella LLC, a seconda di un'attivazione T-dipendente o T-indipendente (Fabbri, 2016). Nonostante quanto riportato, attualmente l'ipotesi più accreditata ricondurrebbe le forme IGHV-M ad una cellula B memoria post-centro germinativo CD5+CD27+, mentre le forme IGHV-U sarebbero da ricondurre ad una cellula B naïve CD5+CD27- sulla scorta di dati provenienti da approfondimenti nei profili di espressione genica (Seifert, 2012) (Figura 1.2). La

stimolazione antigenica svolgerebbe inoltre un ruolo importante nella patogenesi della malattia, infatti sia forme IGHV-M che forme IGHV-U presentano un repertorio immunoglobulinico ristretto (Agathangelidis, 2012; Vardi, 2014) e circa un 30% dei pazienti (soprattutto IGHV-U) mostra una stereotipia recettoriale, ovvero l'uso preferenziale di famiglie V, D e J in corso di riarrangiamento somatico (Vardi, 2014; Tobin, 2003). Sono noti oltre 200 differenti subset di BCR stereotipati (Agathangelidis, 2012) con differenti caratteristiche clinico-biologiche (Stamatopoulos, 2017), in particolare le forme IGHV-U presentano tipicamente BCR a bassa affinità, polireattivo o autoreattivo, mentre le forme IGHV-M solitamente esprimono un BCR oligoreattivo o monoreattivo (Agathangelidis, 2012). Da notare che sia le forme IGHV-M, sia le IGHV-U possono presentare attivazione del BCR antigene-indipendente supportando un razionale per l'impiego di farmaci che blocchino la via del segnale del BCR (Dühren-von Minden, 2012).

A complicare la questione sulla cellula di origine, rendendola ancora oggetto di discussione, sono gli studi sulle alterazioni genetiche ed epigenetiche della cellula leucemica. Questi studi hanno infatti identificato la presenza delle stesse lesioni, non solo nelle cellule neoplastiche, ma anche nelle cellule staminali emopoietiche e nei progenitori pluripotenti (Damm, 2014; Kikushige, 2011; Marsilio, 2018). Queste evidenze hanno fatto supporre che la malattia possa aver origine già a livello della cellula staminale emopoietica che differenziandosi genererebbe la cellula leucemica.

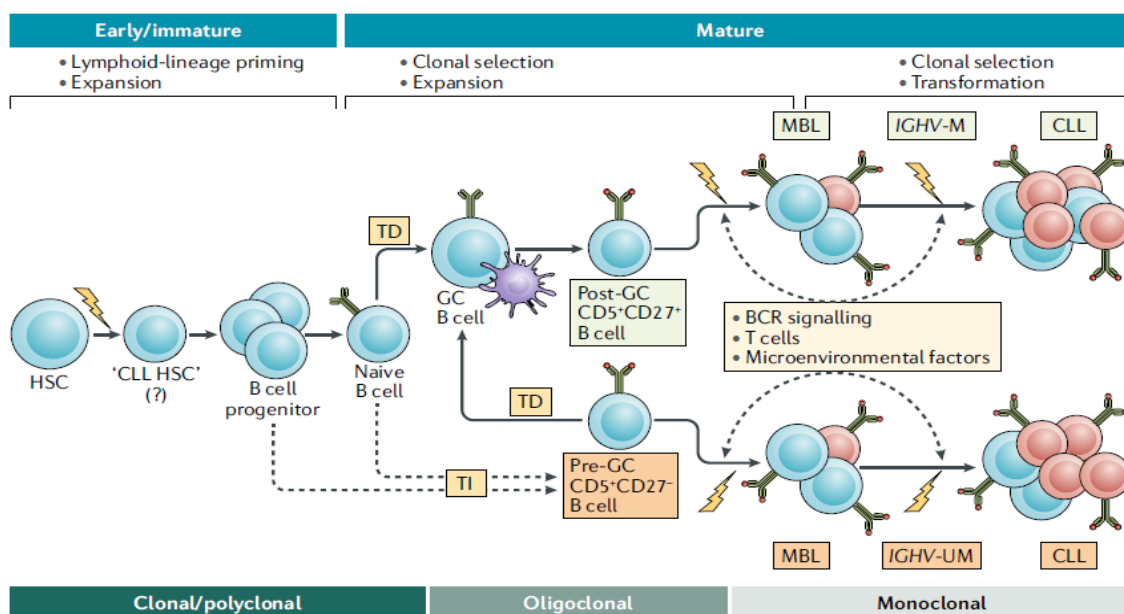


Figura 1.2. Gli eventi genetici ed epigenetici iniziali avverrebbero nella cellula staminale emopoietica (HSC), quindi seguirebbe un'espansione policlonale e poi, grazie alla stimolazione antigenica, oligoclonale. L'evoluzione a linfocitosi B clonale, quindi a LLC sarebbe determinata da anomalie aggiuntive (fulmine), dalla stimolazione del BCR, da fattori microambientali e dalla stimolazione T cellulare. Le freccette tratteggiate indicano un meccanismo ipotetico. TD, antigene T-dipendente; TI, antigene T-indipendente (Bosch, 2019).

1.3.2 Microambiente

Le cellule leucemiche circolanti sono dotate di elevata capacità di sopravvivenza e si trovano prevalentemente in fase G₀ del ciclo cellulare. La loro sopravvivenza dipende dall'interazione con altre cellule, che ne favoriscono crescita e sopravvivenza, in un *microambiente tumorale* (Ten Hacken, 2015). Nella LLC il microambiente tumorale si trova nei *centri di proliferazione*, strutture analoghe ai follicoli linfatici, localizzati a livello nodale e midollare (Stein, 1980), che vanno a costituire il comparto proliferativo leucemico, nonché il potenziale punto di partenza di un'eventuale progressione di malattia (Zenz, 2010a). Nei centri di proliferazione si hanno numerose interazioni cellulari che coinvolgono *cellule stromali midollari, cellule nutrici, cellule follicolari dendritiche, cellule endoteliali e linfociti T*. Ciascuna di queste cellule svolge un ruolo peculiare, finalizzato alla sopravvivenza della cellula leucemica; ad esempio le *cellule nutrici* proteggono le cellule leucemiche dall'apoptosi nel torrente circolatorio, mentre le *cellule midollari stromali* creano "nicchie" di protezione da insulti apoptotici (Fabbri, 2016) (Figura 1.3). Oltre alle interazioni intercellulari, anche l'ambiente extracellulare svolge un ruolo importante, grazie alla presenza di fattori di crescita, proteine e lipidi in grado di stimolare la proliferazione cellulare. Lo studio delle complesse interazioni microambientali sono ancora in corso, e non sono ancora compresi completamente i meccanismi che portano la cellula leucemica a richiamare a sé questo corteo cellulare.

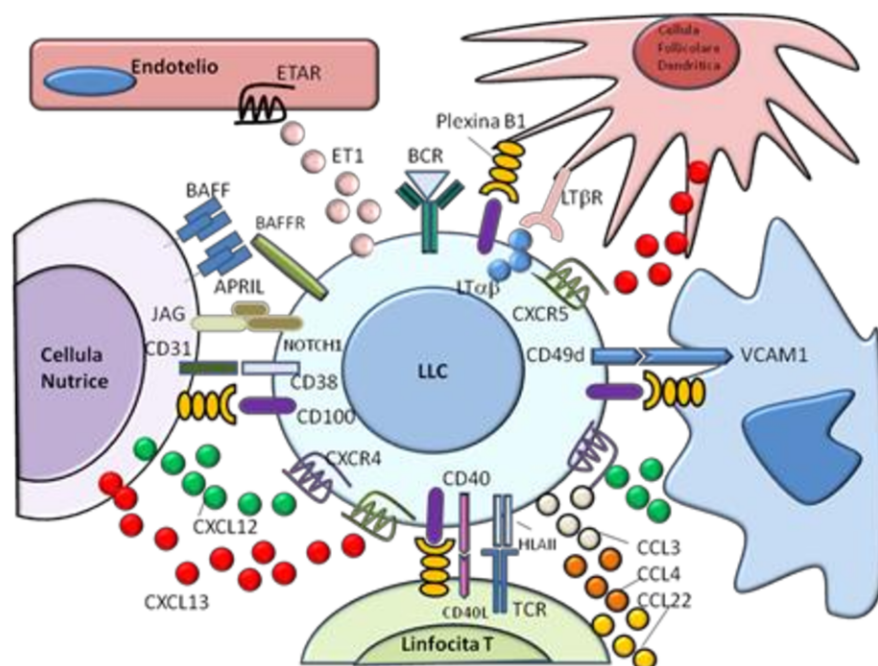


Figura 1.3. Le complesse interazioni microambientali creano una "nicchia" di protezione e sostentamento alla cellula LLC (modificata da Fabbri et al, 2016).

1.3.3 Alterazioni genetiche ricorrenti

I pazienti affetti da LLC presentano un carico mutazionale simile a quello riscontrato in altre forme leucemiche, ma inferiore rispetto alle neoplasie di origine epiteliale (Vogelstein, 2013; Alexandrov, 2013). Oltre l'80% dei pazienti presenta anomalie cromosomiche, mentre a livello genetico sono state rilevate circa 0.9 mutazioni per megabase (10-30 eventi non silenti per ogni caso), rappresentate soprattutto da mutazioni puntiformi (Puente, 2015; Fabbri, 2011; Landau, 2015).

I geni driver riconosciuti nella LLC sono pochi, mentre si trova un numero significativo di geni (oltre 50) variabilmente mutati e spesso coinvolti in *pathways* molto comuni. Le mutazioni più frequenti coinvolgono geni regolatori dell'apoptosi, altre invece riguardano geni implicati nella sintesi degli acidi nucleici, nel rimodellamento cromatinico o nel processo di trascrizione. Infine sono comunemente coinvolti geni che alterano i *pathways* di *NOTCH1*, *NF-kB* e l'attivazione del B-cell receptor (BCR).

1.3.3.1 Iperespressione di BCL2 e delezione 13q14. La più comune lesione genetica della LLC è la delezione del braccio lungo del cromosoma 13 (*del13q14*), presente nel 50-60% dei pazienti (Döhner, 2000). Si tratta di una delezione monoallelica nell'80% dei casi, solitamente riscontrabile in forme IGHV-M e spesso la sola aberrazione cromosomica presente, suggerendo un potenziale ruolo driver (Landau, 2015; Klein, 2010). La *del13q14* contiene i loci *DLEU1* e *DLEU2*, che codificano per lunghi RNA non codificanti; il cluster di microRNA *MIR15A-MIR16-1* e il gene *DLEU7*, che codifica per un regolatore di *NF-kB* (Edelmann, 2012; Migliazza, 2001; Palamarchuk, 2010). Il ruolo patogenetico della *del13q14* sarebbe riconducibile alla delezione dei *MIR15A-MIR16-1*, che fisiologicamente modulano l'espressione del gene anti-apoptotico *BCL2* (Cimmino, 2005) e di geni coinvolti nella transizione G0-G1-S del ciclo cellulare (ad esempio inducendo l'attivazione delle cicline *CCDN2* e *CCDN3*) (Klein, 2010). Studi murini hanno dimostrato che la delezione del locus *MIR15A-MIR16-1*, sarebbe sufficiente da sola a generare la LLC (Klein, 2010; Lia, 2012). La *del13q14* si associa spesso ad una buona prognosi, anche se le forme associate a perdita del gene oncosoppressore RB1 (circa il 20% dei casi) presentano una prognosi meno favorevole (Ouillet, 2011a; Dal Bo, 2011).

1.3.3.2 Mutazione di TP53 e delezione 17p13 (aberrazioni di TP53). Le aberrazioni di *TP53* sono presenti in entità variabile a seconda del momento della storia clinica della malattia,

variando dell'1% delle linfocitosi B monoclonali (MBL) CLL-like sino al 20% delle forme resistenti alla chemioterapia (Dohner 1995; Puente 2015; Stilgenbauer, 2014; Zenz, 2009; Zenz, 2010a). Possono essere la conseguenza di una delezione del braccio corto del cromosoma 17 (*del17p13*), che coinvolge il gene *TP53*, o di una mutazione puntiforme del gene stesso. Le mutazioni a carico di *TP53* sono tipicamente missenso e coinvolgono prevalentemente il dominio di legame al DNA e nell'80% dei casi sono associate a *del17p13* (Zenz, 2008; Gonzalez 2011; Rossi, 2014; Trbusek, 2011). La presenza di anomalie della via di *TP53* sono alla base dell'instabilità genetica e della conseguente complessità genomica (Stilgenbauer, 2014; Haferlach, 2007; Herling, 2016). Le implicazioni prognostiche sfavorevoli delle aberrazioni di *TP53* sono determinate dalla aumentata resistenza all'apoptosi e dalla conseguente chemioresistenza. Ad esse è stata attribuita una valenza prognostico-predittiva sfavorevole in termini di TTFT, PFS ed OS (Rossi, 2013; Puente, 2015; Döhner, 2000; Zenz, 2010b), pertanto le aberrazioni di *TP53* sono considerate il principale fattore determinante la scelta terapeutica nel paziente affetto da LLC (vedi oltre).

1.3.3.3 Inattivazione di ATM e delezione 11q22-23. Il gene *ATM* (*ataxia-teleangectasia mutated*) è responsabile dell'attivazione per fosforilazione di p53 a seguito di un insulto genotossico. La sua inattivazione si riscontra nel 10-20% dei casi di LLC come conseguenza di una mutazione del gene o di una delezione del braccio lungo del cromosoma 11 (*del11q22-23*) (Döhner, 2000). La perdita di funzione di *ATM* si ripercuote in una mancata attivazione di p53 con conseguente alterazione del processo apoptotico e sviluppo di instabilità genomica (Austen, 2007, Stankovic, 2014). Si tratta di un'anomalia associata a malattia con prevalente espressione nodale, casi con stato IGHV-U e tipicamente in soggetti più giovani (Wang, 2011, Döhner, 2000; Austen, 2007). La *del11q22-23* è prevalentemente monoallelica, ma in un 30% dei casi si associa a mutazione di *ATM* nell'altro allele; inoltre una quota di pazienti può presentare mutazione di *ATM* in assenza di anomalie citogenetiche (Austen, 2007; Skowronska, 2012). È stato inoltre osservato che in alcuni casi di *del11q22-23* non c'è coinvolgimento di *ATM*, ma interessamento del gene *BIRC3* (*baculoviral IAP repeat containing 3*), un regolatore negativo della via di NF-κB (Rossi, 2012a). Circa un terzo dei casi di LLC con *del11q22-23* si associa a concomitante mutazione di *SF3B1*, con impatto prognostico peggiorativo (Wang, 2011; Rossi, 2011a).

1.3.3.4 Attivazione della via di segnale di NOTCH1. Mutazioni del gene *NOTCH1* sono presenti in circa il 10% dei pazienti alla diagnosi, soprattutto nelle forme IGHV-U (Puente,

2015; Rossi, 2013; Baliakas, 2015), e fino al 30% delle forme chemiorefrattarie (Fabbri, 2011; Nabhan, 2015). Circa la metà dei pazienti con queste alterazioni presentano anche *trisomia 12*, le cui relazioni funzionali non sono ancora note (Puente, 2015; Fabbri, 2011; Del Giudice, 2012). *NOTCH1* codifica per un recettore transmembrana, che in risposta al legame col proprio ligando, libera la sua porzione intracellulare ICN1, transattivando geni coinvolti in meccanismi di proliferazione e di sopravvivenza (incluso *MYC*) (Kopan, 2009; Guruharsha, 2012). Le mutazioni di *NOTCH1* provocano la perdita del dominio PEST di ICN1 (Puente, 2015), rendendolo insensibile alla ubiquitinazione mediata da *FBXW7* (F-box an WD repeat containing protein 7) e quindi alla successiva degradazione proteasomica (Kopan, 2009), con conseguente aumento della sua via di segnale (Rossi, 2012b). In circa il 2-5% dei pazienti si trovano invece mutazioni inattivanti il gene *FBXW7* con analoghe conseguenze sul segnale di *NOTCH1* (Jeromin, 2014). Le mutazioni di *FBXW7* si associano anch'esse frequentemente a *trisomia 12*, mentre sono rare nei pazienti con *del13q14* e sono mutualmente esclusive nei confronti delle mutazioni di *NOTCH1* e *SF3B1* (Puente, 2015; Fabbri, 2011; O'Neil, 2007). Il ruolo patogenetico della via di segnale di *NOTCH1* nella LLC potrebbe non essere limitato ai pazienti con le mutazioni descritte, infatti questa via è amplificata anche in molti pazienti che non presentano mutazioni di *NOTCH1* o di *FBXW7*, pertanto si sta affermando l'idea che questa via giochi un ruolo cruciale nella patogenesi della LLC (Fabbri, 2017; Bosch 2019). Infine la mutazione di *NOTCH1* è associata ad una scarsa espressione superficiale del CD20, con conseguente minore sensibilità di queste forme agli anticorpi monoclonali anti-CD20 (Pozzo, 2016; Stilgenbauer, 2014).

1.3.3.5 Trisomia 12. La trisomia del cromosoma 12 (+12) si riscontra nel 15% dei pazienti alla diagnosi (Döhner, 2000). Questa anomalia prevale nelle LLC atipiche e nel linfoma linfocitico e il suo significato patogenetico non è ancora noto. Poiché nel locus *12q13-15* si trova il gene *MDM2* (*mice double minutes 2*), si ritiene che la sua iperespressione possa determinare instabilità genomica, poiché *MDM2* lega p53 e ne causa inattivazione. Nonostante l'iperespressione di *MDM2* sia stata identificata nei 2/3 dei pazienti con *trisomia 12*, il suo incremento non presenta correlazione col grado di aggressività, stadio di malattia o farmacoresistenza (Döhner, 2000; Watanabe, 1994). I pazienti con *trisomia 12* sono considerati a rischio intermedio, che peggiora se associata alla mutazione di *NOTCH1* (Del Giudice, 2012). Essi, inoltre, hanno una maggiore probabilità di sviluppare una seconda neoplasia o di avere una evoluzione a sindrome di Richter (Landau, 2014).

1.3.3.6 Alterazione dei meccanismi di splicing. Sono state identificate numerose mutazioni che coinvolgono geni implicati nel processo di splicing, di cui quelle a carico del gene *SF3B1* (*splicing factor 3b subunit 1*) sono le più comuni (~10% delle LLC) (Wang, 2011; Quesada, 2012; Skowronska, 2012) e prevalenti nelle forme IGHV-U (Puente, 2015; Fabbri, 2011). Le conseguenze funzionali di queste mutazioni sono poco conosciute, tuttavia potrebbero causare alterazioni strutturali di proteine coinvolte nei meccanismi di risposta al danno del DNA, come suggerito dalla frequente associazione con la *del11q22-23* e dalla parziale alterazione funzionale della via *ATM-p53* nelle forme che mostrano la mutazione (Wang, 2011). In aggiunta ad *SF3B1*, sono state identificate anche mutazioni a carico di altri geni coinvolti nel processo di splicing (es. *XPO1*, *NFX1* e *MED12*), suggerendo come proprio l'alterazione della processazione dell'RNA giochi un ruolo importante nella patogenesi della LLC (Puente, 2015; Fabbri 2011; Wang 2011; Landau, 2015).

1.3.3.7 Attivazione della via di NF- κ B. Numerosi geni mutati in corso di LLC sono implicati nella via di segnale del complesso trascrizionale *NF- κ B*, alcuni determinando amplificazione del segnale, altri causando una *down-regolazione* di modulatori negativi (Puente, 2015; Fabbri, 2011; Wang, 2011; Landau, 2015). Tra queste le più comuni sono le mutazioni a carico di *BIRC3* e di *MYD88*. L'inattivazione del gene *BIRC3* è presente nel 2-4% delle LLC ed è la conseguenza di delezioni monoalleliche o di mutazioni che determinano la perdita del dominio RING C – terminale (Rossi, 2011b). Tale alterazione causa l'attivazione costituzionale della via non canonica del pathway di *NF- κ B* (Rossi, 2011b; Rossi, 2012a). La mutazione *MYD88^{L265P}* (*myeloid differentiation primary response 88*) è presente nel 5% dei casi di LLC, esclusivamente nelle forme IGHV-M ed in pazienti tipicamente più giovani (Puente, 2015). La mutazione coinvolge il dominio TIR (*toll/interleukin-1 receptor*) e determina un incremento del legame di *MYD88* alla chinasi IRAK1 (*IL-1 receptor associated kinase 1*) cui segue un incremento di fosforilazione delle chinasi a valle con effetti pleiotropici, tra cui l'attivazione della via di *NF- κ B* (Puente, 2015). Infine, altre mutazioni presenti in meno del 2% dei pazienti con LLC sembrano associarsi ad attivazione della via di *NF- κ B* (*NFKIB*, *TRAF2* e *TRAF3*). Le mutazioni descritte avrebbero come elemento comune un'attivazione della via di *NF- κ B* mediata da un elemento iniziante, che potrebbe essere rappresentato dalla stimolazione del BCR e dei TLRs, e che potrebbe avvenire all'interno dei *centri di proliferazione* e nel sangue dei pazienti affetti da LLC (Fabbri, 2016).

1.3.3.8 Alterazioni epigenetiche. Lo studio delle alterazioni epigenetiche (epigenoma o metiloma) nel contesto della LLC sta assumendo un ruolo crescente nel comprendere i processi di modulazione dell'espressione genica e nello sviluppo di nuovi farmaci (Fabbri, 2016). Nella LLC questi studi hanno documentato uno stato di ipometilazione globale con aree di ipermetilazione locali variabili (Kulis, 2012). Il profilo di metilazione sembra essere stabile nel tempo, ma differisce significativamente tra le forme IGHV-U e le forme IGHV-M. Studi di comparazione del metiloma tra le cellule leucemiche e i linfociti B normali hanno evidenziato che l'epigenomica delle cellule IGHV-U è del tutto simile a quello delle cellule B naïve, mentre quello delle cellule IGHV-M è più simile a quello delle cellule B memoria, supportando le ipotesi sulla cellula di origine della LLC (Kulis, 2012). Infine, lo studio del metiloma sta mettendo in evidenza la correlazione tra specifiche alterazioni genomiche ed un determinato profilo di metilazione come osservato per la *trisomia 12* e la mutazione di *MYD88* (Beekman, 2018)

1.3.3.9 Telomeri. Lo studio dei telomeri nelle cellule leucemiche ha evidenziato come questi siano più corti se confrontati alle cellule B normali, a parità di età e sesso. Questi riscontri sono inoltre più comuni nelle forme IGHV-U, nelle quali si rinviene anche una maggiore attività telomerasica (Damle, 2004; Grabowski, 2005), associata a un *outcome* peggiore e ad un'aumentata probabilità di evoluzione in sindrome di Richter (Rossi, 2009a). Alla base dell'accorciamento dei telomeri è stata identificata la mutazione del gene *POT1* (*protection of telomeres 1*) che si verifica in circa il 3% dei pazienti affetti da LLC, tutti di stato *IGHV-U* e stadio avanzato alla diagnosi (Puente, 2015; Wang, 2011; Landau, 2015). *POT1* codifica per una proteina del complesso *shelterin* che protegge i telomeri. Le mutazioni che interessano questo gene alterano l'interazione con le sequenze telomeriche TTAGGG (Lei, 2004) con conseguente rottura e alterazioni strutturali dei cromosomi, favorendo l'accorciamento dei telomeri (Loayza, 2003; Ramsay 2013).

1.4 STORIA NATURALE

Gli studi di correlazione clinica-biologica della leucemia linfatica cronica identificano nella sua storia naturale una prima fase pre-maligna, definita linfocitosi B monoclonale (MBL) ed una progressione clonale che può portare nelle fasi più avanzate sino ad una trasformazione in un linfoma aggressivo (sindrome di Richter).

1.4.1 Linfocitosi B monoclonale tipo LLC

La linfocitosi B monoclonale (MBL) è un'entità nosologica definita dalla presenza nel sangue periferico di un clone B linfocitario $\leq 5000/\mu\text{L}$, con pattern fenotipico identico alla LLC, in assenza di segni o sintomi riconducibili al quadro leucemico (Swerdlow, 2016). Fino al 12% della popolazione adulta sana (che sale fino al 25% se età > 70 anni) può presentare questa condizione (Almeida, 2011). Si distinguono due forme di MBL (Swerdlow, 2016): i) a "bassa conta", quando le cellule clonali sono $< 500/\mu\text{L}$; ii) a "conta elevata" quando sono $\geq 500/\mu\text{L}$ (Swerdlow, 2016; Strati, 2015). La MBL a "conta elevata" è considerata a tutti gli effetti una condizione pre-maligna, perché precede virtualmente tutte le forme di LLC (Shanafelt, 2010) e presenta caratteristiche genetiche e citogenetiche analoghe alla LLC (Vardi, 2013). La forma a "bassa conta" invece, presenta un repertorio immunoglobulinico simile a quello della popolazione anziana e differente da quello della LLC, suggerendo che questa forma sia la conseguenza dell'invecchiamento linfocitario piuttosto che una condizione pre-maligna (Ghia, 2000). Complessivamente la probabilità di evoluzione di una MBL a LLC è stimata all'1-4% all'anno (Mulligan, 2008; Shanafelt, 2010; Rossi, 2009b). Studi di WES e WGS hanno evidenziato come la MBL e la LLC differiscano tra loro in termini di carico mutazionale IGHV (1.2 vs 1.7 mutazioni per megabase; $P=0.0008$) (Puente, 2015), con caratteristiche analoghe anche per altri geni come *NOTCH1*, *TP53* e *SF3B1*, i quali mantengono il loro significato prognostico senza essere apparentemente coinvolti nella progressione clonale (Barrio, 2017). Nonostante non siano stati ben definiti i meccanismi di evoluzione clonale che portano alla trasformazione della MBL a LLC, è ormai evidente che la *del13p14*, la *trisomia 12* e la mutazione di *MYD88* sarebbero lesioni iniziali, perché già riscontrabili nella MBL (Landau, 2015; Barrio, 2017), mentre le mutazioni di *TP53*, *ATM* e *SF3B1* si sviluppano in corso di evoluzione clonale e pertanto sarebbero da considerare lesioni aggiuntive (Landau, 2015).

1.4.2 Sindrome di Richter

La sindrome o "trasformazione" di Richter (RT) si verifica nello 0.5% dei casi e consiste nella trasformazione della LLC in un linfoma più aggressivo (Rossi, 2016). La RT si può presentare in due varianti: i) la variante linfoma B diffuso a grandi cellule (*DLBCL-type*), che costituisce la quasi totalità dei casi e ii) la variante linfoma di Hodgkin (*HL-type*) (Campo, 2017). I fattori predisponenti alla RT sono stati identificati nella presenza di aberrazioni di *TP53*, nelle mutazioni di *NOTCH1*, e nella stereotipia recettoriale con subset #8 (*IGHV4-39*) (Rossi,

2018). Nei pazienti sottoposti a trattamento con inibitori del BTK la probabilità di sviluppare una RT aumenta invece nei pazienti con aberrazioni di *TP53* o cariotipo tetraploide (Miller, 2017). La RT *DLBCL-type* ha una derivazione clonale diretta dalla cellula LLC di origine nell'85% dei casi e si caratterizza per una prognosi infausta legata a chemioresistenza (Rossi, 2011c; Chigrinova, 2013). Solo un 15% dei casi non presenta correlazione clonale alla LLC di origine, con prognosi sovrapponibile alle forme di linfoma B diffuso a grandi cellule *de novo* (Rossi, 2011c; Rossi, 2016; Parikh 2014). Mentre non sono noti i meccanismi molecolari che portano allo sviluppo delle RT *HL-type*, sono stati invece in parte compresi quelli che portano allo sviluppo della RT *DLBCL-type*. In relazione a quest'ultima, la caratterizzazione molecolare ha identificato frequentemente la presenza di mutazioni di *TP53*, *MYC*, *CDKN2A* e *CDKN2B* (circa il 90% dei casi) e una attivazione significativa della via del segnale di *NOTCH1* (Rossi, 2018; Parikh, 2014). Anche la trisomia 12 è di frequente riscontro ed è un indice di RT clonalmente correlata alla LLC, essendo questa alterazione pressoché assente nei DLBCL *de novo* (Rossi, 2011c). Infine la presenza del recettore stereotipato IGHV4-39 aumenta di 24 volte la probabilità di sviluppare RT, per cui è possibile considerare anche un'alterata via del segnale del BCR alla base della trasformazione (Rossi, 2018). In relazione ai nuovi trattamenti la RT si verifica nel 5-10% dei pazienti in trattamento con Ibrutinib, entro 2 anni dall'inizio del trattamento, suggerendo un possibile ruolo del farmaco nella selezione di subcloni precedentemente esistenti (Bosch, 2019). Anche in corso di trattamento con Venetoclax possono verificarsi episodi di RT, tuttavia in questo contesto i meccanismi non sono ancora del tutto noti (Bosch, 2019). Da un punto di vista clinico la RT presenta la comparsa rapidamente ingravescente di sintomi sistemici, linfadenomegalie, possibili localizzazioni extranodali, in particolare a livello del SNC o delle sierose, associate tipicamente, dal punto di vista laboratoristico, ad un incremento delle LDH. Le localizzazioni di malattia sono tipicamente PET captanti, ed un valore di SUV > 5 deve incoraggiare l'approfondimento istologico dell'adenopatia in quanto la diagnosi resta comunque istologica (Papajik, 2014).

1.5 MANIFESTAZIONI CLINICHE

Le manifestazioni cliniche della Leucemia Linfatica Cronica (LLC) sono molto variabili, come conseguenza della sua fisiopatologia eterogenea. Alcuni pazienti hanno un esordio asintomatico caratterizzato da una lenta progressione, mentre altri possono avere un

andamento rapidamente progressivo sin dalle prime fasi di malattia. Nel 70-80% dei casi la malattia è asintomatica con linfocitosi assoluta clonale isolata, in assenza di segni o sintomi rilevabili. Negli altri pazienti le manifestazioni sono variabili, in relazione al coinvolgimento degli organi linfoidi, all'attività delle cellule leucemiche e all'eventuale compromissione di organi extralinfatici. Il riscontro di linfadenomegalie indolenti polidistrettuali è molto comune, e quando queste interessano distretti profondi possono causare un effetto massa. Splenomegalia, epatomegalia e sintomi sistemici (iperdiaforesi notturna, febbre e calo ponderale) sono invece meno frequenti, mentre le citopenie, quando presenti, sono spesso conseguenza di fenomeni autoimmuni e, più raramente, di estesa infiltrazione midollare. Infine, il coinvolgimento di strutture extralinfatiche è rarissimo. Nel 50-70% dei casi si riscontra ipogammaglobulinemia con predisposizione ad infezioni ricorrenti, mentre nel 5% dei casi si associa a gammopatia monoclonale a significato indeterminato (variante secretoria).

1.6 DIAGNOSI

La diagnosi di LLC è clinico-laboratoristica. La valutazione preliminare avviene attraverso lo studio morfologico del sangue periferico, dove si evidenzia la presenza piccoli linfociti e di *ombre di Gumprecht*, cellule rotte durante l'allestimento del vetrino derivanti da un'estrema fragilità della membrana citoplasmatica. L'analisi citofluorimetrica è fondamentale per dimostrare la natura clonale della linfocitosi escludendo forme reattive, e per differenziarla da altri disordini linfoproliferativi (Hallek, 2018; Eichhorst, 2015). Ogni clone LLC esprime una sola catena leggera (κ 60%, λ 40%) ed ha un pattern di superficie CD19⁺, CD5⁺, CD23⁺, FMC7⁻, con blanda espressione di immunoglobuline (sIg_{low}), CD79b e CD22 (Matutes, 1994; Rawstron, 2017). L'attribuzione a ciascuno di questi marker di un "punto" permette di ottenere lo score immunofenotipico di Matutes. In presenza di uno score di almeno 3 è possibile identificare oltre il 95% dei casi di LLC (Johnson, 2014; Rai, 1975). Recentemente Köhnke *et al*, hanno proposto un nuovo score citofluorimetrico ugualmente sensibile (97.1% vs 98.6%, p=0.38), ma più specifico rispetto allo score Matutes (87.2% vs 53.8%, p<0.001), che introduce la valutazione del CD200, ai markers già impiegati (Köhnke, 2017), fornendo un ulteriore strumento per porre una diagnosi accurata.

Quando la malattia si manifesta esclusivamente con interessamento tissutale in assenza di linfocitosi si parla di *linfoma a piccoli linfociti* (Swerdlow, 2016). In questo caso la diagnosi

viene posta mediante biopsia linfonodale o mediante biopsia mirata a tessuti infiltrati. In presenza di una linfocitosi clonale modesta, con caratteristiche immunofenotipiche di LLC ($<5 \times 10^9/L$), in assenza di organomegalie o adenomegalie, si parla di linfocitosi B monoclonale (MBL) (Hallek, 2018). La MBL è una condizione preleucemica caratterizzata da un rischio evolutivo dell'1-2% per anno, ed è associata a un aumentato rischio di infezione e di seconde neoplasie (Solomon, 2016).

1.7 PROGNOSI

Una volta posta la diagnosi di LLC è necessario eseguire un'accurata stratificazione del rischio al fine di guidare la scelta del trattamento, in modo che possa essere il più possibile personalizzato per il singolo paziente. Nel corso degli anni sono stati identificati numerosi parametri prognostici di carattere clinico, sierologico, citofluorimetrico, citogenetico e molecolare con lo scopo di affinare la stratificazione prognostica del paziente con LLC. In particolare i marcatori prognostici sono in grado di stimare il tempo al primo trattamento (*time to first treatment* - TTFT), ovvero il tempo che intercorre tra la diagnosi e l'inizio di un primo trattamento specifico; la sopravvivenza libera da progressione (*progression free survival* – PFS) e la sopravvivenza globale (*overall survival* – OS). Tra i marcatori prognostici, alcuni sono anche in grado di prevedere la risposta ad un determinato trattamento e sono per questo definiti marcatori predittivi. I marcatori prognostici, pur essendo molto utili nella pratica clinica, presentano delle limitazioni che devono essere tenute in considerazione: i) la maggior parte di essi è stata identificata nel corso di trial clinici in cui la popolazione arruolata era spesso selezionata e con età < 65 anni, per cui la loro validità in senso "universale" non è certa; ii) alcuni marcatori sono facilmente identificabili in tutti i centri, mentre altri sono identificabili solamente con strumentazioni specifiche (non disponibili su larga scala) per cui alcuni possono essere a disposizione di tutti, mentre altri possono essere impiegati solo in ambito sperimentale; iii) la maggior parte dei parametri è stata studiata al momento della diagnosi e non se ne riconosce un chiaro valore prognostico in corso di trattamento, né durante il decorso della malattia. In relazione a questo ultimo aspetto, le eccezioni sono rappresentate dalla FISH e dai nuovi marcatori genetici, di cui sono note le variazioni durante la storia naturale della malattia e che assumono un significato predittivo oltre che prognostico.

1.7.1 Marcatori prognostici clinici

1.7.1.1 Stadio di malattia. Nella LLC la stadiazione avviene attraverso l'impiego di due sistemi clinico-laboratoristici sviluppati da *Rai* e *Binet* (Rai, 1975; Binet, 1981) (Tabelle 1.1 e 1.2). Questi sistemi si basano esclusivamente sull'esame clinico, e non sulla diagnostica per immagini, ed escludono le citopenie autoimmuni nella definizione dello stadio, poiché è stato dimostrato che le citopenie non correlate ad infiltrazione midollare presentano un decorso clinico migliore (Moreno, 2010; Zenz, 2008). Secondo la stadiazione di Rai la sopravvivenza mediana dei pazienti a basso rischio (stadi 0/I) è superiore ai 10 anni (55-60% dei casi), mentre negli stadi intermedi (stadi II/III) è di 7-9 anni (35-40% dei casi). I pazienti ad alto rischio (stadio IV), hanno invece una sopravvivenza mediana variabile da 1.5 a 5 anni (5-10% dei casi). Se si considera invece la stadiazione secondo Binet la sopravvivenza mediana è > 10 anni per lo stadio A, di 7 anni per lo stadio B e di 2 – 5 anni per lo stadio C. Nonostante i due sistemi di stadiazione siano molto simili tra loro, questi non correlano l'uno con l'altro. Molti dei pazienti nello stadio A di Binet, infatti, non rientrano nella categoria a basso rischio di Rai, mentre per lo stadio B la maggior parte rientra negli stadi a rischio intermedio di Rai. Nonostante i limiti di queste stadiazioni, rimangono ancora oggi di elevata utilità, mantenendo il loro significato prognostico.

Stadio	
0	Linfocitosi assoluta > 15000/ μ L + Linfociti midollo > 40%
I	Linfocitosi + linfadenomegalie
II	Linfocitosi + splenomegalia e/o epatomegalia
III	Linfocitosi + anemia (Hb < 11 g/dL)
IV	Linfocitosi + trombocitopenia (< 100000/ μ L)

Tabella 1.1 Classificazione della LLC secondo Rai (Rai, 1975)

Stadio	
A	Interessamento di meno di 3 aree linfoidi, assenza di anemia e piastrinopenia. A(0), A(I), A(II)
B	Interessamento di 3 o più aree linfoidi, assenza di anemia e piastrinopenia. B(I) o B(II)
C	Anemia (Hb < 10 g/dL), piastrinopenia (PTL < 100000/ μ L), indipendentemente dal numero di aree linfoidi coinvolte. C(III), C(IV)

Tabella 1.2 Classificazione della LLC secondo Binet (Binet, 1981).

I numeri romani si riferiscono al corrispondente stadio della classificazione secondo Rai. Le aree linfoidi valutate sono 5: cervicali, ascellari, inguinali, milza e fegato. La stadiazione secondo Binet raggruppa in due soli stadi gli stadi I e II di Rai e gli stadi III e IV di Rai.

1.7.1.2 Età e sesso. Nella LLC solo il 25% dei pazienti ha un'età < 55 anni e in questi casi è stato osservato che la clinica, lo stadio e i marcatori prognostici sono sovrapponibili a quelli di età più avanzata. In particolare in entrambi i gruppi la sopravvivenza è paragonabile, per cui ne deriva che la mortalità è superiore nella popolazione più giovane. Questi riscontri suggeriscono come la malattia del giovane sia spesso più aggressiva e presenti, inoltre, una probabilità di trasformazione di Richter 5 volte superiore rispetto alla popolazione più anziana (Kipps, 2017). I pazienti con esordio entro i 55 anni di età sono soprattutto donne, le quali mostrano un andamento meno aggressivo rispetto agli uomini, secondo meccanismi attualmente ignoti, anche se è stato osservato che spesso le donne presentano uno stato mutazionale IGHV-M.

1.7.2 Marcatori prognostici citofluorimetrici

1.7.2.1 CD38. CD38 è una proteina enzimatica transmembrana a funzione NAD-glicoidrolasica e ADP-ribosilciclasica (Morabito, 2006) espressa normalmente su molte cellule del sistema ematopoietico, la cui funzione è importante nella regolazione di apoptosi, signalling del BCR e adesione cellulare (Zupo, 1994). L'espressione del CD38 (*cut-off* di positività $\geq 30\%$ in citofluorimetria) è un fattore indipendente che fa parte del pannello di caratterizzazione prognostica di routine della malattia alla diagnosi (Damle, 1999; Hamblin, 2002).

1.7.2.2 ZAP-70. ZAP-70 è una Src tirosin chinasi coinvolta nel signalling del T-cell Receptor (TCR), espressa in modo aberrante da alcuni cloni LLC (Chan, 1992). La sua espressione citoplasmatica (*cut-off* di positività $\geq 20\%$ in citofluorimetria) conferisce vantaggio di sopravvivenza legato a segnali mediati dal BCR (Gobessi, 2007) e correla con uno stato *IGHV-U* e con un outcome clinico sfavorevole (Crespo, 2003). Poiché la quantificazione citofluorimetrica di ZAP-70 è gravata da una scarsa riproducibilità, la sua ricerca routinaria nella LLC non è raccomandata.

1.7.2.3 CD49d. CD49d è una molecola di superficie in grado di legarsi a molecole presenti nel microambiente midollare (VCAM-1, fibronectina) promuovendo la sopravvivenza e la proliferazione cellulare oltre ad essere coinvolta nei processi di adesione, migrazione ed *homing* (Burger, 2012). Si associa a progressione di malattia e a presenza di grossolane linfadenomegalie. L'impatto prognostico di CD49d (*cut-off* di positività $\geq 20\%$ in citofluorimetria) in termini di sopravvivenza libera da trattamento e di sopravvivenza

globale è risultato indipendente e superiore rispetto all'espressione di CD38 e ZAP-70 (Bulian, 2014; Tissino, 2020)

1.7.3 Marcatori prognostici laboratoristici

1.7.3.1 Tempo di raddoppiamento linfocitario (lymphocyte doubling time - LDT). I pazienti con LDT < 12 mesi hanno una sopravvivenza peggiore (Montserrat, 1986), purché siano state escluse altre cause di aumenti transitori della linfocitosi. Pazienti in stadio A con LDT < 12 mesi mostrano un TTFT di 2.5 anni e una OS mediana di 12.6 anni, mentre i pazienti nello stesso stadio con LDT ≥ 12 mesi mostrano TTFT di 18.6 anni con OS mediana di 20.3 anni (Pepper, 2012).

1.7.3.2 Lattico deidrogenasi (LDH). I livelli sierici di LDH sono un indicatore di aggressività di malattia e di prognosi. Livelli serici elevati di LDH si associano inoltre ad un aumentato rischio di evoluzione in sindrome di Richter (Gentile, 2014; Autore, 2019).

1.7.3.3 b2-microglobulina. I valori sierici di b2-microglobulina sono un marcatore prognostico indipendente di PFS, OS e TTFT (Gentile, 2014). Si ritiene la concentrazione di b2-microglobulina rifletta il carico tumorale e correli con i valori di citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-8 e TNF-alfa (Johnson, 2014).

1.7.3.4 Timidin chinasi (TK). La TK è un enzima intracellulare, la cui forma solubile serica rappresenta un indicatore di stadio avanzato di malattia (Matthews, 2006).

1.7.4 Marcatori prognostici citogenetici

1.7.4.1 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Nella LLC il pannello FISH standard prevede la ricerca delle aberrazioni cromosomiche più comuni e caratterizzate da un significato prognostico di rilievo. Sulla scorta del modello gerarchico di Döhner vengono solitamente ricercate la *del13q14*, la *trisomia 12*, la *del11q22-23* e la *del17p13* (Döhner, 2000). La ***del17p13*** è presente nel 4-5% dei pazienti alla diagnosi e in circa il 10% dei pazienti al momento del trattamento (Tam, 2009; Hallek 2010). I pazienti con *del17p13* presentano un TTFT mediano di 3 anni (Tam, 2009) e una resistenza primaria al trattamento chemioterapico (Hallek, 2010). Molti pazienti con *del17p13* presentano anche la mutazione di *TP53* nell'altro allele, mentre una quota di pazienti mostra la mutazione di *TP53* senza presentare la *del17p13*. I pazienti con *del17p13* e/o mutazione di *TP53* presentano prognosi sfavorevole. Per quanto riguarda la *del11q22-23*, questa si riscontra prevalentemente in

soggetti uomini adulto-anziani con grossolani pacchetti linfonodali, la cui prognosi può essere significativamente migliorata dal trattamento contenente rituximab (Hallek, 2010). La **trisomia 12** può associarsi alla morfologia atipica, ma l'incidenza non correla con lo stadio e i pazienti presentano una buona risposta al trattamento (Hallek, 2010). I pazienti con trisomia 12 sono classificati come pazienti a rischio intermedio, ma presentano una maggiore probabilità di sviluppare sindrome di Richter. Nonostante la metodica FISH fornisca informazioni utili al riconoscimento delle principali lesioni citogenetiche, circa un terzo dei casi a FISH "negativa" valutati mediante analisi del cariotipo convenzionale mostra anomalie cromosomiche che altrimenti sarebbero rimaste misconosciute (Rigolin, 2012). In particolare una quota di questi potrebbe addirittura mostrare condizioni a prognosi sfavorevole, come il **cariotipo complesso**, ovvero la presenza di almeno 3 lesioni citogenetiche all'interno dello stesso clone (Rigolin, 2016; Baliakas, 2014; Baliakas, 2019). Il ruolo del cariotipo complesso nella LLC sarà approfondito nella seconda parte di questa tesi, essendo stato oggetto di ricerca nel corso del triennio di dottorato.

1.7.5 Marcatori prognostici genetico – molecolari

1.7.5.1 Stato mutazionale IGHV. Lo stato mutazionale IGHV rimane invariato durante il decorso della malattia, pertanto rappresenta uno dei marcatori prognostici più importanti. Circa il 60% dei pazienti presenta uno stato mutazionale *IGHV-M*, condizione che si associa a morfologia tipica e malattia stabile (Zenz, 2010a). I pazienti con stato mutazionale *IGHV-U* hanno invece una malattia più aggressiva con tendenza all'evoluzione clonale, presentano spesso associazione con lesioni genetiche ad alto rischio (aberrazioni di *TP53* e/o del11q22-23 ed eventualmente *NOTCH1^{MUT}*) e si associano ad un peggior TTFT e ad una peggiore OS (Puente, 2015; Rossi, 2012b). Una eccezione a questa distinzione dicotomica tra le forme *IGHV-M* e *IGHV-U* è il subset *IGHV3-21*, che ha mostrato un significato prognostico sfavorevole indipendentemente dallo stato mutazionale, probabilmente come conseguenza della over-espressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nel processo di trascrizione (Baliakas, 2015; Stamatopoulos, 2017).

1.7.5.2 Mutazioni di TP53. La presenza di aberrazioni a carico di *TP53* (*TP53* mutato e/o del17p13), così come la presenza di uno stato mutazionale *IGHV* non mutato (*U-IGHV*) si associano a maggiore aggressività clinica (Döhner, 2000; Hallek 2010; Zenz 2010a; Damle,

1999; Pepper, 2012); inoltre le aberrazioni di *TP53* si sono dimostrate predittive di chemiorefrattarietà (Döhner, 2000; Hallek 2010; Zenz, 2010b).

1.7.5.3 Attività telomerasica e lunghezza dei telomeri. Come descritto in precedenza, nella LLC i telomeri sono più corti rispetto alle altre cellule normali, specie nelle forme *IGHV-U* (Damle, 2004, Roos, 2008). In risposta all'accorciamento l'attività telomerasica risulta aumentata. L'accorciamento dei telomeri e l'incremento dell'attività telomerasica sono stati associati ad una prognosi peggiore (Roos, 2008).

1.7.5.4 Mutazioni di *NOTCH1* e *SF3B1*. Le mutazioni a carico di *NOTCH1* e di *SF3B1* sono marcatori prognostici sfavorevoli (Wang, 2011; Fabbri, 2011; Quesada, 2012; Rossi, 2012c; Rossi, 2011a). Le **mutazioni di *NOTCH1*** si riscontrano nel 4-10% dei pazienti, specie *IGHV-U*, con un'incidenza che aumenta fino al 41.9% nei soggetti con trisomia 12, fino al 20% nei soggetti con chemiorefrattarietà (Fabbri, 2011; Rossi, 2012b) e fino al 30% nei soggetti con trasformazione di Richter (Fabbri, 2011; Rossi, 2012b). Le mutazioni di *NOTCH1* incrementano l'attività del pathway di *NF-kB* e di conseguenza riducono il processo apoptotico. Le mutazioni di *TP53* sono presenti solo nel 10% dei casi di pazienti con mutazioni di *NOTCH1*, per cui la chemiorefrattarietà indotta da *NOTCH1* è conseguenza di un meccanismo indipendente da p53 (Rossi, 2012b). Le **mutazioni di *SF3B1*** si riscontrano nel 15-17% dei casi e si associano ad anomalie dello splicing di vari mRNA (Wang, 2011; Fabbri, 2011, Quesada, 2012; Rossi, 2012c; Rossi, 2011a). Si trovano prevalentemente nei pazienti con *IGHV-U* e si associano spesso alla del11q22-23 (36%) e a resistenza a fludarabina (Wang, 2011; Rossi, 2012c; Rossi, 2011a).

1.7.5.5 MicroRNA. Bassi livelli di MIR181b alla diagnosi si associano ad un decorso di malattia più aggressivo. Sia *BCL2* che *MCL1* sono regolati da MIR181b, per cui a bassi livelli di questo miRNA corrisponde un incremento dei livelli di questi fattori antiapoptotici. Altri miRNA sono oggetto di studio in senso prognostico, ad esempio il MIR125a-5p, quando down-regolato è stato associato a complessità genetica e peggiore *outcome* (Rigolin, 2014).

1.7.6 International Prognostic Index (CLL-IPI)

Recentemente, attraverso uno studio cooperativo internazionale su 3472 pazienti arruolati in protocolli clinici e mai trattati, sono stati identificati cinque parametri prognostici indipendenti a costituire l'*International Prognostic Index* (CLL-IPI)(International CLL-IPI working group, 2016). Questo score prognostico considera il peso relativo di ciascun

parametro prognostico (*TP53*, *IGHV*, b2-microglobulina, stadio clinico, ed età) identificando quattro gruppi di rischio stratificati per OS a 5 anni: basso rischio (93.2%), rischio intermedio (79.3%), alto rischio (63.3%), e rischio molto alto (23.3%). Le stime di sopravvivenza di questo score devono essere considerate tenendo conto che sono state ricavate da trials che non includevano target therapy (International CLL-IPI working group, 2016). Il CLL-IPI è solo il più recente degli score proposti per la stratificazione del rischio, tuttavia non può essere utilizzato come strumento per decidere se trattare o meno il paziente (Hallek, 2018; Hallek 2019).

PARTE SECONDA

IL RUOLO DEL CARIOTIPO COMPLESSO

2.0 INTRODUZIONE: IL CARIOTIPO COMPLESSO NELLA LLC

Nella prima parte di questa tesi sono stati descritti i molteplici parametri clinici e biologici con valore prognostico e/o predittivo, che permettono la stratificazione dei pazienti affetti da LLC in sottogruppi accomunati da decorso clinico e risposta al trattamento. Secondo il workshop internazionale sulla LLC (iwCLL) del 2018, la valutazione prognostica pre-trattamento nella pratica clinica e negli studi clinici dovrebbe prevedere lo studio del background genetico, con particolare riferimento allo studio del gene *TP53* e allo stato mutazionale IGHV (Hallek, 2018).

Come descritto, le lesioni genomiche di questa malattia sono eterogenee, in assenza di lesioni citogenetiche specifiche ed esclusive (Puiggros, 2014). Storicamente, la prima evidenza di questa eterogeneità emerse da studi di bandeggio cromosomico negli anni '90, quando furono identificate molteplici anomalie numeriche e strutturali dei cromosomi (Dierlamm, 1997; Juliusson, 1990). Già questi studi identificarono come la presenza di un numero crescente di alterazioni citogenetiche fosse associato a un decorso clinico più aggressivo e a una prognosi peggiore, introducendo il significato sfavorevole del cariotipo complesso (*complex karyotype* – CK) (Juliusson, 1990). Da allora però, lo studio del cariotipo non fu mai incorporato nell'algoritmo diagnostico di routine della LLC, a causa di difficoltà tecniche legate alla scarsa resa mitotica dei cloni LLC in coltura; una limitazione che si traduceva in scarsa capacità di identificazione delle anomalie cromosomiche, almeno fino a tempi relativamente recenti (Gahrton, 1980; Haferlach, 2011). Le difficoltà tecniche della determinazione del cariotipo, combinate alla scoperta della FISH, hanno reso le tecniche di citogenetica convenzionale sempre meno comuni, focalizzando l'attenzione sulle quattro lesioni dotate di significato prognostico (*del13q*, *del11q*, *trisomia 12* e *del17p*), facilmente identificabili su nuclei in interfase con tecniche di citogenetica molecolare.

Sulla base di queste osservazioni, le raccomandazioni iwCLL del 2018 hanno previsto la necessità di eseguire un'accurata stratificazione del rischio genetico della LLC attraverso lo studio FISH integrato allo studio mutazionale di *TP53* (Hallek, 2018).

Nonostante queste raccomandazioni è indubbio che le indagini FISH offrano una visione parziale delle alterazioni citogenetiche della LLC, mentre la citogenetica convenzionale offrirebbe una valutazione globale dell'assetto cromosomico, fornendo informazioni complementari e potenzialmente migliorando la stratificazione del rischio (Baliakas, 2014;

Baliakas, 2016; Dierlamm, 1997; Haferlach, 2007; Haferlach, 2010; Puiggross, 2017; Rigolin, 2012).

Al giorno d'oggi, da un punto di vista pratico, i limiti metodologici delle tecniche di citogenetica convenzionale sono stati superati dall'impiego di nuovi agenti mitogeni (es. CpG-oligodeossinucleotide (DSP30) + Interleuchina(IL-2), dotati di una elevata resa mitotica (Mayr, 2006; Bardi, 2011) e capaci di permettere l'identificazione di anomalie cromosomiche nel 65-83% di pazienti LLC (Haferlach, 2007; Baliakas 2014; Herling, 2016).

La diffusione crescente di indagini citogenetiche convenzionali più moderne e attendibili ha posto l'attenzione sul ruolo del cariotipo complesso (CK) quale marcatore prognostico indipendente (Baliakas, 2014; Eichhorst, 2016a; Blanco, 2016; Dicker, 2006; Jaglowski, 2012), ma anche quale potenziale marcatore predittivo di refrattarietà a regimi chemioimmunoterapici (Badoux, 2011a; Herling, 2016; Takahashi, 2018; Le Bris, 2017) e ai nuovi agenti, indipendentemente dallo stato mutazionale di *TP53* (Mato, 2017; Mato, 2018; Roberts, 2016; Thompson, 2015; Anderson, 2017). I dati a supporto del ruolo prognostico e predittivo del CK derivano in gran parte da piccole serie eterogenee di pazienti, una condizione che limita significativamente le conclusioni relative al preciso valore del CK e di conseguenza limita la gestione ottimale dei pazienti con CK.

Proprio queste ultime osservazioni hanno portato i redattori delle ultime linee guida dell'iwCLL 2018 a considerare "desiderabile" l'analisi del cariotipo nell'ambito di sperimentazioni cliniche e "utile" nella pratica clinica, a condizione che sia disponibile una metodologia consolidata per la sua determinazione (Hallek, 2018) con l'intenzione di fornire evidenze utili a rinforzare il significato predittivo-prognostico del CK.

Sulla scorta delle osservazioni riportate è sorta la linea di ricerca di questi tre anni di dottorato che mi ha visto impegnato nell'approfondimento di questo argomento.

La mia linea di ricerca è stata caratterizzata da una pre-fase, al termine del mio percorso di specializzazione in Ematologia, e poco prima dell'ingresso in corso di dottorato, dove insieme ai colleghi del mio istituto abbiamo confermato la valenza prognostica sfavorevole indipendente del CK rispetto allo score prognostico CLL-IPI (allegato 1) (Rigolin, 2017a). Successivamente mi sono dedicato ad una revisione della letteratura scientifica sull'argomento, approfondendo le basi biologiche del cariotipo complesso (allegato 2) (Cavallari, 2018). Seguiva quindi uno studio di approfondimento sul significato delle

specifiche alterazioni strutturali e numeriche dei cromosomi che costituiscono il CK (allegato 3)(Rigolin, 2018) e col nostro istituto partecipavamo ad un'ampia collaborazione multicentrica europea sulla definizione e sul significato clinico del CK (Baliakas, 2019). Al secondo anno di dottorato ho collaborato a uno studio multicentrico guidato dall'istituto di ematologia di Padova, in cui abbiamo valutato il ruolo prognostico della combinazione dei sottotipi di cariotipo complesso con lo stato mutazionale IGHV (allegato 4) (Visentin, 2019), mentre nell'ultimo anno ho partecipato ad uno studio collaterale sul significato prognostico dell'espressione del gene *SLAMF1* nella LLC, derivato dallo studio del 2018 sulle aberrazioni cromosomiche maggiori (allegato 5) (Rigolin, 2020).

Di seguito vengono riportati i singoli studi condotti in questi anni, il cui testo *in extenso*, pubblicato in letteratura, è consultabile in allegato.

2.1 CONTRIBUTO SPERIMENTALE:

In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI (allegato 1)

2.1.1 Razionale dello studio

Nel 2016 un gruppo di lavoro multicentrico ha messo a punto e validato l'indice prognostico internazionale per la leucemia linfatica cronica (CLL-IPI) col fine di ottimizzare la stratificazione prognostica e la gestione dei pazienti affetti da LLC, sia nella pratica clinica sia nei trial clinici (International CLL-IPI Working Group, 2016). Questo score prognostico è stato realizzato prendendo in considerazione il contributo relativo dei principali parametri prognostici identificati sino a quel momento: i) le aberrazioni di *TP53*, ii) lo stato mutazionale IGHV, iii) i livelli di b2-microglobulina serica, iv) lo stadio clinico e v) l'età. Poiché la LLC è una patologia che interessa prevalentemente l'anziano, molti pazienti alla diagnosi presentano comorbidità significative che possono influire sulla scelta terapeutica e sulla prognosi (Stauder, 2017). Inoltre, negli ultimi anni, il CK è emerso come marcatore prognostico sfavorevole (Rigolin, 2016; Baliakas, 2014) e predittivo di refrattarietà ai trattamenti, inclusi i nuovi farmaci (Herling, 2016; Thompson, 2015). Sulla base di queste considerazioni è stato condotto questo studio, volto ad analizzare la rilevanza prognostica del CK e delle comorbidità, in relazione al CLL-IPI.

2.1.2 Pazienti e metodi

Lo studio è stato condotto su 335 pazienti affetti da LLC mai trattati, la cui diagnosi era stata posta presso il nostro istituto e che avevano eseguito regolari visite di follow up tra il 2006 e il 2016. La diagnosi di LLC era stata posta in tutti i pazienti seguendo i criteri del National Cancer Institute (Hallek, 2008) e lo studio era stato approvato dal comitato etico locale. Nei pazienti giovani e/o in buone condizioni (*fit patients*), i trattamenti impiegati in prima linea erano stati regimi terapeutici contenenti fludarabina o bendamustina, con o senza rituximab, mentre nei pazienti anziani e/o in condizioni mediocri (*unfit patients*) erano state impiegate terapie a base di clorambucile, con o senza rituximab, in accordo alla linea di trattamento del nostro centro in quel momento. Dal 2015 ai pazienti recidivati/refrattari era stato possibile offrire trattamenti con ibrutinib o idelalisib più rituximab. A tutti i pazienti arruolati in questo studio era stato calcolato l'indice di comorbidità, mediante

l'impiego del *Cumulative Illness Rating Scale* (CIRS) (Parmelee, 1995), permettendoci di avere una stima riproducibile delle condizioni mediche coesistenti. Inoltre, era stata calcolata la clearance della creatinina mediante l'uso della formula di Cockcroft-Gault (Cockcroft, 1976). La presenza di almeno tre aberrazioni cromosomiche nello stesso clone leucemico, identificate attraverso tecniche di citogenetica convenzionale definiva la presenza di CK (Rigolin, 2012) (vedi tabella supplementare 1 dell'allegato 1, per le caratteristiche dei pazienti). Il tempo al primo trattamento (*time to first treatment* – TTFT) era calcolato come l'intervallo tra la diagnosi e l'inizio della prima linea di trattamento. La sopravvivenza globale (*overall survival* – OS) era calcolata dalla data della diagnosi sino alla morte dovuta ad ogni causa o sino all'ultimo follow up. Per identificare le variabili prognostiche indipendenti è stata impiegata l'analisi del rischio di regressione proporzionale sul TTFT e sulla OS, mentre l'analisi statistica è stata condotta utilizzando Stata 14.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

2.1.3 Risultati

L'età mediana era 68.7 anni (range, 33-96 anni) con il 61.5% di età >65 anni. In relazione al CLL-IPI i pazienti erano così distribuiti: 106 a basso rischio (44.5%), 78 a rischio intermedio (32.8%), 43 ad alto rischio (18.1%), e 11 a rischio molto alto (4.6%), riproducendo in maniera molto simile la distribuzione dei pazienti osservata nel lavoro originale di validazione del CLL-IPI (International CLL-IPI Working Group, 2016). Questo ha permesso di svolgere in questo studio un'analisi attendibile del tempo al primo trattamento (TTFT) e della sopravvivenza globale (OS) nella pratica clinica, al di fuori di trial clinici. In relazione alle comorbidità, 145 su 335 pazienti (43.3%) presentavano un CIRS score >6. Nel 40.6% (136/355) dei casi la clearance della creatinina era <70 mL/min. Come atteso, la presenza di uno score CIRS >6 si associava ad età >65 anni ($P<0.001$), a una clearance della creatinina <70 mL/min ($P<0.001$), a un *performance status* secondo l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) ≥ 2 ($P<0.001$), e anche a una concentrazione di b2-microglobulina >3.5 mg/L ($P=0.005$). Il 14.3% (41/287) dei casi presentava CK, un dato concorde con altre serie di pazienti riportate in letteratura (Baliakas, 2014). Il CK si associava significativamente con stadio clinico avanzato secondo Binet ($P=0.013$), positività del CD38 ($P=0.003$), concentrazione di b2-microglobulina > 3.5 mg/L ($P=0.010$), delezione o mutazione di *TP53* ($P=0.001$), CLL-IPI alto o molto alto ($P=0.002$), e caratteristiche FISH intermedio-sfavorevoli

($P < 0.001$). In questa analisi è stato confermato l'impatto prognostico del CLL-IPI sulla OS (Tabella 2.1.1; Figura 2.1.1A) e sul TTFT (Figura 2.1.1D) (Gentile, 2016a; da Cunha-Bang, 2016, Molica, 2016).

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis, n = 228			
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	After bootstrapping	
					HR (95% CI)	P
OS						
CLL-IPI						
Low	1		1		1	
Intermediate	2.593 (1.121-6.001)	.026	2.074 (0.853-5.237)	.108	2.074 (0.822-5.049)	.122
High	4.828 (2.152-10.834)	<.001	5.716 (2.434-13.423)	<.001	5.716 (2.516-12.989)	<.001
Very high	13.628 (4.742-39.166)	<.001	4.875 (1.399-16.984)	.013	4.875 (1.161-20.477)	.031
CIRS $\leq 6 / > 6$	3.843 (2.433-6.071)	<.001	2.899 (1.521-5.523)	.001	2.899 (1.352-6.217)	.006
CK, yes/no	3.176 (1.882-5.359)	<.001	3.572 (1.572-8.116)	.002	3.572 (1.341-9.515)	.011
TTFT						
CLL-IPI						
Low	1		1		1	
Intermediate	6.640 (2.993-14.729)	<.001	6.214 (2.788-13.853)	<.001	6.214 (2.171-17.790)	.001
High	20.831 (9.588-45.260)	<.001	22.308 (10.214-48.720)	<.001	22.308 (7.718-64.480)	<.001
Very high	25.637 (9.748-67.425)	<.001	15.811 (5.611-44.555)	<.001	15.811 (4.425-56.502)	<.001
CIRS $\leq 6 / > 6$	1.151 (0.794-1.669)	.407	---	---	---	---
CK, yes/no	2.521 (1.606-3.958)	<.001	2.157 (1.185-3.926)	.012	2.157 (1.177-3.952)	.013

Tabella 2.1.1. Analisi univariata e multivariata per il TTFT e la OS. Legenda: ---, non applicabile; CI, intervallo di confidenza; HR, hazard ratio.

All'analisi univariata il CK e un CIRS score > 6 si associavano a una OS inferiore ($P < 0.001$ e $P < 0.001$, rispettivamente; Figure 2.1.1B – 2.1.1C). All'analisi multivariata sia il CK ($P = 0.002$) sia un CIRS score > 6 ($P = 0.001$) confermavano il loro impatto prognostico negativo sulla OS, indipendentemente dal CLL-IPI. All'analisi univariata, un CIRS score > 6 non mostrava correlazioni al TTFT mentre il CK correlava a un TTFT inferiore ($P < 0.001$; Figure 2.1.1E); quest'ultima correlazione veniva mantenuta anche all'analisi multivariata ($P = 0.012$), indipendentemente dal CLL-IPI.

Il significato prognostico indipendente del CK sul TTFT e sulla OS e delle comorbidità sulla OS sono stati confermati anche quando le variabili del CLL-IPI sono state considerate separatamente.

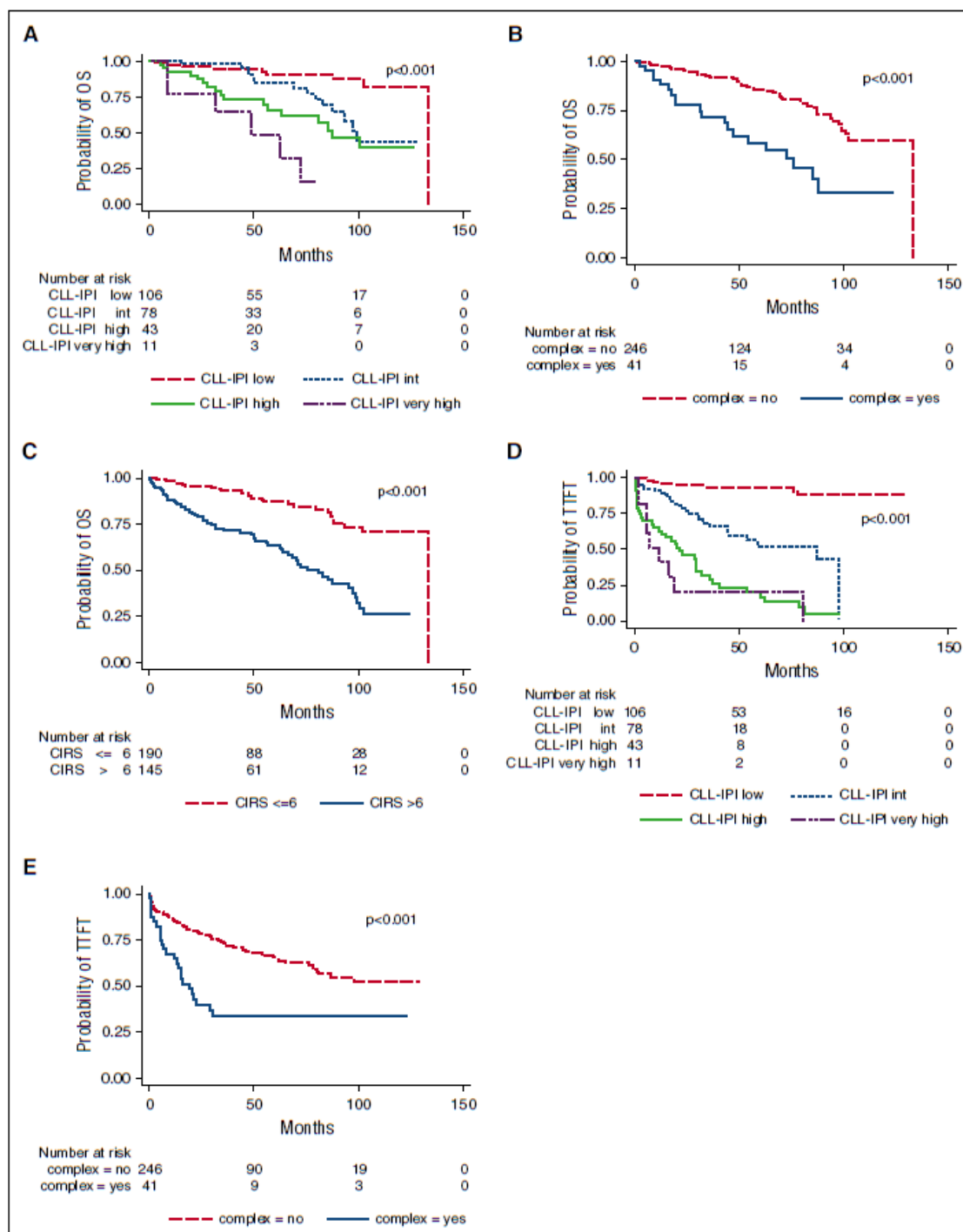


Figura 2.1.1: OS e TTFT in relazione a CLL-IPI, CIRS, e CK. OS in relazione a (A) CLL-IPI, (B) CK, e (C) CIRS. TTFT in relazione a (D) CLL-IPI e (E) CK.

2.1.4 Discussione

Sebbene siano necessarie serie di pazienti più ampie e con un follow up più lungo per confermare queste osservazioni, questi risultati rinforzano l'evidenza che il CK e le comorbidità rappresentano nuovi marcatori prognostici importanti nei pazienti con LLC. In particolare, la presenza di comorbidità rilevanti può ridurre l'aspettativa di vita e la

tolleranza al trattamento (Stauder, 2017; Goede, 2014a), pertanto i nuovi algoritmi di terapia raccomandano non soltanto di considerare l'età, ma anche le comorbidità, nelle scelte terapeutiche (Goede, 2014a; Baumann, 2014), soprattutto nell'impiego dei nuovi farmaci (Routledge, 2016). Ovviamente, l'impatto prognostico delle comorbidità e del CK nell'era dei nuovi trattamenti dovrà essere validato su serie più ampie di pazienti, e trattati per periodi più lunghi, in quanto in questa casistica i nuovi farmaci erano stati impiegati in un numero limitato di pazienti, a causa della loro recente introduzione in commercio. Sebbene nessuno score di comorbidità fosse stato validato prospetticamente nella LLC, è stato impiegato lo score CIRS, perché era quello più frequentemente utilizzato nei trial clinici (Goede, 2014a). Inoltre, grazie all'impiego di mitogeni più efficaci, il CK sta emergendo come nuovo marcatore prognostico-predittivo associato ad *outcome* peggiore (Rigolin, 2016; Baliakas, 2014; Herling, 2016; Thompson, 2015; Rigolin, 2015; Rigolin, 2012; Blanco, 2016) e a chemiorefrattarietà (Rigolin, 2017b).

2.1.5 Conclusioni

In questo studio è stato mostrato per la prima volta come le comorbidità e il CK si associno a una prognosi peggiore, indipendentemente dal CLL-IPI, suggerendo che questi due parametri possano essere impiegati nella valutazione prognostica del paziente affetto da LLC, al fine di migliorarne la gestione pratica clinica e vagliarne la significatività nei trial clinici sui nuovi farmaci.

2.2 REVISIONE DELLA LETTERATURA:

Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia (Allegato 2)

2.2.1 Razionale dello studio

Il CK ha mostrato un significato prognostico sfavorevole in numerose malattie ematologiche (Döhner, 2017; Strickland, 2017; Greenberg, 2012; Valcarcel, 2011), ma solo recentemente gli è stato riconosciuto un ruolo analogo nella LLC, con numerose pubblicazioni scientifiche sul tema. Queste considerazioni sono state lo stimolo per redigere una revisione della letteratura con l'obiettivo di comprendere le basi biologiche del CK e approfondire il suo valore prognostico – predittivo in relazione ai trattamenti chemioimmunoterapici e ai nuovi farmaci.

2.2.2 Metodi

Il CK era definito dalla presenza di ≥ 3 aberrazioni cromosomiche clonali nello stesso clone, identificate mediante citogenetica convenzionale (Rigolin, 2015). Gli studi che documentavano lesioni cromosomiche multiple in cloni non correlati o con < 3 aberrazioni nello stesso clone sono stati esclusi da questa revisione.

Ricerca in letteratura. In un primo momento è stata eseguita una ricerca controllata su PubMed mediante MeSH, utilizzando i termini: “Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell” [Mesh] AND “Karyotype” [Mesh] OR “Abnormal Karyotype” [Mesh] OR “Karyotyping” [Mesh]. Da questa ricerca sono state estratte 311 citazioni, da cui sono stati selezionati i lavori coi seguenti requisiti: i) lingua inglese; ii) caratterizzazione dei principali parametri clinico-biologici e del cariotipo; iii) studi monocentrici o multicentrici con arruolamento consecutivo; iv) studi di *learning cohort* e *validation cohort*. Seguiva una ricerca di lavori pubblicati tra gennaio 2000 e marzo 2018, che descrivessero il ruolo prognostico del CK nella LLC, mediante l'impiego dei seguenti termini: “Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell/drug therapy” [Mesh] AND “Clinical Trial” [Publication Type]. Infine, venivano incluse solo pubblicazioni complete che mostrassero questi criteri: i) lingua inglese; ii) trial clinici di fase 2 o 3; iii) analisi multivariata e/o univariata che includessero il cariotipo complesso; iv) endpoint che includessero il tempo al primo trattamento (*time to first treatment* – TTFT),

la sopravvivenza libera da progressione (*progression free survival* – PFS) e/o la sopravvivenza globale (*overall survival* – OS).

2.2.3 Risultati

2.2.3.1 Il CK come conseguenza della instabilità genomica.

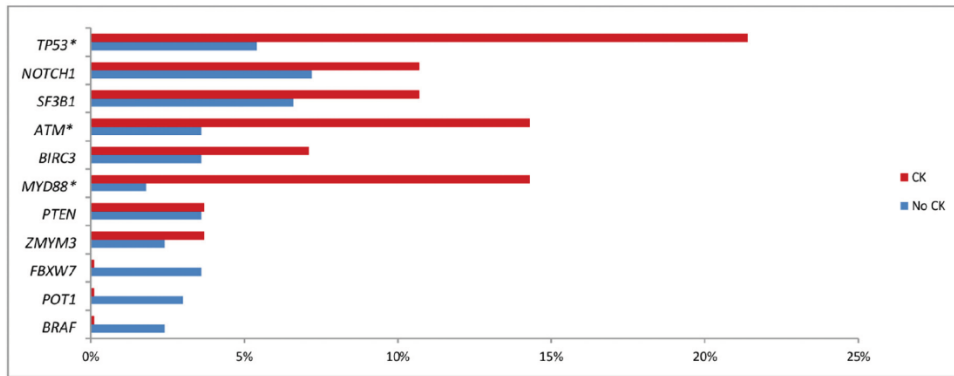
Sino al 90% delle LLC con CK presenta uno stato mutazionale IGHV-U (Haferlach, 2007; Baliakas, 2014; Rigolin, 2017b; Le Bris, 2017), permettendoci di ipotizzare una correlazione tra la configurazione IGHV e lo sviluppo del CK. Diversi studi documentano che i linfociti con stato mutazionale IGHV-U: i) rispondono allo stimolo antigenico attraverso attivazione di vie del segnale intracellulari, ii) vanno incontro a replicazione cellulare *in vivo*, iii) presentano telomeri più corti e, iv) tendono ad accumulare difetti genetici (Chiorazzi, 2012; Martinelli, 2016). Studi di *whole genome sequencing* hanno dimostrato che nei pazienti IGHV-U sono molto più frequenti le mutazioni a carico di geni predisponenti alla instabilità genomica (*NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*, *KLHL6*) rispetto ai pazienti IGHV-M (Burns, 2018). Tali mutazioni potrebbero ridurre la capacità di risposta al danno del DNA, attivare indirettamente la proliferazione cellulare e incrementare l'interazione microambientale aumentando i segnali di sopravvivenza e l'instabilità genomica (Guieze, 2015). Analogamente, anche le aberrazioni di *TP53* sono state associate a un aumentato numero di eventi di rottura cromosomica, in grado di generare cromosomi dicentrici e traslocazioni bilanciate (Thomay, 2017), oltre ad associarsi a telomeri più corti (Thomay, 2017; Roos, 2008; Mansouri, 2013; Steinbrecher, 2018) che inducono instabilità cromosomica (Thomay, 2017; Deng, 2008) e quindi favorendo lo sviluppo del CK. Inoltre, nei pazienti con aberrazioni di *ATM* (*del11q* e/o *ATM^{MUT}*) e CK viene suggerito che la disfunzione della via di controllo del danno al DNA favorisca lo sviluppo di riarrangiamenti cromosomici multipli (Thomay, 2017). Altre mutazioni ad alta frequenza nei pazienti con CK riguardano i geni *FBXW7* (16.7%) (Herling, 2016) e *MYD88* (14.3%)(Rigolin, 2016). Questi geni sono stati correlati alla via di *NOTCH1/WNT* e alla via dell'infiammazione, rispettivamente (Landau, 2015). *FBXW7* codifica per una proteina oncosoppressiva, che regola la degradazione di numerose oncoproteine (ciclina E, *MYC*, *NOTCH*) (Welcker, 2008). Il legame anomalo della ciclina E a *FBXW7* sarebbe correlato alla instabilità cromosomica dei progenitori ematopoietici (Siu, 2014), provvedendo ad un possibile link funzionale per lo sviluppo del CK. La mutazione di *MYD88* potrebbe avere invece un ruolo nel generare instabilità genomica attraverso l'attivazione della via di *RAS/ERK* (Coste, 2010). Infine, uno studio di

Oliveira-Santos et al. ha messo in evidenza il possibile ruolo delle iston-metiltransferasi *SMYD2* (*SET and MYND domain containing 2*) e *SMYD3* (*SET and MYND domain containing 3*) nello sviluppo del CK (*Oliveira-Santos, 2016*). In particolare in questo studio *SMYD2* e *SMYD3* sono risultate iperespresse nei pazienti LLC, ma ipoespresse nei pazienti con CK (*Oliveira-Santos, 2016*). Sebbene il meccanismo che lega queste metiltransferasi al CK sia sconosciuto, è da notare come *SMYD2* possa agire come oncogene promuovendo la metilazione di p53 e di pRB (*Huang, 2006; Cho, 2012*), mentre *SMYD3* promuoverebbe la metilazione di *MAP3K2*, inducendo instabilità genomica attraverso l'attivazione di meccanismi mediati da *Ras/Aurora chinasi A* (*Oliveira-Santos, 2016; Yang, 2013; Lucena-Araujo, 2011*). Sebbene il meccanismo preciso che permette lo sviluppo del CK nella LLC non sia ancora ben definito, le osservazioni fornite in due studi che hanno correlato l'analisi di citogenetica convenzionale a studi di NGS su geni driver di LLC, permettono di evidenziare come il CK sia associato ad un pattern di lesioni genetiche ben distinte rispetto ai pazienti senza CK (figura 2.2.1). Nella figura 2.2.2 è riportata una possibile sequenza di eventi che porterebbe allo sviluppo del CK.

2.2.3.2 Il CK è più frequente nelle LLC con caratteristiche clinico-biologiche sfavorevoli.

I marcatori prognostici sfavorevoli della LLC sono stati identificati attraverso una caratterizzazione biologica dei pazienti arruolati in trial clinici internazionali che impiegavano trattamenti chemioimmunoterapici (*International CLL-IPI Working Group, 2016; Pflug, 2014*). Poiché la valutazione del cariotipo non veniva inclusa in questi studi, è stata impostata un'analisi di correlazione tra il CK e i parametri clinici (stadio, età, sesso, *performance status*) e biologici (aberrazioni di *TP53*, *del11q*, IGHV-U) dotati di un noto significato prognostico in questo setting di trattamento (*International CLL-IPI Working Group, 2016; Pflug, 2014*). Gli studi che includevano il cariotipo e i comuni fattori prognostici clinico-biologici non hanno dimostrato correlazioni significative tra il CK e i parametri clinici sfavorevoli come età, sesso, *performance status* e b2-microglobulina, mentre è risultata ben evidente la correlazione tra il CK e lo stadio avanzato (vedi tabella supplementare 1, allegato 2). Lo stato mutazionale IGHV-U, le aberrazioni di *TP53* o la *del11q*/delezioni *ATM* si sono osservate molto più comunemente nelle LLC con CK, piuttosto che in quelle senza CK (Figura 2.2.3) (*Haferlach, 2007; Baliakas, 2014, Herling, 2016; Rigolin, 2017b; Le Bris, 2017; Rigolin 2015; Thompson, 2015; Gonzalez-Gascon, 2018; Puiggros, 2018*).

A



B

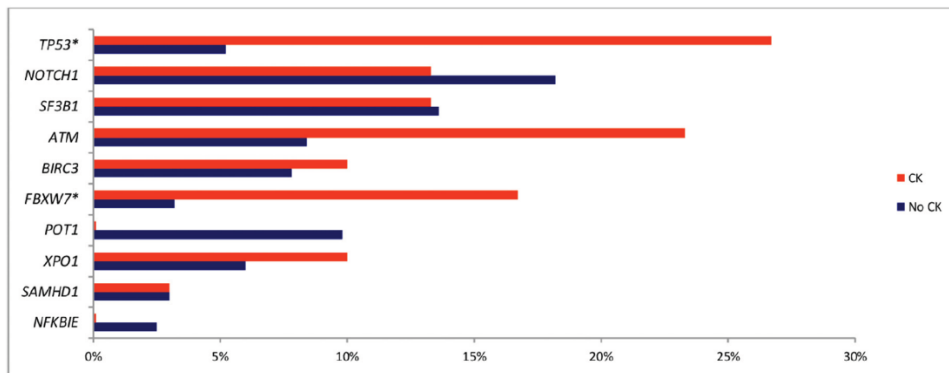


Figura 2.2.1: (A) Frequenze di mutazione genetica all'NGS nei pazienti con o senza CK secondo Rigolin et al (Rigolin, 2017b) **(B)** Frequenze di mutazione genetica all'NGS nei pazienti con o senza CK secondo Rigolin et al (Herling, 2016) * $p < 0.05$

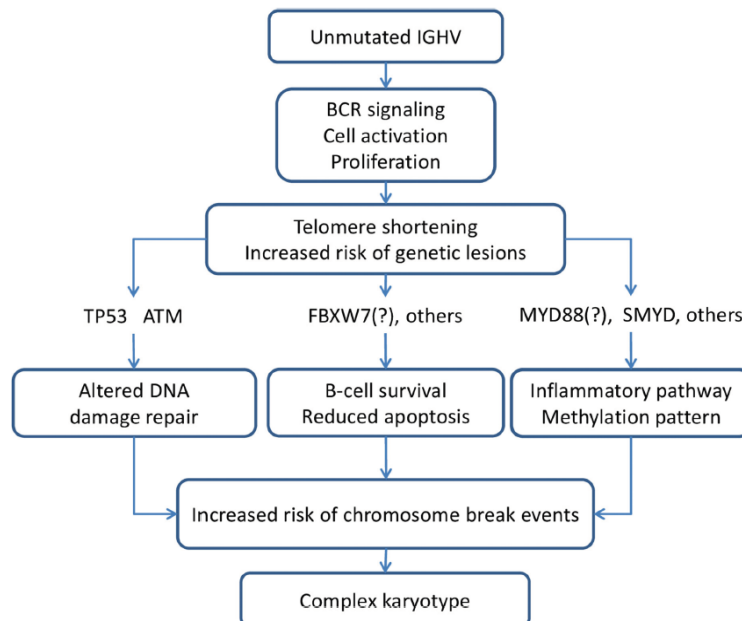


Figura 2.2.2: Il background genetico favorisce lo sviluppo del cariotipo complesso

Attraverso studi di *next generation sequencing* (NGS) è stato identificato un numero significativo di mutazioni a carico di geni driver che si presentano a bassa frequenza allelica nei pazienti LLC, in particolare le mutazioni di *TP53*, *ATM*, *NOTCH1*, ed *SF3B1* si trovano in oltre il 5% dei pazienti mai trattati e sono predittive di una prognosi peggiore (Steinbrecher, 2018; Gaidano, 2017; Nadeu, 2016).

Sono stati quindi valutati i dati disponibili circa l'associazione tra le caratteristiche genetiche e il CK. Diversi studi riportavano una correlazione tra il CK e le mutazioni a carico di *TP53*, *ATM* o IGHV-U (Figura 2.2.3). I risultati di due studi che hanno valutato il CK e studiato le mutazioni in NGS in grandi pannelli di geni LLC-specifici sono mostrati in figura 2.2.2. Globalmente, questi dati mostrano che l'incidenza delle aberrazioni di *TP53* nelle LLC con CK era significativamente più elevata (21-80% dei casi) rispetto ad una popolazione di LLC non selezionate mai trattate (3-13% dei casi) (Haferlach, 2007; Baliakas, 2014; Herling, 2016; Rigolin, 2017b; Le Bris, 2017; Rigolin 2015; Puiggros 2018) o in LLC senza CK. Allo stesso modo è stata osservata un'associazione significativa tra il CK e lo stato mutazionale IGHV-U nella maggior parte degli studi (50-90% dei casi) (Haferlach, 2007; Baliakas, 2014; Herling, 2016; Rigolin, 2017b; Le Bris, 2017; Rigolin 2015; Puiggros 2018) e con *del11q/ATM^{MUT}* (22%-42% dei casi) (Tabella supplementare 1 allegato 2, Figura 2.2.1) (Baliakas, 2014; Rigolin, 2016; Rigolin, 2017b, Le Bris, 2017; Puiggros, 2018). Nello studio clinico CLL11 non è stata invece osservata alcuna associazione tra il CK e IGHV-U, probabilmente a causa di una sovra-rappresentazione dei casi IGHV-U e la conseguente riduzione del numero di casi IGHV-M, che includevano pazienti con progressione di malattia (Herling, 2016). Queste osservazioni non sorprendono, se si pensa che le funzioni di *TP53* e di *ATM* sono coinvolte nel mantenimento della stabilità genomica (Kasthuber, 2017; Blackford, 2017) e che la configurazione IGHV-U identifica un clone CLL responsivo alla stimolazione antigenica del BCR, con conseguente attivazione cellulare (Chiorazzi, 2012; Martinelli, 2016). È stata inoltre analizzata la possibile associazione tra il CK e i marcatori immunofenotipici. In tre studi il CK è stato associato con una positività del CD38 (Baliakas, 2014; Puiggros, 2018) (Tabella supplementare 1, allegato 2). Nessuno studio ha analizzato se il CK fosse associato all'espressione di CD49d, un marcatore immunofenotipico associato a prognosi sfavorevole (Gattei, 2008). Globalmente, i dati qui riassunti mostrano chiaramente come ci sia un'associazione forte e riproducibile tra il CK e lo stadio avanzato, lo stato IGHV-U, le aberrazioni di *TP53* e le mutazioni di *ATM*.

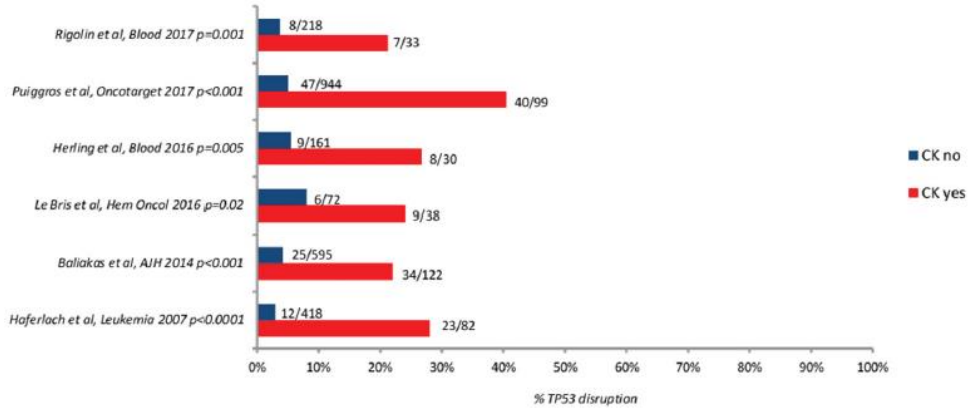
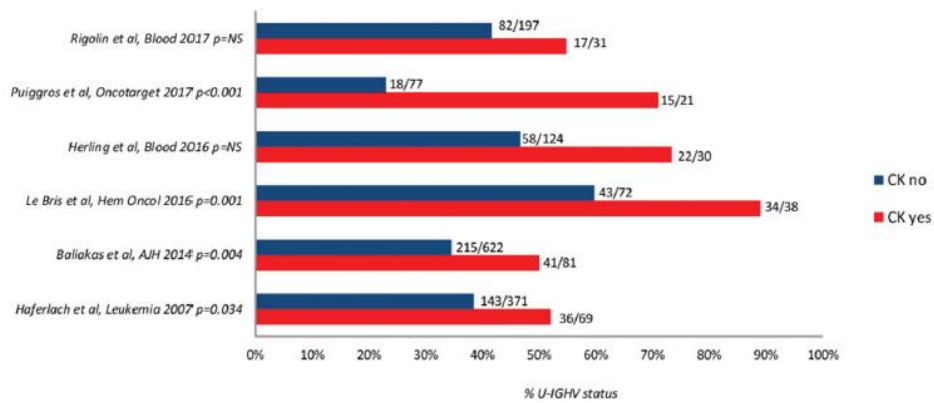
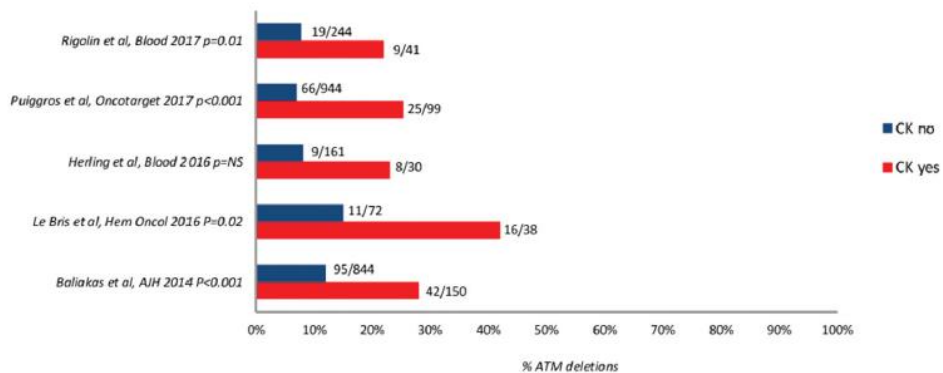
A**B****C**

Figura 2.2.3: Frequenza delle aberrazioni di *TP53* (A), delezioni di *ATM* (B), e *IGHV-U* (C) in relazione alla presenza o assenza del CK. Il numero di casi sono riportati accanto a ciascuna barra. NS: not significant; *UM-IGHV*: unmutated *IGHV*.

2.2.3.3 Il CK è un forte fattore di rischio avverso nell'epoca della chemioimmunoterapia.

Il CK è stato riconosciuto quale fattore prognostico indipendente in numerosi studi che hanno valutato serie complete di biomarcatori ed endpoint robusti ed efficaci come il TTFT, la PFS e la OS.

Impatto sul TTFT. In uno studio monocentrico su 109 pazienti affetti da LLC, il CK si è dimostrato predittivo di un peggiore TTFT all'analisi univariata (TFT mediano 26 mesi; 95% CI, 15-37 mesi vs 106 mesi 95% CI, 61-151 mesi; $P < 0.001$) (Mayr, 2006).

In un altro studio monocentrico, su 482 pazienti affetti da LLC (Haferlach, 2010), il CK è stato associato a TTFT più breve nei pazienti mai trattati, all'analisi univariata (HR 1.644; $P = 0.029$). Riscontri simili sono stati riportati da *Travella et al*, che hanno descritto un TTFT mediano di 13 mesi in pazienti con CK, rispetto ai 69 mesi di TTFT mediano nei pazienti senza CK ($P=0.015$) (Travella, 2013). Queste osservazioni sono state riportate anche in uno studio più ampio su 1001 pazienti mai trattati, in cui il CK era associato a TTFT più breve in analisi univariata ($p=0.01$) e multivariata (Baliakas, 2014). L'impatto prognostico del CK sul TTFT è stato confermato in uno studio successivo in una *learning cohort* (LC), che includeva 166 pazienti, e in una *validation cohort* (VC) indipendente di 250 pazienti (HR 5.004; 95% CI, 1.980-12.597; $P < 0.001$ e HR 2.159; 95% CI, 1.499-5.331; $P < 0.001$, rispettivamente)(Rigolin, 2015). Più recentemente, uno studio su 1045 MBL/LLC mai trattate ha valutato l'impatto del CK e della FISH ad alto rischio (HR-FISH) sulla prognosi (Puiggros, 2018). I casi con CK avevano un'incidenza cumulativa di progressione a 2 anni più elevata (48%; 95% CI, 36-58% vs. 20%; 95%CI, 18-23%; $P < 0.001$) (Puiggros, 2018). Infine, in uno studio monocentrico retrospettivo condotto da *Rigolin et al*, che includeva 335 pazienti affetti da LLC di nuova diagnosi, il CK è stato associato con un TTFT più breve, indipendentemente dal CLL-IPI (HR 2.157; IC 95%, 1.177-3.952; 0.013)(Rigolin, 2017a).

Impatto sulla PFS. La correlazione tra il CK e la PFS è stata studiata in pochi trial clinici con trattamento chemioimmunoterapico (CIT). In uno studio di *Badoux et al*, il CK si è dimostrato predittivo di una PFS più breve in 284 pazienti R/R trattati con FCR (HR 2.6; 95%CI, 1.5-4.4; $P < 0.001$) (Badoux, 2011a). Dati simili sono stati presentati in un altro studio condotto su 80 pazienti R/R, trattati con ciclofosfamide, fludarabina, alemtuzumab, e rituximab (Badoux, 2011b). In questa analisi il CK associato alla *del17p* si associava significativamente con una PFS peggiore (HR 4.1; 95%CI, 2.0-8.4; $P < 0.001$). Allo stesso modo uno studio retrospettivo su 110 pazienti trattati con FCR in prima linea, ha mostrato

che il CK era associato con una PFS mediana più breve (21 vs. 55 mesi; HR 2.4; 95%CI, 1.14-5.19; P=0.002) (Le Bris, 2017). *Herling et al*, hanno descritto l'impatto prognostico del CK in un sottogruppo di pazienti trattati con un regime contenente clorambucile, chemioterapia o chemioimmunoterapia nel trial CLL11 (Herling, 2016). Questo studio ha osservato come le traslocazioni cromosomiche, uno sbilanciamento cromosomico spesso associato al CK, fossero associate ad una PFS più breve (Herling, 2016).

Impatto sulla OS. Come mostrato in tabella 2.2.1, i pazienti con CK mostravano una OS più breve in tutti gli studi osservazionali che includevano pazienti mai trattati, incluso uno studio monocentrico su pazienti trattati con FCR in prima linea (Le Bris, 2017) e un'analisi che utilizzava una *learning cohort* e una *validation cohort* (Rigolin, 2015). Il CK è stato inoltre identificato come fattore prognostico sfavorevole in termini di OS indipendente dal CLL-IPI (Rigolin, 2017a). Nel 2016, *Herling et al*, hanno condotto un'analisi in un sottogruppo di 161 pazienti anziani e comorbidi arruolati nel trial CLL11, che comparava l'efficacia del clorambucile da solo, contro il clorambucile con rituximab o con l'antiCD20 di seconda generazione obinutuzumab. I pazienti inclusi in questa sottoanalisi avevano a disposizione lo studio del cariotipo ed erano rappresentativi dell'intera popolazione che aveva preso parte allo studio, con una elevata percentuale di pazienti con >70 anni (Herling, 2016). In questo sottogruppo il CK era presente nel 19.5% dei casi e rappresentava un fattore prognostico negativo indipendente in termini di OS, insieme allo stadio avanzato, ai livelli elevati di b2-microglobulina, allo stato mutazionale IGHV-U e alla mutazione del gene *POT1* (Herling, 2016). In un trial di fase 2 che valutava clorambucile e rituximab su 85 pazienti mai trattati in precedenza (Foà, 2014), la presenza del CK si associava a un tasso di risposta ridotto e a un minor tasso di remissioni complete, un endpoint surrogato della OS. Inoltre *Takahashi et al.* hanno confermato l'impatto negativo del CK sul tasso di risposta e di OS in uno studio condotto su 186 pazienti R/R trattati con regimi a base di lenalidomide (Takahashi, 2018). Infine, in due trial che includevano LLC R/R il CK è stato significativamente associato a una OS più breve in pazienti trattati con fludarabina, ciclofosfamide e rituximab, con o senza alemtuzumab (Badoux, 2011a, Badoux, 2011b).

Reference	Tot. pts	CK	Treatment	Disease status	Median OS (months)		Univariate analysis		Multivariate analysis	
					CK yes	CK no	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
[20]	109	NA	various	TN and pretreated	107	346	15.44*	<0.001	-	Ø
[38]	482	71/399 (17.8%)	NA	TN	81.1% at 5y	86-94.4% at 5y #	3.830 (1.714-8.560)	0.001	-	Ø
[73]	284	22/182 (12.1%)	FCR	R/R	26	10.5 m. -78 m. ##	-	-	1.9 (1.1-3.2)	0.015
[74]	80	8/67 (11.9%)	CFAR	R/R	NA	NA	-	-	2.0 (1.1-3.7)**	0.022
[72]	38	16/38 (42.1%)	NA	TN	56	144	-	-	-	-
[39]	LC 166 VC 250	20/145 (13.8%) 35/238 (14.7%)	various	TN	NA	NA	2.701 (1.988-3.877) 2.155 (1.160-4.004)	<0.001 0.015	4.856 (1.475-9.998) 3.630 (1.358-9.703)	<0.0001 0.010
[29]	110	38/110 (34.5%)	FCR	TN	72.4% at 5y	85.8% at 5y	-	-	5.16 (1.2-22.1)	0.07
[24]	161	30/154 (19.5%)	Clb/Clb-R/ Clb-G	TN	NA	NA	2.9 (1.5-5.4) ^o 2.6 (1.3-5.4) ^{oo}	0.001 ^o 0.006 ^{oo}	2.682 (1.366-5.264)	0.004
[63] [#]	1045	99/1043 (9.5%)	various	TN	79	NR	-	-	1.66 (1.06-2.59)	0.027
[27]	335	41/287 (14.3%)	various	TN	70	135	3.176 (1.882-5.359)	<0.001	3.572 (1.341-9.515)	0.011
[77]	186	37/186 (19.8%)	Lenalidomide-R Lenalidomide-O	R/R	23	62.8	-	-	2.08 (1.15-3.76)	0.015

TN=treatment naïve; R/R= relapsed/refractory; OS=overall survival; CK=complex karyotype; NA=not available; Clb=chlorambucil; FCR=Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab; G=Obinutuzumab; R= Rituximab; O=Ofatumumab; Ø=not significant; LC: learning cohort; VC: validation cohort
*log rank; **CK or 17p aberration; #all arms; ^o(Clb-R+Clb-G);
[#]MBL/CLL
OS was compared in this study between patients with CK and patients without CK carrying chromosome translocations, or 1-2 aberrations or normal karyotype.
OS in the patients without CK was reported in this study according to the aberration detected by FISH (13q-, +12, 11q-, 17p).

Tabella 2.2.1: impatto del CK sulla OS

2.2.3.4 Il CK è un fattore prognostico negativo nelle LLC ad alto rischio.

L'impatto prognostico negativo del CK è stato osservato anche quando si limitava la valutazione alle LLC ad alto rischio, queste ultime definite dalla presenza di caratteristiche genetiche sfavorevoli (Baliakas, 2014; Herling, 2016; Rigolin, 2017b; Blanco, 2016). Herling *et al* hanno dimostrato che i pazienti con il solo CK mostravano una sopravvivenza simile a quelli con aberrazioni di *TP53*, mentre nei pazienti con CK e aberrazioni di *TP53* si aveva una prognosi particolarmente negativa (P<0.001)(Herling, 2016). In un altro studio su 101 pazienti portatori di anomalie di *TP53*, 31 pazienti (47%) mostravano un CK. Quest'ultimo era associato a una OS più breve alla analisi multivariata (HR 2.47; 95% CI, 1.11–5.49; P=0.027), confermando la sua valenza prognostica negativa in questo sottogruppo aggressivo (Blanco, 2016). In un altro studio su pazienti LLC mai trattati ad alto rischio (definito dalla presenza di IGHV-U e/o dalla presenza di *del11q22* e/o *del17p13* e/o mutazioni di *TP53*), il CK era presente in 21 casi su 101 (20.8%) e si associava a FISH sfavorevole (*del11q* o *del17p*) (P<0.001) e ad anomalie di *TP53* (P=0.012). All'analisi multivariata, il CK era associato a un TTFT più breve (HR 2.934; 95% CI, 1.686-5.108; P<0.001), a una OS inferiore (HR 2.914; 95% CI, 1.080-7.861; P=0.024) ed era

tendenzialmente associato a un tempo alla chemiorefrattarietà più breve (*time to chemorefractoriness* – TTCR) (HR 2.486; 95% CI, 0.905-6.825; P=0.077) (Rigolin, 2017b). Nel sottogruppo di pazienti con aberrazioni di *TP53* e cariotipo sfavorevole, il TTFT mediano era di 5.5 mesi rispetto ai 97.3 mesi dei pazienti con la sola aberrazione di *TP53* (p<0.0001); allo stesso modo, la OS mediana e il TTCR, erano molto più brevi in questo sottogruppo (28.7 mesi e 15 mesi, rispettivamente) rispetto ai pazienti con la sola aberrazione di *TP53* che non raggiungevano la OS mediana (P<0.0001) e mostravano un TTCR di 30 mesi (P<0.0001) (Rigolin, 2017b). Osservazioni simili sono state riportate da *Baliakas et al*, che hanno riscontrato un trend per un TTFT più breve nei pazienti con *del17p* e CK intercorrente, rispetto ai pazienti con la sola *del17p* (P=0.06) (Baliakas, 2014). Infine, *Le Bris et al* hanno riportato una prognosi pessima nei pazienti con anomalie intercorrenti di *TP53*, IGHV-U e CK, con una PFS più breve (12 vs. 55 mesi; HR: 8.1, 95% CI 1.13–57.39; P<0.0001) e una OS più breve (OS a 5 anni: 21.3 ± 18% vs 84.7 ± 8%; HR: 25.7, 95% CI 1.15–574; P < 0.0001), se confrontata coi pazienti senza questa combinazione di fattori di rischio avversi (Le Bris, 2017).

2.2.3.5 Il CK può rappresentare un marcatore prognostico sfavorevole nell'era della target therapy.

Nonostante i nuovi trattamenti abbiano mostrato un'elevata efficacia anche nei pazienti appartenenti a sottogruppi genetici sfavorevoli (U-IGHV, *del17p/TP53* e *del11q*)(O'Brien, 2018; Jones, 2017; Seymour, 2018), numerosi studi hanno dimostrato che il CK può avere un impatto prognostico negativo anche nella LLC R/R, che riceve trattamenti con inibitori del BTK o con anti-BCL2, come riassunto in tabella 2.2.2 (Roberts, 2016, Thompson, 2015; O'Brien, 2018; Kreuzer, 2016; Anderson, 2017). Un'analisi retrospettiva su 88 pazienti R/R che ricevevano trattamenti a base di ibrutinib, ha dimostrato che il CK era un fattore predittivo negativo più forte rispetto alla *del17p* (Thompson, 2015) Il CK e la *del17p* in questo studio erano stati riscontrati in 21/56 (83%) e 34/86 (40%) dei casi accessibili, rispettivamente, mentre coesistevano in 17 casi. A un follow up mediano di 28 mesi (range, 14-48 mesi) il CK era associato a una sopravvivenza libera da eventi (EFS) più breve (HR 6.6; 95% CI, 1.7-25.6; P=0.006) e a una OS inferiore (HR 5.9; 95% CI, 1.6-22.2; P=0.008). Inoltre, era stata osservata la tendenza a una EFS più breve nei pazienti con CK e *del17p* rispetto a quelli con la sola *del17p* (P=0.056), mentre non era stata identificata alcuna correlazione tra *del17p* e OS (P=0.885) (Thompson, 2015). *Brown et al*, hanno analizzato l'impatto

prognostico del CK nello studio di fase 3 RESONATE, che includeva 195 pazienti R/R trattati con ibrutinib. A un follow up mediano di 19 mesi il CK era presente in 39/153 (25%) pazienti valutabili e non mostrava alcun impatto sulla PFS (HR 1.53, 95% CI, 0.741-3.157; P=0.2476) o sulla OS (HR 1.86; 95% CI, 0.770-4.485; P=0.1610) (Brown, 2018). Da notare che ad un follow up a 5 anni di studi di fase 2, il CK era invece associato a una differenza significativa in termini di PFS mediana nelle LLC R/R (31 mesi con CK vs 51 mesi dell'intera coorte), mentre il solo parametro che manteneva il proprio significato avverso in analisi multivariata era la *del17p* (O'Brien, 2018). Il CK e/o la *del17p* potrebbero predisporre alla resistenza a ibrutinib attraverso lo sviluppo della mutazione *BTK* C481S o della mutazione attivante la fosfolipasi $\text{C}\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) (Thompson, 2015; Jain, 2015; Woyach, 2014). Il CK ha mostrato un forte impatto prognostico avverso anche nei pazienti trattati con venetoclax (Anderson, 2017). Su 67 pazienti R/R trattati con l'inibitore di BCL2, 16/38 (42%) avevano il CK. All'analisi univariata il CK era associato ad un rischio più alto di progressione (HR 6.6; 95% CI, 1.5-29.8; P=0.005) insieme allo stato di refrattarietà alla fludarabina (HR 7.01; 95%CI, 1.7-28.5; P=0.002). L'analisi multivariata invece non era stata eseguita per il numero limitato di pazienti arruolati nello studio. È interessante osservare come la presenza del CK aumentasse il rischio di progressione tra i pazienti refrattari a fludarabina (P=0.002), mentre la mutazione di *TP53* e/o *del17p* non mostrassero alcun impatto sul tempo alla progressione (TTP) (Anderson, 2017). Nei pazienti trattati con idelalisib-rituximab, la prognosi non è stata invece influenzata significativamente dalla presenza del CK nell'analisi di Kreuzer *et al*, che ha riportato l'esperienza su 65 pazienti R/R che avevano ricevuto idelalisib-rituximab. A un follow up mediano di 21.4 mesi, 26 pazienti con CK non mostravano una differenza significativa in termini di PFS e OS, se confrontati con 39 pazienti senza CK (Kreuzer, 2016). Per supportare i dati sinora raccolti, e qui riassunti, saranno necessari studi prospettici di validazione, anche se il CK sembrerebbe rappresentare un fattore prognostico negativo anche nei pazienti R/R trattati con i nuovi agenti.

Therapy and patient population	Tot. pts	CK	Median OS (months)		OS		Median PFS (months)		PFS	
			CK yes	CK no	HR (IC 95%)	P	CK yes	CK no	HR (IC 95%)	P
<i>Ibrutinib</i> in R/R CLL [14, 61]	88	21/56 (37.5%)	25	NR	5.9 (1.6-22.2)	0.008	19	39	6.6 (1.7-25.6)*	0.006
	195	39/153 (25.5%)	NR	NR	1.86 (0.770-4.485)	0.161	NR	NR	1.53 (0.741-3.157)	0.248
<i>Idelalisib</i> in R/R CLL [82]	110	26/65 (40%)	NR	NR	1.78 (0.69-4.64)	0.230	20.9	19.4	1.18	0.630
<i>Venetoclax</i> in R/R CLL post KI [83]	67	16/38 (42.1%)	-	-	-	-	16	NR	6.6 (1.5-29.8)**	0.005

R/R relapsed/refractory; OS = overall survival; TTF = time to first treatment; EFS = event free survival; PFS = progression free survival; NR = not reached; *Event Free Survival (EFS); **Time to progression (TTP).

Tabella 2.2.2. Impatto del CK sui pazienti con LLC R/R trattati coi nuovi farmaci

2.2.3.6 Cariotipo complesso e Sindrome di Richter.

Solo sporadicamente il CK è stato correlato alla trasformazione di Richter (RT) (Hébert, 1994; Arranz, 1998; Woroniecka, 2015). In uno studio retrospettivo su pazienti trattati in prima linea con FCR, un quarto dei casi che andavano incontro a RT presentavano un CK (Le Bris, 2017). *Anderson et al* hanno osservato la presenza del CK in 12/25 (48%) pazienti con progressione in corso di terapia con venetoclax, inclusi 8/17 pazienti con RT (47%) (Anderson, 2017). *Rogers et al* hanno studiato il CK in 46 pazienti con RT, osservandone la presenza nel 67% (28/42) dei casi e descrivendone un impatto negativo sulla OS nei pazienti trattati con il regime chemioimmunoterapico R-EPOCH (HR 2.72; CI 95%, 1.14-6.52; P=0.025) (Rogers, 2018). In un'analisi condotta da *Miller et al* è stata osservata un'associazione tra cariotipo simil-tetraploide (4 copie di più cromosomi nella stessa cellula) e il CK, osservando che 6/9 pazienti con questo pattern citogenetico peculiare sviluppavano la RT. In un'analisi multivariata la simil-tetraploidia e il CK sono emerse come fattori predittivi indipendenti di discontinuazione di ibrutinib da RT (Miller, 2017).

I dati riportati in letteratura relativi alla correlazione tra il CK e la RT sono limitati, per cui saranno necessari studi ulteriori per definirne la reale associazione.

2.2.4 Prospettive

L'importanza dell'analisi citogenetica nella LLC è stata riconosciuta dalle linee guida dell'iwCLL 2018 (Hallek, 2018), che hanno proposto l'introduzione dell'analisi sistematica

del cariotipo nei trial clinici, al fine di validare il valore prognostico-predittivo delle anomalie cromosomiche definite mediante citogenetica convenzionale (Hallek, 2018). Gli aspetti che seguono rappresentano un'area di studio che potrebbe facilitare l'introduzione dell'analisi citogenetica nella pratica clinica.

2.2.5 Nuove metodiche di identificazione della complessità cromosomica

Poiché la citogenetica convenzionale è laboriosa, ha una bassa sensibilità e richiede la stimolazione mitotica di cellule vive fresche o congelate, sono state sviluppate metodiche alternative con l'obiettivo di identificare la complessità genomica. Le analisi basate sugli array (CGH/SNP) offrono l'opportunità di studiare il genoma della LLC senza ricorrere all'impiego di mitogeni in vitro, permettendo di identificare perdite o guadagni di materiale genetico (Braggio, 2013). *Leeksma et al* hanno analizzato 1911 pazienti con MBL e LLC mai trattati, osservando che 451/1911 casi (24%) presentavano complessità genomica (≥ 3 aberrazioni strutturali e/o numeriche) (Leeksma, 2017). Questo studio inoltre ha dimostrato che l'analisi degli array è in grado di identificare più anomalie rispetto alla citogenetica convenzionale (2.35 vs 1.84, 95% CI 0.221-0.798) (Leeksma, 2017). Le piattaforme diagnostiche di *whole genome sequencing* (WGS) per l'identificazione delle varianti a singolo nucleotide (SNV) e delle inserzioni/delezioni sono state sviluppate e validate per un potenziale impiego nella pratica clinica (Klintman, 2018). Queste metodiche forniranno probabilmente una caratterizzazione genomica completa della LLC e costituiranno una valida alternativa per l'identificazione di lesioni genetiche dal valore prognostico-predittivo, ma al momento richiedono ancora una standardizzazione e una definizione univoca di "complessità genomica".

Al momento pertanto, la citogenetica convenzionale rappresenta uno strumento standardizzato per la definizione del rischio nella LLC, fornendo informazioni complementari alla FISH e agli studi di genetica tradizionale sulle mutazioni ricorrenti. Poiché i laboratori di citogenetica sono disponibili nella maggior parte dei centri ematologici, e la resa mitotica è stata ampiamente migliorata con i nuovi agenti mitogeni, l'analisi del cariotipo potrà essere inclusa in trial prospettici, per stabilire definitivamente il suo potere predittivo in un'epoca in cui sono disponibili sia la CIT che i nuovi farmaci (Hallek, 2018).

2.3 CONTRIBUTO SPERIMENTALE:

In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics (Allegato 3)

2.3.1 Razionale dello studio

I pazienti con CK possono presentare alterazioni citogenetiche piuttosto variabili, incluse anomalie numeriche (monosomie e trisomie) e strutturali (traslocazioni bilanciate e sbilanciate, cromosomi marcatori o derivativi, isocromosomi, delezioni, inserzioni e addizioni). Non è noto se specifici pattern citogenetici all'interno del CK possano correlare con l'*outcome* clinico, pertanto è stato condotto uno studio per valutare se la presenza di anomalie numeriche o strutturali potessero essere associate con caratteristiche cliniche o biologiche specifiche, nei pazienti affetti da LLC con CK.

2.3.2 Materiali e Metodi

2.3.2.1 Pazienti. Lo studio ha incluso 90 pazienti con LLC mai trattata e CK diagnosticate presso il nostro istituto tra il 2000 e il 2017. Tutti i pazienti avevano ricevuto diagnosi di LLC in accordo ai criteri del National Cancer Institute (Hallek, 2008) e il comitato etico locale aveva approvato lo studio.

2.3.2.2 Analisi citogenetica L'analisi citogenetica era stata condotta su campioni di sangue periferico ed il cariotipo era definito complesso in presenza di almeno 3 aberrazioni cromosomiche nello stesso clone (Rigolin, 2017a). Sono state considerate le seguenti aberrazioni citogenetiche, ciascuna presente in almeno 5 pazienti: monosomie, trisomie, traslocazioni bilanciate, riarrangiamenti sbilanciati (incluse addizioni cromosomiche, derivativi, inserzioni, duplicazioni, cromosomi a anello, dicentrici e marcatori) e la presenza di ≥ 5 anomalie.

2.3.2.3 Stato mutazionale IGHV e analisi di gene expression profile (GEP). I geni IGHV sono stati amplificati a partire da DNA genomico e sequenziati in accordo alle metodiche standard con il *cut-off* del 98% di omologia rispetto alla linea germinale per distinguere le forme mutate (<98%) da quelle non mutate ($\geq 98\%$) (Rigolin, 2015). Le mutazioni dei geni *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* e *TP53* sono state analizzate attraverso l'impiego del sequenziatore

Ion Torrent PGM (Life Technologies, Foster City, CA) (Rigolin, 2016). I dettagli dell'analisi GEP sono riportati nei metodi supplementari (Appendice S1, allegato 3).

2.3.2.4 Analisi statistica. Alle variabili categoriche è stato applicato il test esatto di Fisher. Il tempo al primo trattamento (*time to first treatment* - TTFT) è stato calcolato come l'intervallo tra la diagnosi e l'inizio della prima linea di trattamento. La sopravvivenza globale (*overall survival* - OS) è stata calcolata dalla data della diagnosi sino alla morte dovuta ad ogni causa o sino all'ultimo follow up. Per identificare il significato delle variabili prognostiche indipendenti sul TTFT è stata utilizzata l'analisi di regressione del rischio proporzionale. La stabilità del modello di Cox è stata validata internamente attraverso processo di *bootstrapping* (Rigolin, 2017b). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando Stata 14.0 (Stata Corp., College Station, TX).

2.3.3 Risultati

2.3.3.1 Pazienti ed outcome. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in tabella 2.3.1. L'età mediana era 67.4 anni (range 40–94 anni) e il follow up mediano era di 51.3 mesi. All'analisi univariata (tabella 2.3.2), l'età >65 anni (P=0.007), i riarrangiamenti sbilanciati (P=0.015) e la presenza di ≥ 5 anomalie (P=0.021) erano associati ad una OS inferiore. L'analisi multivariata (tabella 2.3.2) ha confermato l'impatto prognostico negativo sulla OS dell'età >65 anni (P=0.038) e dei riarrangiamenti sbilanciati (P=0.025; Figura S1A, allegato 3). In tabella SI (allegato 3) è riportata una lista delle anomalie cromosomiche e della loro distribuzione, in relazione alla presenza di riarrangiamenti sbilanciati. I pazienti con riarrangiamenti sbilanciati avevano una minore incidenza di *del11q* (P=0.029) e di trisomie (P=0.006), mentre avevano un'incidenza più alta di aberrazioni di *TP53* (P=0.014), monosomie (P=0.004) e di un cariotipo con ≥ 5 anomalie (P=0.003) (tabella 2.3.1). Considerando il TTFT, all'analisi univariata (tabella 2.3.2) lo stadio avanzato secondo Binet (P=0.003), lo stato mutazionale IGHV-U (P=0.009) e i riarrangiamenti sbilanciati (P=0.018; Figura S1B, allegato 3) si associavano ad *outcome* peggiore. All'analisi multivariata (tabella 2.3.2), lo stadio avanzato (P=0.001), lo stato mutazionale IGHV-U (P=0.034) e i riarrangiamenti sbilanciati (P=0.043) mantenevano il loro impatto prognostico negativo sul TTFT.

2.3.3.2 Gene expression profiling (GEP). L'analisi dei profili di espressione degli mRNA di 23 pazienti con (n=11) e senza (n=12) riarrangiamenti sbilanciati ha identificato 160 geni espressi in modo differente ($P < 0.1$, *fold change cut-off* > 2.0). I casi analizzati erano rappresentativi dell'intera serie in termine di età, stadio, TTFT e sopravvivenza. In tabella S2 (allegato 3) è riportata una lista dei principali geni con pathways up- e down-regolati. Utilizzando questo set di geni è stata osservata una netta separazione nei campioni analizzati (Figura S2, allegato 3). In figura S3 (allegato 3) è riportata una *heat-map* dell'espressione dei 30 geni espressi modo differente tra pazienti con e senza riarrangiamenti sbilanciati. Tra gli mRNA espressi in modo differenziale, c'erano due geni coinvolti nella risposta al danno del DNA e nella regolazione ciclo cellulare.

Variable	Number of patients (%)	Unbalanced rearrangements		P
		Number of patients (%)		
		No	Yes	
Age $\leq 65 / > 65$ years	43/47 (47-8/52-2)	13/11 (54-2/45-8)	30/36 (45-5/54-5)	0-485
Gender male/female	58/32 (64-4/35-6)	16/8 (66-7/33-3)	42/24 (63-6/36-4)	1-000
Binet Stage A/B-C	63/27 (70-0/30-0)	19/5 (79-2/20-8)	44/22 (66-7/33-3)	0-306
CD38 negative/positive (cut-off 30%)	46/42 (52-3/47-7)	13/11 (54-2/45-8)	33/31 (51-6/48-4)	1-000
ZAP70 negative/positive (cut-off 30%)	36/24 (60-0/40-0)	11/3 (78-6/21-4)	25/21 (54-4/45-6)	0-130
IGHV mutated/unmutated	21/39 (35-0/65-0)	7/8 (46-7/53-3)	14/31 (31-1/68-9)	0-352
11q deletion yes/no	24/66 (26-7/73-3)	11/13 (54-2/45-8)	13/53 (80-3/19-7)	0-029
TP53 aberration yes/no	28/42 (40-0/60-0)	3/16 (15-8/84-2)	25/26 (49-0/51-0)	0-014
NOTCH1 mutated/wild type	5/41 (10-9/89-1)	2/12 (14-3/85-7)	3/29 (9-4/90-6)	0-633
SF3B1 mutated/wild type	6/31 (16-2/83-8)	2/11 (15-4/84-6)	4/20 (16-7/83-3)	1-000
BIRC3 mutated/wild type	2/35 (5-4/94-6)	1/12 (7-7/92-3)	1/23 (4-2/95-8)	1-000
Monosomies yes/no	42/48 (46-7/53-3)	5/19 (20-8/79-2)	37/29 (56-1/43-9)	0-004
Trisomies yes/no	34/56 (37-8/62-2)	15/9 (62-5/37-5)	19/47 (28-8/71-2)	0-006
Deletions yes/no	68/22 (75-6/24-4)	19/5 (79-2/20-8)	49/17 (74-2/25-8)	0-784
Balanced translocations yes/no	30/60 (33-3/66-7)	12/12 (50-0/50-0)	18/48 (27-3/72-7)	0-075
Unbalanced rearrangements yes/no	66/24 (73-3/26-7)	na	na	na
≥ 5 abnormalities yes/no	35/55 (38-9/61-1)	3/21 (12-5/87-5)	32/34 (48-5/51-5)	0-003

na, not applicable.

Tabella 2.3.1: caratteristiche clinico-biologiche di 90 pazienti con CK in accordo ai riarrangiamenti sbilanciati

2.3.4 Discussione

Il CK si riscontra nel 10-15% delle LLC (Baliakas, 2014; Rigolin, 2015) ed è stato associato a un *outcome* inferiore quando è presente alla diagnosi (Baliakas, 2014; Rigolin, 2017a), alla progressione di malattia (Herling, 2016) o in pazienti recidivi/refrattari trattati con ibrutinib (Thompson, 2015) o venetoclax (Anderson, 2017). È interessante osservare come nelle LLC ad alto rischio (Rigolin, 2017b), l'impatto prognostico del CK fosse indipendente dallo stato mutazionale di *TP53*, mentre mostrasse un significato prognostico negativo più forte rispetto a *TP53* nella LLC R/R trattata coi nuovi farmaci (Thompson, 2015; Anderson, 2017). In questo studio è stato osservato che nei pazienti con CK, i riarrangiamenti sbilanciati erano associati in maniera indipendente a una OS e a un TTFT peggiori e identificavano un

subset di pazienti con caratteristiche distinte, inclusa una minor incidenza di *del11q* e una incidenza più alta di aberrazioni di *TP53*. Inoltre, l'impatto prognostico negativo dei riarrangiamenti sbilanciati era indipendente dallo stato mutazionale di *TP53*.

Overall survival	Univariate analysis		Multivariate analysis (n = 90)			
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	Bootstrap	
					HR (95% CI)	P
Age >65 vs. ≤65 years	2.553 (1.291–5.049)	0.007	2.126 (1.043–4.331)	0.038	2.126 (1.133–3.987)	0.019
Binet Stage B-C vs. A	1.243 (0.900–1.717)	0.187	–	–	–	–
<i>IGHV</i> unmutated vs. mutated	1.305 (0.530–3.215)	0.652	–	–	–	–
<i>TP53</i> aberrations yes vs. no	1.134 (0.533–2.412)	0.744	–	–	–	–
CD38 positive vs. negative	1.847 (0.923–3.696)	0.083	–	–	–	–
ZAP70 positive vs. negative	1.388 (0.658–2.929)	0.390	–	–	–	–
Del11q yes vs. no	1.123 (0.564–2.237)	0.741	–	–	–	–
Unbalanced rearrangements yes vs. no	2.948 (1.237–7.029)	0.015	2.797 (1.135–6.897)	0.025	2.797 (1.159–6.753)	0.022
Deletions yes/no	0.811 (0.363–1.815)	0.612	–	–	–	–
Monosomies yes/no	1.420 (0.742–2.718)	0.290	–	–	–	–
≥5 abnormalities yes/no	2.131 (1.120–4.055)	0.021	0.716 (0.364–1.409)	0.334	0.716 (0.356–1.442)	0.350
Trisomies yes/no	0.717 (0.366–1.406)	0.334	–	–	–	–
Balanced translocations yes/no	0.881 (0.453–1.711)	0.708	–	–	–	–

Time to first treatment	Univariate analysis		Multivariate analysis (n = 60)			
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	Bootstrap	
					HR (95% CI)	P
Age >65 vs. ≤65 years	0.950 (0.579–1.559)	0.841	–	–	–	–
Binet Stage B-C vs. A	1.493 (1.148–1.942)	0.003	1.851 (1.305–2.627)	0.001	1.851 (1.305–2.627)	0.001
<i>IGHV</i> unmutated vs. mutated	2.624 (1.269–5.426)	0.009	2.238 (1.062–4.718)	0.034	1.911 (1.062–4.718)	0.034
<i>TP53</i> aberrations yes vs. no	1.382 (0.800–2.388)	0.246	–	–	–	–
CD38 positive vs. negative	1.304 (0.789–2.155)	0.300	–	–	–	–
ZAP70 positive vs. negative	1.128 (0.603–2.113)	0.705	–	–	–	–
Del11q yes vs. no	1.156 (0.662–2.020)	0.609	–	–	–	–
Unbalanced rearrangements yes vs. no	2.007 (1.124–3.582)	0.018	2.375 (1.027–5.492)	0.043	2.375 (1.027–5.492)	0.043

HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

Tabella 2.3.2: analisi univariata e multivariata per OS e TTFT

Nei pazienti con LLC la citogenetica convenzionale con i nuovi mitogeni rappresenta uno strumento valido per una maggiore definizione prognostica. Permette l'identificazione di anomalie non riscontrabili attraverso la FISH (*fluorescence in situ hybridization*) (Rigolin, 2015), ma anche di lesioni numeriche e strutturali che possano predire una prognosi peggiore (Haferlach, 2007; Rigolin, 2012; Baliakas, 2014). In questo studio è stata inoltre osservato che la presenza di riarrangiamenti sbilanciati era associata a un profilo di espressione di mRNA ben distinto, associato a una disregolazione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e della risposta al danno del DNA. Tra questi *TRPM4*, *RASGRF1*, *CTTNBP2* e *SLAMF1* potrebbero essere di interesse clinico, poiché potrebbero avere potenziali risvolti terapeutici. *TRPM4* (*transient receptor potential channel melastatin 4*) è un canale ionico che gioca un ruolo cruciale nel controllo del potenziale di membrane, che sta alla base della regolazione del ciclo cellulare, della replicazione del DNA, della trasduzione del segnale intracellulare e della risposta infiammatoria. *TRPM4* si riscontra

up-regolata nel linfoma B diffuso a grandi cellule, dove si associa a un *outcome* clinico significativamente peggiore (Loo, 2017). RASGRF1 è un fattore di scambio guaninico che gioca un ruolo nel signalling del BCR ed è stato riscontrato overespresso nella LLC; la sua attivazione viene bloccata dagli inibitori del BTK (Liao, 2014). *CTTNBP2* (cortactin binding protein 2) è una proteina legante l'actina ed un substrato di Lyn, up-regolata nella LLC; correla ad una prognosi negativa, suggerendo che questa proteina possa essere rilevante nella patogenesi e nell'aggressività della malattia (Martini, 2017).

Infine, i livelli ridotti di *SLAMF1* sono stati associati a marcatori molecolari e clinici di prognosi sfavorevole. *SLAMF1* è coinvolto in numerose vie di segnale correlate alla migrazione cellulare, all'organizzazione citoscheletrica e alla formazione di vescicole intracellulari. La perdita dell'espressione di *SLAMF1* potrebbe impattare sulla risposta ad agenti terapeutici, come la fludarabina e i BH3 mimetici, ABT-737 (Bologna, 2016).

2.3.5 Conclusioni

In conclusione è stato osservato che i pazienti LLC con riarrangiamenti sbilanciati rappresentano un sottogruppo di pazienti a rischio molto elevato con caratteristiche cliniche e biologiche distinte. Questi pazienti dovrebbero essere identificati al momento del trattamento e dovrebbero essere considerati in prima linea per trattamenti alternative, incluse combinazioni di nuovi agenti.

2.4 CONTRIBUTO SPERIMENTALE:

Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact (Baliakas, 2019)

2.4.1 Razionale dello studio

Nel 2018 l'*international workshop on CLL* (iwCLL) ha aggiornato le linee guida per la diagnosi, la prognosi e il trattamento della LLC, indicando la necessità di utilizzare le indagini di citogenetica convenzionale nell'ambito dei trial clinici, ed auspicabilmente nella pratica clinica, alla condizione che sia disponibile una metodica consolidata (Hallek, 2018). Poiché l'applicabilità su larga scala della determinazione del cariotipo è spesso difficoltosa, è stato necessario mettere a punto definizioni rigorose che fossero fruibili da tutti i centri ematologici. Alla luce di queste osservazioni abbiamo partecipato col nostro istituto ad un ambizioso studio multicentrico retrospettivo europeo, nell'ambito del gruppo ERIC (*European Research Initiative on CLL*), con l'obiettivo di fornire alcune indicazioni dettagliate circa la definizione e il significato della complessità citogenetica (Baliakas, 2019).

2.4.2 Pazienti e Metodi

2.4.2.1 Pazienti. Sono stati inclusi 5479 pazienti affetti da LLC (n=5082 [93%]) e da MBL a "conta elevata" (Swerdlow, 2016)(n=397 [7%]) provenienti da 17 istituti Europei in cui fossero disponibili dati di citogenetica convenzionale. Il 3% dei pazienti (n=189) è stato escluso per l'assenza di un numero adeguato di metafasi (vedi oltre). L'analisi del cariotipo doveva essere stata condotta entro un anno dalla diagnosi e prima della somministrazione di qualsiasi trattamento in 4402 pazienti (85%) su 5179 e in 4499 pazienti (92%) su 4868, rispettivamente. Lo studio è stato condotto nel rispetto dei regolamenti etici nazionali ed internazionali, e dopo l'approvazione dei comitati etici locali. In tabella 2.4.1 sono riassunte le caratteristiche dei pazienti arruolati.

2.4.2.2 Analisi citogenetica. I protocolli di stimolazione delle metafasi erano basati su procedure standard, che prevedevano sia impiego del TPA (forbolo-12-miristato-13acetato) (n=2631[50%]) sia l'impiego del CpG-DSP30 + IL-2 (n=2659 [50%]) (Baliakas, 2014; Haferlach, 2011; Blanco, 2016; Dicker, 2006). Le alterazioni del cariotipo sono state descritte in accordo al sistema internazionale per la nomenclatura citogenetica umana del 2016 (ISCN, 2016). Il cariotipo era definito normale dopo la valutazione di almeno 15 metafasi, mentre per essere definito anomalo dovevano essere valutate almeno 10 metafasi. In caso di riscontro

di singola anomalia citogenetica era stata eseguita valutazione di conferma mediante FISH. Il CK era definito dalla presenza di ≥ 3 anomalie nello stesso clone (Peterson, 2017; Slovak, 2000). Le indagini FISH sono state condotte in 4766 casi (90%) utilizzando sonde per le regioni 13q14, 11q22 (*ATM*), e 17p13 (*TP53*) e per la trisomia 12 (*CEP 12*).

Feature	Entire cohort (n = 5290)	Non-CK (0-2 abs; n = 4496)	CK ≥ 3 abs (n = 794)	Low-CK/intermediate-CK (3-4 abs; n = 523)	High-CK (≥ 5 abs; n = 271)	P, non-CK vs CK	P, low-CK/intermediate-CK vs high-CK
Male	3302/5290, 62%	2790/4496, 62%	522/794, 66%	351/523, 67%	171/271, 63%	.047	.56
Median age (diagnosis)	64.6 y	64.3 y	64.7 y	64.2 y	66.1 y	.58	.02
MBL	383/4454, 9%	353/3813, 9%	30/641, 5%	27/412, 7%	3/229, 1%	.0001	.004
Binet A	3030/4454, 68%	2643/3813, 69%	387/641, 60%	263/412, 64%	124/229, 54%	<.0001	.017
Binet B/C	1041/4454, 23%	817/3813, 22%	224/641, 35%	122/412, 29%	102/229, 45%	<.0001	.0002
U-CLL	1514/3453, 44%	1187/2939, 40%	327/514, 64%	201/351, 57%	126/163, 77%	<.0001	<.0001
TP53abs	657/4968, 13%	337/4204, 8%	320/764, 42%	151/501, 30%	169/263, 64%	<.0001	<.0001
del(11q)	487/4500, 11%	353/3714, 9%	165/622, 26%	119/413, 29%	46/209, 22%	<.0001	.07
Trisomy 12	685/4500, 15%	557/3714, 15%	150/622, 24%	117/413, 28%	33/209, 16%	<.0001	.0005
idel(13q)	1734/4500, 38%	1621/3714, 44%	113/622, 18%	86/413, 21%	27/209, 13%	<.0001	<.0001

Il livello statisticamente significativo è stato definito allo 0.008 seguendo la correzione di Bonferroni per i test multipli. abs, anomalie; CK, ≥ 3 anomalie; low-CK, 3 anomalie; intermediate-CK, 4 anomalie; high-CK, ≥ 5 anomalie; MBL, linfocitosi B monoclonale; TP53abs=del17p e/o mutazione TP53; del(11q), idel(13q)=delezione isolata del cromosoma 13q.

Tabella 2.4.1. Principali caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti arruolati nello studio.

2.4.2.3 Analisi immunogenetica. L'amplificazione del riarrangiamento del gene IGHV era stata eseguita nel 65% dei pazienti (Agathangelidis, 2012). I geni IGHV sono stati amplificati a partire da DNA genomico e sequenziati in accordo alle metodiche standard con il cut-off del 98% di omologia rispetto alla linea germinale per distinguere le forme mutate (<98%) da quelle non mutate ($\geq 98\%$) (Rigolin, 2015).

2.4.2.4 Analisi dello stato mutazionale di TP53. Lo screening mutazionale del gene *TP53* includeva gli esoni 4-8, e in alcuni centri anche gli esoni 9-10. Il dato era disponibile in 2861 casi (54%) su 5290, ovvero prevalentemente in coloro che erano risultati negativi per la *del17p* all'analisi FISH (n=2482). Nel 70% dei casi, *TP53* era stato analizzato mediante sequenziamento *Sanger*, mentre nel restante 30% erano state impiegate metodiche di *next generation sequencing* (NGS) con cut-off di frequenza di variazione allelica $>10\%$ (Malcikova, 2018). Il tasso di identificazione delle mutazioni di *TP53* era risultato simile indipendentemente dalla metodica impiegata (21% e 26% rispettivamente con NGS e *Sanger*, rispettivamente; P=0.15).

2.4.2.5 Analisi statistica. La statistica descrittiva per i parametri discreti includeva la distribuzione di frequenza; per le variabili quantitative, le misure statistiche includevano la mediana, la deviazione standard ed un valore minimo-massimo. L'*endpoint* di questo studio era l'OS, calcolata dalla data di esecuzione dell'analisi citogenetica alla data di morte o

dell'ultimo follow up. L'impatto del cariotipo sul TTFT nei pazienti con malattia in stadio precoce è riportato in uno studio precedente (Baliakas, 2014). Le curve di sopravvivenza sono state costruite mediante il metodo di Kaplan-Meier ed il test log-rank è stato utilizzato per determinare le differenze tra le proporzioni di sopravvivenza. Il modello di regressione di Cox univariata è stata impiegata per definire il significato prognostico del cariotipo e degli altri fattori prognostici nell'impatto sulla sopravvivenza. Il modello di regressione di Cox multivariata è stato implementato per testare gli effetti simultanei dei restanti parametri. Per l'analisi multivariata sono stati considerati solo i casi con la disponibilità dei dati di tutti i fattori inclusi nel modello (n=2376), per evitare di introdurre bias. Nonostante questa analisi parziale, non sono state osservate differenze maggiori tra l'intera serie e la porzione di casi inclusi nell'analisi multivariata. L'analisi di sopravvivenza è stata eseguita con un livello di significatività del 5%; per la statistica descrittiva il livello di significatività statistica è stato ottenuto mediante la correzione di Bonferroni per i test multipli. Tutte le analisi sono state eseguite mediante il Software Statistica versione 10.0 (StatSoft, Inc.).

2.4.3 Risultati

2.4.3.1 CK nella LLC: caratteristiche principali ed associazioni. Secondo la definizione corrente di CK (≥ 3 lesioni strutturali e/o numeriche), il CK è stato identificato in 794 pazienti (15%) su 5290 in accordo con quanto riportato in precedenza in una serie di pazienti valutati in prossimità della diagnosi (Baliakas, 2014).

Il CK si associava in modo significativo allo stadio clinico, alla presenza di aberrazioni di *TP53*, a IGHV-U, alla *del11q* e alla +12, oltre ad una bassa prevalenza di *del13q* isolata (*idel13q*) identificate mediante tecniche FISH ($P < 0.008$ per tutti i confronti vs casi non-CK) (Tabella 2.3.1). Lo stesso riscontro si è osservato anche nelle MBL (30 su 383 [8%]). Il CK è stato identificato più frequentemente quando veniva utilizzata la stimolazione CpG/IL2 rispetto al TPA (508 su 2659 [19%] vs 286 su 2630 [11%]; $P < 0.001$). Questa differenza potrebbe essere attribuita alla migliore resa documentata della stimolazione con CpG/IL-2 rispetto al TPA (Haferlach, 2011; Put, 2009). Complessivamente sono stati riscontrate anomalie del cariotipo diverse dalla *idel13q* nel 55% e 43% dei casi rispettivamente con CpG/IL-2 e TPA. I casi analizzati col metodo CpG/IL-2 presentavano più frequentemente aberrazioni di *TP53* (16% vs 10% [$P = 0.0001$] vs protocollo di stimolazione con TPA). Relativamente all'impatto clinico, il CK era associato ad una OS più breve (OS mediana, 6.9 anni; quartile inferiore -

quartile superiore [LQ-UQ], 2.5-18.2 anni; $P < 0.0001$) (figura 2.4.1A). Questa osservazione manteneva un significato indipendente anche all'analisi multivariata (hazard ratio [HR], 1.578; 95% intervallo di confidenza [CI], 1.267-1.966; $P < 0.001$) associata con uno stadio avanzato, anomalie di *TP53*, stato mutazionale IGHV-U. È stato osservato analogamente ad altri studi come il CK si possa riscontrare anche in casi con *idel13q* o con FISH normale [FISH-normale/*idel(13q)*], identificando i casi a prognosi peggiore tra i pazienti definiti a "FISH favorevole" (Baliakas, 2014; Haferlach, 2007; Haferlach, 2010). In questa serie di pazienti, 159 (5%) su 2963 con FISH-normale/*idel13q* erano portatori di CK con una incidenza maggiore di CK nel sottogruppo *idel13q* [*idel13q*, 113 of 1746 (6.4%); FISH-normale, 46 su 1229 (3.7%); $P < 0.001$]. Questi casi mostravano una OS significativamente inferiore rispetto ai casi FISH-normale/*idel13q* senza complessità citogenetica (0-2 anomalie in citogenetica convenzionale) (OS mediana di 7.88 anni [LQ-UQ, 3.5-12.74 anni] vs una OS mediana di 13.7 anni [LQ-UQ, 7.5-20.1], rispettivamente; $P = 0.002$) (figura 2.4.1B). È interessante osservare come la grande maggioranza dei pazienti con FISH-normale/*idel13q* con CK non presentassero mutazioni di *TP53* (100 [87%] su 115 casi con dati disponibili).

2.4.3.2 Il cariotipo complesso non è sempre sfavorevole: il caso delle LLC +12, +19. Come riportato in precedenza in letteratura la contemporanea presenza di +12 e +19 definisce un sottogruppo di LLC con delle caratteristiche clinico-biologiche ben definite, inclusa l'espressione costante dell'isotipo IgG lambda delle immunoglobuline, un'elevata prevalenza di positività del CD38 e intercorrente gammopatia monoclonale, una bassa prevalenza di aberrazioni di *TP53* e un impiego quasi esclusivo di IGHV-M (Ibbotson, 2012; Sellmann, 2007; Baliakas, 2016). Inoltre, in questi casi, in genere sono presenti delle ulteriori trisomie, prevalentemente +18, ma anche anomalie strutturali, per cui spesso soddisfano i criteri per essere inquadrati come CK; in realtà essi mostrano un andamento clinico molto più indolente rispetto ai casi con la trisomia 12 isolata. In questa serie di pazienti sono stati identificati 81 casi di CK con +12, +19 (10% di tutti i CK) che presentavano sia trisomie extra ($n=43$) sia anomalie strutturali ($n=38$). Tra questi due sottogruppi non è stata osservata alcuna differenza in termini di caratteristiche demografiche/biologiche o in termini di *outcome* clinico. È interessante notare come i CK appartenenti alla variante +12, +19 presentassero una OS significativamente più lunga (OS mediana non raggiunta [NR]) rispetto alle LLC con CK (OS mediana, 6.2 anni; LQ-UQ, 2.2-14.4 anni; $P < 0.001$), ma anche rispetto alle altre forme di LLC (OS mediana, 11.1 anni; LQ-UQ, 6.1-17.3 anni; $P < 0.0001$) (Figura 2.4.1C). Quindi, questo profilo identificherebbe un sottogruppo che, nonostante sia

formalmente considerato un CK, mostra un decorso estremamente indolente con soli 7 morti su 81 casi. Questo vantaggio di sopravvivenza dei CK +12, +19 rispetto alle altre LLC con CK veniva mantenuto anche quando l'analisi veniva ristretta ai soli casi IGHV-M (OS mediana +12, +19 CK, NR; OS mediana CK/IGHV-M, 9.24 anni [LQ-UQ, 4.9-NR], rispettivamente; $P < 0.02$) (Figura 2.4.1D).

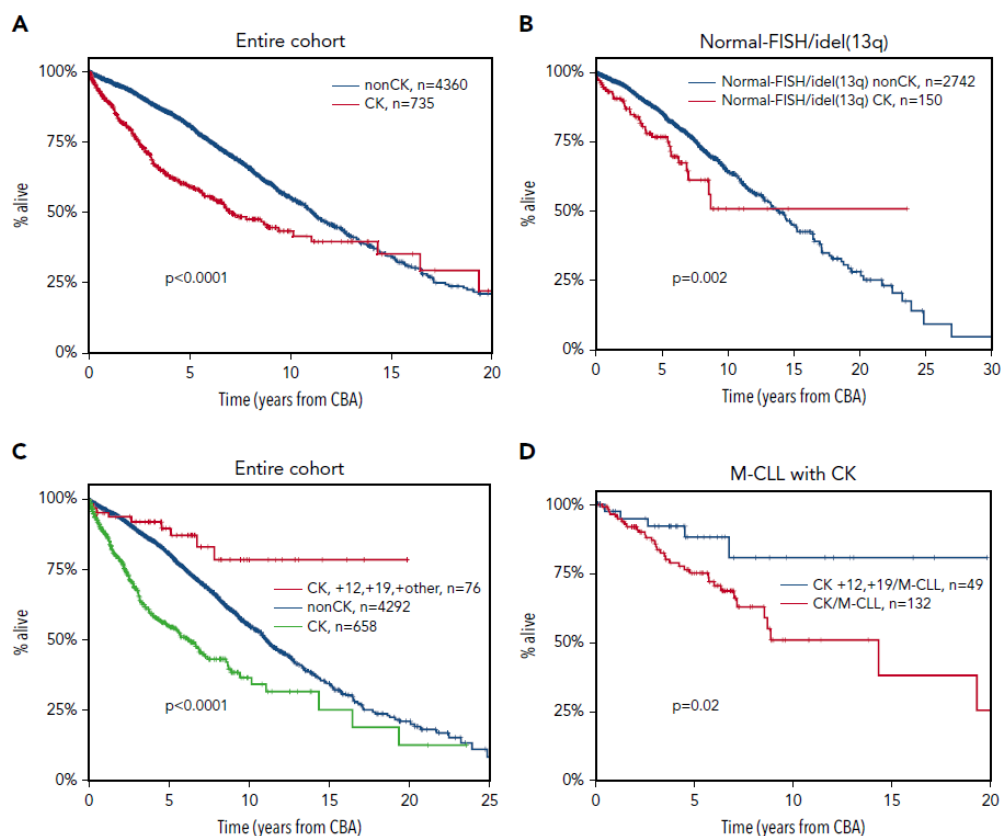


Figura 2.4.1. Curve di Kaplan-Meier per la OS

2.4.3.3 Non tutti i CK sono uguali: alta complessità e bassa complessità

I dati pubblicati suggeriscono che tra i casi con CK, quelli con ≥ 5 anomalie possono mostrare un *outcome* peggiore rispetto a quelli con 3 o 4 anomalie (Baliakas, 2014; Jaglowski, 2012), tuttavia i dati a disposizione sono sempre stati piuttosto contenuti limitando conclusioni attendibili a riguardo. Al fine di ottenere informazioni conclusive, in questo studio i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi, a seconda che presentassero 3 ($n=355$ [45%]), 4 ($n=168$ [21%]), o ≥ 5 ($n=271$ [34%]) anomalie. Questi sottogruppi sono stati definiti a bassa, intermedia o elevata complessità del cariotipo (*low-CK*, *intermediate-CK*, e *high-CK*), rispettivamente. I casi *high-CK* presentavano frequentemente aberrazioni di *TP53* e stato mutazionale IGHV-U, presenti nel 65% e 76% dei casi rispettivamente ($P < 0.001$ rispetto a *low-CK* e *intermediate-CK*) (figura 2.4.2A), mentre i casi *low-CK* e *intermediate-CK*

mostravano profili demografici e biologici simili. Sulla base di questa osservazione alcuni lavori indipendenti (Rossi, 2014; Nadeu, 2016), alludendo al significato dei piccoli cloni *TP53* mutati identificabili mediante tecniche NGS, hanno studiato se i casi *high-CK* senza aberrazioni di *TP53* potessero avere piccoli cloni, utilizzando tecniche di NGS con *cut-off* del 2%. Dei 25 casi analizzati nessuno presentava piccoli cloni *TP53* mutati. Inoltre i casi con *low-CK* e *intermediate-CK* mostravano una distribuzione simile delle regioni cromosomiche aberranti con forme “CLL-ricorrenti” predominanti; per contro i casi *high-CK* mostravano un più ampio spettro di aberrazioni, che coinvolgevano quasi tutti i cromosomi (Figura 2.4.3), indipendentemente dallo stato di *TP53*. In linea con le precedenti osservazioni riguardo la presenza di casi FISH-normale/*idel13q* con CK (Baliakas, 2014; Haferlach, 2007), questi casi sono stati riscontrati nel 30%, 28%, e 21% dei casi *low-CK*, *intermediate-CK*, e *high-CK*, rispettivamente (figura 2.4.2A). In questi casi, le forme *high-CK* mostravano una OS significativamente inferiore (OS mediana, 3.1 anni; LQ-UQ, 1.3-8.3 anni; $P < 0.001$) sia rispetto ai casi *low-CK* sia rispetto ai casi *intermediate-CK* (OS mediana per *low-CK* e *intermediate-CK*, 12.3 e 7.25 anni; LQ-UQ, 5.1-18.1 e 3.75-NR, rispettivamente; $P = 0.04$ tra *low-CK* e *intermediate-CK*) (figura 2.4.2B). Il pessimo *outcome* dei casi *high-CK* rispetto ai casi *intermediate-CK* e *low-CK* si è confermato anche nei casi senza aberrazioni di *TP53* (OS mediana, 5.1 anni; LQ-UQ, 1.8-8.9 anni; $P < 0.0001$) (figura 2.4.2C). Per contro, non è stata rilevata alcuna differenza tra i *low-CK* o gli *intermediate-CK* rispetto ai casi rimanenti senza CK o senza aberrazioni di *TP53* (OS mediana, 14.8 anni, NR, e 11.8 anni; LQ-UQ, 6.7-19.1 anni, 4.3 anni-NR, e 6.7-17.9 anni, rispettivamente; $P = 0.27$). Quando l’analisi è stata ristretta ai casi con anomalie di *TP53*, i casi *high-CK* mostravano la OS più breve quando confrontati coi casi *intermediate-* e *low-CK* (OS mediana, 2.5, 3.1, e 5 anni, rispettivamente; $P = 0.004$) (figura 2.4.2D), suggerendo come un background genetico complesso aggravi l’*outcome* già sfavorevole dei casi con aberrazioni di *TP53*. I casi rimanenti non-CK, portatori di *TP53* mostrano una OS mediana di 6.6 anni (LQ-UQ, 3.2 anni-NR).

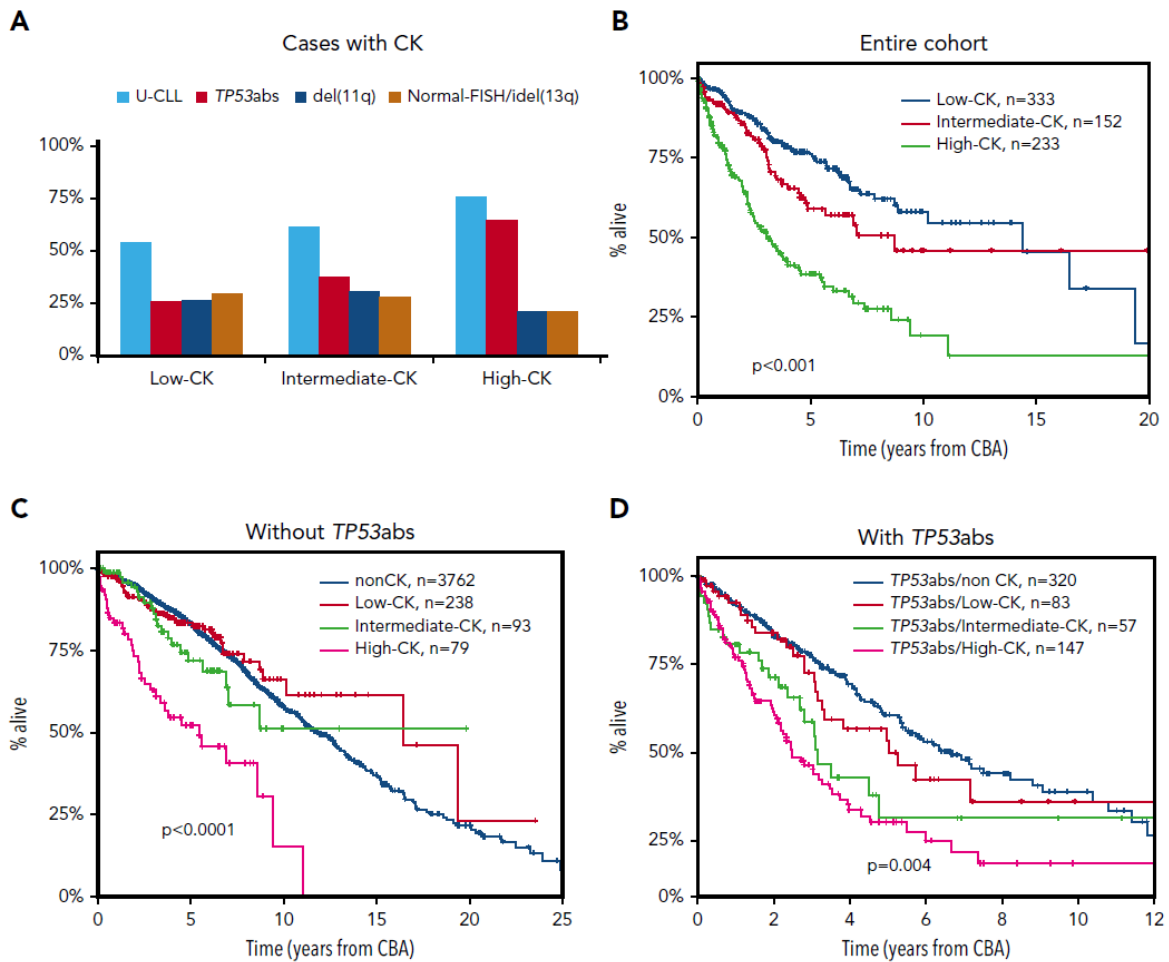


Figura 2.4.2. Profili biologici e *outcome* clinici differenti nei pazienti con CK (≥ 3 aberrazioni [abs]) sulla base del numero di anomalie cromosomiche.

Passando alle categorie immunogenetiche, all'interno dei casi IGHV-U, i casi *high-CK* mostrano la più breve OS (OS mediana, 2.33 anni; LQ-UQ, 1.2-7.9 anni; $P < 0.001$) sia rispetto ai *low-CK* sia rispetto ai casi *intermediate-CK* (OS mediana, 10.1 e 4.4 anni; LQ-UQ, 5 anni-NR e 2.7 anni-NR, rispettivamente [$P=0.003$] tra *low-CK* e *intermediate-CK*). Nei casi IGHV-M, gli *high-CK* si associavano al peggiore *outcome* (OS mediana, 6.1 anni; LQ-UQ, 3.2-8.4 anni; $P < 0.001$), mentre i casi *low-CK* e *intermediate-CK* mostravano una OS simile. Alla luce di questi riscontri, i casi *high-CK* sono stati considerati come un sottogruppo indipendente, separato dai casi *low-CK* e *intermediate-CK* (uniti in un solo sottogruppo). Quando valutati come un singolo parametro, i casi *low-CK/intermediate-CK* presentavano un significato borderline all'analisi univariata per la OS (HR, 1.216; 95% CI, 1.007-1.470; $P=0.042$), mentre fallivano nel raggiungere una significatività statistica all'analisi multivariata (HR, 1.214; 95% CI, 0.918-1.606; $P=0.17$). Per contro, i casi *high-CK* sono emersi come fattore prognostico indipendente all'analisi multivariata (HR, 2.320; 95% CI, 1.603-3.092; $P < 0.001$), insieme allo stadio avanzato, *TP53*, e lo stato mutazionale IGHV (tabella 2.4.2).

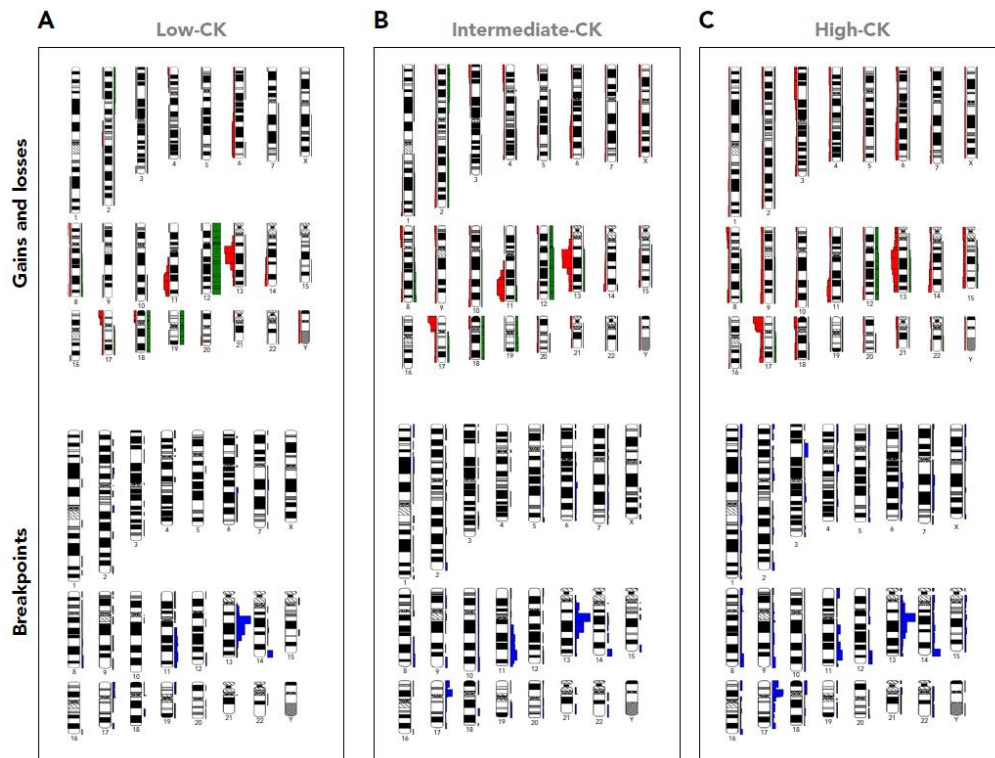


Figura 2.4.3. Distribuzione dei guadagni e delle perdite di materiale genetico e dei breakpoint cromosomici nei CK di questa serie fino a 3 aberrazioni (low-CK), 4 aberrazioni (intermediate-CK), e ≥ 5 aberrazioni (high-CK).

Parameter	Univariable analysis (n = 5095)			Multivariable analysis (n = 2376)		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Male	1.202	1.070-1.350	.001	1.159	0.974-1.379	.09
Low-CK/intermediate-CK	1.216	1.007-1.470	.042	1.214	0.918-1.606	.17
High-CK	2.059	1.789-2.370	<.001	2.226	1.603-3.092	<.001
idel(13q)	0.894	0.792-1.010	.07	—	—	—
Trisomy 12	1.310	1.125-1.525	<.001	1.206	0.979-1.487	.08
del(11q)	1.942	1.659-2.273	<.001	1.152	0.914-1.451	.23
TP53abs	2.904	2.517-3.350	<.001	1.960	1.558-2.465	<.001
U-CLL	2.851	2.467-3.295	<.001	2.320	1.927-2.793	<.001
Binet B/C	2.036	1.793-2.312	<.001	1.575	1.313-1.888	<.001

High-CK (≥ 5 aberrations) is an independent predictor for shorter OS contrasting low-CK/intermediate-CK (3 and 4 aberrations, respectively), which failed to retain significance in the multivariable analysis. Abbreviations are explained in Table 1.

Tabella 2.4.2. Analisi univariata e multivariata per la OS

2.4.3.4 CK, aberrazioni di TP53 e stato mutazionale IGHV: un modello integrato.

Integrando il CK, le aberrazioni di TP53 e lo stato mutazionale IGHV è stato sviluppato un modello gerarchico che sta alla base dell'identificazione di 5 gruppi ordinati in termini di OS, dalla più breve alla più lunga, come segue: (1) *high-CK* (OS mediana, 3.1 anni; LQ-UQ, 1.3-8.3 anni); (2) *low-CK* e *intermediate-CK* con aberrazioni di TP53 (OS mediana, 4.3 anni; LQ-UQ, 2.3 anni-NR); (3) non-CK/aberrazioni di TP53 (OS mediana, 6.6 anni; LQ-UQ, 3.2 anni-

NR); (4) non-CK/non-aberrazioni *TP53*/IGHV-U (OS mediana, 8.4 anni; LQ-UQ, 5.1 anni-NR); e (5) non-CK/non-aberrazioni *TP53*/ IGHV-M e CK con +12, +19 (OS mediana, 14.7 anni; LQ-UQ, 9.4-21.5 anni) ($P < 0.05$ per tutte le coppie di confronto) (figura 2.4.4). In questa proposta di modello gerarchico, tutti i casi con *high-CK* sono stati considerati come un singolo gruppo, indipendentemente dalla presenza di aberrazioni di *TP53*. Questa decisione è stata basata sull'evidenza che quando i casi con CK e simultanea presenza di aberrazioni di *TP53* venivano posti nel modello come un sottogruppo separato, non si osservavano differenze statisticamente significative rispetto ai casi con *high-CK* senza anomalie di *TP53* ($P = 0.06$).

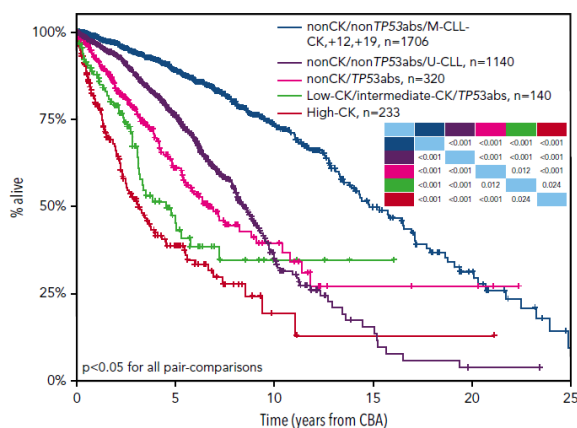


Figura 2.4.4. Curve di Kaplan-Meier basate sul modello gerarchico per la OS che includono CK, aberrazioni di *TP53* (*TP53abs*), e l'espressione di IGHV-M o IGHV-U.

2.4.4 Discussione

In questo studio (il più grande condotto sinora) è stato concluso che le LLC con CK, definito dalla presenza di ≥ 3 anomalie cromosomiche strutturali/numeriche, non dovrebbero essere considerate assiomaticamente a prognosi sfavorevole, ma dovrebbero essere considerate nell'ambito di un gruppo eterogeneo, dal comportamento clinico variabile da estremamente indolente a estremamente aggressivo. I casi ad alta complessità citogenetica (*high-CK*), definiti dalla presenza di almeno 5 anomalie, sono stati associati ad un pessimo *outcome* clinico, indipendentemente dallo stato mutazionale IGHV e di *TP53*. Per contro, i casi a bassa e intermedia complessità citogenetica (*low-CK*, *intermediate-CK*), definiti in relazione alla presenza di 3 o 4 anomalie, rispettivamente, sembrano essere clinicamente rilevanti solo in presenza di aberrazioni di *TP53*. L'impatto differente sulla prognosi tra i casi *high-CK* rispetto al sottogruppo *low-CK/intermediate-CK*, potrebbe essere parzialmente attribuiti all'elevata presenza di IGHV-U e anomalie di *TP53* entro il primo gruppo, raggiungendo il 76% e il 65%, rispettivamente. Inoltre, su 25 casi valutati mediante tecnica NGS, nessuno è risultato positivo per mutazioni di *TP53* a bassa frequenza, indicando che le aberrazioni di *TP53* non sono l'unica spiegazione per gli *high-CK*. Quando consideriamo

la distribuzione delle aberrazioni tra i vari cromosomi, gli *high*-CK mostrano un profilo differente rispetto ai casi *low*-CK/*intermediate*-CK. In particolare, lo spettro delle regioni cromosomiche affette è risultato significativamente ampio, indicando che gli *high*-CK riflettono l'aumento dell'instabilità genomica (figura 2.4.3). A differenza dalle neoplasie mieloidi ad elevata complessità cromosomica, che sono caratterizzate da pattern distintivi di anomalie citogenetiche (delezioni di 5q, 7q, e 17p), le LLC *high*-CK mostrano l'accumulo di varie anomalie cromosomiche addizionali rispetto alle tipiche della LLC (delezioni di 13q, 11q, 17p, e trisomia 12). Su queste basi, la possibilità che gli *high*-CK possano rappresentare in pratica un surrogato per l'instabilità genomica nella LLC non può essere esclusa; tuttavia questa conclusione dovrà essere dimostrata. I casi con 3 o 4 anomalie invece (sottogruppi *low*-CK e *intermediate*-CK, rispettivamente), potrebbero essere prони alla evoluzione clonale, acquisire aberrazioni genetiche additive ed evolvere a forme ad elevata complessità citogenetica. L'evoluzione clonale nella LLC è stata associata a IGHV-U e anomalie di *TP53*, e quando presente, è stata collegata alla resistenza al trattamento e ad una più breve OS (Arber, 2016; Huang, 2017; Wawrzyniak, 2014). In questa serie la grande maggioranza dei campioni analizzati sono stati ottenuti da una diagnosi recente, indicando che l'elevata complessità genomica può essere un evento precoce. Tuttavia, per definire il concetto di evoluzione clonale saranno necessarie ampie serie prospettiche di pazienti. Inoltre, evidenziando che non tutti i CK sono equivalenti, i casi di CK portatori di +12, +19 hanno mostrato un decorso estremamente indolente, anche quando l'analisi è stata ristretta per i casi IGHV-M. Questa evidenza supporta i precedenti studi che mettevano in luce che le LLC con +12, +19 rappresentano un sottogruppo unico con un background biologico distinto (Baliakas, 2016). Il significato relativo del CK, in particolare in relazione allo stato mutazione *TP53*, nei pazienti con LLC trattata coi nuovi agenti rimane da definire in modo conclusivo, data l'evidenza disponibile derivante da numerosi studi retrospettivi da piccole serie di pazienti con risultati discrepanti. Queste discrepanze possono essere parzialmente spiegate delle differenze tra le serie (Mato, 2017; Mato, 2018; Thompson, 2015; Anderson, 2017; Lazarian, 2016), e dovrebbe essere notato che in tutti gli studi pubblicati, il CK è stato considerato come un gruppo omogeneo senza ulteriori differenze in relazione al numero di anomalie, cosa che invece come viene dimostrato in questo studio, è cruciale ed indipendente dallo stato mutazionale di *TP53*. Riguardo alla metodologia ottimale per la determinazione del CK nella LLC, i nostri risultati rispecchiano i risultati per cui l'impiego della stimolazione CpG/IL-2 sia superiore alla stimolazione con TPA, poiché è

capace di identificare più casi di CK (Haferlach, 2011). In un'analisi di sottogruppo, la distinzione tra i gruppi *low-CK/intermediate-CK* e *high-CK* è definita chiaramente tra i casi analizzati col protocollo CpG/IL-2, mentre i casi *intermediate-CK* e *high-CK*, identificati attraverso il protocollo TPA, mostravano OS simili. Questo suggerisce che il protocollo TPA abbia fallito nel determinare lo spettro di aberrazioni cromosomiche nella LLC, potenzialmente sottostimando i casi di CK. In questa esperienza, questo *outcome* non è principalmente dovuto ad un numero insufficiente di metafasi ottenute, ma piuttosto alla differenza in termini di qualità delle metafasi clonali ottenute, che è più elevata col protocollo CpG/IL-2, facilitando quindi il riscontro delle rispettive aberrazioni cromosomiche. L'ampio numero di CK identificati in questa serie di pazienti permette di considerare robusta l'analisi di sottogruppo con conclusioni significative, inoltre, la natura retrospettiva di questo studio, permette di definire correlazioni tra la presenza del CK e la risposta al trattamento, ricordando però che la maggior parte dei pazienti erano stati trattati con chemioimmunoterapia, e solo una piccola parte coi nuovi farmaci. Per questi motivi la valenza predittiva del CK coi nuovi farmaci dovrà essere definita su serie prospettiche di pazienti. Dovrebbe essere inoltre evidenziato come la citogenetica convenzionale emerga come la metodica tradizionale consolidata per definire la complessità genomica non solo nella LLC, ma in tutte le neoplasie ematologiche. Nuove metodiche molecolari come i *microarray* potrebbero essere utili per la caratterizzazione del background genomico clonale (Gunnarson, 2010; Kay, 2010; Ouillette, 2011b; Schoumans, 2016), insieme alle tecniche di *whole-genome sequencing* (WGS) (Klintman, 2018; Puente, 2015), attualmente impiegante in ambito di ricerca.

2.4.5 Conclusioni

In questo studio è stato riportato come il CK, definito in relazione alla presenza di ≥ 3 anomalie strutturali e/o numeriche identificate attraverso tecniche di citogenetica convenzionale, non debba essere considerato necessariamente a prognosi sfavorevole, ma sia da considerare come gruppo eterogeneo dal comportamento clinico variabile. L'elevata complessità citogenetica (*high-CK*), definita dalla presenza di ≥ 5 aberrazioni cromosomiche, è emersa come prognosticamente avversa, indipendentemente dallo stadio clinico, dallo stato mutazionale IGHV e dallo stato di *TP53*, mentre i *low-CK* e gli *intermediate-CK* sono clinicamente rilevanti solo se coesistono anomalie di *TP53*. Da notare invece come le forme di CK con +12 e +19 rappresentino un unico sottogruppo di pazienti a prognosi eccellente.

Il CK insieme con lo stato mutazionale IGHV e di *TP53* ha permesso la costruzione di un modello gerarchico che identifichi sottogruppi di pazienti con andamento clinico molto variabile. Ovviamente saranno necessarie validazioni cliniche prospettiche, prima di indicare la necessità di definire sempre la presenza della *high-CK* nella stratificazione del rischio nella LLC nella pratica clinica quotidiana.

2.5 CONTRIBUTO SPERIMENTALE:

The combination of complex karyotype subtypes and IGHV mutational status identifies new prognostic and predictive groups in chronic lymphocytic leukaemia (Allegato 4)

2.5.1 Razionale dello studio

Questo studio multicentrico guidato dall'istituto di ematologia di Padova è stato pensato per valutare se il potere prognostico del CK potesse essere migliorato quando combinato con un marcatore stabile come lo stato mutazionale IGHV, aiutandoci a identificare i pazienti che potessero ottenere il massimo beneficio dalla chemioimmunoterapia.

2.5.2 Metodi

2.5.2.1 Disegno dello studio. Sono stati arruolati pazienti che rispettassero i seguenti criteri di inclusione: diagnosi di LLC in accordo ai criteri dell'iwCLL del 2008 (Hallek, 2008), età >18 anni e presenza dell'analisi del cariotipo eseguita entro un anno dalla diagnosi. I dati dell'analisi comparativa includevano: sesso, età, stadio secondo Binet (Hallek, 2008), presenza di indicazioni al trattamento, espressione del CD38 (*cut-off* 30%) (Visentin, 2015), analisi FISH (Hallek, 2015), stato mutazionale IGHV (Langerak, 2011) e presenza di aberrazioni di *TP53* (Malcikova, 2018).

L'obiettivo primario era la valutazione dell'impatto della combinazione dei sottotipi di CK con lo stato mutazionale IGHV e la OS dei pazienti. Gli obiettivi secondari erano la correlazione della stessa combinazione con le variabili clinico-biologiche e l'impatto sul TTFT e sulla recidiva dopo chemioimmunoterapia. Lo studio era stato approvato dal comitato etico locale e il consenso informato era stato ottenuto da tutti i pazienti.

2.5.2.2 Analisi del cariotipo. L'analisi citogenetica era stata eseguita su sangue periferico dopo stimolazione con CpG-DSP30 + IL2 (Roche). Il cariotipo veniva quindi descritto dopo l'analisi di almeno 25 metafasi con bandeggio-G utilizzando il software IKAROS (MetasYstems, Altlhusseim, Germany), in accordo alle linee guida internazionali (ISCN 2016). Il cariotipo complesso (CK) era definito dalla presenza di 3 o più aberrazioni cromosomiche nello stesso clone (Baliakas, 2014; Rigolin, 2017b; Blanco, 2016; Kreinitz, 2018). Sulla base delle differenze all'interno del cariotipo, è stato definito "CK di tipo 2" (CK2), quello contenente i riarrangiamenti strutturali maggiori (traslocazioni sbilanciate, cromosomi markers, duplicazioni, inserzioni, addizioni, cromosomi dicentrici, cromosomi

ad anello) (Rigolin, 2018), mentre è stato definito “CK di tipo 1” (CK1) quello che presentava traslocazioni bilanciate, delezioni, monosomie o trisomie (Rigolin, 2018).

2.5.2.3 Stato mutazionale IGHV. L’analisi dello stato mutazionale IGHV era stata eseguita entro 12 mesi dalla diagnosi (v. allegato 4 per tecnica *in extenso*). Una omologia di sequenza <98% rispetto alla linea germinale era considerata mutata (IGHV-M), al contrario era considerata non mutata (IGHV-U) (Visentin, 2019).

2.5.2.4 Citogenetica mediante FISH e mutazioni di TP53. L’indagine FISH è stata eseguita su sangue periferico utilizzando sonde per le regioni 13q14, 11q22 (*ATM*), e 17p13 (*TP53*) e per la trisomia 12 (*CEP 12*) (v. allegato 4 per tecnica *in extenso*). Col termine FISH ad alto rischio ci si riferiva alla presenza di *del11q* o *del17p*, mentre col termine FISH a basso rischio si includevano i casi con *del13q14* o FISH normale. I pazienti con *trisomia 12* erano considerati a rischio intermedio. Il sequenziamento e l’analisi del gene *TP53* sono state eseguite in accordo alle linee guida ERIC (Malcikova, 2018).

2.5.2.5 Trattamento. I pazienti erano stati trattati in accordo alle linee guida iwCLL del 2008 (Hallek, 2008) utilizzando in prima linea regimi di trattamento contenenti fludarabina o bendamustina, con o senza rituximab nei pazienti *fit*; oppure clorambucile con o senza anticorpo monoclonale anti-CD20 nei pazienti anziani e/o *unfit*. Da gennaio 2015 i pazienti con aberrazioni di *TP53* erano stati trattati con inibitori del BCR: ibrutinib o idelalisib più rituximab.

2.5.2.6 Analisi statistica. Le variabili categoriche sono state comparate mediante il test del Chi-quadro (stadio secondo Binet e FISH) o mediante il test esatto di Fisher (sesso, trattamento, CD38, *TP53* e IGHV). Le variabili continue (età mediana) sono state comparate con il test di Mann–Whitney. Il TTFT è stato calcolato dalla data della diagnosi alla data di inizio trattamento o all’ultimo follow up (Hallek, 2008). Il tempo al trattamento successivo (*time to next treatment* - TTNT) è stato calcolato in mesi, dal trattamento di prima linea FCR o BR alla terapia successiva o all’ultimo follow up. La OS è stata calcolata come l’intervallo di tempo tra la diagnosi e la morte per qualsiasi causa o all’ultimo follow up. L’analisi di sopravvivenza è stata eseguita mediante il metodo di Kaplan–Meier e il test Log-rank per confrontare le curve di sopravvivenza tra i gruppi. Per stimare l’hazard ratio (HR) è stato impiegato il modello di regressione di Cox. La stabilità del nostro modello è stata validata internamente mediante *bootstrapping*. L’indice di concordanza di *Harrell* è stato utilizzato

per comparare il modello di questo studio con quello di Döhner (Döhner, 2000), FISH-IGHV e il modello CLL-IPI (International CLL-IPI working group, 2016). L'analisi statistica è stata eseguita con R (pacchetto statistico open source scaricabile da <http://www.r-project.org>).

2.5.3 Risultati

2.5.3.1 Caratteristiche dei pazienti. Sono stati raccolti i dati di 522 pazienti affetti da LLC con cariotipo disponibile eseguito entro un anno dalla diagnosi (tabella 2.5.1). L'età mediana era 65 anni, il 61% erano maschi, il 76% erano in stadio A (Binet), la concentrazione mediana di b2-microglobulina era 3.27 mg/L, il 47% erano portatori di IGHV-U, il 9% avevano aberrazioni *TP53* e il 19% presentavano CK. 232 pazienti avevano ricevuto almeno una linea di trattamento (31% FCR, 16% BR, 8% ibrutinib, 5% clorambucile - antiCD20, 40% altri trattamenti come FC o clorambucile) e 80 erano morti a un follow-up mediano di 5.8 anni. In accordo ai sottogruppi di CK, 30 (30%) avevano un CK1 e 69 (70%) un CK2. In quest'ultimo gruppo, il 35% erano IGHV-M e il 65% erano IGHV-U (tabella 2.5.1). In una fase preliminare è stato confermato il significato prognostico negativo di IGHV-U, CK, e CK con alterazioni strutturali maggiori (MAS) (es. CK2) nella nostra serie di pazienti (Figura S1A-F, allegato 4). La OS a 10 anni è risultata del 60% negli IGHV-U e dell'89% negli IGHV-M ($p < 0.0001$, Figura S1D, allegato 4); del 58% nei pazienti con CK e del 79% per i pazienti senza CK, rispettivamente ($p < 0.0001$, Figura S1E, allegato 4); 49% vs 66% vs 79% for CK2, CK1 e no-CK ($p < 0.0001$, Figura S1F, allegato 4). Poiché non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le curve di OS del CK1 e dei pazienti IGHV-U, questi pazienti sono stati raggruppati insieme (gruppo U-CK1), così come i pazienti con IGHV-M e i pazienti senza CK (M-noCK) (Figure S1G, allegato 4). 69 (13%) pazienti dell'intera popolazione mostrava un CK2, 213 (41%) CK1 o IGHV-U (U-CK1) e 240 (46%) IGHV-M senza alcun sottotipo di CK (M-noCK). Il primo gruppo era caratterizzato da uno stadio più avanzato alla diagnosi (Binet C, 13% vs 7% vs 4%, $p < 0.0001$), livelli più elevati di b2-microglobulina (2.47 mg/L vs 3.17 mg/L vs 3.27 mg/L, $p < 0.0001$), un minor numero di casi con FISH a basso rischio (13q- o FISH normale, 38% vs 55% vs 92%, $p < 0.0001$), ma un'aumentata prevalenza di aberrazioni di *TP53* (38% vs 8% vs 3%, $p < 0.0001$) e di numero di anomalie cromosomiche (≥ 5 lesioni, 0% vs 1% vs 59%), rispetto agli altri due gruppi (Tabella 2.5.1).

	Population (n = 522)	M-noCK (n = 240)	U-CK1 (n = 213)	CK2 (n = 69)	p values
Gender					
Female	203 (39%)	88 (37%)	87 (41%)	28 (41%)	0.6298
Male	319 (61%)	152 (63%)	126 (59%)	41 (59%)	
Age (years)					
Median ± sd	65 ± 10	59 ± 11	65 ± 12	70 ± 10	0.0053
Binet stage					
A	396 (76%)	164 (69%)	189 (89%)	43 (62%)	<0.0001
B	91 (17%)	66 (27%)	8 (4%)	17 (25%)	
C	35 (7%)	10 (4%)	16 (7%)	9 (13%)	
β2-microglobulin (mg/L)					
Median ± sd	2.92 ± 1.53	2.47 ± 1.55	3.17 ± 1.34	3.27 ± 1.78	<0.0001
CD38 ^a					
<30%	388 (74%)	207 (88%)	140 (67%)	41 (62%)	<0.0001
≥30%	121 (23%)	27 (12%)	69 (33%)	25 (38%)	
IGHV status					
M-IGHV	279 (53%)	240 (100%)	15 (7%)	24 (35%)	n.a.
U-IGHV	243 (47%)	0 (0%)	198 (93%)	45 (65%)	
FISH ^b					
Normal	153 (29%)	86 (38%)	59 (28%)	8 (12%)	<0.0001
13q	196 (38%)	122 (54%)	56 (27%)	18 (26%)	
+12	76 (15%)	17 (8%)	52 (25%)	7 (10%)	
11q	50 (10%)	4 (2%)	33 (16%)	13 (19%)	
17p	36 (7%)	3 (1%)	10 (5%)	23 (33%)	
TP53 ^a					
Normal	469 (90%)	229 (97%)	197 (92%)	43 (62%)	<0.0001
Abnormal	48 (9%)	6 (3%)	16 (8%)	26 (38%)	
N. Chr. abn.					
0	167 (32%)	117 (49%)	50 (24%)	0 (0%)	<0.0001
1-2	258 (49%)	123 (51%)	135 (63%)	0 (0%)	
3-4	53 (10%)	0 (0%)	25 (12%)	28 (41%)	
≥5	44 (9%)	0 (0%)	3 (1%)	41 (59%)	

sd standard deviation, M-IGHV mutated IGHV gene, U-IGHV unmutated IGHV gene, N. Chr. abn. number of chromosomal abnormalities, CK complex karyotype, M-noCK M-IGHV without CK, U-CK1 U-IGHV and/or type 1 CK, CK2 type 2 CK. n.a. not applicable

^aMissing data = 3% about CD38 expression, 1% cytogenetic by FISH and 1% for TP53 abnormalities (including deletions and/or mutations)

Tabella 2.5.1. Caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti

2.5.3.2 L'impatto prognostico dei sottotipi di CK e la combinazione con lo stato mutazionale IGHV. I pazienti con CK2 avevano un TTFT e una OS significativamente più corti rispetto al gruppo U-CK1 o ai casi M-noCK (Figura 2.5.1c-d). La OS mediana era 7.1 anni per i pazienti con CK2, mentre non era raggiunta per i pazienti U-CK1 e M-noCK ($p < 0.0001$). La OS a 5 anni era 67%, 85%, e 93% per i casi CK2, U-CK1 e M-noCK, rispettivamente (Figura 2.5.1d, $p < 0.0001$). I TTFT mediani erano 1.97 vs 3.40 vs 19.1 anni, e a 5 anni 31% vs 39% vs 81% per i casi CK2, U-CK1 e M-noCK (Figura 2.5.1c, $p < 0.0001$), rispettivamente. Sia per il TTFT che per la OS, ciascuna curva era statisticamente diversa rispetto a tutte le altre (Figura 2.5.1c-d). Inoltre la prognosi peggiore dei pazienti con CK2 era indipendente dallo stato mutazionale di TP53 (Figura S2A-B, allegato 4, $p = 0.0845$ e 0.8122 per TTFT e OS) e di IGHV (Figura S2C-D, allegato 4, $p = 0.0755$ e 0.2230 per TTFT e OS). In particolare l'analisi multivariate ha confermato che i pazienti U-CK1 hanno un rischio 3 volte maggiore di iniziare un trattamento e di morire rispetto ai pazienti M-noCK (Tabella 2.5.2, $p < 0.0001$). Analogamente, i pazienti CK2 hanno un rischio di 5 e 7 volte maggiore di essere sottoposti

a trattamento e di morire rispetto ai pazienti M-noCK (Tabella 2.5.2, $p < 0.0001$). Altre variabili associate con un TTFT e ad una OS più brevi all'analisi univariata e multivariata erano lo stadio avanzato secondo Binet, la positività di CD38, lo stato IGHV-U, la *del11q*, la *del17p* e le aberrazioni di TP53 (Tabelle S1-S2, allegato 4). L'età >65 anni alla diagnosi era inoltre predittiva di una OS più breve all'analisi multivariata (Tabella S2, allegato 4).

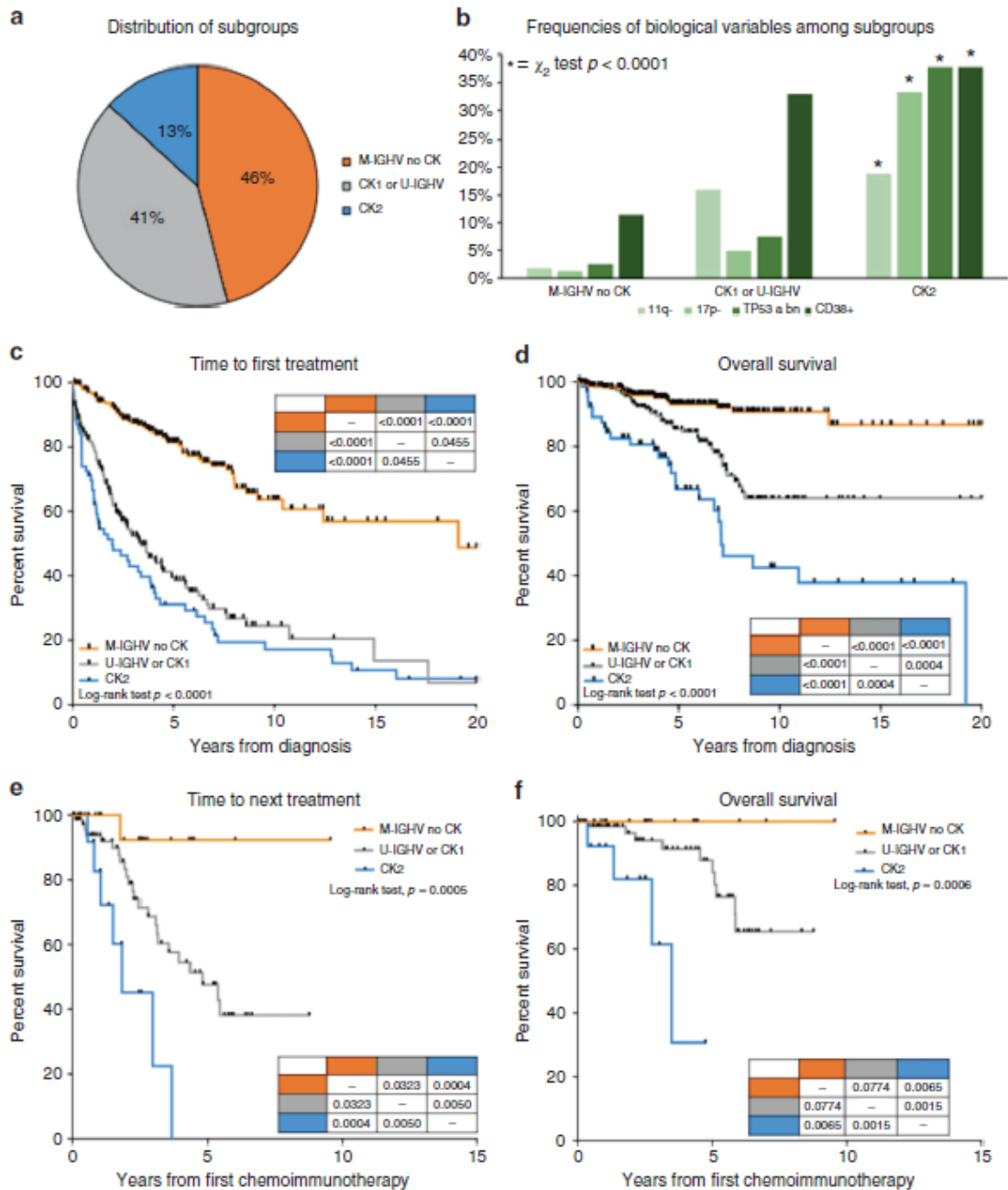


Figura 2.5.1. (a) distribuzione dei sottogruppi; (b) frequenza delle variabili biologiche nei sottogruppi; (c–f) curve di Kaplan–Meier per le analisi di sopravvivenza. I pazienti con CK2 (grigio chiaro) mostrano il TTFT più breve (c) e la OS più breve (d) dalla diagnosi, così come mostrano il peggiore TTNT (e) ed OS (f) dopo chemoimmunoterapia con FCR or BR se confrontati con U-CK1 (grigio scuro) e coi casi M-noCK (nero).

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% C.I.	p values	HR	95% C.I.	p values
TTFT						
M-noCK	1.00	–	–	1.00	–	–
U-CK1	4.31	3.14–5.90	<0.0001	3.98	2.87–5.52	<0.0001
CK2	4.89	2.99–7.99	<0.0001	5.12	3.5–7.47	<0.0001
OS						
M-noCK	1.00	–	–	1.00	–	–
U-CK1	3.10	1.81–5.30	<0.0001	3.14	1.75–5.64	0.0001
CK2	7.07	3.13–15.08	<0.0001	7.37	3.97–13.69	<0.0001

95% C.I. 95% confidential interval, M-noCK mutated IGHV without complex karyotype, U-CK1 unmutated IGHV and/or type 1 complex karyotype, CK2 type 2 complex karyotype, TTFT time to first treatment, OS overall survival

Tabella 2.5.2: Hazard ratio (HR) per la combinazione dello stato mutazionale IGHV con il CK

2.5.3.3 Impatto predittivo del CK e la combinazione allo stato mutazionale IGHV. La combinazione dello stato mutazionale IGHV coi sottotipi di CK forniscono informazioni predittive dopo la prima linea di terapia (n=160 pazienti, p<0.0001 sia per TTNT sia per OS, Figure S2G-H, allegato 4). In particolare, focalizzandoci su 107 pazienti trattati con FCR o BR, il 20% erano M-noCK, il 67% U-CK1 e il 13% CK2. Ad un follow-up mediano di 43 mesi solo un caso del sottogruppo M-noCK era recidivato e nessun paziente tra questi è morto, rispetto agli altri due sottogruppi (Figure 2.5.1e-f). Il TTNT mediano è stato di 1.86 e 4.79 anni per i CK2 e per gli U-CK1, mentre non era stato raggiunto per i pazienti con M-noCK (p<0.0005, Figura 2.5.1e). Il TTNT stimato a 3 anni era del 92%, 69% e 23% rispettivamente, per i pazienti M-noCK, U-CK1 e CK2 (p<0.0005, Figura 2.5.1e). L'OS mediana era di 3.5 anni per i CK2 mentre non era raggiunta sia per gli U-CK1 sia per i casi M-noCK (p=0.0006, Figura 2.5.1f). La OS a 3 anni era 100%, 94% e 62% per i pazienti M-noCK, U-CK1 e CK2 (p=0.0006, Figura 2.5.1f), rispettivamente. Le variabili associate con il TTNT e l'OS alle analisi univariata e multivariata sono riportate in tabella S3 e S4 (allegato 4). Il CK2 era predittivo di TTNT e OS più brevi anche alla analisi multivariata (p=0.0055 e p=0.0113, rispettivamente). Successivamente, sono stati confrontati i pazienti CK2 trattati con FCR o BR (n=14) con quelli che avevano ricevuto ibrutinib in prima linea (n=7). Sebbene a 3 anni il TTFT e l'OS per i pazienti trattati con chemioimmunoterapia, rispetto a quelli trattati con ibrutinib, fossero 67% vs 22% e 100% vs 62%, rispettivamente, queste differenze non erano statisticamente significative (p=0.2479 per TTNT e p=0.2011 per OS, Figura S4A-B, allegato 4).

2.5.4 Discussione

L'analisi del cariotipo nella LLC è in grado di identificare anomalie che non sono identificabili attraverso l'indagine FISH, spesso permettendo il riscontro di un numero di anomalie tali da inquadrare il paziente nell'ambito di un CK (Baliakas, 2014; Kreinitz, 2018; Baliakas, 2016; Puiggros, 2017). In questo studio retrospettivo è stato confermato su un numero elevato di pazienti, come il CK non sia una singola entità, ma una categoria citogenetica eterogenea sia in termini quantitativi che qualitativi. I pazienti con CK e lesioni strutturali maggiori (CK2) presentano una prognosi pessima. Inoltre, la combinazione tra lo stato mutazionale IGHV e i dati derivanti dal cariotipo, hanno permesso di identificare un sottogruppo di pazienti caratterizzati da stato mutazionale IGHV-M senza alcun sottotipo di CK, con una malattia molto indolente, con il 90% dei pazienti ancora vivi a 10 anni di follow-up e con la possibilità di ottenere una remissione completa a lungo termine dopo un breve ciclo di chemioimmunoterapia. La disponibilità degli inibitori del BCR e di BCL2, da soli o in combinazione, ci ha permesso inoltre di superare i fattori prognostici negativi associati alla LLC, come lo stadio clinico, le anomalie di *TP53* e lo stato mutazionale IGHV-U, facendo emergere nuovi parametri predittivi (Scarfò, 2016; Hallek, 2018). Negli ultimi anni il ruolo prognostico-predittivo del CK, definito dalla presenza di almeno 3 lesioni citogenetiche nello stesso clone, sta diventando evidente alla diagnosi (Baliakas, 2014; Rigolin, 2017a), alla progressione (Herling, 2016) e nei pazienti recidivi/refrattari trattati con ibrutinib (Thompson, 2015) o venetoclax (Anderson, 2017). Sebbene il CK si riscontri nel 14–35% delle LLC (Baliakas, 2014; Rigolin, 2015) si tratta di una categoria citogenetica eterogenea sia in termini quantitativi che qualitativi. I dati della letteratura hanno documentato come i pazienti con +12, +18 e +19, sebbene costituiscano una forma di CK, presentino una LLC indolente con caratteristiche peculiari (predominanza femminile, giovane età alla diagnosi, etc.) (Baliakas, 2016); dall'altra parte la presenza di almeno 5 aberrazioni cromosomiche sono predittive di un decorso clinico altamente aggressivo indipendentemente dallo stato mutazionale IGHV e di *TP53* (Baliakas, 2019). Il numero di lesioni cromosomiche era stato definito nella nostra popolazione di studio, confermando che 5 o più lesioni si associano ad un peggiore TTFT e OS (Figura S5, allegato 4).

Recentemente è stato dimostrato che circa il 70% dei casi con CK si associa ad aberrazioni strutturali maggiori (come traslocazioni sbilanciate, cromosomi ad anello o marker). Questo sottogruppo, qui chiamato CK2, era associato ad una più elevata incidenza di aberrazioni di *TP53*, chemiorefrattarietà e ad una più breve OS all'analisi multivariata

(Rigolin, 2018). Inoltre, i casi di LLC CK2 presentavano un differente profilo di espressione di mRNA con disregolazione dei geni coinvolti nel ciclo cellulare e nella risposta al danno al DNA (Rigolin, 2018). In questo studio sono stati inclusi 522 pazienti e sono stati combinati i dati derivati dalla analisi del cariotipo e dallo studio dello stato mutazionale per cercare di migliorarne l'impatto prognostico e predittivo. È stato dimostrato che i pazienti con IGHV-M in assenza di alcun sottogruppo CK, corrispondenti al 45% dei pazienti, presentavano una malattia molto indolente con un TTFT mediano di 19 anni e più del 90% di loro erano ancora vivi a 10 anni dalla diagnosi. È stato osservato che sebbene i pazienti CK2 fossero un gruppo relativamente raro (13% dei casi), molti di loro (81%) richiedevano un trattamento entro 5 anni dalla diagnosi, quasi tutti necessitavano di un secondo trattamento entro 3 anni dalla chemioimmunoterapia e presentavano una OS mediana di 7 anni.

Nonostante sino sconosciuti gli esatti meccanismi che favoriscono lo sviluppo del CK, la forte associazione tra il CK e le aberrazioni di TP53 qui presentate e riportate anche da altri autori (Rigolin, 2015, Baliakas, 2019) potrebbero giocare un ruolo rilevante. I pazienti con mutazioni di TP53 sono caratterizzati da telomeri corti ed elevata espressione di hTERT, una condizione nota per essere alla base dell'instabilità cromosomica (Gueze, 2016; Thomay, 2017). I pazienti con TP53 alterato mostrano delezione telomerica e fusioni cromosomiche end-to-end nelle cellule con CK (Rampazzo, 2017). Thomay et al (Thomay, 2017) hanno riportato che la perdita o la mutazione di TP53 causava un aumento del numero di eventi di rottura cromosomica, meccanismo che sta alla base dei cromosomi dicentrici e delle traslocazioni a braccio intero. In aggiunta, un lavoro del German CLL Study Group ha trovato una associazione tra i telomeri corti, le anomalie di TP53, la recidiva precoce dopo chemioimmunoterapia e la ridotta sopravvivenza (Jebaraj, 2019). In particolare casi con *del17p* o mutazioni di TP53 mostravano telomeri più corti, aumento della complessità genomica, così come una evoluzione clonale (Jebaraj, 2019). La sfida degli attuali trattamenti della LLC riguarda il tentativo di personalizzare i trattamenti in accordo ad uno specifico profilo di rischio biologico del paziente. Per permettere uno sviluppo responsabile ed efficace dei nuovi trattamenti, le terapie target dovrebbero essere offerte specificamente a sottogruppi di pazienti che possano ottenere il massimo beneficio se confrontati con le strategie chemioimmunoterapiche ben stabilite. Rossi D et al (Rossi, 2015) hanno dimostrato che l'OS dei pazienti IGHV-M senza *del11q* o *del17p* è sovrapponibile a quella della popolazione generale stratificata per età, mentre i soggetti IGHV-U e quelli con FISH ad alto rischio (*del11q* o *del17p*) recidivano costantemente dopo

FCR. Questa osservazione è stata inoltre confermata nella rianalisi del trial clinico cardine del gruppo di studio tedesco sulla CLL e dall'MD Cancer institute (Fischer, 2016; Thompson, 2016). *Gentile et al* (Gentile, 2018) hanno pubblicato uno studio retrospettivo multicentrico su BR nei pazienti mai trattati dimostrando che, anche con questo regime chemioimmunoterapico, le LLC con IGHV-M senza *del11q/17p* mostravano il miglior controllo di malattia e la migliore OS. Tutte queste osservazioni identificano chiaramente i pazienti LLC con un profilo biologico ad alto rischio che può raggiungere risultati a lungo termine eccellenti ed un controllo di malattia con soli 6 cicli di chemioimmunoterapia. I dati del nostro studio hanno confermato quanto riportato (Rossi, 2015, Fischer, 2016; Thompson, 2016) supportando il concetto secondo cui la chemioimmunoterapia di prima linea, FCR o BR, rappresenta una opzione di trattamento altamente efficace per i pazienti IGHV-M con una buona fitness e senza un CK. Visti i pessimi risultati ottenuti dai pazienti CK2 con la chemioimmunoterapia, è stato ipotizzato che i nuovi farmaci, in particolare ibrutinib, potessero migliorare l'*outcome* sfavorevole di questo sottogruppo. Sono stati pertanto confrontati i pazienti CK2 trattati con FCR o BR con quelli che avevano ricevuto ibrutinib in prima linea. Sebbene vi fossero differenze in termini di TTNT e di OS, queste non erano statisticamente significative, probabilmente dovuto al breve follow up (14mesi per i pazienti trattati con ibrutinib) e al basso numero di pazienti (7 casi CK2 trattati con ibrutinib). La migliore terapia di prima linea e delle linee successive per i pazienti con CK è ancora oggetto di discussione. Mentre il CK è stato associato ad una recidiva precoce nel paziente recidivato/refrattario trattato con ibrutinib o venetoclax (Anderson, 2017; Thompson, 2015), l'attività di ibrutinib nei soggetti mai trattati con CK non è stata finora riportata. I dati sinora a disposizione suggeriscono l'importanza della valutazione dello stato mutazionale IGHV in accordo con le recenti linee guida iwCLL aggiornate, e suggeriscono che la prognosi dei pazienti con CK sia negativa a causa di un elevato tasso di chemiorefrattarietà, recidiva precoce e ridotta sopravvivenza (Herling, 2016; Badoux, 2011a).

2.5.5 Conclusioni

Grazie alle attuali tecniche di citogenetica convenzionale coi nuovi mitogeni è stato possibile identificare un CK nel 19% di 522 pazienti affetti da LLC. In questo studio è stato suggerito come la combinazione dello stato mutazionale IGHV e i dati derivanti dallo studio del cariotipo permettano di stratificare meglio i pazienti affetti da LLC, al fine di identificare

i pazienti con IGHV-M e nessun sottogruppo di CK caratterizzati da una malattia indolente e da un ottimo *outcome* dopo chemioimmunoterapia. È stato quindi riportato come i pazienti CK2 presentino frequentemente aberrazioni di TP53, mostrino scarsa risposta alla chemioterapia e abbiano una malattia aggressiva con solo il 40% di essi ancora vivo dopo 10 anni di follow up. I nuovi trial clinici che includono combinazioni o sequenziamento dei nuovi farmaci dovrebbero prevedere lo studio del ruolo del CK, in particolare del CK2.

2.6 CONTRIBUTO SPERIMENTALE:

In chronic lymphocytic leukaemia, SLAMF1 deregulation is associated with genomic complexity and independently predicts a worse outcome (Allegato 5)

2.6.1 Razionale dello studio

Nella LLC la down-regolazione di SLAMF1 (*signalling lymphocytic activation molecule family member 1*) è strettamente associata alla complessità genomica e rappresenta un fattore predittivo indipendente di *outcome*. SLAMF1 è una molecola di adesione/costimolazione in grado di legarsi a se stessa, appartenente ad una famiglia di 9 recettori di membrane (Bologna, 2018). Nella LLC, SLAMF1 modula la risposta alle chemochine e regola l'autofagia (Bologna, 2018) e la sua perdita predice una prognosi sfavorevole (Schweighofer, 2011; Bologna, 2016). Nella LLC la complessità citogenetica è emersa come marcatore prognostico sfavorevole indipendente (Baliakas, 2014; Rigolin, 2017a) e per queste ragioni le linee guida più recenti hanno incluso l'analisi del cariotipo quale test desiderabile nel work up dei trial clinici (Hallek, 2018). Tuttavia, la definizione di complessità citogenetica è ancora oggetto di dibattito e le più recenti analisi hanno dimostrato che il cariotipo altamente complesso (high-CK), definito dalla presenza di 5 o più anomalie cromosomiche (CK5) (Baliakas, 2019), nonché la presenza di anomalie cromosomiche maggiori (*major chromosomal structural abnormalities - MSA*) (Rigolin, 2018; Visentin, 2019), potrebbero identificare un sottogruppo di pazienti a rischio molto alto con pessima prognosi. Recentemente è stato osservato come la downregolazione di SLAMF1 nei pazienti affetti da LLC con CK ed MSA possa suggerire un'associazione con caratteristiche genomiche ad alto rischio (Rigolin, 2018). Lo scopo di questo studio è stato quello di considerare, in un'ampia serie di pazienti affetti da LLC, l'impatto prognostico dell'espressione di *SLAMF1* alla diagnosi e la sua correlazione con le caratteristiche citogenetiche e genomiche.

2.6.2 Pazienti e metodi

2.6.2.1 Pazienti. Lo studio è stato condotto su 349 pazienti mai trattati, affetti da LLC diagnosticata e seguiti presso il nostro centro tra il 2004 e il 2019, come descritto in precedenza (Rigolin, 2017a). Tutti i pazienti erano stati sottoposti a diagnosi di LLC in accordo ai criteri NCI (Hallek, 2018). Lo studio era stato approvato dal comitato etico locale. In prima linea sono stati utilizzati trattamenti contenenti fludarabina o bendamustina con

rituximab nei pazienti *fit*; il clorambucile era stato utilizzato nei pazienti anziano *e/o unfit* in accordo con le strategie di trattamento adottate presso il nostro centro. Dal 2015 sono stati offerti ai pazienti, ibrutinib, idelalisib più rituximab o venetoclax.

2.6.2.2 Studi biologici. Sono stati utilizzati campioni di sangue periferico per eseguire analisi di FISH, citogenetica convenzionale e dello stato mutazionale IGHV attraverso metodiche di sequenziamento in accordo a quanto descritto in letteratura (Rigolin, 2015; Rigolin, 2016). Il cariotipo era definito “complesso” o “altamente complesso” rispettivamente in presenza di tre o più (CK3), o cinque o più (CK5), aberrazioni nello stesso clone. Le anomalie citogenetiche considerate come MSA erano le seguenti: addizioni cromosomiche, cromosomi derivativi, inserzioni, duplicazioni, cromosomi ad anello, cromosomi dicentrici e marcatori cromosomici (Rigolin, 2018). Mediante l’impiego di tecniche di NGS con Ion Torrent PGM (Life Technologies, Foster City, CA, USA), sono state analizzate le mutazioni di *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* e *TP53* (Rigolin, 2016).

2.6.2.3 SLAMF1 e droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR). Attraverso l’impiego della *QX200TM ddPCR* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) è stata valutata l’espressione di *SLAMF1* su cellule mononucleate provenienti da campioni di sangue periferico contenenti più del 95% di cellule tumorali, prelevati da pazienti con recente diagnosi di LLC (<1 anno) (Raponi, 2018). Le reazioni in ddPCR sono state eseguite utilizzando il *Taqman Gene Expression Assay* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Per ciascun gene è stato selezionato un set di primer ed una sonda provenienti dalla *Applied Biosystems list del TaqMan Gene Expression Assays* (Hs00234149_m1 per *SLAMF1* e Hs99999903_m1 per la b-actin [ACTB], come controllo endogeno di riferimento). Il DNA complementare sintetizzato (cDNA) è stato diluito 20 volte per *SLAMF1* e 10 000 volte per la quantificazione di ACTB e saggiato in accordo al protocollo del produttore (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Infine, è stato calcolato un rapporto *SLAMF1/ACTB*.

2.6.2.4 Analisi statistica. Per le variabili quantitative e per le variabili categoriche sono stati applicati rispettivamente il test di Mann–Whitney ed il test esatto di Fisher. Il TTFT è stato calcolato come l’intervallo tra la diagnosi e l’inizio della prima linea di trattamento. La OS è stata calcolata dalla data della diagnosi sino alla morte dovuta ad ogni causa o sino all’ultimo follow up. Le curve di sopravvivenza sono state confrontate mediante il test log-rank. Per identificare le variabili prognostiche indipendenti significative è stata impiegata

l'analisi del rischio di regressione proporzionale sul TTFT e sulla OS. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando Stata 16.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

2.6.3 Risultati

Le caratteristiche basali di questa serie sono presentate nella tabella SI (allegato 5). CK3 e CK5 sono stati identificati rispettivamente in 37 (11.3%) e 13 pazienti (4.0%), mentre 39 (11.9%) avevano delle MSA. In tutti i 39 pazienti con MAS, 25 (64.1%) e 11 (28.2%) mostravano un CK3 e un CK5, rispettivamente. Nei pazienti con CK3 è stata osservata una minore espressione di *SLAMF1* (Tabella SII, allegato 5) rispetto ai pazienti senza CK3 ($P < 0.001$) e nei pazienti con CK5 rispetto ai pazienti senza CK5 ($P < 0.001$). È stata osservata una espressione inferiore di *SLAMF1* anche nei pazienti con MSA, rispetto a quelli senza MSA ($P < 0.001$) e nei pazienti con MSA e CK5, rispetto a quelli con MSA senza CK5 ($P = 0.018$), mentre non è stata osservata alcuna differenza tra i pazienti con MSA e CK3 rispetto ai pazienti con MSA senza CK3. Al fine di approfondire l'impatto clinico e biologico dell'espressione di *SLAMF1*, i pazienti sono stati suddivisi in terzili sulla base dei livelli di espressione di *SLAMF1*: i pazienti con livello di espressione di *SLAMF1* ≤ 2.81 sono stati classificati come low-*SLAMF1*, mentre quelli con un livello ≥ 6.24 sono stati considerati come high-*SLAMF1*, tutti gli altri casi come int-*SLAMF1*. I tre terzili di pazienti sono stati differenziati in accordo a noti parametri prognostici (tabella SI, allegato 5): positività di CD38, elevati livelli di espressione di b2-microglobulina, stato mutazionale IGHV-U, *del11q* e rischio più elevato secondo il CLL International Prognostic Index (IPI) (International CLL-IPI working group, 2016). Non è stata identificata alcuna correlazione con le mutazioni di *NOTCH1*, *SF3B1* e *BIRC3*. Rispetto a pazienti del gruppo int-*SLAMF1*, i pazienti del gruppo low-*SLAMF1* presentavano un profilo clinico e genomico ad alto rischio ben distinto, con una maggior incidenza di aberrazioni di *TP53*, CK3, CK5, MSA e di necessità di trattamento, mentre i pazienti nel gruppo high-*SLAMF1* presentavano una minore incidenza di stadi avanzati secondo Binet. È stata inoltre riscontrata una associazione tra la *trisomia 12* e bassi livelli di espressione di *SLAMF1*, supportando l'idea che la down-regolazione di *SLAMF1* possa concorrere, insieme alle mutazioni di *MYD88* e di *ATM* o all'espressione di IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*), a identificare un sottogruppo di pazienti a prognosi peggiore (Autore, 2018).

All'analisi univariata livelli più bassi di *SLAMF1* sono stati associati significativamente ad un peggiore TTFT ($P < 0.001$, Tabella 2.6.1, Figura 2.6.1A) e con una peggiore OS ($P < 0.001$, Tabella 2.6.1 e Figura 2.6.1B). Un TTFT inferiore ed una peggiore OS sono state inoltre associate a uno score prognostico a rischio più elevato secondo il CLL-IPI e con il CK5, recentemente descritto come il più rilevante marcatore prognostico citogenetico avverso indipendente (Baliakas, 2019). Sulla base delle caratteristiche genetiche ben distinte, i casi low-*SLAMF1* sono stati considerati come un sottogruppo indipendente all'analisi multivariata, mentre i casi int- e high-*SLAMF1* sono stati uniti in un unico sottogruppo. L'analisi multivariata ha mostrato che bassi livelli di *SLAMF1* mantenevano il loro impatto prognostico negativo in termini di TTFT e OS, indipendentemente da uno score CLL IPI ad alto rischio, mentre, in questo modello, il CK5 non manteneva il suo significato statistico. È stato inoltre valutato un modello alternativo in cui venivano accorpati i gruppi low- e int-*SLAMF1*. In questo secondo modello, l'impatto prognostico dei bassi livelli di *SLAMF1* su TTFT e OS sono stati confermati, indipendentemente da un CLL IPI ad alto rischio, mentre il CK5 non manteneva il suo significato statistico.

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis Model 1		Multivariate analysis Model 2	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
TTFT						
CLL IPI high-very high	2.61 (2.19-3.12)	<0.001	2.43 (2.01-2.95)	<0.001	2.51 (2.08-3.04)	<0.001
CK5	6.52 (3.53-12.06)	<0.001	1.44 (0.72-2.86)	0.304	1.76 (0.89-3.49)	0.105
Low <i>SLAMF1</i>	3.16 (2.29-4.35)	<0.001	2.27 (1.61-3.21)	<0.001	-	-
Low-int <i>SLAMF1</i>	2.96 (2.01-4.37)	<0.001	-	-	2.50 (1.65-3.77)	<0.001
OS						
CLL IPI high-very high	2.23 (1.81-2.75)	<0.001	2.07 (1.64-2.60)	<0.001	2.03 (1.62-2.55)	<0.001
CK5	4.89 (2.34-8.24)	<0.001	1.15 (0.55-2.43)	0.707	1.29 (0.62-2.68)	0.489
Low <i>SLAMF1</i>	2.58 (1.76-3.80)	<0.001	1.79 (1.17-2.76)	0.008	-	-
Low-int <i>SLAMF1</i>	3.27 (1.98-5.39)	<0.001	-	-	2.77 (1.57-4.88)	<0.001

CI, confidence interval; CK5, five or more chromosomal abnormalities; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; HR, hazard ratio; IPI, International Prognostic Index; OS, overall survival; *SLAMF1*, signalling lymphocytic activation molecule family member 1; TTFT, time-to-first treatment.

Tabella 2.6.1. Analisi univariata e multivariata per TTFT e OS

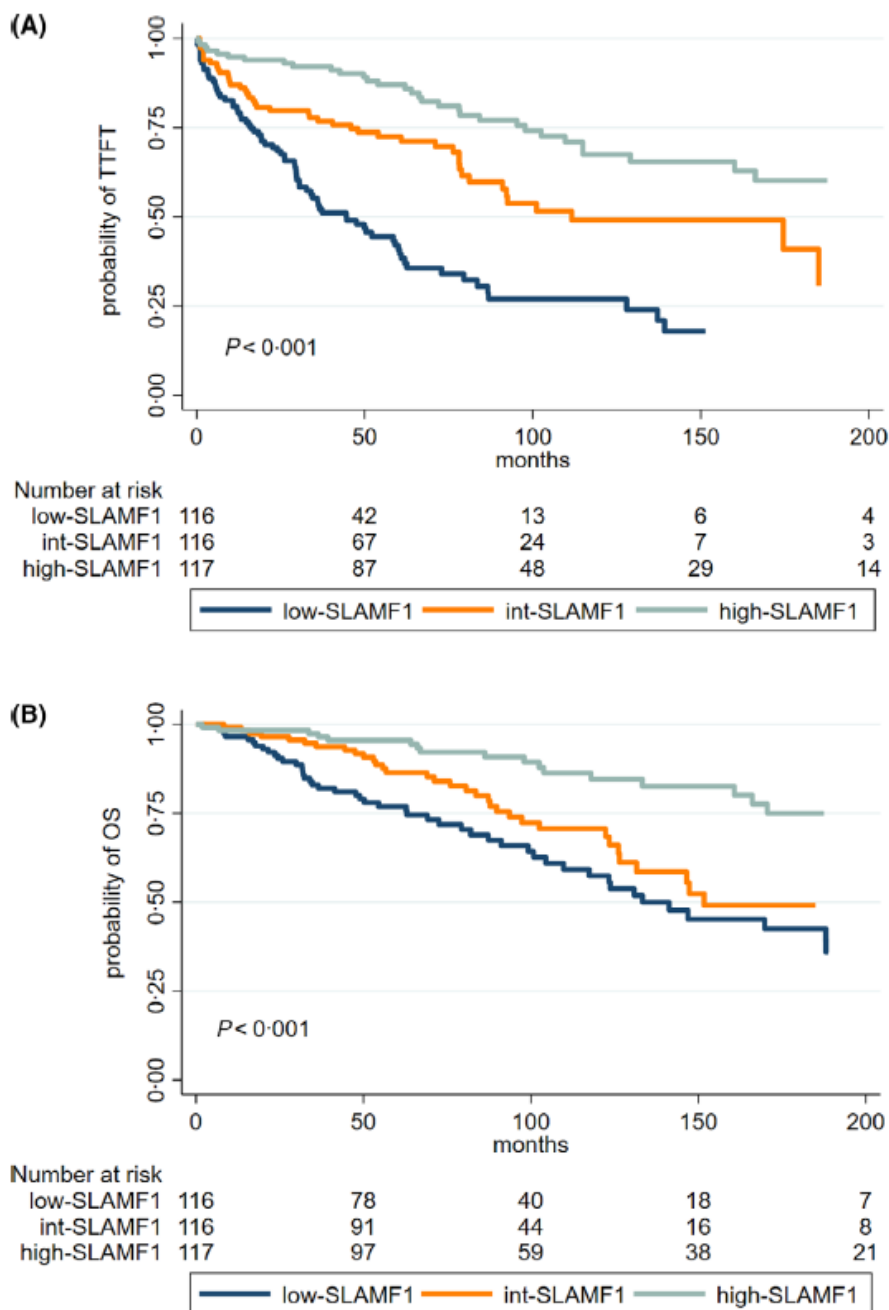


Figura 2.6.1. Time to first treatment (TTFT) (A) e sopravvivenza globale (OS) (B) in accordo ai livelli di *SLAMF1*

2.6.4 Discussione

Queste osservazioni potrebbero avere una implicazione di rilievo nella pratica clinica. La stretta correlazione tra i livelli di *SLAMF1*, la complessità citogenetica e le caratteristiche ad alto rischio genetico suggeriscono che *SLAMF1* potrebbe rappresentare un marker surrogato della complessità genomica, quando l'analisi citogenetica non sia disponibile. Inoltre, a differenza dall'analisi citogenetica, i livelli di *SLAMF1* potrebbero essere valutati mediante tecniche relativamente semplici, riproducibili ed affidabili, inclusa la ddPCR e la

citofluorimetria (Bologna, 2016). In questa analisi l'espressione di *SLAMF1* ha dimostrato di essere più informativa ed efficiente, rispetto alla citogenetica convenzionale nella definizione del rischio. In linea con un recente grande studio retrospettivo su 5290 pazienti con LLC (Baliakas, 2019), attraverso la citogenetica solo il 4% e l'11.2% dei nostri pazienti avevano CK5 e CK3, rispettivamente, che significa che dovrebbero essere eseguite 20 o 10 analisi del cariotipo per identificare un paziente con un CK5 o un CK3 rispettivamente. Per contro, una bassa espressione di *SLAMF1* ha mostrato un impatto prognostico molto significativo e indipendente in circa un terzo dei pazienti nel modello di analisi che includeva il CLL-IPI e il CK5.

Ovviamente, saranno necessari ulteriori studi per definire il migliore, e più rilevante, cut-off per l'applicazione clinica. Inoltre è interessante osservare come i pazienti con livelli int-*SLAMF1* mostrassero una prognosi intermedia (Figura 2.6.1), possibilmente correlata con un livello intermedio di caratteristiche genomiche ad alto rischio, che includono la *del11q* e lo stato mutazionale IGHV, senza caratteristiche citogenetiche di complessità (Tabella SI, allegato 5). Infine è da osservare che i livelli di *SLAMF1* sono stati associati con la risposta a specifici agenti terapeutici (Bologna, 2018). Livelli di *SLAMF1* down-regolati, attraverso la modulazione del pathway genetico che regola la chemiotassi e l'autofagia, renderebbe le cellule LLC potenzialmente non responsive a farmaci che inducono autofagia, inclusi gli inibitori di BCL-2 (Bologna, 2016). Se confermato in analisi prospettiva, questa osservazione potrebbe avere un significato clinico predittivo nei pazienti che dovessero necessitare un trattamento con venetoclax, che, come descritto recentemente, avrebbe un effetto simile sia nei casi con, che nei casi senza CK (Al-Sawaf, 2020).

2.6.5 Conclusioni

In conclusione i dati presentati supportano come la determinazione dei livelli di *SLAMF1* sia semplice, facilmente realizzabile e costituisca un biomarcatore con un buon rapporto costo-efficacia, con potenziale significato prognostico e predittivo da testare su una più ampia scala di pazienti, specie nell'era dei nuovi farmaci.

2.7 CONCLUSIONI

Il CK nella LLC costituisce un marcatore prognostico e predittivo robusto, con possibili ripercussioni cliniche e ricadute sulla scelta terapeutica. Questo ruolo prognostico sfavorevole in termini di OS, PFS e di TTFT appare evidente tanto con i trattamenti chemioimmunoterapici, quanto coi nuovi trattamenti (Cavallari, 2018) ed è risultato indipendente dal CLL-IPI (Rigolin, 2017a).

Grazie ai contributi apportati in questi anni abbiamo compreso che col termine di “cariotipo complesso”, globalmente inteso come la presenza di almeno 3 aberrazioni cromosomiche clonali, si intende un gruppo eterogeneo di pazienti, il cui andamento clinico dipenderà non solo da caratteristiche cromosomiche quantitative, ma anche qualitative. In particolare i pazienti con alterazioni cromosomiche strutturali maggiori (es. traslocazioni sbilanciate, addizioni, inserzioni, duplicazioni, cromosomi ad anello, cromosomi dicentrici)(Rigolin, 2018; Visentin, 2019) presentano un andamento clinico peggiore, così come i pazienti con elevata complessità citogenetica (≥ 5 aberrazioni cromosomiche), rispetto ai pazienti con complessità intermedia (4 aberrazioni) o bassa (3 aberrazioni) (Baliakas, 2019; Rigolin, 2018). Inoltre i pazienti con cariotipo complesso portatori di doppia trisomia (+12,+19) sono da considerarsi una categoria a parte, caratterizzata da un decorso clinico estremamente indolente (Baliakas, 2019). Infine la combinazione del CK con lo stato mutazionale IGHV, può contribuire ad affinare la stratificazione prognostica del paziente (Visentin, 2019).

Essendo le indagini di citogenetica convenzionale uno strumento standardizzato in grado di fornire informazioni complementari alla FISH e alla genetica molecolare, l'analisi del cariotipo dovrà essere inclusa auspicabilmente in trial prospettici, al fine di stabilire definitivamente il suo potere predittivo, così come suggerito dalle ultime linee guida iwCLL.

PARTE TERZA

LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA: IL TRATTAMENTO

3.1 CONSIDERAZIONI PRELIMINARI E INDICAZIONE AL TRATTAMENTO

Prima di definire qualsiasi tipo di trattamento è necessario considerare una serie di elementi che permettano di individuare una terapia disegnata sul singolo individuo.

i) Età e condizioni generali del paziente. Poiché l'età media dei pazienti alla diagnosi è compresa tra i 60 e i 70 anni, occorre vagliare attentamente le comorbidità. La presenza di patologie intercorrenti rappresenta un parametro prognostico indipendente rispetto al CLL-IPI (Rigolin, 2017a) e può essere valutata rigorosamente attraverso l'impiego della Cumulative Illness Rating Scale Geriatric (CIRS). Uno score CIRS di almeno 6 identifica pazienti "unfit" e può guidare nella scelta al trattamento (Parmalee, 1995).

ii) Caratteristiche cliniche e biologiche della malattia. Da un punto di vista clinico occorre distinguere se vi sia un prevalente coinvolgimento emato-midollare ovvero linfonodale, o se vi siano condizioni cliniche indirette, come la presenza di citopenie autoimmuni. La corretta identificazione di queste situazioni ha ricadute in un diverso approccio terapeutico. Sotto l'aspetto biologico sono invece fondamentali l'identificazione delle aberrazioni di *TP53*, della *del11q22* e dello stato mutazionale IGHV. La presenza di aberrazioni di *TP53* farà propendere per un approccio con target therapy, piuttosto che chemioimmunoterapico, mentre la presenza di uno stato mutazionale IGHV-M in assenza di *del11q22* o di *del17p13*/mutazioni *TP53* farà propendere verso un approccio chemioterapico tipo FCR (Fludarabina-Ciclofosfamide-Rituximab), vista la potenziale azione curativa dimostrata in questo subset di pazienti (Fischer, 2016; Rossi, 2015).

iii) Quando iniziare il trattamento. L'inizio del trattamento, secondo l'orientamento clinico attuale, è da prevedere soltanto in presenza di malattia clinicamente attiva, ovvero quando sia presente almeno uno dei criteri di trattamento secondo l'iWCLL (Tabella 3.1) (Hallek, 2018). Numerose evidenze sperimentali mettono in luce come non vi sia prolungamento della sopravvivenza nell'iniziare una terapia in condizioni di malattia clinicamente silente e stabile, rispetto ad un inizio del trattamento durante la fase evolutiva, nonostante si siano avuti notevoli evoluzioni in ambito terapeutico (Dighiero, 1998; Shustik, 1988; Montserrat, 1991; CLL trialists Collaborative group, 1999). L'inizio del trattamento in epoca precoce può esporre a rischi il paziente in relazione a numerose variabili quali l'età, le condizioni generali di salute e l'intrinseca tossicità dei farmaci; quest'ultima può essere responsabile di un importante incremento del rischio di infezione e probabilità di morte correlata al

trattamento nel 2% dei casi, a fronte della possibilità di mantenere uno stato asintomatico che può raggiungere anche gli 11 anni nel 49% dei pazienti in stadio Binet A (Mauro, 1999).

- Insufficienza midollare progressive evidenziata dallo sviluppo, o dal peggioramento di anemia e/o trombocitopenia ($Hb < 10$ g/dL o $PLT < 100 \times 10^9/L$).
- Splenomegalia massiva (≥ 6 cm dall'arco costale sn) o progressiva o sintomatica.
- Linfadenopatie massive (≥ 10 cm in diametro maggiore) o progressivi o sintomatici.
- Linfocitosi progressiva con un aumento $\geq 50\%$ nell'arco di 2 mesi o tempo di raddoppiamento linfocitario (LDT) < 6 mesi (estrapolato anche da un periodo di osservazione di 2-3 mesi con emocromo bisettimanale, escludendo cause secondarie quali infezioni o terapia steroidea). Questo criterio deve essere considerato a partire da una con di linfociti $\geq 30 \times 10^9/L$.
- Anemia o trombocitopenia autoimmune scarsamente responsiva allo steroide.
- Coinvolgimento extranodale con ripercussioni funzionali o sintomatiche (es. cute, reni, polmoni).
- Sintomi sistemici:
 - Calo ponderale $\geq 10\%$ non motivato nei sei mesi precedenti
 - Fatigue (peggioramento del Performance Status - ECOG ≥ 2)
 - Febbre $> 38^\circ C$ per almeno 2 settimane in assenza di segni di infezione
 - Iperdiaforesi notturna ≥ 1 mese in assenza di segni di infezione

Tabella 3.1.1 Criteri per la definizione di malattia attiva o in progressione (Hallek, 2018)

3.2 TRATTAMENTO

Le opzioni terapeutiche hanno subito notevoli variazioni nel corso degli anni, con conseguente miglioramento dell'*outcome*. Per anni la sola opzione terapeutica è stata rappresentata dal clorambucile (Han, 1973; Knospe, 1974; Eichhorst, 2009) e solo dagli anni '90 sono stati introdotti i primi regimi chemioterapici di combinazione (Fludarabina-Clorambucile) con impatto positivo sulla qualità e sulla durata della risposta nei pazienti più giovani (Eichhorst, 2006; Catovsky, 2007; Flinn, 2007). Una prima svolta significativa si è avuta con l'introduzione degli anticorpi monoclonali anti-CD20 (Rituximab, Ofatumumab e Obinutuzumab), con un netto incremento sulla sopravvivenza (Hallek, 2010; Goede, 2014b; Goede, 2015), ridefinendo lo standard di trattamento. Solo recentemente, con l'acquisizione di più approfondite conoscenze sulla patogenesi della malattia sono stati introdotti farmaci capaci di mirare alla sopravvivenza della cellula leucemica, con un meccanismo completamente differente rispetto alla chemioimmunoterapia. I farmaci concepiti in questo senso, sviluppati sinora sono due inibitori di chinasi, Ibrutinib ed

Idelalisib (colpiscono rispettivamente la Tirosin-chinasi di Bruton - BTK e la fosfatidilinositol-3-chinasi - PI3K) ed un antagonista di BCL-2, Venetoclax. Si tratta di farmaci estremamente attivi in grado di valicare le avversità prognostiche delle aberrazioni di (Sharman, 2014; O'Brien, 2016; Roberts, 2016; Stilgenbauer, 2016) e che stanno mutando radicalmente il modo di trattare la leucemia linfatica cronica.

3.2.1 Terapia di prima linea.

Le opzioni terapeutiche di prima linea per il trattamento della LLC devono tener presente le considerazioni preliminari. In particolare, la scelta del trattamento dovrà basarsi in prima istanza sulla presenza o meno di aberrazioni di *TP53*.

3.2.1.1 Terapia di prima linea in assenza di aberrazioni di *TP53*.

Nonostante i notevoli progressi degli ultimi anni, il regime chemioimmunoterapico FCR (Fludarabina-Ciclofosfamida-Rituximab) rappresenta ancora oggi il trattamento standard per i pazienti giovani e "fit" (CrCl>70 mL/min e CIRS<6) (Hallek, 2010; Robak, 2010; Keating, 2005). I dati di follow-up del trial CLL8 (FCR vs FC) hanno evidenziato come ad una mediana di osservazione di 5.9 anni, il 69% dei pazienti trattati con FCR sia ancora vivo, contro il 62% dei pazienti trattati con FC (Hallek, 2010). Inoltre una parte dei pazienti trattati con FCR in prima linea raggiungono un plateau di sopravvivenza cumulativa quando presentano uno stato mutazionale IGHV-M, l'assenza di *del17p13* e di *del11q22* (Fischer, 2016; Rossi, 2015). Tale osservazione pone le basi per ipotizzare che questo sottogruppo di pazienti possa raggiungere una vera e propria guarigione, anche in assenza di negativizzazione della MRD, poiché non mostrano più manifestazioni cliniche, né recidive di malattia anche dopo 10 anni (Fischer, 2016; Rossi, 2015). Il trattamento con FCR è gravato da tossicità non trascurabile, specie in termini di neutropenia grado 3-4 (34%) ed infezioni grado 3-4 (25%) (Hallek, 2010), per cui non è da considerare una opzione terapeutica per i pazienti anziani o "less fit". Lo studio di fase 3 CLL10 ha confrontato FCR vs BR (Bendamustina-Rituximab) in prima linea ed ha osservato come FCR al di sotto dei 65 anni, mostri una migliore PFS ed una migliore OS rispetto a BR (FCR 53.6 mesi vs 38.5 mesi p<0.001) (Heichhorst, 2016b). Tuttavia nei soggetti di età superiore ai 65 anni, non è stata osservata una differenza statisticamente significativa in termini di OS (NR vs 48.5 mesi, p=0.170) (Heichhorst, 2016b). I pazienti anziani trattati con FCR avevano avuto invece una maggiore tossicità midollare, con necessità di riduzione della dose o del numero di cicli somministrati

(Heichhorst, 2016b). Alla luce di questa osservazione un paziente anziano “fit” o “less fit” potrebbe giovare di un trattamento con BR piuttosto che FCR.

Nonostante le osservazioni fatte finora, molti pazienti della vita reale hanno un’età di molto superiore ai 70 anni. Uno studio ad hoc per questa categoria di pazienti è stato il CLL11, che ha arruolato pazienti anziani e fragili (CIRS ≥ 6), comparando Obinutuzumab-Clorambucile (G-CLB) con Rituximab-Clorambucile (R-CLB) (Goede, 2014b). I risultati hanno dimostrato una PFS mediana di 29.2 mesi vs 15.4 mesi ($p < 0.0001$), in assenza di vantaggio in termini di OS. Per questa categoria di pazienti è stato approvato l’impiego di G-CLB in prima linea. Un’altra associazione testata nei pazienti anziani e fragili è stata Ofatumumab-Clorambucile vs Clorambucile che si è dimostrata un’ottima associazione con una PFS mediana di 22.4 mesi vs 13.1 mesi ($p < 0.001$) (Hillmen, 2015). Infine anche l’associazione Rituximab-Clorambucile in uno studio di fase II ha mostrato ottimi risultati in questo setting di pazienti con una ORR dell’84%, un tasso di RC del 10%, una PFS mediana di 23.5 mesi ed un’OS non raggiunta, rendendo questo regime terapeutico un’ottima strategia alternativa (Foà, 2014) (Figura 3.2.1).

Recentemente uno studio di fase 3 ha confrontato Ibrutinib vs Clorambucile in pazienti anziani con comorbidità, mai trattati. Questo lavoro ha dimostrato un netto incremento della ORR (86% vs 35%, $p < 0.001$), della PFS mediana (non raggiunta vs 18.9 mesi) e della OS a 24 mesi (98% vs 85%) nei pazienti trattati con Ibrutinib (Burger, 2015). Alla luce di questo studio, Ibrutinib è stato approvato in prima linea nei pazienti anziani e con patologie intercorrenti, indipendentemente dallo stato mutazionale di TP53, introducendo una valida alternativa di trattamento chemo-free.

3.2.1.2 Terapia di prima linea in presenza di aberrazioni di TP53.

I pazienti portatori di aberrazioni di TP53 mostrano una malattia aggressiva, chemiorefrattaria e gravata da una pessima prognosi. Il trattamento per questi pazienti deve prevedere necessariamente un meccanismo d’azione indipendente da p53 (Figura 3.2.2). In passato il trattamento di questi pazienti prevedeva il ricorso ad un’associazione di alemtuzumab (anti-CD52) e steroide, un regime terapeutico gravato da un’elevata tossicità infettiva e dai risultati limitati (PFS mediana 18.3 mesi) (Pettitt, 2012) od il ricorso al trapianto allogenico. Dal 2013 alemtuzumab non è più un’opzione terapeutica per la LLC, mentre il trapianto allogenico rappresenta ancora oggi un’opportunità per una frazione

molto limitata di questa categoria di pazienti. Con l'avvento della terapia mirata (Ibrutinib, Idelalisib e Venetoclax), l'*outcome* dei pazienti con aberrazioni di *TP53* è radicalmente cambiato. Sia l'impiego di Ibrutinib come agente singolo (Byrd, 2014), sia l'uso di Idelalisib in combinazione con Rituximab (Furmann, 2014) od Ofatumumab (Jones, 2015) sono in grado di determinare un elevato tasso di risposte al trattamento e ottimi dati di PFS e di OS (O'Brien, 2016; Byrd, 2014; Furmann, 2014; Burger, 2014). Alla luce di questi risultati, questi farmaci si sono imposti come trattamento di prima scelta nei pazienti con mutazione di *TP53* o *del17p13*, pur mantenendo questi ultimi un *outcome* peggiore rispetto ai pazienti che non presentano queste aberrazioni (Sharman, 2014; O'Brien, 2016; Byrd, 2014; Furmann, 2014; Burger, 2014). La scelta dell'inibitore di tirosin-chinasi più adeguato si basa sul profilo di tossicità del farmaco e sulle comorbidità del paziente. Ad esempio pazienti con anamnesi positiva per pregresse infezioni da citomegalovirus o polmoniti da *Pneumocystis jirovecii* non dovrebbero assumere Idelalisib a causa dell'aumentato rischio infettivo evidenziato per questi agenti patogeni (Lampson, 2016), mentre pazienti cardiopatici dovrebbero essere valutati attentamente prima di essere posti in trattamento con Ibrutinib a causa dell'aumentato rischio di sviluppo di fibrillazione atriale (Leong, 2016).

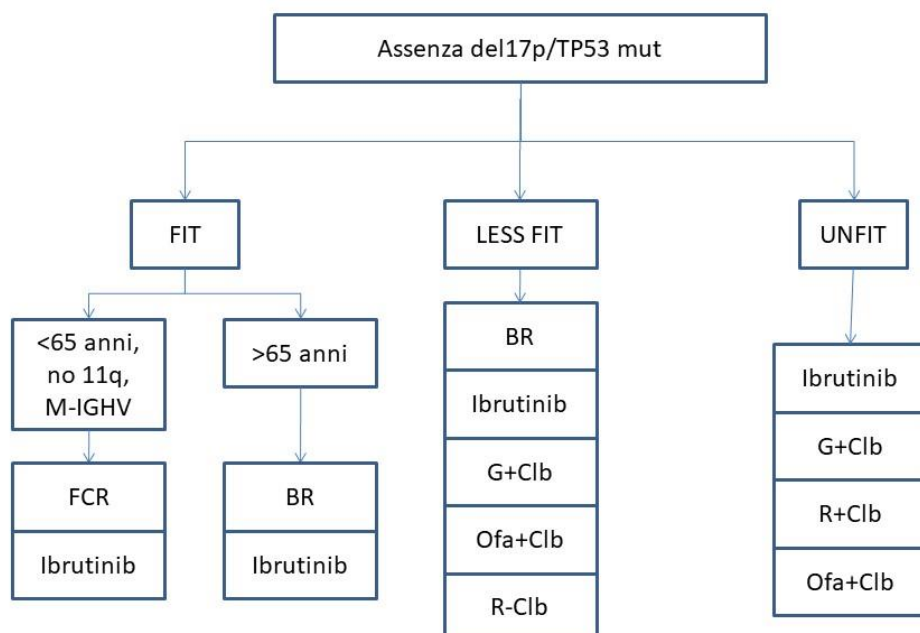


Figura 3.2.1. Algoritmo di trattamento in I linea di pazienti senza *del17p13*/mutazione *TP53*

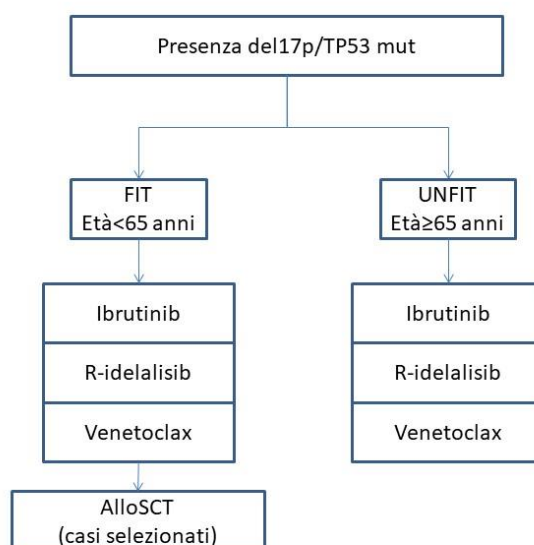


Figura 3.2.2. Algoritmo di trattamento in I linea di pazienti con *del17p13*/mutazione TP53

3.2.2 Terapia del paziente recidivato o refrattario.

Nonostante i notevoli progressi in termini di controllo della malattia con i trattamenti di prima linea, la recidiva è la norma. Se si esclude la quota di pazienti con IGHV-M e assenza di *del17p13* o *del11q22*, che mostrano una lunga PFS dopo il trattamento con FCR, la maggior parte dei pazienti avrà bisogno di un nuovo trattamento. L'ampia disponibilità di nuove terapie mirate rappresenta la vera sfida per il medico in termini di scelta e sequenza di somministrazione (Figura 3.2.3). Un secondo trattamento chemioimmunoterapico può essere considerato un'opzione solo nel caso in cui il paziente abbia avuto una PFS superiore ai 36 mesi (Hallek, 2018). La riduzione della riserva midollare indotta dalla chemioterapia e l'emergenza di cloni con *del17p13* può limitare questa scelta. Inoltre la ripetizione di un trattamento a base di fludarabina può incrementare il rischio di sviluppo di una mielodisplasia secondaria. In una piccola quota di pazienti potrebbe essere considerato il ricorso al trapianto allogenico come approccio potenzialmente curativo, in presenza di un donatore HLA – compatibile, ma per la maggior parte dei pazienti il trapianto non rappresenta un'opzione, a causa dell'età e/o delle comorbidità. Quando la recidiva di malattia è caratterizzata da una linfocitosi lenta e progressiva, potrebbe non richiedere alcun trattamento se non quando fossero soddisfatti i medesimi criteri di trattamento per la prima linea (Hallek, 2018). Prima di intraprendere una nuova terapia è necessario

ripetere le indagini citogenetiche e di biologia molecolare al fine di identificare l'eventuale comparsa di un clone portatore della del17p13/mutazione TP53 che possa condizionare la scelta del trattamento. In assenza di trial clinici che abbiano confrontato tra loro i diversi farmaci target, la scelta terapeutica dovrà essere essenzialmente basata sulle caratteristiche del paziente e su eventuali tossicità pregresse. Numerosi dati supportano la bontà del trattamento con target therapy nei pazienti recidivati o refrattari (R/R), anche in presenza di aberrazioni di TP53. Il follow up dei pazienti R/R trattati con Ibrutinib ha documentato una PFS di 30 mesi nel 69% dei pazienti (Byrd, 2015) con una PFS mediana di 29 mesi per i portatori di del17p13 nello studio RESONATE-17 (O'Brien, 2016). In uno studio di fase 3 che ha confrontato Idelalisib-Rituximab vs Placebo-Rituximab in pazienti R/R è stato documentato un significativo incremento della PFS e della OS nel braccio Idelalisib (42% dei pazienti erano portatori di aberrazioni di TP53) (Furmann, 2014). Infine Venetoclax si è dimostrato molto efficace nella LLC, dimostrando una ORR del 79% con il 20% di RC (5% MRD-negative) in una popolazione di pazienti R/R fortemente pretrattati (Roberts, 2016) ed una ORR del 79% con l'8% di RC in pazienti R/R con aberrazioni di TP53 (Stilgenbauer, 2016). Studi di combinazione di Venetoclax con anti-CD20 (Rituximab o Obinutuzumab) in pazienti R/R hanno fornito ottimi risultati con tassi di RC rispettivamente del 41% e del 24% ed elevata MRD-negatività (50%) (Brander, 2016; Flinn, 2015). Tali risultati sono stati confermati nello studio di fase 3 MURANO, in cui il confronto tra Venetoclax-Rituximab vs Bendamustina-Rituximab ha fornito dati straordinari in termini di PFS (84.9% vs 36.3% a 2 anni; 81.5% vs 27.8% in pazienti con del17p13 a 2 anni) (Seymour, 2018) per cui il trattamento di combinazione Venetoclax-Rituximab può essere considerata come ulteriore opzione terapeutica in questo setting di pazienti.

3.2.3 Resistenza, progressione e sequenza di trattamento.

La progressione di malattia dopo un trattamento prolungato con Ibrutinib è stata associata ad una scarsa sopravvivenza (17.6 mesi dalla progressione di LLC, 3.5 mesi in caso di trasformazione in sindrome di Richter) (Maddocks, 2015). La trasformazione in Richter è stata riportata come complicanza precoce del trattamento con Ibrutinib, ma si è verificata soprattutto in pazienti con anomalie citogenetiche sfavorevoli come il cariotipo complesso e anomalie di MYC alla FISH (Shustik, 2017). Studi su pazienti che hanno sviluppato una resistenza ad Ibrutinib hanno documentato la presenza di una mutazione al sito di legame al BTK C481S, con conseguente perdita di funzione del farmaco (Woyach, 2014). Un'analisi

retrospettiva su 123 pazienti che hanno interrotto il trattamento con Ibrutinib o con Idelalisib per tossicità o progressione, ha dimostrato che i pazienti rispondono ad un trattamento alternativo (40% PR+PRL a farmaci non inibitori di chinasi e 60-67% ad un inibitore di chinasi alternativo) (Mato, 2016). Risultati preliminari di uno studio di fase II in corso hanno messo in luce l'efficacia di venetoclax nei pazienti recidivati dopo trattamento con Ibrutinib o Idelalisib (Jones, 2016). Dati analoghi sono stati riportati in uno studio di "real-world" che ha messo in luce come dopo il fallimento di un trattamento con un inibitore di chinasi, l'uso di un inibitore alternativo o di Venetoclax determini una PFS superiore se confrontato alla chemioterapia, mentre dopo l'interruzione di Ibrutinib si otterrebbe un giovamento dall'impiego di Venetoclax piuttosto che dall'impiego di Idelalisib (Mato, 2017).

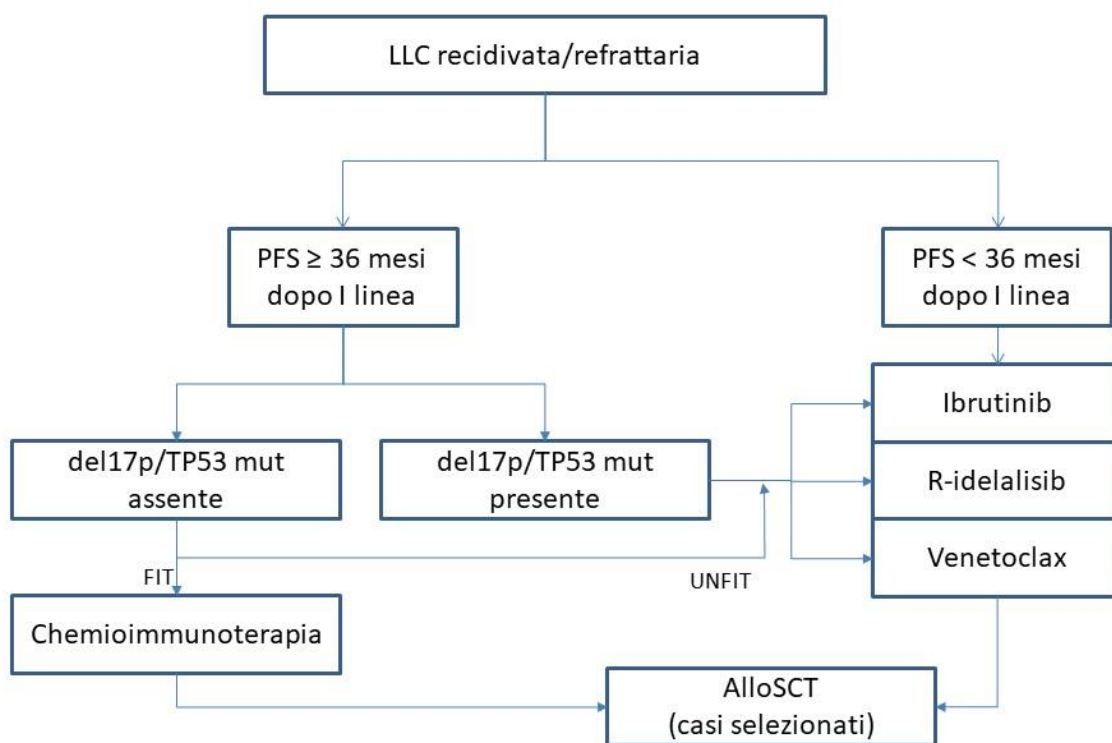


Figura 3.2.3. *Algoritmo di trattamento di pazienti recidivati/refrattari.*

3.2.4 Risposta al trattamento.

La risposta al trattamento negli anni è stata definita come risposta completa o risposta parziale ad un trattamento e deve essere valutata almeno 2 mesi dopo il termine di un trattamento (Hallek, 2018). Per risposta parziale (RP) si intende un riduzione di almeno il 50% del carico tumorale, valutato a livello linfonodale, splenico ed epatico, una riduzione del 50% della linfocitosi, una conta piastrinica superiore alle $100 \times 10^9/L$ (o $\geq 50\%$ rispetto al basale) e valori di Hb >11 g/dL (o $\geq 50\%$ rispetto al basale), in assenza di ricorso a trasfusioni o fattori di stimolazione (Hallek, 2018). Per risposta completa (RC) si intende invece la normalizzazione dell'emocromo, la risoluzione delle linfadenomegalie e della splenomegalia ed una normale funzione midollare (Hallek, 2018). L'uso della TC nella definizione della risposta al trattamento sta divenendo sempre più comune, specie all'interno dei trial clinici. Nello specifico la ripetizione dell'indagine TC nel monitoraggio del paziente nel tempo non sembra avere alcuna ripercussione in termini prognostici (Kipps, 2017). In considerazione della differente modalità di risposta ai farmaci che interferiscono con il pathway del BCR è stata introdotta una nuova categoria di risposta definita risposta parziale con linfocitosi (PRL). Si tratta di una riduzione superiore al 50% delle linfadenomegalie e della splenomegalia e linfocitosi persistente con valori di linfociti spesso uguali o superiori a quelli osservati precedentemente al trattamento.

Nel setting dei trial clinici sta divenendo sempre più comune la valutazione della malattia minima residua (MRD). La MRD è definita negativa quando il numero di cellule LLC rispetto alla popolazione mononucleata nel sangue o nel midollo scende al di sotto dello 0.01%. La MRD può essere valutata mediante tecnica citofluorimetrica, mediante PCR o mediante NGS sul riarrangiamento della porzione variabile delle immunoglobuline (Thompson, 2016). Nonostante i numerosi studi che stanno valutando la MRD in ambito sperimentale, il migliore elemento predittivo su una PFS ed una OS duratura sembrerebbe essere il raggiungimento della RC indipendentemente dalla MRD negativa (Kipps, 2017).

3.2.5 Nuove strategie terapeutiche.

Immunomodulatori (IMiDs). I farmaci immunomodulatori, come talidomide e lenalidomide, sono stati approvati per il trattamento di altre neoplasie ematologiche quali mieloma multiplo, linfomi e sindromi mielodisplastiche. Nonostante questi farmaci abbiano dimostrato un'utilità clinica nei pazienti affetti da LLC, hanno ancora un impiego molto

modesto in associazione a un anti-CD20 (James, 2014; Chavez, 2016). La lenalidomide nella LLC è in grado di indurre l'espressione di p21WAF1/CIP1, che inibisce la chinasi ciclina dipendente e la proliferazione delle cellule LLC (Fectau, 2014); implementa la formazione della sinapsi immunologica, incrementando potenzialmente la funzione immunologica (Ramsay, 2008); riduce la severità dell'ipogammaglobulinemia (Badoux, 2011c). Gli effetti limitanti l'impiego della lenalidomide sono rappresentati dalla mielotossicità, TLS ed un rebound della massa tumorale (*tumor flare*). Per ragioni sconosciute, i pazienti affetti da LLC sono molto sensibili al trattamento con lenalidomide, rendendosi sufficienti dosaggi di 2.5-5 mg al giorno. L'associazione con aspirina a basse dosi è raccomandata per ridurre il rischio trombotico. La lenalidomide ha mostrato una ORR del 60% (15% di RC) quando impiegata in prima linea ed una ORR del 40% (8% di RC) nei pazienti recidivati/refrattari (Ferrajoli, 2008; Badoux, 2011c). In uno studio di fase II lenalidomide in I linea nei pazienti over 65 anni ha mostrato una ORR del 65% ed un tasso di RC del 10% (Badoux, 2011c). Uno studio di fase III sulla stessa categoria di pazienti ha mostrato un incremento del numero di morti nei pazienti in trattamento con lenalidomide, rispetto ai pazienti in trattamento con Clorambucile. In uno studio di fase II multicentrico, l'impiego di lenalidomide per 7 mesi, in associazione a Rituximab in pazienti di età <65 anni ha mostrato una ORR del 95% ed un tasso di RC del 20%, mentre nei pazienti di età ≥65 anni ha mostrato una ORR del 78% con un tasso di RC del 11% (James, 2014). In questo stesso studio la PFS mediana si attestava attorno ai 20 mesi per entrambi i gruppi fornendo dati fortemente incoraggianti. La talidomide a differenza dalla lenalidomide ha un effetto limitato nella LLC, ma ha mostrato efficacia quando associata a mAb anti-CD20 (Giannopoulos, 2011).

Terapia T cellulare con recettori antigenici chimerici (CAR-T). Le cellule T possono essere modificate ex vivo al fine di esprimere nuovi recettori di superficie conosciuti come recettori antigenici chimerici (CARs), i quali sono stati ingegnerizzati per colpire le cellule neoplastiche, espansi in vitro, quindi reintrodotti in circolo per il trattamento della LLC. Sia le cellule leucemiche, sia i linfociti B normali esprimono il CD19, per cui questo antigene di superficie è stato selezionato come bersaglio delle CAR-T impiegate per il trattamento della LLC. I primi studi di trattamento con questa particolare terapia cellulare hanno documentato una PFS duratura ed una sopravvivenza libera da eventi di lunga durata. Di 14 pazienti trattati con la tecnologia CD19-targeted CAR-T, 4 hanno ottenuto una RC e 4

una RP (Porter, 2015). Numerosi studi sullo sviluppo della tecnologia CAR-T sono in fase di sviluppo.

Inibitori del checkpoint. I checkpoint immunitari sono delle molecole espresse sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene che regolano il sistema immunitario attraverso segnali co-stimolatori o co-inibitori a ligandi espressi sulle cellule T od altre cellule effettrici del sistema immunitario. La conoscenza dei meccanismi attraverso i quali le cellule neoplastiche evadono la sorveglianza immunitaria ha permesso di mettere a punto una nuova categoria di farmaci definiti inibitori del checkpoint, il cui impiego è già una realtà nell'ambito di neoplasie solide e linfomi (Sharma, 2015). Il recettore PD1 ed i suoi ligandi PD-L1 e PD-L2 rappresentano il principale sistema di modulazione negativa del sistema immunitario. Le cellule della LLC esprimono un'elevata concentrazione di PD-L1 e PD-L2, e possono sopprimere la risposta dei linfociti T esprimenti il PD1 (Ramsay, 2012), determinando un esaurimento funzionale del comparto T linfocitario.

Gli studi preclinici su modelli murini hanno documentato che gli inibitori del checkpoint possono riattivare le cellule effettrici del sistema immunitario e ripristinare l'attività anti-leucemica (McClanahan, 2015). Studi di fase I/II sull'impiego degli inibitori del checkpoint nella LLC sono in corso, ma non hanno mostrato sinora grossi risultati, possibilmente anche in considerazione della profonda immunosoppressione tipica di questa malattia (Kipps, 2017).

3.3 CONTRIBUTO SPERIMENTALE:

Efficacy of bendamustine and rituximab in unfit patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia. Indirect comparison with ibrutinib in a real-world setting. A GIMEMAERIC and US study (Allegato 6)

3.3.1 Razionale dello studio

In una quota rilevante di pazienti anziani *e/o unfit*, il trattamento secondo schema FCR non può essere somministrato, a causa del suo profilo di tossicità, per cui per questa categoria di pazienti sono stati sviluppati regimi meno tossici, come l'associazione bendamustina-rituximab (BR) o clorambucile-rituximab (Zoellner, 2016), molto utilizzati nella pratica clinica. Recentemente è stato dimostrato come nei pazienti LLC non precedentemente trattati, ibrutinib sia in grado di fornire una PFS più lunga rispetto ai pazienti trattati con CIT (Moreno, 2019; Woyach, 2018; Shanafelt, 2019), pertanto gli esperti raccomandano l'impiego di ibrutinib in prima linea, specie nei pazienti più anziani o nei pazienti più giovani con aberrazioni di *TP53* o caratteristiche immunogenetiche sfavorevoli (IGHV-U) (Jain, 2018; Kipps, 2017; Hallek, 2019). Uno studio osservazionale sull'impiego della CIT nel "mondo reale", al di fuori dei trial clinici, ha messo in evidenza come questi regimi siano sicuri ed efficaci (Gentile, 2016b; Cuneo, 2018; Laurenti, 2017), anche se spesso è necessaria una riduzione delle dosi nella pratica clinica e questo può avere un impatto sull'*outcome* (Herishanu, 2015). Analogamente i tassi di interruzione e di sopravvivenza nei pazienti trattati con ibrutinib sono probabilmente peggiori nella pratica clinica, rispetto a quanto riportato dai trial clinici, probabilmente come conseguenza della maggiori comorbidità e dei peggiori performance status dei pazienti nella pratica clinica (UK CLL Forum, 2016; Ghia, 2016; Mato, 2018). Recentemente, un confronto indiretto tra i pazienti che avevano ricevuto BR o ibrutinib come primo trattamento di salvataggio al di fuori dei trial clinici non ha documentato alcuna differenza in termini di OS (Cuneo, 2018). Poiché vi sono informazioni limitate circa l'efficacia e la sicurezza di BR nei pazienti *unfit*, in questo studio è stata analizzata l'efficacia di questo regime in una serie di pazienti al di fuori di studi clinici ed è stato condotto un confronto indiretto con una serie di pazienti anziani trattati con ibrutinib in prima linea in un contesto del "mondo reale" (Mato, 2018).

3.3.2 Metodi

3.3.2.1 Pazienti. I pazienti inclusi in questo studio retrospettivo sono stati selezionati da una serie di pazienti trattati in prima linea con BR, tra il 2008 e il 2014, presso i centri del

gruppo GIMEMA e del gruppo ERIC e da una serie di pazienti trattati con ibrutinib provenienti da 20 centri degli Stati Uniti.

3.3.2.2 BR nei pazienti unfit. I criteri di inclusione nello studio erano: (a) LLC in progressione in accordo ai criteri NCI (Hallek, 2008), (b) nessun precedente trattamento per la LLC, (c) clearance della creatinina <70 mL/min e/o $\text{CIRS} > 6$ (pazienti *unfit*) (Goede, 2014a), (d) aver ricevuto almeno un giorno di trattamento secondo lo schema BR (Fischer, 2012). I pazienti venivano esclusi dallo studio in caso di sindrome di Richter prima dell'inizio del trattamento, infezione da HIV e infezioni HCV e/o HBV attive o non controllate. La risposta al trattamento era definita in accordo ai criteri NCI (Hallek, 2008). L'endpoint primario era la PFS a 12 mesi. Gli endpoint secondari erano il tasso di risposta globale (*overall response rate* - ORR), il TTNT, e la OS, come definiti altrove (Cuneo, 2018). I dati di sicurezza sono stati riportati in accordo ai criteri NCI (*Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0*). Lo studio era stato registrato presso ClinicalTrials.gov (NCT02491398) ed era stato approvato da un gruppo di revisori appartenenti a ciascuna istituzione partecipante.

3.3.2.3 Confronto indiretto con ibrutinib. I dati clinici sono stati ottenuti esaminando le cartelle cliniche e i dataset dei pazienti ≥ 65 anni arruolati nello studio GIMEMA ERIC che avevano ricevuto BR in prima linea e dei pazienti ≥ 65 anni arruolati in uno studio statunitense che avevano ricevuto ibrutinib (Mato, 2018). Sono stati esclusi i pazienti con aberrazioni di *TP53*. Gli endpoint di questa analisi sono stati il PFS e la OS.

3.3.2.4 Analisi statistica. L'analisi è stata eseguita seguendo il principio dell'*"intention to treat"* (Cuneo, 2018), utilizzando il software SAS (versione 9.4 o successiva) con un livello di significatività di 0.05. I dati sono stati raccolti e gestiti utilizzando lo strumento elettronico di acquisizione dei dati *REDCap* (Harris, 2009).

3.3.3 Risultati

3.3.3.1 Trattamento con BR nei pazienti unfit.

Sono stati arruolati 157 pazienti trattati in 31 centri (24 centri GIMEMA e 7 centri ERIC). Le caratteristiche di base sono riportate in tabella 3.3.1. L'età media era 72 anni. L'80.9% dei pazienti era >65 anni; il 69.2% aveva ≥ 2 comorbidità, la clearance della creatinina mediana era 59.8 mL/min e il 58.9% aveva uno stadio B-C (Binet). Il 51% (dati disponibili nel 56.7% dei pazienti) era IGHV-U, il 17.6% aveva aberrazioni di *TP53* (dati disponibili nell'83.4% dei pazienti). 114 pazienti su 157 (73.1%) avevano ricevuto il numero di cicli pianificato, mentre

il trattamento era stato interrotto per tossicità nel 18% dei pazienti (n=28), per ritiro del consenso nel 2% dei casi (n=3), per altri motivi nel 7% (n=11). Il numero di cicli effettivamente somministrati ai pazienti che hanno interrotto il trattamento era ≥ 4 nel 71% dei casi. La dose iniziale di bendamustina era 90 mg/m² nel 45.8% dei pazienti, 70 mg/m² nel 33.1% dei pazienti e 50-70 mg/m² nel 21.1% dei pazienti. Una riduzione della dose >10% della dose pianificata è stata registrata nel 24.2% dei casi; un ritardo del trattamento si è verificato nel 22.9% dei pazienti. Il trattamento di seconda linea è stato offerto alla progressione sintomatica secondo le linee guida locali.

Variable (n. of patients)	N. of patients (%)
age ≤ 65 / >65 years (n = 157)	30 (19.1)/127 (80.9)
median age (range) (n = 157)	72.5 (39-89)
stage ^a early/intermediate-advanced (n = 129)	53 (41.1)/76 (58.9)
gender male/female (n = 157)	95 (60.5)/62 (39.5)
ECOG PS 0/1/ ≥ 2 (n = 154)	68 (43.3)/70 (44.6)/ 16 (10.2)
N. of comorbidities 0-1/ ≥ 2 (n = 156)	48 (30.8)/108 (69.2)
Median Cr Cl ml/min (range) (n = 157)	59.8 (22.0–137.0)
beta 2 microglobulin ≥ 3.5 / <3.5 mg/L (n = 113)	94 (83.2)/19 (16.8)
IGHV Mutated/Unmutated (n = 89)	44 (49.4)/45 (50.6)
17p- and/or TP53 mutated yes/no (n = 131)	23 (17.6)/108 (82.4)
FISH abns 13q-/+12/11q-/17p-/normal (n = 111)	34 (30.6)/24 (21.6)/10 (9.0)/7 (6.3)/36 (32.4)

Note: Legend: ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; Cr Cl, Creatinine clearance.

^aEarly: Binet A.

Tabella 3.3.1. Caratteristiche di 157 pazienti nel gruppo BR

3.3.3.2 Efficacia

L'ORR a BR era del 91.7% con una probabilità di ottenere una risposta significativamente più bassa nei pazienti con aberrazioni di TP53 rispetto ai pazienti senza aberrazioni di TP53 (50% vs 85.1%, P=0.02). Le altre variabili non hanno mostrato alcun impatto significativo sull'ORR (tabella S2, allegato 6). La PFS mediana era di 45 mesi (Figura 3.3.1A, con una PFS a 12 mesi del 93% (95% CI 89.0%-97.1%). Le PFS stimate a 24 anni e a 36 mesi erano dell'81% (95% CI 74.5%-88.2%) e del 66.8% (95% CI 74.5%-88.2%), rispettivamente. I fattori associati a un PFS più breve all'analisi univariata sono state le aberrazioni di TP53, il performance status ECOG e la presenza di 2 o più comorbidità, come mostrato in tabella 3.3.2, mentre uno stadio intermedio/avanzato e uno stato IGHV-U hanno mostrato un

significato borderline. L'età (*cut-off* 65 anni) e gli altri parametri clinico-biologici non hanno avuto alcun impatto sulla PFS. Le aberrazioni di *TP53* hanno rappresentato l'unico parametro avverso all'analisi multivariata (tabella 3.3.2, figura 3.3.1B). Un trattamento di seconda linea era stato somministrato al 3.2% (95% CI 1.2%-6.9%), all'8.3% (95% CI 4.3%-13.9%) e al 21.5% (95% CI 13.1%-31.1%) dei pazienti a 12, 24 e 36 mesi, rispettivamente (figura S1, allegato 6). Un TTNT più breve era associato alle aberrazioni di *TP53* ($P<0.01$; tabella S2, allegato 6). La OS a 12, 24 e 36 mesi era del 96.2% (95% CI 93.2%-99.2%), del 90.1% (95% CI 85.0%-95.5%) e del 79.5% (95% CI 70.0%-90.5%), rispettivamente, con una OS mediana non raggiunta a un follow-up mediano di 26 mesi (figura 3.3.2). La presenza di aberrazioni di *TP53* ($P<0.01$) e la mancanza di risposta al trattamento ($P<0.01$) sono state associate a una OS più breve alle analisi univariata e multivariata (tabella 3.3.3). Gli altri parametri clinico-biologici non hanno avuto alcun impatto sulla OS. 22 pazienti sono morti ($n=2$ a causa di LLC, 9.1%; $n=12$ per infezione con o senza LLC attiva, 54.6%; $n=3$ per seconde neoplasie, 13,6%; $n=1$ per malattia cardiaca con morte improvvisa). In tre pazienti, la causa del decesso non è stata segnalata.

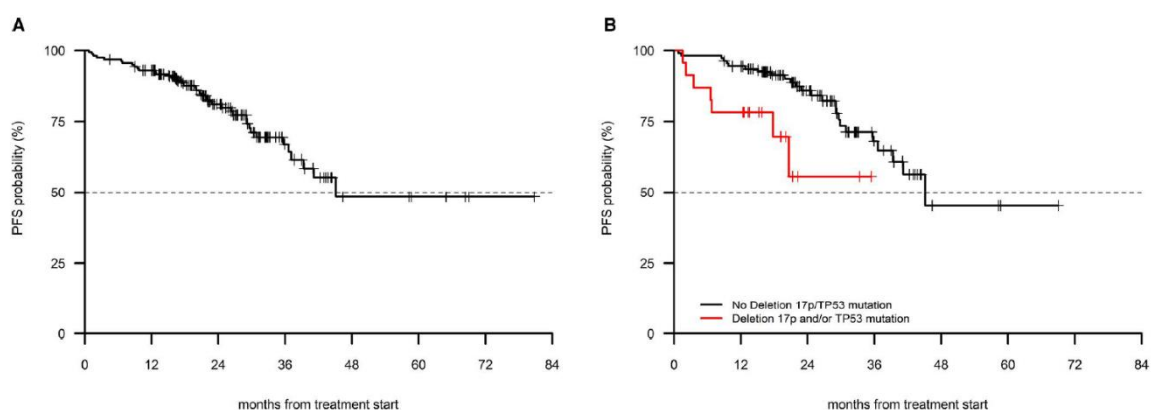


Figura 3.3.1. PFS in 157 pazienti trattati con BR (A) nell'intera coorte, (B) nei pazienti con e senza aberrazioni di *TP53*.

3.3.3.3 Sicurezza

Il 42% dei pazienti trattati con BR ha riportato almeno un evento avverso di grado 3-4. Complessivamente, le citopenie sono state registrate nel 34% dei pazienti. Nel 24% dei casi si era verificato neutropenia di grado 3-4, mentre le infezioni di grado 3-4, tra cui le neutropenie febbrili si sono registrate nell'11% dei pazienti. È stato segnalato un caso di infezione fatale. Eruzione cutanee e/o dermatiti di grado 3-4 sono state segnalate nel 3% dei pazienti.

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age > 65 vs ≤ 65 years	1.85 (0.66-5.24)	0.24		
Binet B-C vs Binet A	2.16 (0.95-4.92)	0.07		
beta 2 microglobulin ≥ 3.5 vs < 3.5 mg/L	1.64 (0.57-4.70)	0.36		
IGHV unmutated vs mutated	2.29 (0.92-5.69)	0.07		
17p- and/or TP53 mutated yes vs no	3.14 (1.29-7.63)	0.01	2.52 (1.00-6.39)	0.05
Gender female vs male	0.60 (0.31-1.17)	0.13		
ECOG 0 vs 1	1.64 (0.78-3.46)	0.19		
ECOG 0 vs ≥ 2	3.12 (1.25-7.81)	0.02		
Comorbidities 0-1 vs ≥ 2	2.91 (1.14-7.45)	0.03		
Creatinine clearance ≤ 70 vs > 70 mL/min	1.76 (0.69-4.54)	0.24		

Tabella 3.3.2. PFS: analisi univariata e multivariata nel gruppo BR

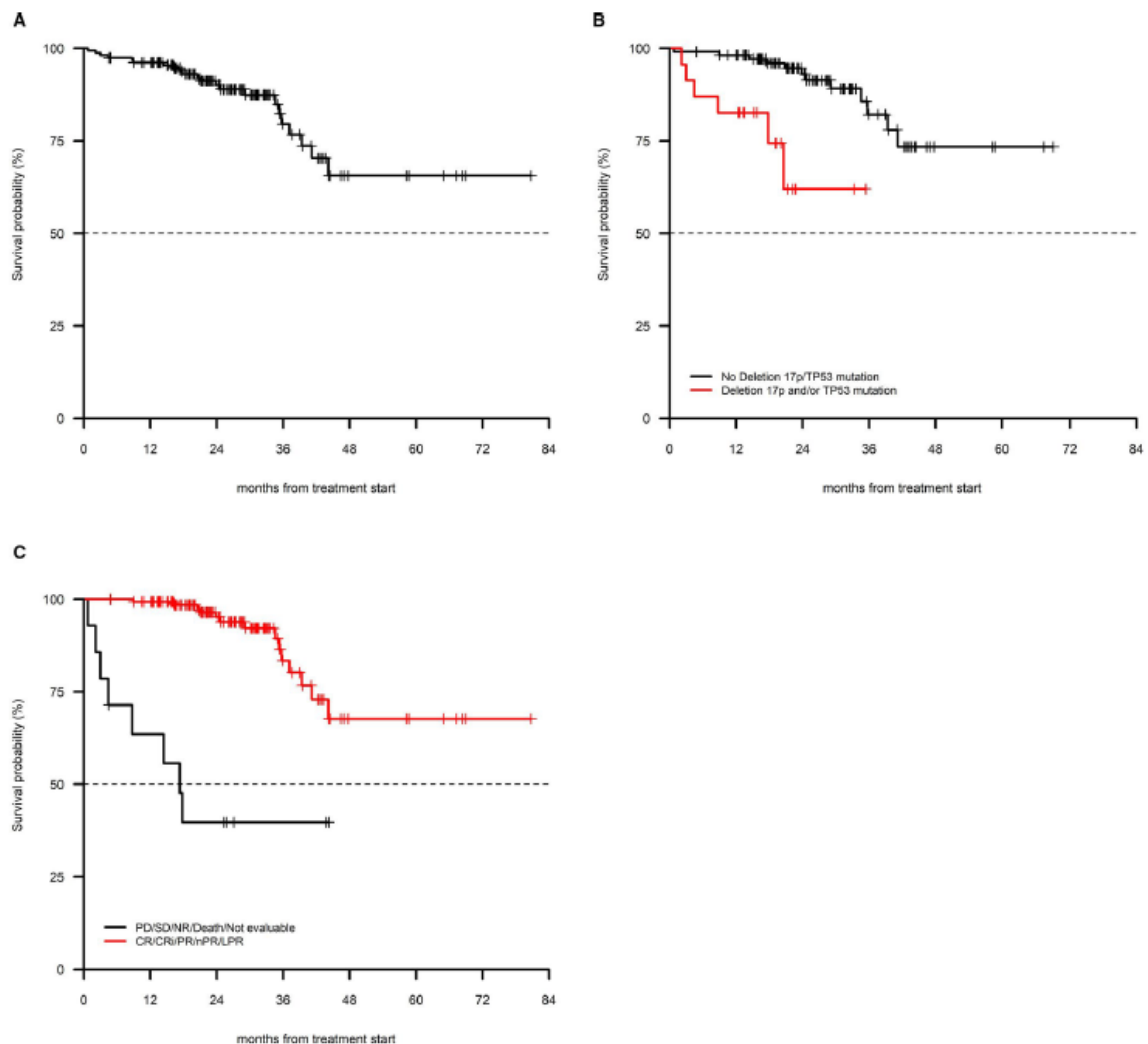


Figura 3.3.2. OS in 157 pazienti trattati con BR (A) nell'intera coorte, (B) nei pazienti con e senza aberrazioni di TP53, (C) nei pazienti che hanno risposto al trattamento vs quelli che non hanno risposto

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age > 65 vs ≤ 65 years	3.95 (0.53-29.50)	0.18		
Binet B-C vs Binet A	2.42 (0.79-7.41)	0.12		
β2 microglobulin ≥ 3.0-5 vs < 3.5 mg/L	4.11 (0.55-30.92)	0.17		
IGHV unmutated vs mutated	0.81 (0.22-3.05)	0.76		
17p- and/or TP53 mutated yes vs no	6.14 (2.08-18.13)	<0.01	4.47 (1.37-14.56)	0.01
NR vs CR or PR	8.43 (3.52-20.19)	<0.01	15.21 (5.72-40.74)	<0.01
Gender female vs male	0.68 (0.29-1.64)	0.39		
ECOG 0 vs 1	2.28 (0.79-6.59)	0.13		
ECOG 0 vs ≥ 2	4.90 (1.48-16.19)	0.01		
Comorbidities 0-1 vs ≥ 2	1.79 (0.60-5.29)	0.29		
Creatinine clearance ≤ 70 vs > 70 mL/min	3.02 (1.01-9.09)	0.05		
no-aberrations vs 13q	0.74 (0.12-4.45)	0.74		
11q- vs 13q	3.18 (0.52-19.37)	0.21		
+12 vs 13q	3.88 (0.90-16.71)	0.07		
17p- vs 13q	11.29 (2.08-61.14)	<0.01		

Legend: NR, no response; CR, complete response; PR, partial response.

Tabella 3.3.3. OS: analisi univariata e multivariata nel gruppo BR

3.3.3.4 Confronto tra BR del dataset GIMEMA/ERIC e ibrutinib del dataset statunitense

Sono stati analizzati i dati di 165 e 162 pazienti anziani senza aberrazioni di TP53 trattati rispettivamente con BR e con ibrutinib. Il follow-up mediano nel gruppo BR e nel gruppo ibrutinib è stato rispettivamente di 29 mesi (95% CI 26-31) e 13 mesi (95% CI 10-14). Come indicato in tabella 3.3.4, i due gruppi erano comparabili in termini di età e frequenza di *del11q*. I pazienti con stadio Rai avanzato erano più frequenti nel gruppo ibrutinib rispetto al gruppo BR, mentre l'intervallo tra la diagnosi e il trattamento era più lungo nel gruppo ibrutinib. I fattori associati a un PFS più lunga all'analisi multivariata nella popolazione di pazienti combinata trattata con BR e ibrutinib sono stati rappresentati dall'età come variabile continua e dal trattamento con ibrutinib (tabella 3.3.5). L'età era l'unico fattore predittivo per una OS più breve all'analisi multivariata (HR 1.10, 95% CI 1.04 - 1.15, P<0.01). In un'analisi *post hoc* che ha incluso pazienti in fase avanzata (ad esempio Rai III-IV), la coorte di ibrutinib (n=96 pazienti) e la coorte BR (n=46 pazienti) erano comparabili in termini di età (*cut-off* 70 anni) e di intervallo tra diagnosi e trattamento di prima linea (*cut-off* 36 mesi), come mostrato in tabella 3.3.6. Un significativo vantaggio di PFS è stato osservato nel gruppo di ibrutinib (P=0.03), che ha anche mostrato una tendenza per un vantaggio in termini di OS (P=0.08, Figura 3.3.3A-B). I pazienti in stadio precoce/intermedio

nel gruppo BR (n=79) e nel gruppo ibrutinib (n=59) avevano un'età e un intervallo tra la diagnosi e l'intervallo la diagnosi e il trattamento di prima linea (tabella 3.3.6). Non è stata osservata alcuna differenza in termini di PFS (P=0.89) e OS (P=0.66) in questi pazienti (Figura 3.3.4A-B).

	BR n = 165 (%)	ibrutinib = 162 (%)	P
Age ≤ 70/ >70 years	53 (32.1)/ 112 (67.9)	53 (32.7)/ 109 (67.3)	1.00
gender Male/ Female	106 (64.2)/ 59 (35.8)	102 (63.0)/ 60 (37.0)	0.90
Time dx-trx ^a < 36/≥36 months	99 (60.0)/ 66 (40.0)	69 (42.6)/ 93 (57.4)	<0.01
RAI ^b stage 0-2/ 3-4	79 (63.2)/ 46 (36.8)	59 (38.1)/ 96 (61.9)	<0.01
del11q no/ yes	101 (89.4)/ 12 (10.6)	125 (87.4)/ 18 (12.6)	0.77

^aInterval between diagnosis and treatment.

^bThe Rai staging system was used here because it was adopted in the US cohort.

Tabella 3.3.4. Caratteristiche dei pazienti nel gruppo BR e nel gruppo ibrutinib

Variable	univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age (as continuous variable)	1.05 (1.02-1.09)	<0.01	1.06 (1.02-1.10)	<0.01
RAI 3-4 vs 0-2	1.09 (0.66-1.79)	0.73	—	—
11q- yes vs no	2.13 (1.04-4.37)	0.04	—	—
Time dx-trx ^a (continuous variable)	1.00 (0.99-1.00)	0.62	—	—
interval dx-trx ^a ≥ 36 vs < 36 months	0.89 (0.57-1.38)	0.61	—	—
Ibr vs. BR	0.60 (0.36-1.01)	0.05	0.55 (0.33-0.93)	0.03

^aInterval between diagnosis and treatment

Tabella 3.3.5. PFS: analisi univariata e multivariata dell'intera popolazione tratta con BR e Ibrutinib

		Advanced stage			Early/intermediate stage		
		BR n = 46 (%)	ibrutinib n = 96 (%)	P	BR n = 79 (%)	ibrutinib n = 59 (%)	P
Age	≤70 years	16 (34.8)	27 (28.1)	0.54	31 (39.2)	22 (37.3)	0.96
	>70 years	30 (65.2)	69 (71.9)		48 (60.8)	37 (62.7)	
Gender	Male	31 (67.4)	58 (60.4)	0.54	49 (62.0)	38 (64.4)	0.91
	Female	15 (32.6)	38 (39.6)		30 (38.0)	21 (35.6)	
Time dx-trx ^a	<36 months	25 (54.3)	35 (36.5)	0.07	50 (63.3)	30 (50.8)	0.20
	≥36 months	21 (45.7)	61 (63.5)		29 (36.7)	29 (49.2)	
del11q	No	26 (78.8)	77 (88.5)	0.29	55 (96.5)	41 (83.7)	0.06
	Yes	7 (21.2)	10 (11.5)		2 (3.5)	8 (16.3)	

^aTime dx-trx: Interval between diagnosis and treatment.

Tabella 3.3.6. Caratteristiche dei pazienti con stadio avanzato (Rai III-IV) e stadio precoce/intermedio (Rai 0-II) nella coorte BR e nella coorte ibrutinib

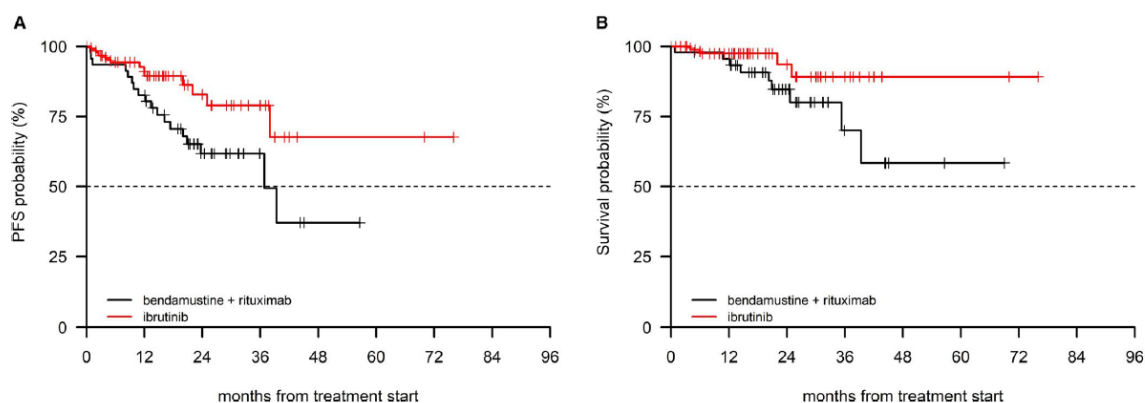


Figura 3.3.3. PFS (A) e OS (B) nei pazienti trattati con BR e ibrutinib in stadio avanzato (Rai III/IV)

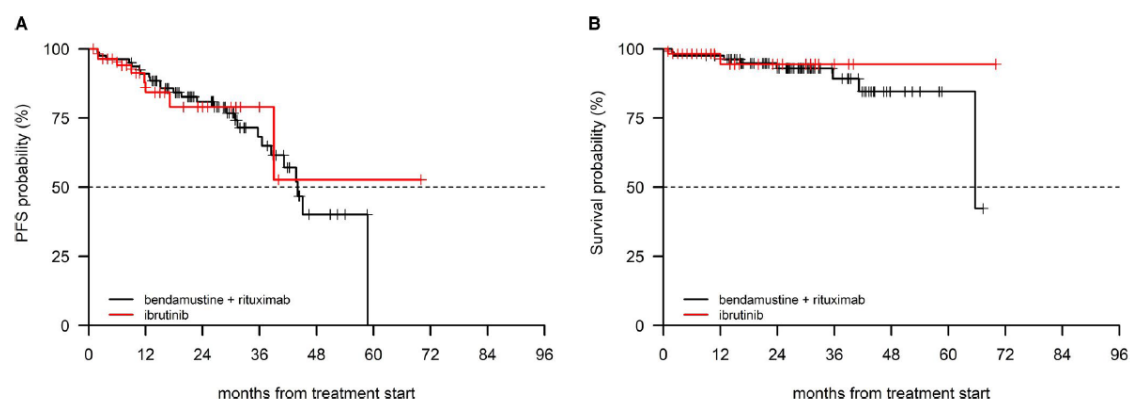


Figura 3.3.4. PFS (A) e OS (B) nei pazienti trattati con BR e ibrutinib in stadio precoce/intermedio (Rai 0/II)

3.3.4 Discussione

In questo studio sono stati riportati per la prima volta dati relativi all'efficacia e alla sicurezza del trattamento con BR in pazienti *unfit*, trattati al di fuori degli studi clinici. In particolare, sono stati valutate, oltre alla PFS, misure oggettive di efficacia come la OS e il TTNT. Le caratteristiche dei pazienti trattati con BR erano simili a quelle che si riscontrano nella pratica clinica in termini di età, clearance della creatinina, *performance status* e comorbilità (Knauf, 2015). La percentuale di pazienti in stadio precoce (41.1%) è risultata superiore rispetto a quella degli studi GCLLSG e del Regno Unito, dove il 23% e il 33% dei pazienti si trovavano rispettivamente nello stadio A di Binet (Goede, 2014b; Hillmen, 2015). La percentuale di pazienti che avevano completato la terapia prevista (73.1%) era in linea con i dati dello studio MABLE che ha confrontato clorambucile e rituximab con il regime BR in una popolazione di LLC non eleggibile a trattamento con fludarabina (Michallet, 2018). Le infezioni di grado 3-4 (11%) si sono verificate con una frequenza simile a quella degli

studi clinici (7.7%-19%)(Michallet, 2018; Woyach, 2018; Fischer, 2012) mentre si è osservata una minore incidenza di citopenie grado 3-4 (34%) rispetto ad altri studi che riportavano un'incidenza del 52.1%-56%, probabilmente a causa della minore valutazione dell'emocromo al nadir. Con una PFS mediana di 45.1 mesi e una OS a 24 e 36 mesi del 90.1% e 79.5%, rispettivamente, è stato osservato come BR rappresenti un'opzione terapeutica di prima linea efficace per in pazienti *unfit* al di fuori dei trial clinici. Le aberrazioni di *TP53* e la mancata risposta al trattamento con BR hanno mostrato un impatto negativo sugli endpoint di efficacia e in particolare la mancata risposta a BR si è dimostrata un fattore prognostico indipendente per la OS. Lo stato IGHV-U è stato associato a una PFS più breve, con significato borderline, probabilmente a causa del numero limitato di pazienti valutati. La PFS è risultata simile a quella dello studio MABLE (mediana 39.6 mesi)(Michallet, 2018). La OS è risultata simile a quella degli studi prospettici che hanno riportato un tasso di OS dell'80% a 36 mesi e del 90%-95% a 24 mesi (Woyach, 2018; Zoellner, 2016; Keating, 2005; Fischer, 2016; Eichhorst, 2016b). Da notare che il clorambucile-rituximab mostrano una ORR dell'87% con un tasso di OS a 48 e 60 mesi dell'86.1% (95% CI: 79.4-93.5) e 81.2% (95% CI: 72.4-91.2), rispettivamente, in pazienti anziani trattati al di fuori degli studi clinici (Laurenti, 2017) Allo stesso modo, una ORR dell'80.3% e una OS a 2 anni dell'88% sono state registrate dal gruppo ERIC e dal gruppo israeliano in pazienti anziani che avevano ricevuto clorambucile e obinutuzumab, senza eventi avversi imprevisti (Herishanu, 2020). Presi insieme, questi dati mostrano che l'efficacia e la sicurezza dei diversi regimi CIT nella pratica clinica di routine sono coerenti con quelli riportati negli studi clinici. Poiché appare chiaro che l'impiego continuativo e l'efficacia del trattamento con ibrutinib nella pratica clinica possano essere inferiori, rispetto a quanto riportato negli studi clinici (Ghia, 2016; Mato, 2017), dato il crescente ruolo degli studi di *real world* che forniscono informazioni integrative, si è deciso di confrontare la PFS e la OS in una serie di pazienti trattata con ibrutinib in uno studio di pratica clinica condotto negli Stati Uniti (Mato, 2018) con una popolazione di pazienti simile trattata con BR presso i centri europei GIMEMA ERIC. Anche se i due gruppi erano stati trattati in periodi di tempo diversi con differenze nei tempi di follow-up, è stato eseguito un confronto indiretto cercando di ridurre al minimo l'effetto dell'eterogeneità delle popolazioni di pazienti. In primo luogo, è stato documentato che nella popolazione totale dello studio (esclusi i pazienti con *del17p*), l'età e il trattamento con ibrutinib sono stati associati a un PFS più lunga all'analisi multivariata. Una volta limitata l'analisi ai pazienti

con stadio avanzato (Rai III-IV) con caratteristiche di base confrontabili, è stato dimostrato che ibrutinib si associava a una PFS più lunga e a tendeva a una OS più lunga rispetto a BR, mentre non si osservava alcuna differenza nei pazienti in stadio intermedio-precocce. Anche se questi dati presentano dei limiti, poiché ottenuti da un numero limitato di pazienti trattati al di fuori della sperimentazione clinica, è da osservare come risultati simili siano stati riportati anche in uno studio prospettico randomizzato (Burger, 2015).

3.3.5 Conclusioni

I dati di questo studio mostrano che: (a) BR è un regime di prima linea sicuro ed efficace in una coorte reale di pazienti *unfit* ad eccezione dei pazienti con caratteristiche genetiche sfavorevoli (es. aberrazioni TP53 e IGHV-U; (b) non vi sono differenze apprezzabili in termini di efficacia e sicurezza tra BR negli studi clinici che hanno arruolato pazienti anziani e questa esperienza nel mondo reale su pazienti *unfit* con ridotta funzione renale e con comorbidità e, (c) ibrutinib ha fornito un controllo della malattia più durevole rispetto a BR in prima linea nei pazienti trattati al di fuori degli studi clinici, soprattutto nei pazienti con stadio di malattia avanzata. Pur avendo dimostrato che BR sia un regime efficace di prima linea nei pazienti *unfit*, questi dati rafforzano l'idea che ibrutinib abbia un posto stabilito nel trattamento in prima linea dei pazienti più anziani con LLC (Woyach, 2018; Hallek, 2019; Brown, 2019). Questi risultati possono avere implicazioni pratiche nella definizione di algoritmi di trattamento, soprattutto in quei paesi con restrizioni all'uso di ibrutinib o di altri agenti orali (Chen, 2017; Iovino, 2020)

Bibliografia

1. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012; 119: 4467-4475.
2. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500:415-421.
3. Almeida J, Nieto WG, Teodosio C et al. CLL- like B- lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia*. 2011;25:718–722.
4. Al-Sawaf, O, Lilienweiss E, Bahlo J et al. High efficacy of venetoclax plus obinutuzumab in patients with complex karyotype and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2020;135:866–70.
5. Anderson MA, Tam C, Lew TE, et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*. 2017;129:3362-3370.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391-2405.
7. Arranz E, Martínez B, Richart A et al. Increased C-MYC oncogene copy number detected with combined modified comparative genomic hybridization and FISH analysis in a Richter syndrome case with complex karyotype. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998; 106:80-83.
associated with genomic complexity and independently predicts a worse outcome. *Br J Haematol*. 2020; Online ahead of print.
8. Austen B, Skowronska A, Baker C et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol*. 2007; 25:5448-5457.
9. Autore F, Strati P, Innocenti I et al. Elevated lactate dehydrogenase has prognostic relevance in treatment-naïve patients affected by chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12. *Cancers*. 2019.11:896.
10. Autore F, Strati P, Laurenti L et al. Morphological, immunophenotypic, and genetic features of chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12: a comprehensive review. *Haematologica*. 2018;103:931–938.
11. Badoux XC, Keating MJ, Wang X, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy is highly effective treatment for relapsed patients with CLL. *Blood*. 2011;117:3016-3024(a).
12. Badoux XC, Keating MJ, Wang X et al. Cyclophosphamide, fludarabine, alemtuzumab, and rituximab as salvage therapy for heavily pretreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 118:2085-2093(b).
13. Badoux XC, Keating MJ, Wen S et al. Lenalidomide as initial therapy of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 118:3489-3498 (c).
14. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood*. 2015;125:856-859.
15. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014; 89:249-255.
16. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*. 2019;133:1205-1216.
17. Baliakas P, Puiggros A, Xochelli A, et al. Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. *Haematologica*. 2016;101:e299-e302.

18. Bardi A, Cavazzini F, Rigolin GM et al. Employment of oligodeoxynucleotide plus interleukin-2 improves cytogenetic analysis in splenic marginal zone lymphoma. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:691493.
19. Barrio S, Shanafelt TD, Ojha J et al. Genomic characterization of high-count MBL cases indicates that early detection of driver mutations and subclonal expansion are predictors of adverse clinical outcome. *Leukemia.* 2017;31:170–176.
20. Baumann T, Delgado J, Santacruz R, et al. Chronic lymphocytic leukemia in the elderly: clinicobiological features, outcomes, and proposal of a prognostic model. *Haematologica.* 2014;99:1599-1604.
21. Beekman R, Chapaprieta V, Russiñol N et al. The reference epigenome and regulatory chromatin landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* 2018;24:868–880.
22. Berndt SI, Skibola CF, Joseph V et al. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45:868-876.
23. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981; 48: 198-206.
24. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell.* 2017; 66:801-817.
25. Blanco G, Puiggros A, Baliakas P, et al. Karyotypic complexity rather than chromosome 8 abnormalities aggravates the outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 aberrations. *Oncotarget.* 2016;7:80916-80924.
26. Bologna C, Buonincontri R, Serra S et al. SLAMF1 regulation of chemotaxis and autophagy determines CLL patient response. *J Clin Invest.* 2016;126:181–194.
27. Bologna C, Deaglio S. Linking SLAMF1 to autophagy and sensitivity to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cell Oncol.* 2018;5:e1143077.
28. Bosch F, Dalla-Favera R, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16:684-701.
29. Braggio E, Fonseca R, Kay NE. CGH protocols: chronic lymphocytic leukemia. *Methods Mol Biol.* 2013; 973:87-98.
30. Brander D, Roberts AW, Seymour JF, et al. Durable treatment-free remission and effective retreatment in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia who achieve a deep response with venetoclax combined with rituximab. *Haematologica* 2016; 101 (suppl 1): 58.
31. Brown JR, Hillmen P, O'Brien S et al. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia.* 2018; 32:83-91.
32. Brown JR, Wierda WG. Evolving strategies in first-line chronic lymphocytic leukemia: is there a role for chemoimmunotherapy? *J Natl Compr Canc Netw.* 2019;17:1408-1410.
33. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2014; 32:897-904.
34. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2015; 373: 2425–37.
35. Burger JA. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol.* 2012; 24:643-649.
36. Burns A, Alsolami R, Becq J et al. Whole-genome sequencing of chronic lymphocytic leukaemia reveals distinct differences in the mutational landscape between IgHVmut and IgHVunmut subgroups. *Leukemia.* 2018; 32:332-342.
37. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371: 213–23.
38. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Three-year follow-up of treatment-naive and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood* 2015; 125: 2497–506.

39. Campo E., Harris NL, Jaffe ES et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (eds Swerdlow, S. H. et al.) (IARC, 2017).
40. Cancer facts figures, NCI 2020
41. Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 230–39.
42. Cavallari M, Cavazzini F, Bardi A et al. Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2018;9:34398-34412.
43. Chan AC, Iwashima M, Turck CW et al. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992; 71:649-662.
44. Chen Q, Jain N, Ayer T et al. Economic burden of chronic lymphocytic leukemia in the era of oral targeted therapies in the United States. *J Clin Oncol*. 2017;35:166-174.
45. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I et al. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*. 2013;122:2673-82.
46. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352: 804-815.
47. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012; 2012: 76-87.
48. Cho HS, Hayami S, Toyokawa G et al. RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia*. 2012;14:476-486.
49. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:13944-13949.
50. CLL Trialists Collaborative Group. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 861–68.
51. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16:31-41.
52. Coste I, Le Corf K, Kfoury A et al. Dual function of MyD88 in RAS signaling and inflammation, leading to mouse and human cell transformation. *J Clin Invest*. 2010;120:3663-3667.
53. Crespo M, Bosch F, Villamor N et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348:1764-1775.
54. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat Genet*. 2010; 42:132-136.
55. Cuneo A, Follows G, Rigolin GM et al. Efficacy of bendamustine and rituximab as first salvage treatment in chronic lymphocytic leukemia and indirect comparison with ibrutinib: a GIMEMA, ERIC and UK CLL FORUM study. *Haematologica*. 2018;103:1209-1217.
56. da Cunha-Bang C, Christiansen I, Niemann CU. The CLL-IPI applied in a population-based cohort. *Blood*. 2016;128:2181-2183.
57. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50:633-643.
58. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood*. 2004;103:375-382.
59. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94:1840-1847.
60. Damm F, Mylonas E, Cosson A et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. 2014;4:1088-1101.
61. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive prognosis of +12CLL. *Haematologica* 2012;97:437–441.

62. Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:450-458.
63. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006;108:3152-3160.
64. Dierlamm J, Michaux L, Criel A et al. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;94:27-35.
65. Dighiero G. CLL biology and prognosis. *Hematology ASH education program*. 2005; 278-284.
66. Döhner H, Estey E, Grimwade D et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129:424-447.
67. Döhner H, Fischer K, Bentz M et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B cell leukemias. *Blood* 1995;85:1580–1589.
68. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343:1910-1916.
69. Dühren-von Minden M, Übelhart R, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012;489:309-312.
70. Edelmann J, Holzmann K, Miller F et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 2012;120:4783-4794.
71. Eichhorst B, Hallek M. Prognostication of chronic lymphocytic leukemia in the era of new agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016:149-155(a).
72. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 928–942(b).
73. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015; 26 Suppl 5: v78-84.
74. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 885–891.
75. Eichhorst BF, Busch R, Stilgenbauer S, et al. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114: 3382–3391.
76. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:145-162.
77. Fabbri G, Holmes AB, Viganotti M et al. Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:E2911–E2919.
78. Fabbri G, Rasi S, Rossi D et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J. Exp. Med*. 2011;208:1389–1401.
79. Fischer K, Bahlo J, Fink AM et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016; 127:208–215.
80. Fischer K, Cramer P, Busch R et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2012;30:3209-3216.
81. Flinn IW, Brunvand M, Choi M, et al. Safety and efficacy of a combination of venetoclax (GDC-0199/ABT-199) and obinutuzumab in patients with relapsed/refractory or previously

- untreated chronic lymphocytic leukemia—results from a phase 1b study (GP28331). *Blood* 2015; 126: 494.
82. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, et al. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007; 25: 793–98.
 83. Foà R, Del Giudice I, Cuneo A et al. Chlorambucil plus rituximab with or without maintenance rituximab as first-line treatment for elderly chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol.* 2014; 89:480-486.
 84. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014; 370: 997–1007.
 85. Gahrton G, Robert KH, Friberg K et al. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood.* 1980;56:640-647.
 86. Gaidano G, Rossi D. The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017; 1:329-337. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008; 111:865-873.
 87. Gentile M, Mauro FR, Rossi D et al. Italian external and multicentric validation of the MD Anderson Cancer Center nomogram and prognostic index for chronic lymphocytic leukaemia patients: analysis of 1502 cases. *Br J Haematol.* 2014; 167:224-232.
 88. Gentile M, Shanafelt TD, Reda G et al. Validation of a biological score to predict response in chronic lymphocytic leukemia patients treated front-line with bendamustine and rituximab. *Leukemia.*2018; 32:1869–1873.
 89. Gentile M, Shanafelt TD, Rossi D, et al. Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood.* 2016;128:2093-2095(a).
 90. Gentile M, Zirlik K, Ciolli S et al. Combination of bendamustine and rituximab as front-line therapy for patients with chronic lymphocytic leukaemia: multicenter, retrospective clinical practice experience with 279 cases outside of controlled clinical trials. *Eur J Cancer.* 2016;60:154-165(b).
 91. Ghia P, Cuneo A. Ibrutinib in the real-world patient: many lights and some shades. *Haematologica.* 2016;101(12):1448-1450.
 92. Ghia P., Melchers F, Rolink AG. Age- dependent changes in B lymphocyte development in man and mouse. *Exp Gerontol.* 2000;35,159–165.
 93. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG et al. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood.* 2007; 109:2032-2039.
 94. Goede V, Cramer P, Busch R, et al; German CLL Study Group. Interactions between comorbidity and treatment of chronic lymphocytic leukemia: results of German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group trials. *Haematologica.* 2014;99:1095-1100(a).
 95. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2014;370:1101-1110(b).
 96. Goede V, Fischer K, Engelke A, et al. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia* 2015; 29: 1602–04.
 97. Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X et al. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood.* 2004;104:1850-1854.
 98. Gonzalez D, Martinez P, Wade R et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011;29:2223–2229.

99. González-Gascón y Marín I, Hernández-Sanchez M et al. Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH). Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018; 59:633-642.
100. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood*. 2005; 105:4807-4812.
101. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120:2454-2465.
102. Guieze R, Pages M, Veronese L et al. Telomere status in chronic lymphocytic leukemia with TP53 disruption. *Oncotarget*. 2016; 7:56976–56985.
103. Guièze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015; 126:445-453.
104. Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, et al. Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia*. 2010;24(1): 211-215.
105. Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 2012;13:654–666.
106. Haferlach C, Bacher U. Cytogenetic methods in chronic lymphocytic leukemia. *Methods Mol Biol*. 2011;730:119-130.
107. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007;21:2442-2451.
108. Haferlach C, Dicker F, Weiss T, et al. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49:851-859.
109. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131:2745-2760.
110. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111:5446-5456.
111. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010; 376:1164-1174.
112. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2019; 94:1266–1287.
113. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am. J. Hematol*. 2015; 90:446–460.
114. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002; 99:1023-1029.
115. Han T, Ezdinli EZ, Shimaoka K, Desai D. Chlorambucil vs combined chlorambucil-corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1973; 31: 502–508.
116. Harris PA, Taylor R, Thielke R, et al. Research electronic data capture (REDCap) - a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42:377-381.
117. Hébert J, Jonveaux P, d'Agay MF et al. Cytogenetic studies in patients with Richter's syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994; 73:65-68.

118. Herishanu Y, Goldschmidt N, Bairey O et al. Efficacy and safety of front-line therapy with fludarabine-cyclophosphamide-rituximab regimen for chronic lymphocytic leukemia outside clinical trials: the Israeli CLL Study Group experience. *Haematologica*. 2015;100:662-669.
119. Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK et al. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*. 2016;128:395-404.
120. Hillmen P, Robak T, Janssens A et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet*. 2015; 385:1873-1883.
121. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cllsl1.html>
122. Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ et al. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*. 2006; 444:629-632.
123. Huang SJ, Bergin K, Smith AC, et al. Clonal evolution as detected by interphase fluorescence in situ hybridization is associated with worse overall survival in a population-based analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia in British Columbia, Canada. *Cancer Genet*. 2017;210:1-8.
124. Ibbotson R, Athanasiadou A, Sutton LA, et al. Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. *Leukemia*. 2012;26(1):170-172.
125. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016; 17:779-790.
126. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. ISCN: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Basel, NY: Karger; 2016.
127. Iovino L, Shadman M. Novel therapies in chronic lymphocytic leukemia: a rapidly changing landscape. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21:24.
128. Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, et al. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012; 159:82-87.
129. Jain N. Selecting front-line therapy for CLL in 2018. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018;2018:242-247.
130. Jain P, Keating M, Wierda W et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood*. 2015; 125:2062-2067.
131. Jebaraj BMC, Tausch E, Landau DA et al. Short telomeres are associated with inferior outcome, genomic complexity, and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2019; 33:2183-2194.
132. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014;28:108-117.
133. Johnson JB, Seftel M, Gibson SB. Chronic lymphocytic leukemia. In Greer JP, Forster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means RT Jr editors. *Wintrobe's clinical hematology* 13th ed, Lippincott Philadelphia, PA 2014; p 1888-1928.
134. Jones J, Choi MY. Venetoclax (VEN) monotherapy for patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) who relapsed after or were refractory ibrutinib or idelalisib., ASH annual meeting 2016. Abs#627.
135. Jones JA, Robak T, Brown JR et al. Efficacy and safety of idelalisib in combination with ofatumumab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2017; 4:e114-e126.
136. Jones JA, Wach M, Robak T, et al. Results of a phase III randomized, controlled study evaluating the efficacy and safety of idelalisib (IDELA) in combination with ofatumumab

- (OFA) for previously treated chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2015; 33: 7023.
137. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med.* 1990;323:720-724.
 138. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell.* 2017; 170:1062-1078.
 139. Kay NE, Eckel-Passow JE, Braggio E, et al. Progressive but previously untreated CLL patients with greater array CGH complexity exhibit a less durable response to chemoimmunotherapy. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;203:161-168.
 140. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4079–88.
 141. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011; 20:246–259.
 142. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ et al. Chronic lymphocytic leukemia. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3:16096.
 143. Klein U, Lia M, Crespo M et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell.* 2010;17:28-40.
 144. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.* 2001;194:1625-1638.
 145. Klintman J, Barmouti K, Knight SJL et al. Clinical-grade validation of whole genome sequencing reveals robust detection of low frequency variants and copy number alterations in CLL. *Br J Haematol.* 2018; 182(3):412-417.
 146. Knauf W, Abenhardt W, Dörfel S et al. Routine treatment of patients with chronic lymphocytic leukaemia by office-based haematologists in Germany-data from the prospective tumour registry lymphatic neoplasms. *Hematol Oncol.* 2015;33:15-22.
 147. Knospe WH, Loeb V jr, Huguley CM Jr. Biweekly chlorambucil treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1974; 33: 555–562.
 148. Köhnke T, Wittmann VK, Bücklein VL, et al. Diagnosis of CLL revisited: increased specificity by a modified five-marker scoring system including CD200. *Br J Haematol.* 2017; 179:480-487.
 149. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009;137:216-233.
 150. Kreinitz N, Polliack A, Tadmor T et al. Chronic lymphocytic leukemia is becoming more complex: how to define complex karyotype? *Leuk Lymphoma.* 2018;59:521–522.
 151. Kreuzer KA, Furman R, Stilgenbauer S et al. Outcome of Patients with Complex Karyotype in a Phase 3 Randomized Study of Idelalisib Plus Rituximab for Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 2016; 128:192.
 152. Kulis M, Heath S, Bibikova M et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2012; 44:1236-1242.
 153. Lampson BL, Kasar SN, Matos TR, et al. Idelalisib given front-line for treatment of chronic lymphocytic leukemia causes frequent immune-mediated hepatotoxicity. *Blood* 2016; 128: 195–203.
 154. Landau DA, Clement K, Ziller MJ et al. Locally disordered methylation forms the basis of intratumor methylome variation in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell.* 2014;26:813–825.
 155. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.* 2015;526:525-530.
 156. Langerak AW, Davi F, Ghia P et al. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia.* 2011; 25:979–984.

157. Laurenti L, Innocenti I, Autore F et al. Chlorambucil plus rituximab as front-line therapy for elderly and/or unfit chronic lymphocytic leukemia patients: correlation with biologically-based risk stratification. *Haematologica*. 2017;102:e352-e355.
158. Lazarian G, Tausch E, Eclache V, et al. TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes. *Int J Cancer*. 2016;139(8):1759-1763.
159. Le Bris Y, Struski S, Guieze R, et al. Major prognostic value of complex karyotype in addition to TP53 and IGHV mutational status in first-line chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol*. 2017;35:664-670.
160. Leeksa A, Baliakas P, Mellink C et al. Genomic Complexity in Chronic Lymphocytic Leukemia Defined By Array-Based Analysis: Definitions, Associations with Other Biomarkers and Clinical Impact. *Blood*. 2017; 130:4280.
161. Lei M, Podell ER, Cech TR. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11:1223-1229.
162. Leong DP, Caron F, Hillis C, et al. The risk of atrial fibrillation with ibrutinib use: a systematic review and meta-analysis. *Blood* 2016; 128: 138–140.
163. Lia M, Carette A, Tang H et al. Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood*. 2012;119:2981-2990.
164. Liao W, Jordaan G, Coriaty N et al. Amplification of B cell receptor-Erk signaling by Rasgrf-1 overexpression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2014; 55:2907–2916.
165. Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*. 2003; 423:1013-1008.
166. Loo SK, Ch'ng ES, Md Salleh MS et al. TRPM4 expression is associated with activated B cell subtype and poor survival in diffuse large B cell lymphoma. *Histopathology*. 2017; 71:98–111.
167. Lucena-Araujo AR, de Oliveira FM, Leite-Cueva SD et al. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2011; 35:260-264.
168. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol*. 2015;1:80-87.
169. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, et al; European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC)–TP53 network. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*. 2018;32: 1070-1080.
170. Mansouri L, Grabowski P, Degerman S et al. Telomere length is associated with NOTCH1/SF3B1/TP53 aberrations and poor outcome in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol*. 2013; 88:647-651.
171. Marsilio S, Khiabani H, Fabbri G, et al. Somatic CLL mutations occur at multiple distinct hematopoietic maturation stages: documentation and cautionary note regarding cell fraction purity. *Leukemia* 2018;32:1041–1044.
172. Martinelli S, Cuneo A, Formigaro L, et al. Identifying High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia: A Pathogenesis-Oriented Appraisal of Prognostic and Predictive Factors in Patients Treated with Chemotherapy with or without Immunotherapy. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016; 8:e2016047.
173. Martini V, Gattazzo C, Frezzato F et al. Cortactin, a Lyn substrate, is a checkpoint molecule at the intersection of BCR and CXCR4 signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haemat*. 2017; 178:81–93.
174. Mato AR, Hill BT, Lamanna N, et al. Optimal sequencing of ibrutinib, idelalisib, and venetoclax in chronic lymphocytic leukemia: results from a multicenter study of 683 patients. *Ann Oncol*. 2017;28:1050-1056.

175. Mato AR, Nabhan C, Barr PM et al. Outcomes of CLL patients treated with sequential kinase inhibitor therapy: a real world experience. *Blood*. 2016; 128:2199-2205.
176. Mato AR, Thompson M, Allan JN, et al. Realworld outcomes and management strategies for venetoclax-treated chronic lymphocytic leukemia patients in the United States. *Haematologica*. 2018;103:1511-1517.
177. Matthews C, Catherwood MA, Morris TC et al. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol*. 2006; 77:309-317.
178. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8:1640–1645.
179. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*. 1999; 94:448-454.
180. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107:742-751.
181. Michallet A-S, Aktan M, Hiddemann W et al. Rituximab plus bendamustine or chlorambucil for chronic lymphocytic leukemia: primary analysis of the randomized, open-label MABLE study. *Haematologica*. 2018;103:698-706.
182. Migliazza A, Bosch F, Komatsu H et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 97:2098-2104.
183. Miller CR, Ruppert AS, Heerema NA et al. Near- tetraploidy is associated with Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia patients receiving ibrutinib. *Blood Adv*.2017; 1:1584–1588.
184. Molica S, Shanafelt TD, Giannarelli D, et al. The Chronic Lymphocytic Leukemia International Prognostic Index predicts time to first treatment in early CLL: independent validation in a prospective cohort of early stage patients. *Am J Hematol*. 2016;91:1090-1095.
185. Montserrat E, Fontanillas M, Estape J, et al. Chronic lymphocytic leukemia treatment: an interim report of PETHEMA trials. *Leuk Lymphoma* 1991; 5 (suppl 1): 89–92.
186. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol*. 1986; 62:567-575.
187. Morabito F, Damle RN, Deaglio S et al. The CD38 ectoenzyme family: advances in basic science and clinical practice. *Mol Med*. 2006; 12:342-344.
188. Moreno C, Greil R, Demirkan F et al. Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20:43-56.
189. Moreno C, Hodgson K, Ferrer G et al. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance. *Blood*. 2010; 116:4771-4776.
190. Mulligan CS, Thomas ME, Mulligan SP. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008; 359:2065-2066
191. Nabhan C, Raca G, Wang YL. Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia-Reply. *JAMA Oncol*. 2015;1:988-989.
192. Nadeu F, Delgado J, Royo C et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016; 127:2122-2130.
193. O'Brien S, Jones JA, Coutre SE, et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicenter study. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1409–1418.

194. O'Brien S, Furman RR, Coutre S, Flinn et al. Single-Agent Ibrutinib in Treatment-Naïve and Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: A 5-Year Experience. *Blood*. 2018; 131:1910-1919.
195. Oliveira-Santos W, Rabello DA, Lucena-Araujo AR et al. Residual expression of SMYD2 and SMYD3 is associated with the acquisition of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol*. 2016; 37:9473-9481.
196. O'Neil J, Grim J, Strack P et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*. 2007; 204:1813-1824.
197. Ouillette P, Collins R, Shakhan S et al. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:6778-6790(a).
198. Ouillette P, Collins R, Shakhan S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118:3051-3061(b).
199. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N et al. 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood*. 2010; 115:3916-3922.
200. Papajik T, Myslivecek M, Urbanova R, et al. 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography examination in patients with chronic lymphocytic leukemia may reveal Richter transformation. *Leuk Lymphoma*. 2014;55: 314–319.
201. Parikh SA, Kay NE, Shanafelt TD. How we treat Richter syndrome. *Blood*. 2014;123:1647-57.
202. Parmelee PA, Thuras PD, Katz IR, Lawton MP. Validation of the Cumulative Illness Rating Scale in a geriatric residential population. *J Am Geriatr Soc*. 1995; 43:130-137.
203. Pepper C, Majid A, Lin TT et al. Defining the prognosis of early stage chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br J Haematol*. 2012; 156:499-507.
204. Peterson JF. The complexities of defining a complex karyotype in hematological malignancies: a need for standardization? *Acta Haematol*. 2017;138:65-66.
205. Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *J Clin Oncol*. 2012; 30:1647-1655.
206. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124:49-62.
207. Pozzo F, Bittolo T, Arruga F et al. NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia*. 2016;30:182-189.
208. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015; 526:519-524.
209. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int*. 2014;2014:435983.
210. Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget*. 2017;8: 54297-54303.
211. Put N, Konings P, Rack K, et al; Belgian Cytogenetic Group for Hemato-Oncology (BCGHO). Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: a Belgian multicentric study. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48:843-853.
212. Quesada V, Conde L, Villamor N et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012; 44:47–52.
213. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975; 46:219-234.

214. Rampazzo E, Bojnik E, Trentin L et al. Role of miR-15a/miR-16-1 and the TP53 axis in regulating telomerase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2017; 102:e253–e256.
215. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013; 45:526-530.
216. Raval A, Tanner SM, Byrd JC et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2007;129:879-890.
217. Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A, et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018; 94:121-128.
218. Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood*. 2017; 129:3495-3498 (a).
219. Rigolin GM, Formigaro L, Cavallari M et al. An extensive molecular cytogenetic characterization in high-risk chronic lymphocytic leukemia identifies karyotype aberrations and TP53 disruption as predictors of outcome and chemorefractoriness. *Oncotarget*. 2017; 8:28008-28020 (b).
220. Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012; 119:2310-2313.
221. Rigolin GM, del Giudice I, Formigaro L et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54:818-826.
222. Rigolin GM, Saccenti E, Bassi C et al. Extensive next-generation sequencing analysis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis: clinical and biological correlations. *J Hematol Oncol*. 2016; 9:88.
223. Rigolin GM, Saccenti E, Guardalben E et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. *Br J Haematol*. 2018;181:229–233.
224. Rigolin GM, Saccenti E, Melandri A et al. In chronic lymphocytic leukaemia, SLAMF1 deregulation is associated with genomic complexity and independently predicts a worse outcome. *Br J Haematol*. 2020 Jun 24. Online ahead of print.
225. Rigolin GM, Saccenti E, Rizzotto L et al. Genetic subclonal complexity and miR125a-5p down-regulation identify a subset of patients with inferior outcome in low-risk CLL patients. *Oncotarget*. 2014; 5:140-149.
226. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1756–65.
227. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374:311-322.
228. Rogers KA, Huang Y, Ruppert AS et al. A single institution retrospective cohort study of first-line R-EPOCH chemoimmunotherapy for Richter syndrome demonstrating complex chronic lymphocytic leukaemia karyotype as an adverse prognostic factor. *Br J Haematol*. 2018; 180:259-266.
229. Roos G, Kröber A, Grabowski P et al. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 111:2246-2252.

230. Rossi D, Lobetti Bodoni C, Genuardi E, et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009;23:1062-1072.(a)
231. Rossi D, Sozzi E, Puma A et al. The prognosis of clinical B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol.* 2009; 146:64-75.(b)
232. Rossi D, Brusca A, Spina V et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011;118:6904–6908.(a)
233. Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D et al. Alteration of BIRC3 and multiple other NF-kappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood.* 2011; 118:4930-4934.(b)
234. Rossi D, Spina V, Deambrogi C et al: The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood.* 2011;117:3391–401.(c)
235. Rossi D, Fangazio M, Rasi S et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119:2854-2862.(a)
236. Rossi D, Rasi S, Fabbri G et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012; 119:521-529.(b)
237. Rossi D, Rasi S, Spina V et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2012; 158:426-429.(c)
238. Rossi D, Rasi S, Spina V et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121:1403–1412.
239. Rossi D, Khiabanian H, Spina V et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014; 123:2139-2147.
240. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin Oncol.* 2016;43:311–319.
241. Rossi D, Terzi-di-Bergamo L, De Paoli L et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2015;126:1921–1924.
242. Rossi D, Spina V, Gaidano G. Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood.* 2018;131:2761–2772.
243. Routledge DJ, Bloor AJ. Recent advances in therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2016;174:351-367.
244. Scarfò L, Ferreri AJ, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol hematol.* 2016;104:169–182.
245. Schoumans J, Suela J, Hastings R, et al. Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016; 55:480-491.
246. Schweighofer CD, Coombes KR, Barron LL et al. A two-gene signature, SKI and SLAMF1, predicts time-to-treatment in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2011;6:e28277.
247. Seifert M, Sellmann L, Bioehdom J et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 2012;209:2183-2198.
248. Sellmann L, Gesk S, Walter C, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;138:217-220.
249. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378:1107-1120.
250. Seymour JF, Mobasher M, Kater AP. Venetoclax-Rituximab in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018; 378:2143-2144.
251. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC et al. Monoclonal B cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia.* 2010;24:512–520.

252. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE, et al. Ibrutinib-rituximab or chemoimmunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2019;381:432-443.
253. Sharman JP, Coutre SE, Furman RR, et al. Second interim analysis of a phase 3 study of idelalisib (Zydelig®) plus rituximab (R) for relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL): efficacy analysis in patient subpopulations with del(17p) and other adverse prognostic factors. *Blood* 2014; 124: 330.
254. Shustik C, Bence-Bruckler I, Delage R et al. Advances in the treatment of relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2017; 96:1185-1196.
255. Siu KT, Xu Y, Swartz KL, Bhattacharyya M et al. Chromosome instability underlies hematopoietic stem cell dysfunction and lymphoid neoplasia associated with impaired Fbw7-mediated cyclin E regulation. *Mol Cell Biol.* 2014; 34:3244-3258.
256. Skowronska A, Austen B, Powell JE, et al. ATM germline heterozygosity does not play a role in chronic lymphocytic leukemia initiation but influences rapid disease progression through loss of the remaining ATM allele. *Haematologica* 2012;97:142–146(a).
257. Skowronska A, Parker A, Ahmed G et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol.* 2012;30:4524–4532(b).
258. Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood.* 2011;117:1911-1916.
259. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood.* 2000;96:4075-4083.
260. Solomon BM, Chaffee KG, Moreira J, et al. Risk of non-hematologic cancer in individuals with high-count monoclonal B-cell lymphocytosis. *Leukemia* 2016; 30: 331–336.
261. Speedy HE, Di Bernardo MC, Sava GP et al. A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2014;46:56-60.
262. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, et al. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2017;31:282–291.
263. Stankovic T, Skowronska A. The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2014; 55:1227–1239.
264. Stauder R, Eichhorst B, Hamaker ME, et al. Management of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the elderly: a position paper from an International Society of Geriatric Oncology (SIOG) Task Force. *Ann Oncol.* 2017;28:218-227.
265. Stein H, Bonk A, Tolksdorf G et al. Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. *J. Histochem. Cytochem.* 1980; 28: 746–760.
266. Steinbrecher D, Jebaraj BMC, Schneider C et al. Telomere length in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: associations with disease characteristics and outcome. *Leuk Lymphoma.* 2018; 59:1614-1623.
267. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2016; 17: 768–78.
268. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Blood.* 2014; 123:3247-3254.
269. Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood.* 2015;126:454–462.
270. Strickland SA, Sun Z, Ketterling RP et al. ECOGACRIN Cancer Research Group. Independent Prognostic Significance of Monosomy 17 and Impact of Karyotype Complexity in Monosomal Karyotype/Complex Karyotype Acute Myeloid Leukemia: Results from Four ECOGACRIN Prospective Therapeutic Trials. *Leuk Res.* 2017; 59:55-64.
271. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127:2375-2390.

272. Takahashi K, Hu B, Wang F, et al. Clinical implications of cancer gene mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with lenalidomide. *Blood*. 2018; 131:1820-1832.
273. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*. 2009; 114:957-964.
274. Ten Hacken E & Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863:401-413.
275. Thomay K, Fedder C, Hofmann W et al. Telomere shortening, TP53 mutations and deletions in chronic lymphocytic leukemia result in increased chromosomal instability and breakpoint clustering in heterochromatic regions. *Ann Hematol*. 2017;96:1493-1500.
276. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*. 2015;121:3612-3621.
277. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;127:303-309.
278. Tissino E, Pozzo F, Benedetti D et al. CD49d promotes disease progression in chronic lymphocytic leukemia: new insights from CD49d bimodal expression. *Blood*. 2020; 135:1244-1254.
279. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003;101: 4952-4957.
280. Travella A, Ripollés L, Aventin A et al. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis. *Hematol Oncol*. 2013; 31:79-87.
281. Trbusek M, Smardova J, Malcikova J et al. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29:2703-2708.
282. UK CLL Forum. Ibrutinib for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a UK and Ireland analysis of outcomes in 315 patients. *Haematologica*. 2016;101:1563-1572.
283. Valcárcel D, Ademà V, Solé F et al. Complex, not monosomal, karyotype is the cytogenetic marker of poorest prognosis in patients with primary J Clin Oncol. 2011; 29:392-397.
284. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, et al. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Res* 2014;74:4211-4216.
285. Vardi A, Dagklis A, Scarfò L et al. Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood*. 2013;121:4521-4528.
286. Visentin A, Bonaldi L, Rigolin GM et al. The combination of complex karyotype subtypes and IGHV mutational status identifies new prognostic and predictive groups in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Canc*. 2019; 121:150-156.
287. Visentin A, Facco A, Gurrieri C et al. Prognostic and predictive impact of IGHV mutational status and load in chronic lymphocytic leukemia: focus on FCR and BR treatments. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019; 19:678-685.
288. Visentin A, Facco M, Frezzato F et al. Integrated CLL scoring system, a new and simple index to predict time to treatment and overall survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15:612-620.
289. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-58.
290. Wang L, Lawrence MS, Wan Y et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011;365:2497-2506.

291. Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A, et al. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 1994;84:3158–3165.
292. Wawrzyniak E, Kotkowska A, Blonski JZ, et al. Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance. *Eur J Haematol.* 2014;92(2):91-101.
293. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8:83-93.
294. Woroniecka R, Rymkiewicz G, Grygalewicz B et al. Cytogenetic and flow cytometry evaluation of Richter syndrome reveals MYC, CDKN2A, IGH alterations with loss of CD52, CD62L and increase of CD71 antigen expression as the most frequent recurrent abnormalities. *Am J Clin Pathol.* 2015; 143:25-35.
295. Woyach JA, Furman RR, Liu TM et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med.* 2014; 370:2286-94.
296. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA et al. Ibrutinib regimens versus chemoimmunotherapy in older patients with untreated CLL. *N Engl J Med.* 2018;379:2517-2528.
297. Yang G, Mercado-Uribe I, Multani AS et al. RAS promotes tumorigenesis through genomic instability induced by imbalanced expression of Aurora-A and BRCA2 in midbody during cytokinesis. *Int J Cancer.* 2013; 133:275-85.
298. Zenz T, Kröber A, Scherer K et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008; 112:3322–3329.
299. Zenz T, Mertens D, Küppers R et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:37-50(a).
300. Zenz T, Eichhorst B, Busch R et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28:4473-4479(b).
301. Zoellner A-K, Höhler T, Fries S et al. Altered treatment of chronic lymphocytic leukemia in Germany during the last decade. *Ann Hematol.* 2016;95:853-861.
302. Zupo S, Rugari E, Dono M et al. CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells. *Eur J Immunol.* 1994; 24:1218-1222.

ALLEGATO 1

To the editor:

In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI

Gian Matteo Rigolin,^{1,*} Maurizio Cavallari,^{1,*} Francesca Maria Quaglia,¹ Luca Formigaro,¹ Enrico Lista,¹ Antonio Urso,¹ Emanuele Guardalben,¹ Carmine Liberatore,¹ Danilo Faraci,¹ Elena Saccenti,¹ Cristian Bassi,^{2,3} Laura Lupini,^{2,3} Maria Antonella Bardi,¹ Eleonora Volta,¹ Elisa Tammiso,¹ Aurora Melandri,¹ Massimo Negrini,^{2,3} Francesco Cavazzini,¹ and Antonio Cuneo¹

¹Sezione Ematologia, Dipartimento di Scienze Mediche, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Arcispedale S. Anna, ²Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, and ³Laboratorio per le Tecnologie delle Terapie Avanzate, Università di Ferrara, Ferrara, Italy

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) represents the most common form of leukemia in Western countries.¹ The clinical course of the disease is quite heterogeneous with some patients living for years with asymptomatic disease and others experiencing early progression and requiring therapeutic interventions.

To allow rationale management of patients with CLL in clinical practice and in clinical trials, an international prognostic index (CLL-IPI) was defined, based on the relative contribution of the major prognostic parameters, that is, *TP53* status, *IGHV* mutational status, serum $\beta 2$ -microglobulin, clinical stage, and age.²

However, CLL is mainly a disease of the elderly with many patients presenting at diagnosis with significant comorbidities that may affect treatment decisions and outcome.³ Moreover, in recent years, the complex karyotype (CK) emerged as a prognostic biomarker associated with an inferior outcome^{4,5} and worse response to treatments including novel drugs.^{6,7}

We therefore set out to analyze the prognostic relevance of comorbidities and of CK in relation to the CLL-IPI.

The study cohort consisted of 335 untreated CLL patients diagnosed and followed at our center between 2006 and 2016 as previously described.⁸ All patients were diagnosed and treated according to National Cancer Institute criteria.⁹ The study was approved by the local ethics committee. Fludarabine- or bendamustine-containing regimens, with or without rituximab, were used as first-line treatment in fit patients; chlorambucil with or without rituximab was used in elderly and/or unfit patients according to the treatment policy adopted at our center. Since 2015, ibrutinib or idelalisib plus rituximab were offered to relapsed/refractory patients. Coexisting medical conditions were evaluated according to the Cumulative Illness Rating Scale (CIRS) scores as described.¹⁰ Creatinine clearance was assessed with the use of the Cockcroft-Gault formula.¹¹

The CK was defined by the presence of at least 3 chromosome aberrations by cytogenetic analysis as described.¹²

The principal clinical and biological characteristics of the patients are reported in supplemental Table 1 (available on the *Blood* Web site). The median age of these CLL patients was 68.7 years (range, 33-96 years)

Table 1. Univariate and multivariate analysis for OS and TTFT

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis, n = 228			
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	After bootstrapping	
					HR (95% CI)	P
OS						
CLL-IPI						
Low	1		1		1	
Intermediate	2.593 (1.121-6.001)	.026	2.074 (0.853-5.237)	.108	2.074 (0.822-5.049)	.122
High	4.828 (2.152-10.834)	<.001	5.716 (2.434-13.423)	<.001	5.716 (2.516-12.989)	<.001
Very high	13.628 (4.742-39.166)	<.001	4.875 (1.399-16.984)	.013	4.875 (1.161-20.477)	.031
CIRS $\leq 6 / > 6$	3.843 (2.433-6.071)	<.001	2.899 (1.521-5.523)	.001	2.899 (1.352-6.217)	.006
CK, yes/no	3.176 (1.882-5.359)	<.001	3.572 (1.572-8.116)	.002	3.572 (1.341-9.515)	.011
TTFT						
CLL-IPI						
Low	1		1		1	
Intermediate	6.640 (2.993-14.729)	<.001	6.214 (2.788-13.853)	<.001	6.214 (2.171-17.790)	.001
High	20.831 (9.588-45.260)	<.001	22.308 (10.214-48.720)	<.001	22.308 (7.718-64.480)	<.001
Very high	25.637 (9.748-67.425)	<.001	15.811 (5.611-44.555)	<.001	15.811 (4.425-56.502)	<.001
CIRS $\leq 6 / > 6$	1.151 (0.794-1.669)	.407	—	—	—	—
CK, yes/no	2.521 (1.606-3.958)	<.001	2.157 (1.185-3.926)	.012	2.157 (1.177-3.952)	.013

TTFT was calculated as the interval between diagnosis and the start of first-line treatment. OS was calculated from the date of diagnosis until death due to any cause or until the last patient follow-up. Proportional hazards regression analysis was used to identify the significant independent prognostic variables on TTFT. The stability of the Cox model was internally validated using bootstrapping procedures.⁴ Statistical analysis was performed using Stata 14.0 (Stata Corp, College Station, TX).

—, not applicable; CI, confidence interval; HR, hazard ratio.

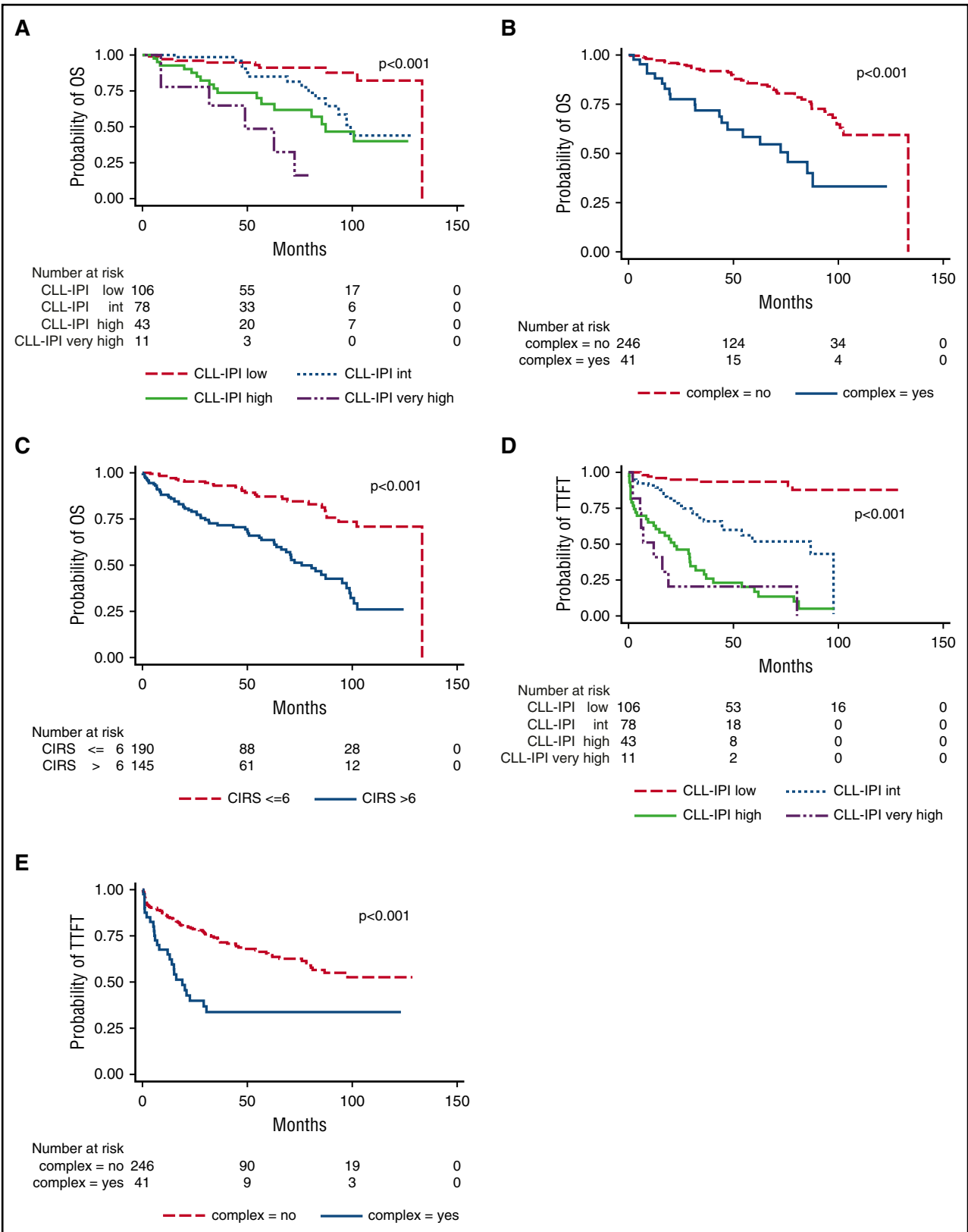


Figure 1. OS and TTFT according to CLL-IPI, CIRS, and CK. OS according to (A) CLL-IPI, (B) CK, and (C) CIRS. TTFT according to (D) CLL-IPI and (E) CK.

with 61.5% of the patients older than 65 years. Patients' distribution according to CLL-IPI was as follows: 106 low (44.5%), 78 intermediate (32.8%), 43 high (18.1%), and 11 very high (4.6%).

Interestingly, these figures are very similar to those observed for the Mayo cohort of newly diagnosed CLL patients in the original CLL-IPI report² and reflect, in our region, a series of patients

diagnosed in a center that has a >90% capture of incident CLL cases therefore allowing for meaningful analyses of time to first treatment (TTFT) and overall survival (OS) in a real-world scenario. When considering coexisting medical conditions, 145 of 335 patients (43.3%) had a CIRS score > 6. CIRS distribution is reported in supplemental Table 2. A creatinine clearance lower than 70 mL per minute was present in 136 cases (40.6%). By combining CIRS and creatinine clearance, 199 of 335 of our patients (59.4%) would have been enrolled in the CLL11 trial for CLL patients with coexisting conditions.¹³ As expected, a CIRS score > 6 was associated with age > 65 years ($P < .001$), creatinine clearance < 70 mL per minute ($P < .001$), Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ≥ 2 ($P < .001$), and also with $\beta 2$ -microglobulin concentration > 3.5 mg/L ($P = .005$) (supplemental Table 3).

A CK was observed in 41 of 287 of the cases (14.3%), a figure in keeping with data from recently published series of patients.⁵ The CK was significantly associated with advanced Binet stage ($P = .013$), CD38 positivity ($P = .003$), $\beta 2$ -microglobulin concentration > 3.5 mg/L ($P = .010$), TP53 deletion or mutation ($P = .001$), higher CLL-IPI ($P = .002$), and intermediate unfavorable fluorescence in situ hybridization results ($P < .001$) (supplemental Table 4).

In this analysis, we confirmed the prognostic impact of CLL-IPI on OS (Table 1; Figure 1A) and TTFT (Figure 1D).¹⁴⁻¹⁶ In univariate analysis, an inferior OS was also associated with the CK ($P < .001$; Figure 1B) and a CIRS score > 6 ($P < .001$; Figure 1C). In multivariate analysis, both CK ($P = .002$) and CIRS score > 6 ($P = .001$) confirmed their negative prognostic impact on OS, independently of CLL-IPI. In univariate analysis, an inferior TTFT was associated with CK ($P < .001$; Figure 1E) but not with CIRS > 6. In multivariate analysis, the CK retained its negative prognostic impact on TTFT ($P = .012$), independently of CLL-IPI. The independent prognostic significance of the CK on TTFT and OS and of comorbidities on OS was also confirmed when CLL-IPI variables were considered separately (supplemental Table 5).

Although larger independent series of patients with longer follow-up are needed to confirm these observations, our findings reinforce the notion that, in CLL patients, comorbidities and the CK represent novel important prognostic markers. Indeed, relevant comorbidities may shorten life expectancy and may reduce treatment tolerance,^{3,17} and modern treatment algorithms recommended evaluating not only age, clinical staging, and disease-specific prognostic biomarkers, but also comorbidities to guide clinical decisions,^{13,18} particularly in the era of novel drugs.¹⁹ However, the prognostic impact of comorbidities and of the CK in the era of mechanism-based treatment needs to be specifically addressed in larger series of patients treated for longer periods of time because in our cohort of CLL, these agents were offered only in more recent years.

Although no comorbidity score has been prospectively validated in CLL, the CIRS score is the most frequently used in CLL clinical trials.¹³ Furthermore, with the use of effective mitogens, cytogenetic abnormalities and, in particular, CK recently emerged as one of the novel biomarkers associated with an inferior outcome^{4,8,12,20} and with the development of chemorefractoriness.²¹

In conclusion, we showed for the first time that comorbidities and CK were associated with a worse outcome independently of CLL-IPI. We therefore suggest that comorbidities and CK might be considered as additional parameters to be included in CLL prognostic scores for better management of patients with CLL in clinical practice and in trials evaluating new drugs.

*G.M.R. and M.C. contributed equally.

The online version of this article contains a data supplement.

Acknowledgments: The Ion Torrent PGM was donated by Associazione Italiana contro le Leucemie Linfomi e Mieloma (AIL) Ferrara.

This work was supported by the Fondo di Ateneo per la Ricerca 2013, 2014, 2016 of the University of Ferrara (G.M.R., A.C., M.N.), Programma Ricerca Regione Università 2007-2009 University of Ferrara (G.M.R., A.C.), Programmi di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) 2008 (A.C.), Ricerca Finalizzata (A.C.; project RF-2011-02349712), Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca PRIN 2015 (A.C.; project 2015ZMRFEA), and AIL Ferrara. E.V. and E.S. are supported by AIL Ferrara.

Contribution: G.M.R., M.C., and A.C. conceived and designed the study; G.M.R., M.C., F.M.Q., E.L., A.U., D.F., C.L., L.F., E.G., E.V., E.T., M.A.B., and A.M. acquired data and provided patient follow-up; G.M.R., M.C., M.N., F.C., and A.C. analyzed and interpreted data; and all of the authors contributed to the writing, approval, and review of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: G.M.R., 0000-0002-8370-5190.

Correspondence: Gian Matteo Rigolin, Sezione Ematologia, Dipartimento di Scienze Mediche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Arcispedale S. Anna, Università di Ferrara, Via Aldo Moro, 8, 44124, Cona, Ferrara, Italy; e-mail: rlgmt@unife.it.

References

- Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:16096.
- International CLL-IPI Working Group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):779-790.
- Stauder R, Eichhorst B, Hamaker ME, et al. Management of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the elderly: a position paper from an International Society of Geriatric Oncology (SIOG) Task Force. *Ann Oncol*. 2017;28(2):218-227.
- Rigolin GM, Saccenti E, Bassi C, et al. Extensive next-generation sequencing analysis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis: clinical and biological correlations [published correction appears in *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):103]. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):88.
- Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014;89(3):249-255.
- Herling CD, Klauwünzer M, Rocha CK, et al. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*. 2016;128(3):395-404.
- Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*. 2015;121(20):3612-3621.
- Rigolin GM, del Giudice I, Formigaro L, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(12):818-826.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456.
- Parmelee PA, Thuras PD, Katz IR, Lawton MP. Validation of the Cumulative Illness Rating Scale in a geriatric residential population. *J Am Geriatr Soc*. 1995; 43(2):130-137.
- Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16(1):31-41.
- Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012; 119(10):2310-2313.
- Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101-1110.
- Gentile M, Shanafelt TD, Rossi D, et al. Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood*. 2016;128(16):2093-2095.
- da Cunha-Bang C, Christiansen I, Niemann CU. The CLL-IPI applied in a population-based cohort. *Blood*. 2016;128(17):2181-2183.

16. Molica S, Shanafelt TD, Giannarelli D, et al. The Chronic Lymphocytic Leukemia International Prognostic Index predicts time to first treatment in early CLL: independent validation in a prospective cohort of early stage patients. *Am J Hematol*. 2016;91(11):1090-1095.
17. Goede V, Cramer P, Busch R, et al; German CLL Study Group. Interactions between comorbidity and treatment of chronic lymphocytic leukemia: results of German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group trials. *Haematologica*. 2014;99(6):1095-1100.
18. Baumann T, Delgado J, Santacruz R, et al. Chronic lymphocytic leukemia in the elderly: clinico-biological features, outcomes, and proposal of a prognostic model. *Haematologica*. 2014;99(10):1599-1604.
19. Routledge DJ, Bloor AJ. Recent advances in therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;174(3):351-367.
20. Blanco G, Puiggros A, Baliakas P, et al. Karyotypic complexity rather than chromosome 8 abnormalities aggravates the outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 aberrations. *Oncotarget*. 2016;7(49):80916-80924.
21. Rigolin GM, Formigaro L, Cavallari M, et al. An extensive molecular cytogenetic characterization in high-risk chronic lymphocytic leukemia identifies karyotype aberrations and TP53 disruption as predictors of outcome and chemorefractoriness [published online ahead of print 3 March 2017]. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.15883.

DOI 10.1182/blood-2017-03-772285

© 2017 by The American Society of Hematology

To the editor:

Platelet factor 4/heparin complexes present epitopes differently on solid-phase vs platelet surfaces

Thi-Huong Nguyen^{1,2} and Andreas Greinacher¹

¹Institute for Immunology and Transfusion Medicine, University Medicine Greifswald and ²Center for Innovation Competence, Humoral Immune Reactions in Cardiovascular Diseases, University of Greifswald, Greifswald, Germany

The immune response to complexes of the chemokine platelet factor 4 (PF4) and polyanions^{1,2} results in anti-PF4/polyanion (anti-PF4/P) antibodies, which can induce one of the most frequent immune-

mediated adverse drug reactions: heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Immune complexes composed of anti-PF4/P antibodies and PF4/P complexes on the platelet surface induce platelet aggregation via

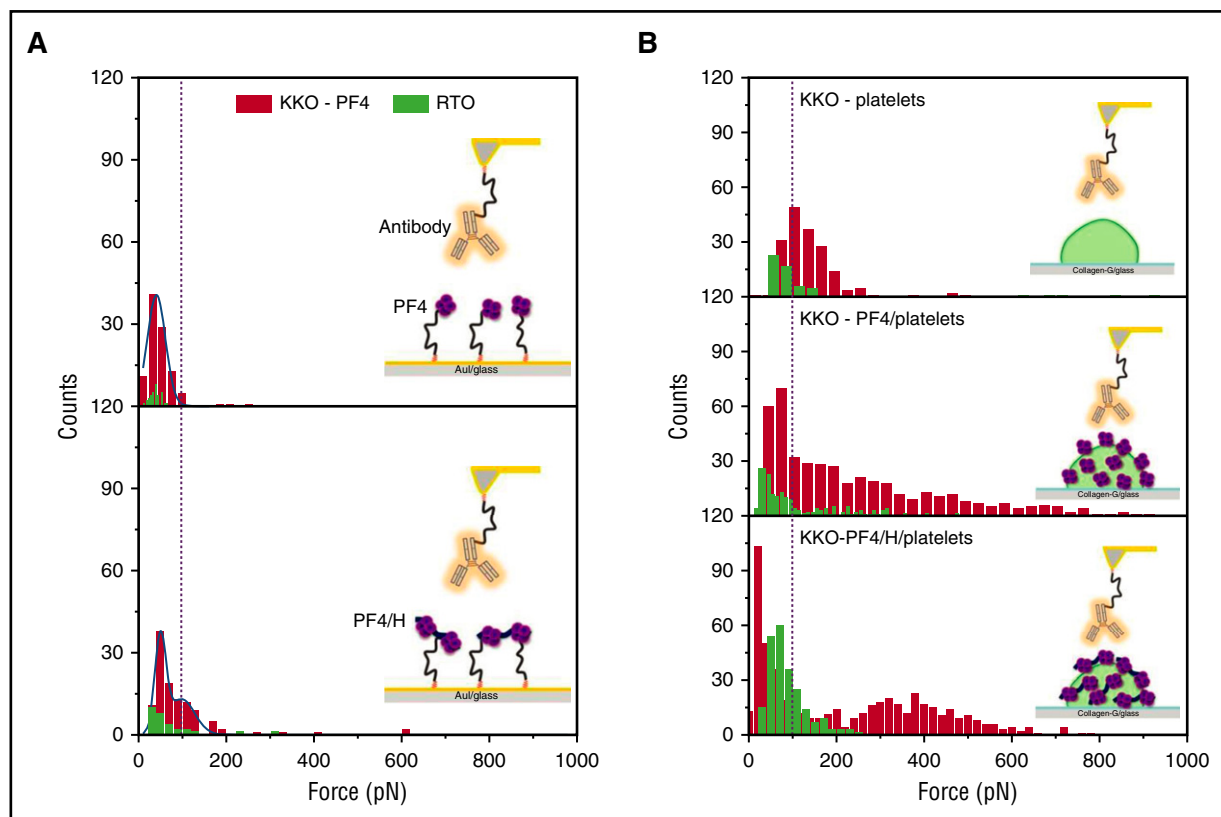


Figure 1. The binding strength of KKO (red) vs RTO (green) to PF4 or PF4/H complexes coated on different surfaces. (A) When PF4 (top) or PF4/H complexes (bottom) were immobilized on a gold surface, the reaction between KKO (red) and PF4 is weaker (rupture force up to 100 pN) than that between KKO and PF4/H complexes (rupture force up to 200 pN), while RTO (green) shows much weaker interactions, as evidenced by the low binding "counts." (B) When PF4 (middle) or PF4/H complexes (bottom) were coated on platelet surfaces, both KKO (red; rupture force up to 800 pN) and RTO (green; rupture force up to 200 pN) show stronger interaction forces than on the solid phase (A) or on noncoated platelets (top). The broad distribution of binding forces indicates that the binding site of KKO is presented very variably, allowing weak to very strong binding of KKO.

Table S1. Patients' characteristics.

Variable	Number of patients (%)
Age, <=65 / > 65 years	129 (38.5)/206 (61.5)
Sex m / f	194 (57.9) / 141 (42.1)
ECOG <2 / >=2	258 (77.0) / 77 (23.0)
Binet Stage a / b / c	261 (77.9) / 48 (14.3) / 26 (7.8)
CD38 neg / pos	201 (61.1) / 128 (38.9)
Clearance creatinine <70 / >=70 ml/min	136 (40.6) / 199 (59.4)
β 2 microglobulin <=3.5 / >3.5 mg/l	236 (75.2) / 78 (24.8)
<i>IGHV</i> * mut / unmut	136 (57.1) / 102 (42.9)
<i>TP53</i> deletion or mutation** yes / no	18 (6.8) / 246 (93.2)
CLL-IPI low / int / high / very high	106 (44.5) / 78 (32.8) / 43 (18.1) / 11 (4.6)
CIRS <=6 / >6	190 (56.7) / 145 (43.3)
Normal FISH yes / no	103 (33.8) / 202 (66.2)
13q14 deletion yes / no	146 (47.9) / 159 (52.1)
Trisomy 12 yes / no	51 (16.7) / 254 (83.3)
11q22 deletion yes / no	31 (10.2) / 274 (89.8)
FISH*** fav/int / unfav	216 (70.8) / 49 (16.1) / 40 (13.1)
Complex karyotype yes / no	41 (14.3) / 246 (85.7)
<i>SF3B1</i> ** mut / WT	18 (8.8) / 186 (91.2)
<i>NOTCH1</i> ** mut / WT	19 (9.3) / 185 (90.7)
<i>BIRC3</i> ** mut / WT	10 (4.9) / 194 (95.1)
Chemotherapy yes / no	114 (34.0) / 221 (66.0)
2 nd neoplasia yes / no	57 (17.0) / 278 (83.0)

**IGHV* genes were amplified from genomic DNA and sequenced according to standard methods with the cut-off of 98% homology to the germline sequence to discriminate between mutated (<98%) and unmutated (\geq 98%) cases, as previously reported.¹³

**Mutations of *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* and *TP53* genes were analyzed by next generation sequencing (NGS) analysis using Ion Torrent PGM (Life technologies, Foster City, CA, USA) as described.⁴

***Each patient was categorized into a FISH risk group according to the following classification: favorable group (isolated 13q14 deletion or absence of FISH aberrations), unfavorable group (deletions of 11q22 or of 17p13); intermediate group (trisomy 12) as described.⁸

Table S2. CIRS distribution

Organ/System	Scoring of Morbidity				% moderate or severe
	No	Mild	Moderate	Severe	
1. Cardiac	240	8	81	6	26.0
2. Hypertension	140	8	184	3	55.8
3. Vascular	267	29	38	1	11.6
4. Respiratory	290	28	17	0	5.1
5. Eye/Ear/Nose/Throat	294	20	21	0	6.3
6. Upper GI	261	60	13	0	3.9
7. Lower GI	281	49	4	1	1.5
8. Liver	298	30	6	1	2.1
9. Kidney	319	11	5	0	1.5
10. Genito-urinary system	251	39	45	0	13.4
11. Musculo-skeletal system	255	61	18	1	5.7
12. Neurology	281	16	33	5	11.3
13. Endocrine/Metabolic	181	26	128	0	38.2
14. Psychiatric	303	21	11	0	3.3

Table S3. Patients' characteristics according to CIRS.

Variable	CIRS ≤6	CIRS >6	p
Age, ≤65 / > 65 years	105/85	24/121	<0.001
Sex m / f	118/72	76/69	Ns
ECOG <2 / ≥2	184/6	74/71	<0.001
Binet Stage a / b / c	151/25/14	110/23/12	Ns
CD38 neg / pos	111/75	90/53	Ns
Clearance creatinine <70 / ≥70 ml/min	143/47	56/89	<0.001
β2 microglobulin ≤3.5 / >3.5 mg/l	150/35	86/43	0.005
<i>IGHV</i> mut / unmut	89/63	47/39	Ns
<i>TP53</i> deleted or mutated yes / no	10/162	8/84	Ns
CLLPI low / int / high / very high	75/48/23/6	31/30/20/5	Ns
Normal FISH yes / no	64/121	39/81	Ns
13q14 deletion yes / no	88/97	58/62	Ns
Trisomy 12 yes / no	32/153	19/101	Ns
11q22 deletion yes / no	16/169	15/104	Ns
FISH fav / int / unfav	133/32/20	83/17/20	Ns
Complex karyotype yes / no	21/154	20/92	Ns
<i>SF3B1</i> mut / WT	14/115	4/71	Ns
<i>NOTCH1</i> mut / WT	8/121	11/64	Ns
<i>BIRC3</i> mut / WT	6/123	4/71	Ns
2 nd neoplasia yes / no	27/163	30/115	Ns
Chemotherapy yes / no	64/127	51/94	Ns

Note: statistical significance was evaluated by Fischer's exact test.

Table S4. Patients' characteristics according to complex karyotype.

Variable	Complex karyotype no	Complex karyotype yes	p
Age, <=65 / > 65 years	109/137	13/28	Ns
Sex m / f	142/104	29/12	Ns
ECOG <2 / >=2	208/38	30/11	Ns
Binet Stage a / b / c	196/37/13	28/5/8	0.013
CD38 neg / pos	154/86	16/25	0.003
Clearance creatinine <70 / >=70 ml/min	162/84	20/21	0.053
β 2 microglobulin <=3.5 / >3.5 mg/l	186/53	23/17	0.010
<i>IGHV</i> mut / unmut	115/82	14/17	Ns
<i>TP53</i> deleted or mutated yes / no	8/210	7/26	0.001
CLLPI low / int / high / very high	92/64/37/4	9/11/42/10	0.002
CIRS <6 / >=6	154/92	21/20	Ns
Normal FISH yes / no	88/157	8/33	0.049
13q14 deletion yes / no	115/130	23/18	Ns
Trisomy 12 yes / no	37/208	12/29	0.041
11q22 deletion yes / no	19/225	9/32	0.010
FISH fav / int / unfav	187/36/22	16/11/14	<0.001
<i>SF3B1</i> mut / WT	14/157	3/24	Ns
<i>NOTCH1</i> mut / WT	15/156	4/23	Ns
<i>BIRC3</i> mut / WT	8/163	2/25	Ns
2 nd neoplasia yes / no	41/205	3/38	Ns
Chemotherapy yes / no	80/166	25/16	0.001

Note: statistical significance was evaluated by Fischer's exact test.

Table S5. Univariate and multivariate analysis for OS and TTFT with CLL-IPI variables.

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis (n=228)					
			OS				After bootstrapping	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p		
Age <=65 / > 65 years	3.199 (1.855-5.431)	<0.001	2.935 (1.364-6.317)	0.006	2.935 (1.248-6.906)	0.014		
Binet Stage a / b / c	1.563 (1.262-1.936)	<0.001	1.706 (1.227-2.372)	0.001	1.706 (1.164-2.501)	0.006		
β2 microglobulin <=3.5 / >3.5 mg/l	2.298 (1.469-3.596)	<0.001	1.321 (0.687-2.537)	0.404	1.321 (0.682-2.557)	0.409		
IGHV mut / unmut	2.740 (1.504-4.993)	0.001	2.373 (1.206-4.667)	0.012	2.373 (1.105-5.095)	0.027		
TP53 deleted or mutated yes / no	4.085 (1.901-8.779)	<0.001	1.541 (0.498-4.771)	0.453	1.541 (0.531-4.473)	0.426		
CIRS <=6/>6	3.843 (2.433-6.071)	<0.001	2.396 (1.224-4.692)	0.011	2.396 (1.163-4.938)	0.018		
Complex karyotype yes/no	3.176 (1.882-5.359)	<0.001	2.564 (1.159-5.671)	0.020	2.564 (1.062-6.192)	0.036		
	TTFT							
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p		
Age <=65 / > 65 years	0.931 (0.640-1.353)	0.706	-	-	-	-		
Binet Stage a / b / c	3.037 (2.506-3.680)	<0.001	2.910 (2.230-3.798)	<0.001	2.910 (2.194-3.859)	<0.001		
β2 microglobulin <=3.5 / >3.5 mg/l	5.055 (3.464-7.379)	<0.001	2.050 (1.218-3.449)	0.007	2.050 (1.183-3.553)	0.011		
IGHV mut / unmut	5.393 (3.254-8.939)	<0.001	3.856 (2.230-6.666)	<0.001	3.856 (2.068-7.189)	<0.001		
TP53 deleted or mutated yes / no	2.746 (1.458-5.572)	0.002	1.110 (0.500-2.463)	0.797	1.110 (0.468-2.630)	0.812		
CIRS <=6/>6	1.151 (0.794-1.669)	0.407	-	-	-	-		
Complex karyotype yes/no	2.521 (1.606-3.958)	<0.001	2.261 (1.266-4.037)	0.006	2.261 (1.281-3.993)	0.005		

ALLEGATO 2

Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia

Maurizio Cavallari^{1,*}, Francesco Cavazzini^{1,*}, Antonella Bardi¹, Eleonora Volta¹, Aurora Melandri¹, Elisa Tammiso¹, Elena Saccenti¹, Enrico Lista¹, Francesca Maria Quaglia¹, Antonio Urso¹, Michele Laudisi¹, Elisa Menotti¹, Luca Formigaro¹, Melissa Dabusti¹, Maria Ciccone¹, Paolo Tomasi¹, Massimo Negrini², Antonio Cuneo^{1,*} and Gian Matteo Rigolin^{1,*}

¹Hematology Section, Department of Medical Sciences, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Arcispedale S. Anna, University of Ferrara, Ferrara, Italy

²Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine, University of Ferrara, Ferrara, Italy

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Antonio Cuneo, email: cut@unife.it

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; complex karyotype; prognosis; target therapy; Richter transformation

Received: April 05, 2018

Accepted: September 01, 2018

Published: September 28, 2018

Copyright: Cavallari et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The complex karyotype (CK) is an established negative prognostic marker in a number of haematological malignancies. After the introduction of effective mitogens, a growing body of evidence has suggested that the presence of 3 or more aberrations by conventional banding analysis (CBA) is associated with an unfavorable outcome in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Thus, the importance of CBA was recognized by the 2018 guidelines of the International Workshop on CLL, which proposed the introduction of CBA in clinical trials to validate the value of karyotype aberrations.

Indeed, a number of observational studies showed that cytogenetic aberrations and, particularly, the CK may have a negative independent impact on objective outcome measures (i.e. time to first treatment, progression free survival, time to chemorefractoriness and overall survival) both in patients treated with chemoimmunotherapy and, possibly, in patients receiving novel mechanism-based treatment.

Here, we set out to present the scientific evidence supporting the significance of CK as a prognostic marker in CLL and to discuss the biological basis showing that the CK is a consequence of genomic instability.

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia of the adult in western countries [1–2]. As a result of genetic and biological complexity [3], the disease runs a variable clinical course, with some patients showing a very indolent evolution and others rapid progression [4]. Several biological features were identified which may predict the time between the diagnosis and the disease progression, the overall survival (OS) (i.e. prognostic markers) and the quality

of response to a specific agent (i.e. predictive markers) [5]. The mutational status of the variable portion of the immunoglobulin gene (*IGHV*) [6], chromosome 17p deletion as detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [7] and *TP53* gene mutations [8] represent powerful prognostic/predictive factors commonly used to stratify CLL patients into different risk groups in the era of chemoimmunotherapy [5, 9–10]. The introduction of effective mechanism-based treatment (i.e. ibrutinib, idelalisib, venetoclax) significantly improved the outcome of CLL [11–13] and the adverse impact of 17p-/*TP53*

mutation and of the *IGHV* mutational status were found to be attenuated in several studies [14–16].

Cytogenetic abnormalities in CLL were first described using chromosome banding analysis (CBA) in the 1970s [17] and in 1990 the complex karyotype (CK) was found to be associated with shorter survival [18]. At that time conventional cytogenetics was limited by the low number of dividing cells in culture [19]. Since 2006, the introduction of the effective mitogens CpG-oligodeoxynucleotide (DSP30) and Interleukin (IL)-2, dramatically improved the mitotic yield [20–21] and 65–83% of CLL patients were shown to carry a karyotype aberration [22–24]. Furthermore, evidence was provided that 21.5–35.7% of CLL cases without aberration by FISH carried chromosome aberrations by CBA, including CK, that were associated with an inferior outcome [25]. Overall, a CK is detectable in 14–34% of untreated CLL patients [23–24, 26–29], and up to 25–35% in the relapse refractory setting [30].

The CK has a strong adverse prognostic significance in several hemopoietic neoplasms such as acute myeloid leukemias, myelodysplastic syndromes and myelofibrosis [31–36] and a number of papers were published in the last 10 years highlighting its relevance in the landscape of prognostic biomarkers in CLL. We therefore set out to review here the biological basis underlying the development of CK and the prognostic and predictive value of this cytogenetic pattern in CLL in the chemoimmunotherapy and the mechanism-based treatment era.

METHODS

In this analysis the CK was defined by the presence of at least three clonal aberrations in the same clone as detected by CBA [18, 37–39]. The studies describing the significance of multiple unrelated clones with less than 3 chromosome aberrations in the same clone were excluded.

Literature search

To describe the biological role of CK and its association with other biomarkers in CLL we performed a first search on PubMed using a MeSH controlled vocabulary using the following terms: “Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell” [Mesh] AND “Karyotype” [Mesh] OR “Abnormal Karyotype” [Mesh] OR “Karyotyping” [Mesh]. We found 311 citations without any restriction on publication date. We included in this analysis those paper fulfilling the following requirements: i) English language; ii) biologic characterization including salient clinicobiologic parameters and CBA; iii) single centre or multicentre studies enrolling consecutive patients and studies using a learning cohort and a validation cohort.

We also performed a research on PubMed to identify publications from January 2000 to March 2018 describing

the role of the CK as a prognosticator in CLL patients (chemoimmunotherapy and targeted therapy era). The following terms were used: “Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell/drug therapy”[Mesh] AND “Clinical Trial” [Publication Type]. We included in this review only full length manuscripts satisfying these criteria: i) English language; ii) phase 2 or phase 3 clinical trials; iii) multivariate and/or univariate analysis including CK; iv) time to first treatment (TFT), or progression free survival (PFS) or overall survival (OS) as clinical endpoints. Manuscripts describing the prognostic impact of the selected parameters in patients who had received experimental treatment were not included.

RESULTS

CK as a consequence of genomic instability

Considering that up to 90% of CLL with CK show an *U-IGHV* mutational status [22–23, 28–29] a relationship may exist between the *IGHV* gene configuration and the development of CK. Indeed a large body of evidence showed that the lymphocytes with *U-IGHV* i) respond to antigen stimulation by activating intracellular signalling, ii) undergo cell divisions *in vivo* as shown by incorporation of deuterated water, iii) carry relatively shorter telomeres and, iv) tend accumulate genomic defects [40–41]. Interestingly, Burns and co-workers [42], used a whole exome sequencing approach to study gene mutations in correlation with the *IGHV* gene configuration and found that exonic CLL driver gene lesions were more common in *U-IGHV* CLL than in CLL with mutated *IGHV* gene. Coding mutations involved *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*, *KLHL6* and, less frequently, *IKZF3*, *SAMHD1* and *BIRC3*[42]. These gene mutations may directly increase genome instability reducing the ability of the cells to respond to DNA damage and may also act in an indirect manner, affecting pathways linked to cell proliferation or serving as an important bridge with the microenvironment, which is of particular importance in CLL [43].

Thomay *et al*[44], reported that loss or mutation of *TP53* was associated with an increased number of break events, with frequent involvement of (near-) heterochromatic regions adjacent to the centromeres, generating dicentric chromosomes and whole-arm translocations. In a recent analysis on relapsed/refractory (R/R) CLL, *TP53* mutations preceded clonal evolution leading to the emergence of clones with CK [45]. Furthermore, patients with *TP53* mutations showed significantly shorter telomeres [44, 46–48] a condition causing chromosomal instability [44, 49]. Though few data are available on the association between CK and telomere length, it is worth noting that two studies showed that patients with CK had shorter median telomere length [44, 50]. In patients with 11q-/*ATM* deletions and a CK,

the frequency of *TP53* mutations was significantly lower than in patients with CK without del (11q), suggesting that the disruption of the DNA damage control pathway through *ATM* or *TP53* lesions may favour the development of multiple chromosomal rearrangements [44]. Other mutations occurring at a higher incidence in patients with CK involved *FBXW7* (16.7%) in a study [24] and *MYD88* (14.3%) in another study [26]. These genes have been linked to the *NOTCH1/WNT* pathways and to the inflammatory pathway, respectively [51]. *FBXW7* encodes for a tumour suppressive protein, which regulates ubiquitin-mediated degradation of various oncoproteins (cyclin E, c-MYC, NOTCH) [52]. The abnormal binding of cyclin E to *FBXW7* has been related to chromosomal instability in hematopoietic progenitors [53] providing a possible functional link to the development of CK. *MYD88* mutation may have a role in generating genome instability through the activation of the RAS/ERK pathway [54]. Moreover, a recent study by Oliveira-Santos *et al* pointed out a possible role of the histone methyltransferases SET and MYND domain containing 2 (*SMYD2*) and SET and MYND domain containing 3 (*SMYD3*), members of the SMYD family of methyltransferases, in the development of CK [55]. In this study, *SMYD2* and *SMYD3* were found to be overexpressed in CLL patients. Interestingly, lower expression of *SMYD2* and *SMYD3* was significantly associated with a CK [55]. Although the mechanism linking these methyltransferases and CK is unknown, it noteworthy that *SMYD2* may act as an oncogene by promoting the methylation of p53 and of the retinoblastoma tumor suppressor protein (RB) [56–57], and that *SMYD3* promotes MAP3K2 methylation, inducing genomic instability by activation of Ras/Aurora kinase A-driven mechanisms [55, 58–59].

Although the precise mechanisms underlying the development of CK in CLL are have not been elucidated, evidence was provided in 2 studies using CBA and NGS on a panel of CLL driver genes that the CK may be associated with a distinct pattern of genetic lesions (Figure 1). A sequence of events possibly leading to the development of complex cytogenetic rearrangements is illustrated in Figure 2.

The CK is more frequently found in CLL with unfavorable clinicobiologic features

An extensive biologic characterization of CLL patients enrolled in clinical trials allowed for the identification of biomarkers associated with an inferior prognosis in large international studies recruiting patients treated with chemoimmunotherapy [10, 60]. Because CBA was not included in these studies, we set out analyse possible correlations between CK and clinical parameters (stage, age, sex, performance status) and biomarkers, i.e TP53 disruption, 11q-; unmutated *IGHV* gene (*U-IGHV*)

with a documented prognostic significance at multivariate analysis in the chemoimmunotherapy era [10, 60].

Studies including CBA and the classical clinicobiologic prognosticators showed that no consistent correlation was found between CK and unfavorable clinical parameters, such as age, sex, performance status, beta-2-microglobulin levels, whereas an association appears to be well documented between CK and advanced stage, as shown in Supplementary Table 1.

The *U-IGHV* status, del (17p)/*TP53* mutations or del (11q)/*ATM* deletions were more frequently seen in CLL with CK, than in CL without CK (Figure 3) [22-24, 28-29, 39, 61-63].

A number of recurrent driver gene mutations was detected in CLL by next generation sequencing (NGS) and excellent reviews highlighted that, while the vast majority of them recur across patients at a low frequency, mutations of *TP53*, *ATM*, *NOTCH1*, and *SF3B1* can be found in >5% of treatment-naïve patients and may predict for an inferior prognosis [48, 64–65]. We therefore analysed available evidence on the association between genetic features and CK. Several studies reported a correlation between CK and *TP53* or *ATM* mutations or the unmutated *IGHV* configuration (Figure 3). The results of 2 studies using CBA with novel mitogens and NGS to detect mutations in large CLL-specific gene panels are shown in Figure 2. Overall, these data show that the incidence of TP53 disruption in CLL with CK was significantly higher (21–80% of the cases) than in an unselected treatment-naïve CLL population (3–13% of the cases) [22-24, 26, 28-29, 63] or in CLL without CK. Likewise, a statistically significant association was found between CK and the unmutated *IGHV* (*U-IGHV*) in the majority of studies (50–90% of the cases) [22-24, 28-29, 63] and with 11q- or *ATM* mutation (22%–42, 1%) (Supplementary Table 1, Figure 1) [23, 26–27, 29, 63]. Herling and colleagues did not find a significant association between CK and the *U-IGHV* status in the patients enrolled in the CLL11 trial [24], possibly due to over-representation of *IGHV*-unmutated cases and consequent low number of *IGHV*-mutated cases in this analysis including patients with disease progression. These findings are not surprising, since *TP53* and *ATM* function are involved in maintaining genomic stability [66–67], and the *U-IGHV* configuration identifies a CLL clone that is responsive to B-cell receptor antigen stimulation with consequent cell activation [40–41].

We also analysed possible association of CK and immunophenotypic markers. In 3 studies the CK was associated with CD38-positivity [23, 63] (Supplementary Table 1). No study analysed whether a CK was associated with CD49d expression, an immunophenotypic marker of unfavorable prognosis [68].

Overall the data here summarized clearly show that there is a strong and reproducible association of CK with advanced stage, *U-IGHV*, *TP53* disruption, *ATM* mutations.

The CK is a strong adverse risk factor in the chemoimmunotherapy era

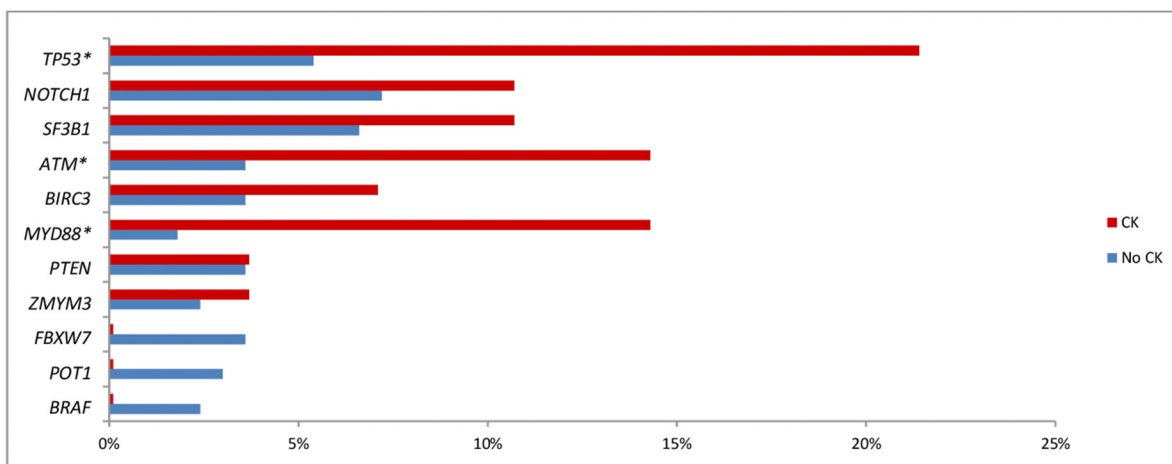
The CK was shown to represent an independent adverse prognostic factor in several studies analysing a full set of biomarkers and using robust efficacy endpoints, i.e. time to first treatment (TFT), progression free survival (PFS) or overall survival (OS).

Impact on TFT

Early observations concerning the negative impact of complex chromosomal abnormalities on clinical outcome date back to the first studies on cytogenetic aberrations in CLL [18–19, 69–71]. In a monocentric

study on 109 CLL patients conducted by Mayr *et al*, the CK was found to be predictive of a worse TFT at univariate analysis (median TFT, 26 months; 95% CI, 15-37 months vs 106 months 95% CI, 61-151 months; $P < 0.001$) [20]. In another monocentric study on 482 CLL patients [38], the CK was associated with a shorter TFT in treatment-naïve patients at univariate analysis (HR 1.644; $P = 0.029$) and similar findings were reported by Travella and coworkers, who observed a 13-month median TFT in patients with CK as compared with 69-month median TFT in patients without CK ($P=0.015$) [72]. These observations were also reported in a larger study on 1001 previously untreated CLL where the CK was associated with a shorter TFT at univariate ($p=0.01$) and multivariate analysis [23]. In subsequent studies the prognostic impact of CK on TFT

A



B

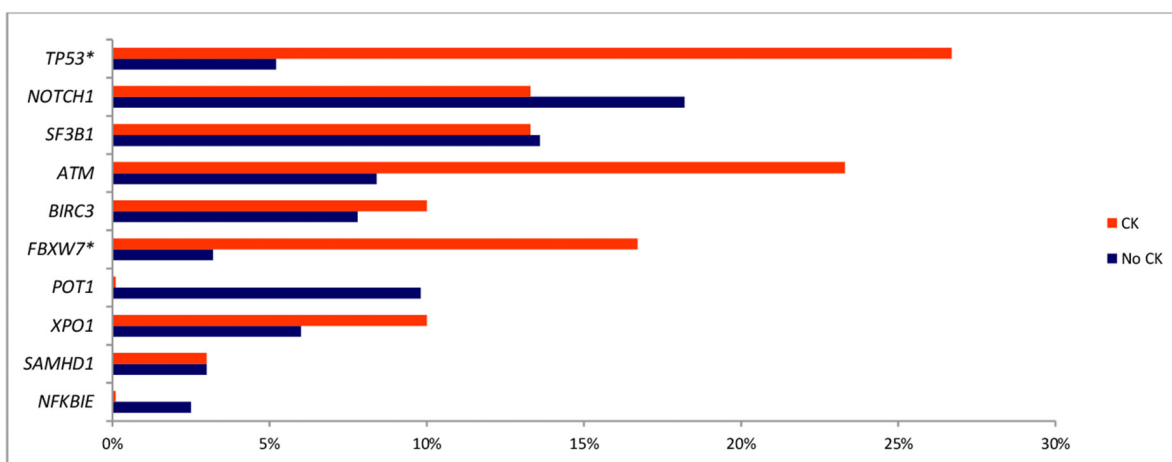


Figure 1: (A) Frequency of Gene Mutation by NGS in patient with or without CK reported by Rigolin et al [26] (B) Frequency of Gene Mutation by NGS in patient with or without CK reported by Herling et al [24]. * $p < 0.05$

was documented in a learning cohort (LC) including 166 patients and in an independent validation cohort (VC) including 250 patients (HR 5.004; 95% CI, 1.980-12.597; $P < 0.001$ and HR 2.159; 95% CI, 1.499-5.331; $P < 0.001$, respectively). The difference held at multivariate analysis in the LC (HR 2.418; 95% CI, 1.173-4.983; $P = 0.017$) [39]. More recently, Puiggros *et al*, conducted a study on 1045 untreated MBL/CLL patients to evaluate the clinical impact of CK and high risk FISH (HR-FISH) on outcome [63]. The cases with CK had a higher 2-year cumulative incidence of progression requiring treatment (48%; 95% CI, 36-58% vs. 20%; 95%CI, 18-23%; $P < 0.001$) [63]. Finally, in a large retrospective monocentric study by Rigolin *et al* including 335 newly diagnosed CLL, the CK was associated with a shorter TFT, independent from CLL-IPI (HR 2.157; IC 95%, 1.177-3.952; 0.013) [27].

Impact on PFS

The correlation between CK and PFS was investigated in few clinical trials in the era of chemoimmunotherapy (CIT). In a study by Badoux *et*

al, the CK proved to be predictive of shorter PFS in 284 R/R CLL patients treated with FCR (HR 2.6; 95%CI, 1.5-4.4; $P < 0.001$) [73]. Similar data were presented in another study including 80 R/R CLL patients treated with Cyclophosphamide, Fludarabine, Alemtuzumab, and Rituximab [74]. In this analysis the CK along with del (17p) were significantly associated with worse PFS (HR 4.1; 95%CI, 2.0-8.4; $P < 0.001$). Likewise a retrospective study on 110 CLL patients treated with first-line FCR showed that the CK was associated with shorter median PFS (21 vs. 55 months; HR 2.4; 95%CI, 1.14-5.19; $P = 0.002$) [29]. Herling and coworkers described the impact on outcome of CK in a subset of patients treated with chlorambucil-based chemo- or chemoimmunotherapy in the CLL11 trial and found that chromosome translocations, a type of chromosome imbalance often associated with complex karyotype [75], was associated with shorter PFS [24].

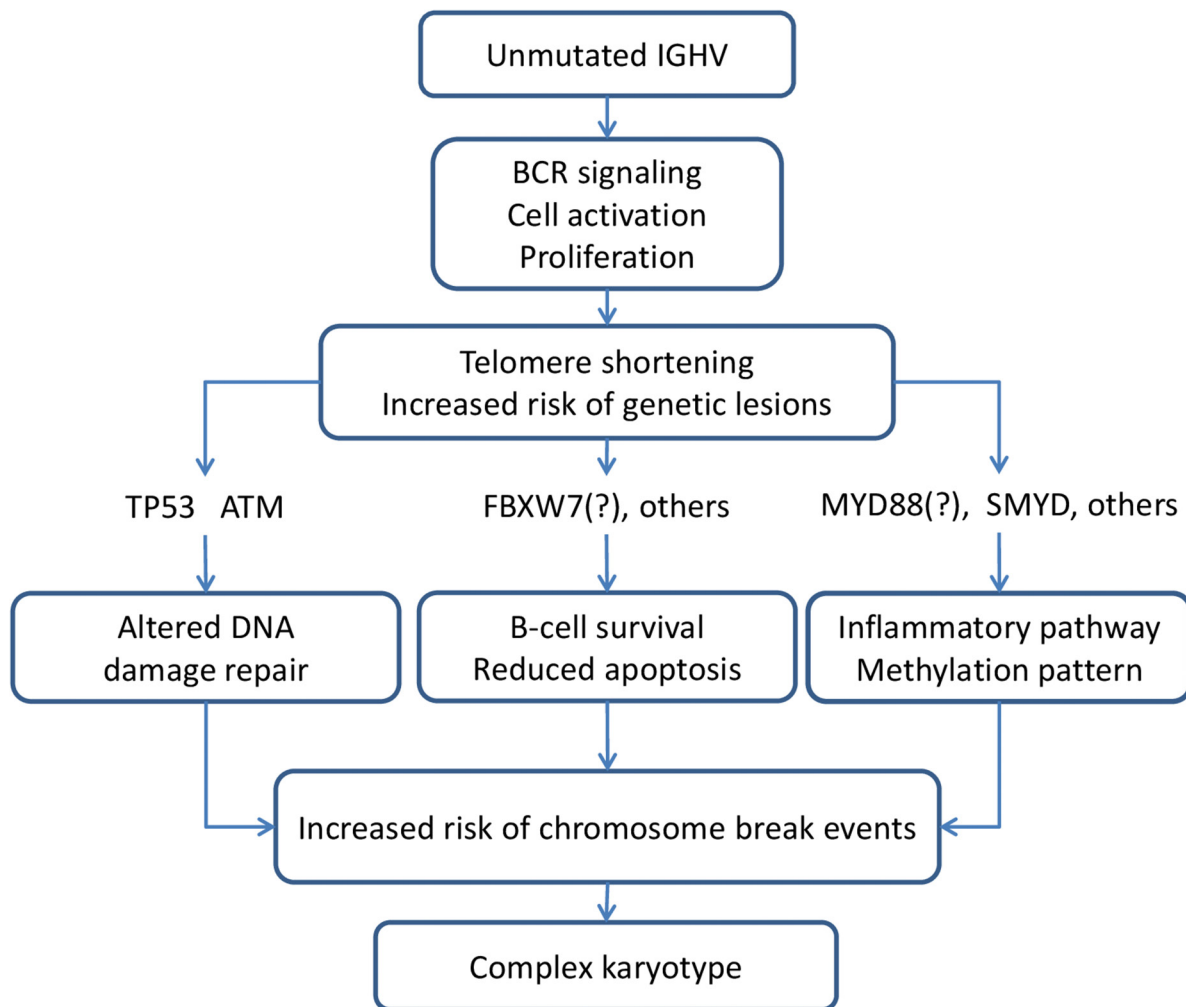


Figure 2: Genetic background favouring the development of complex karyotype.

Table 1: Impact of complex karyotype on OS

Reference	Tot. pts	CK	Treatment	Disease status	Median OS (months)		Univariate analysis		Multivariate analysis	
					CK yes	CK no	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
[20]	109	NA	various	TN and pretreated	107	346	15.44*	<0.001	-	Ø
[38]	482	71/399 (17.8%)	NA	TN	81.1% at 5y	86-94.4% at 5y #	3.830 (1.714-8.560)	0.001	-	Ø
[73]	284	22/182 (12.1%)	FCR	R/R	26	10.5 m. -78 m. ##	-	-	1.9 (1.1-3.2)	0.015
[74]	80	8/67 (11.9%)	CFAR	R/R	NA	NA	-	-	2.0 (1.1-3.7)**	0.022
[72]	38	16/38 (42.1%)	NA	TN	56	144	-	-	-	-
[39]	LC 166 VC 250	20/145 (13.8%) 35/238 (14.7%)	various	TN	NA	NA	2.701 (1.988-8.787) 2.155 (1.160-4.004)	<0.001 0.015	4.856 (1.475-9.998) 3.630 (1.358-9.703)	<0.0001 0.010
[29]	110	38/110 (34.5%)	FCR	TN	72.4% at 5 y	85.8% at 5y	-	-	5.16 (1.2-22.1)	0.07
[24]	161	30/154 (19.5%)	Clb/Clb-R/ Clb-G	TN	NA	NA	2.9 (1.5-5.4) ^o 2.6 (1.3-5.4) ^{oo}	0.001 ^o 0.006 ^{oo}	2.682 (1.366-5.264)	0.004
[63] [#]	1045	99/1043 (9.5%)	various	TN	79	NR	-	-	1.66 (1.06-2.59)	0.027
[27]	335	41/287 (14.3%)	various	TN	70	135	3.176 (1.882-5.359)	<0.001	3.572 (1.341-9.515)	0.011
[77]	186	37/186 (19.8%)	Lenalidomide-R Lenalidomide-O	R/R	23	62.8	-	-	2.08 (1.15-3.76)	0.015

TN=treatment naïve; R/R= relapsed/refractory; OS=overall survival; CK=complex karyotype; NA=not available; Clb=chlorambucil; FCR=Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab; G=Obinutuzumab; R= Rituximab; O-Ofatumumab; Ø=not significant; LC: learning cohort; VC: validation cohort

*log rank; **CK or 17p aberration; ^oall arms; ^{oo}(Clb-R+Clb-G);

[#]MBL/CLL

[#] OS was compared in this study between patients with CK and patients without CK carrying chromosome translocations, or 1-2 aberrations or normal karyotype.

OS in the patients without CK was reported in this study according to the aberration detected by FISH (13q-, +12, 11q-, 17p).

Impact on OS

As shown in Table 1, a significantly shorter survival was observed in virtually all the observational studies that included treatment naïve patients, including a monocentric study on CLL patients treated with first-line FCR [29]

and an analysis using a learning cohort and a validation cohort [39]. Interestingly, the presence of CK was shown to represent an adverse prognostic parameter that was independent of the international prognostic index [27].

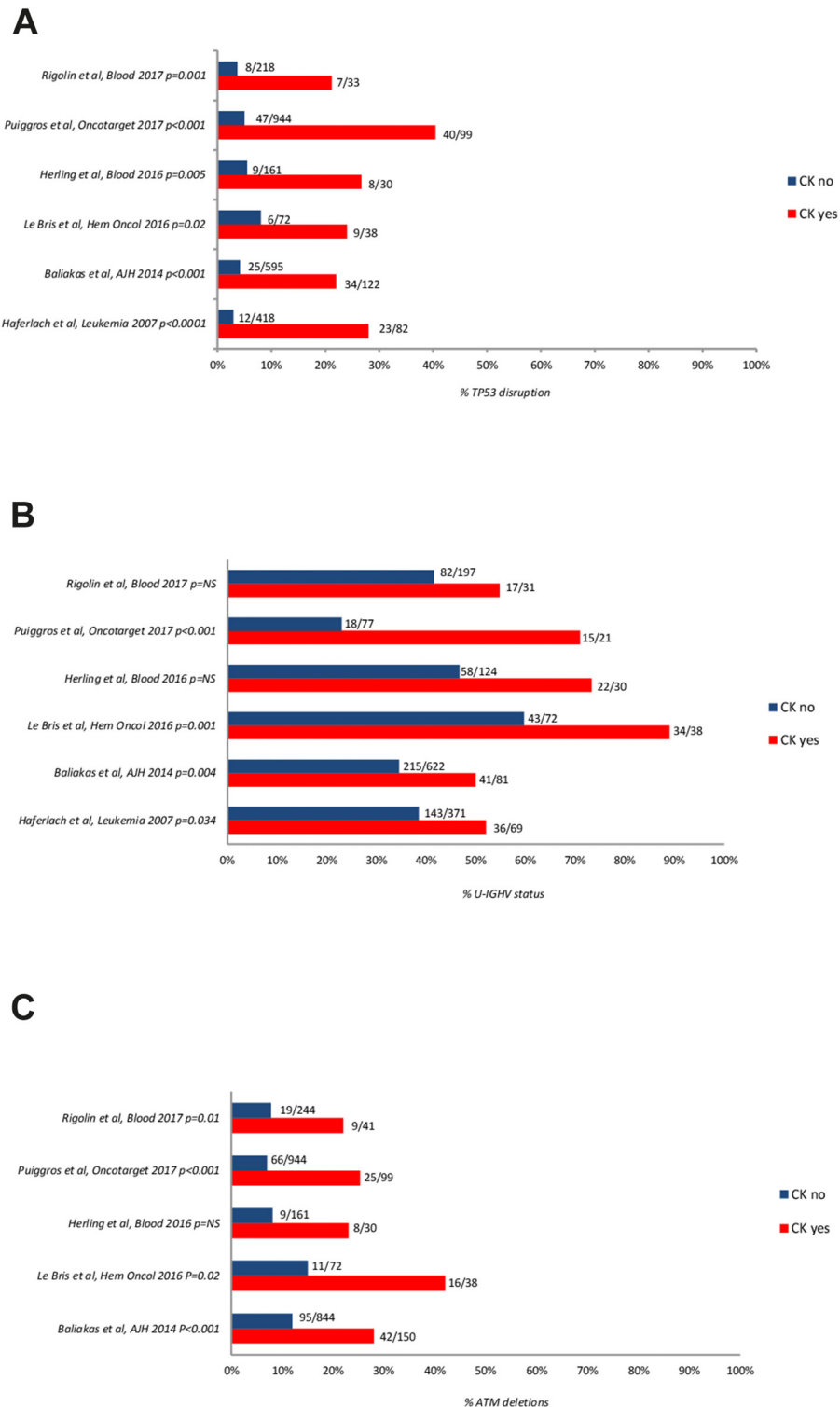


Figure 3: Frequency of *TP53* disruption (A), *ATM* deletion (B), and unmutated *IGHV* gene configuration (C) according to the presence or absence of CK. The number of cases are reported aside each bar. NS: not significant; *UM-IGHV*: unmutated *IGHV*.

In 2016, Herling *et al*[24], performed an analysis in a subgroup of 161 elderly and comorbid patients enrolled in the CLL11 trial comparing the efficacy of chlorambucil alone, against chlorambucil with rituximab or with the second generation anti CD20 obinutuzumab. The patients with available karyotype included in analysis were representative of the entire study cohort with the exception of a higher percentage of patients >70 years. A CK in 30/154 (19.5%) patients was shown to represent an independent negative prognostic factor on OS along with advanced stage, elevated beta-2-microglobulin (β 2M) an unmutated *IGHV* gene and mutations in the *POT1* gene. Interestingly, in a phase II trial evaluating chlorambucil and rituximab in 85 treatment naïve patients [76] the presence of CK was associated with a lower overall response rate (ORR) and complete remission rate, which represent surrogate endpoints of OS. Indeed Takahashi *et al*, more recently confirmed the adverse impact of CK on ORR and OS in a study conducted on 186 R/R CLL patients treated with a Lenalidomide based regimen [77]. Finally, in two trials including relapsed/refractory CLL, the CK was significantly associated with a shorter OS in patients treated with fludarabine cyclophosphamide and rituximab, with or without alemtuzumab [73–74].

CK is an independent adverse prognosticator in high risk CLL

A negative prognostic impact of CK was recently documented even when the analysis was restricted to high risk CLL as defined by unfavorable genetic features [23–24, 28, 78]. Herling *et al*, showed that patients with CK alone exhibited a similar survival as those with *TP53* lesion, whereas patients with both CK and *TP53* aberrations had a particularly poor prognosis ($P < 0.001$) [24]. In another study on 101 patients carrying *TP53* abnormalities, 31/101 cases (47%) showed a CK. CK was associated with shorter OS at multivariate analysis (HR 2.47; 95% CI, 1.11–5.49; $P = 0.027$) confirming that CK may portend a dismal outcome in this aggressive subgroup [78].

In a study on previously untreated high-risk CLL (defined by the presence of U-*IGHV* gene and/or chromosome 11q22 deletion and/or chromosome 17p13 deletion and/or *TP53* mutations) the presence of CK in 21/101 (20.8%) cases has been associated with unfavorable FISH (i.e. 11q- or 17p-) ($P < 0.001$) and *TP53* disruption ($P = 0.012$). In multivariate analysis, the CK was significantly associated with a shorter TFT (HR 2.934; 95% CI, 1.686–5.108; $P < 0.001$), an inferior OS (HR 2.914; 95% CI, 1.080–7.861; $P = 0.024$) and a trend toward a shorter time to chemorefractoriness (TTCR) (HR 2.486; 95% CI, 0.905–6.825; $P = 0.077$) [28].

In the subgroup of patients with concurrent *TP53* disruption and unfavorable karyotype, the median TFT reported in this study was 5.5 months compared to 97.3

months in patients with sole *TP53* disruption ($p < 0.0001$). Likewise, the median OS and TTCR, were much shorter in this subgroup (28.7 months and 15 months, respectively) than in patients with sole *TP53* disruption who did not reach the median OS ($P < 0.0001$) and showed a TTCR of 30 months ($P < 0.0001$) [28].

Similar observations were reported by Baliakas *et al*, who found a trend for a significantly shorter TFT in patients with del(17p) and concomitant CK as compared with patients with del(17p) alone ($P = 0.06$) [23].

Finally, Le Bris *et al*, reported a dismal outcome in patients with concurrent *TP53* disruption, U-*IGHV* and CK, with a shorter PFS (12 vs. 55 months; HR: 8.1, 95% CI 1.13–57.39; $P < 0.0001$) and shorter OS (5-year OS: $21.3 \pm 18\%$ vs $84.7 \pm 8\%$; HR: 25.7, 95% CI 1.15–574; $P < 0.0001$) as compared with the patients without this combination of adverse risk factors [29].

The CK may represent an unfavorable prognostic marker in the targeted therapy era

Whereas mechanism-based treatment with novel agents proved very efficacious in unfavorable genetic subsets of CLL (i.e. U-*IGHV*, *TP53* disruption, 11q-) [79–81] several studies showed that the CK may have a negative prognostic role in R/R CLL receiving kinase targeted treatment or the BCL2 inhibitor venetoclax, as summarized in Table 2 [14, 61, 79, 82–83]. A retrospective analysis on 88 R/R CLL patients receiving Ibrutinib based regimens demonstrated that the CK was a stronger predictor of an inferior outcome than del(17p) [61]. A CK and del(17p) were found in 21/56 (38%) and 34/86 (40%) assessable cases, respectively, whereas they coexisted in 17 cases. At a median follow-up for surviving patients of 28 months (range, 14–48 months) the CK was associated with a shorter event free survival (EFS) (HR 6.6; 95% CI, 1.7–25.6; $P = 0.006$) and inferior OS (HR 5.9; 95% CI, 1.6–22.2; $P = 0.008$). Furthermore, a trend for a shorter EFS was observed in patients with a CK and del(17p) vs. those with sole del(17p) ($P = 0.056$), whereas no association was noted between del(17p) and OS ($P = 0.885$) [61]. It is worth noting that *TP53* mutations were not assessed in this analysis. Brown *et al*, analysed the prognostic significance of CK in the phase 3 RESONATE study, including 195 R/R CLL patients treated with Ibrutinib [14]. At a median follow up of 19 months the presence of CK in 39/153 (25%) assessable patients did not show a significant impact on PFS (HR 1.53, 95% CI, 0.741–3.157; $P = 0.2476$) and on OS (HR 1.86; 95% CI, 0.770–4.485; $P = 0.1610$). It is noteworthy that, at a 5-year follow-up of phase-2 studies, the presence of CK was associated with a highly significant difference in median PFS in R/R CLL (31 months with CK compared to not reached in patients without CK and with 51 months in the entire cohort). However, the only genetic parameter retaining its adverse significance at multivariable analysis

Table 2: Impact of complex karyotype on R/R CLL patients treated with pathway inhibitors

Therapy and patient population	Tot. pts	CK	Median OS (months)		OS		Median PFS (months)		PFS	
			CK yes	CK no	HR (IC 95%)	P	CK yes	CK no	HR (IC 95%)	P
<i>Ibrutinib</i> in R/R CL [14, 61]	88	21/56 (37.5%)	25	NR	5.9 (1.6-22.2)	0.008	19	39	6.6 (1.7-25.6)*	0.006
	195	39/153 (25.5%)	NR	NR	1.86 (0.770-4.485)	0.161	NR	NR	1.53 (0.741-3.157)	0.248
<i>Idelalisib</i> in R/R CLL [82]	110	26/65 (40%)	NR	NR	1.78 (0.69-4.64)	0.230	20.9	19.4	1.18	0.630
<i>Venetoclax</i> in R/R CLL post KI [83]	67	16/38 (42.1%)	-	-	-	-	16	NR	6.6 (1.5-29.8)**	0.005

R/R relapsed/refractory; OS = overall survival; TFT = time to first treatment; EFS = event free survival; PFS = progression free survival; NR = not reached; *Event Free Survival (EFS); **Time to progression (TTP).

in this study was represented by the 17p deletion [79]. The CK and/or del(17p) may predispose to ibrutinib resistance through the development of the BTK C481S mutation or phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) activating mutation [61, 84–86].

The CK was shown to have a strong adverse impact on outcome in patients treated with Venetoclax [83]. Among 67 R/R CLL patients treated with this BCL-2 inhibitor, 16 out of 38 (42%) assessable patients had CK. In univariate analysis the CK was associated with higher risk of progression (HR 6.6; 95% CI, 1.5-29.8; P = 0.005) along with fludarabine-refractory status (HR 7.01; 95%CI, 1.7-28.5; P = 0.002). Multivariate analysis was not performed due to the small sample size in this study. Interestingly, the presence of a CK increased the risk of progression among patients with F-refractory disease (P = 0.002), whereas TP53 mutation and/or del(17p) did not show any impact on time to progression (TTP) [83].

In patients treated with idelalisib and rituximab, the prognosis was not significantly influenced by the presence of a CK in the analysis by Kreuzer and coworkers, who reported their experience on 65 patients with available karyotype drawn from 110 R/R CLL patients receiving Idelalisib plus rituximab. With a relatively short follow-up (median of 21.4 months), 26 patients with CK showed no significant difference in terms of PFS and OS as compared with 39 patients without CK [82].

Prospective studies are needed to support the circumstantial evidence summarized here that a CK may represent a prognosticator in patients with R/R CLL receiving new oral agents.

CK and Richter transformation

The presence of CK was sporadically linked to the development of RT in previous reports [87–89]. In a retrospective study on CLL patients treated with first-line FCR, Le Bris *et al*, reported a CK in 1/4 cases with RT [29]. Anderson *et al* found a CK in 12 of 25 patients (48%) with progression on Venetoclax, including 8 of 17 patients with RT (47%) [83]. Rogers *et al*, studied the impact of CK in 46 CLL patients who developed RT. They reported a CK in 28/42 (67%) patients who subsequently developed RT and found that CK had an adverse impact at multivariate analysis on OS with the R-EPOCH regimen (HR 2.72; CI 95%, 1.14-6.52; P=0.025) [90].

In a recent analysis, Miller *et al*, found an association between near-tetraploidy (4 copies of most chromosomes within a cell) with CK and showed that 6/9 patients with this peculiar cytogenetic pattern developed RT. In a multivariate analysis near-tetraploidy and CK represented independent predictors of ibrutinib discontinuation due to transformation [91].

Further studies are required to define the correlation between CK and RT

Perspectives

The importance of cytogenetic analysis in CLL was recognized by the 2018 guidelines of the International Workshop on CLL [92], which proposed the introduction of CBA in future prospective clinical trials to validate the prognostic and predictive value of karyotype aberrations [93]. The following issues represent an area of investigation which may facilitate the introduction of cytogenetic analysis in clinical practice.

Refinement of the definition of CK

Evidence was provided that this broad cytogenetic category, defined by the presence of at least 3 chromosome aberrations, should be regarded as heterogeneous. The patients with CK due to the coexistence of trisomy of chromosomes 12, 18 and 19, showed favourable clinicobiologic characteristics in terms of age (median 59 years), high incidence of mutated *IGHV* status and low frequency of *TP53* disruption or *NOTCH1* mutation (5% and 4% of cases, respectively) [23, 94, 95]. Likewise, Baliakas and colleagues identified a subset of patients with CK carrying +12, +19 plus other numerical and/or structural chromosome abnormalities (12% of the cases), which displayed indolent clinical course independent of clinical stage, *IGHV* mutational status and *TP53* status [96]. These findings suggest that the cytogenetic complexity defined solely by numerical aberrations should not be regarded as an unfavorable prognostic marker in CLL. Recently, Rigolin *et al.*, showed that within patients carrying CK as defined by the presence of 3 or more aberrations, the presence of unbalanced translocations (i.e. chromosome additions, derivatives, insertions, duplications, ring-, dicentric- and marker-chromosomes) was associated with a worse outcome in terms of OS and TTFT (HR 2.773; 95% CI, 1.056-7.281; P=0.038 and HR 2.375; 95% CI, 1.027-5.492; P=0.043) [97]. Interestingly, a distinct mRNA expression profile, with a deregulation of genes involved in cell cycle control and DNA damage response, was documented in patients with a CK carrying unbalanced rearrangements [97].

Finally, of the presence of ≥ 5 chromosomal aberrations, referred to as high-CK, predicted for a particularly aggressive clinical course in a large multicentre study, possibly due to a strong association with *TP53* disruptions (P<0.001) [23]. More recently high-CK (i.e. ≥ 5 chromosomal aberrations) was shown to represent a strong adverse prognosticator independent of clinical stage, *IGHV* mutational status and *TP53* status [96].

New methods of detection

CBA is somewhat laborious, has a low sensitivity and requires mitotic stimulation of fresh or frozen living cells. Hence, alternative methods of detection of genomic

complexity were developed. The array-based (CGH/SNP) analysis offers the opportunity to study the CLL genome, does not require *in vitro* mitogens and allows for the detection of subtle DNA gains and losses [98]. Leeksa *et al.*, recently analysed 1911 patients with monoclonal B-cell lymphocytosis and treatment-naïve CLL and found that 451/1911 cases (24%) displayed genome complexity (defined as the presence of ≥ 3 structural and/or numerical aberrations) [99]. This study also showed that array-analysis detected more aberrations than CBA (2.35 vs 1.84, 95% CI paired differences 0.221-0.798) [99].

Diagnostic platforms using whole genome sequencing (WGS) to detect single nucleotide variants and insertion/deletions are being developed and validated for potential usage in clinical practice [100]. Although these methods will likely provide comprehensive genomic characterisation of CLL and will represent alternative method to recognize the prognostic or predictive role genetic lesions in trials, they still require standardization and a univocal definition of “genome complexity”.

At the moment CBA represents a standardized tool for risk assessment in CLL, providing complementary information to FISH and traditional genetic studies of recurrent mutations. Because cytogenetic laboratories are available in the majority of hematologic centres and the mitotic yield greatly improved with novel mitogens, CBA could be incorporated in prospective trials to definitely establish its predictive power in an era in which both CIT and new mechanism-based treatment are available [92].

Author contributions

All authors edited and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This work was supported by AIL Ferrara, Beat Leukemia Foundation, Milan (www.beat-leukemia.org/uk/index.asp), the Fondo di Ateneo per la Ricerca 2013, 2014, 2016, 2017 of the University of Ferrara (G.M.R., A.C.), Fondi incentivazione alla ricerca 2017 (FIR) of the University of Ferrara to GMR, Programma Ricerca Regione Università 2007-2009 University of Ferrara (G.M.R., A.C.), Programmi di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) 2008 (A.C.), Ricerca Finalizzata (A.C.; project RF-2011-02349712), Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca PRIN 2015 (A.C.; project 2015ZMRFEA), E.V. and E.S. are supported by AIL Ferrara.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007; 57:43-66.
2. The Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program of the National Cancer Institute. Cancer fact sheets: chronic lymphocytic leukemia (CLL). <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>.
3. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005; 352:804-815.
4. Cuneo A, Cavazzini F, Ciccone M, Daghia G, Sofritti O, Saccetti E, Negrini M, Rigolin GM. Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high-risk subgroups. *Cancer Med.* 2014; 3:555-564.
5. Zenz T, Fröhling S, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010; 23:71-84.
6. Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood.* 1997; 89:4153-4160.
7. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000; 343:1910-1916.
8. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwänen C, Döhner H, Stilgenbauer S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* 2008; 112:3322-3329.
9. Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma.* 2013; 54:2351-2364.
10. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2016; 17:779-790.
11. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, Grant B, Sharman JP, Coleman M, Wierda WG, Jones JA, Zhao W, Heerema NA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 369:32-42.
12. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, Barrientos JC, Zelenetz AD, Kipps TJ, Flinn I, Ghia P, Eradat H, Ervin T, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2014; 370:997-1007.
13. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 374:311-322.
14. Brown JR, Hillmen P, O'Brien S, Barrientos JC, Reddy NM, Coutre SE, Tam CS, Mulligan SP, Jaeger U, Barr PM, Furman RR, Kipps TJ, Cymbalista F, et al. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia.* 2018; 32:83-91.
15. Sharman JP, Coutre SE, Furman RR, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, Barrientos JC, Zelenetz AD, Kipps TJ, Flinn IW, Ghia P, Hallek M, Coiffier B, et al. Second Interim Analysis of a Phase 3 Study of Idelalisib (ZYDELIG®) Plus Rituximab (R) for Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Efficacy Analysis in Patient Subpopulations with Del(17p) and Other Adverse Prognostic Factors. *Blood* 2014; 124:330.
16. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, Puvvada SD, Wendtner CM, Roberts AW, Jurczak W, Mulligan SP, Böttcher S, Mobasher M, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016; 17:768-778.
17. Robèrt KH, Möller E, Gahrton G, Eriksson H, Nilsson B. B-cell activation of peripheral blood lymphocytes from patients with chronic lymphatic leukaemia. *Clin Exp Immunol.* 1978; 33:302-308.
18. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Cuneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med.* 1990; 323:720-724.
19. Gahrton G, Juliusson G, Robèrt KH, Friberg K. Role of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev.* 1987; 1:183-92.
20. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006; 107:742-751.
21. Bardi A, Cavazzini F, Rigolin GM, Tammisio E, Volta E, Pezzolo E, Formigaro L, Sofritti O, Daghia G, Ambrosio C, Rizzotto L, Abass AE, D'Auria F, et al. Employment of oligodeoxynucleotide plus interleukin-2 improves cytogenetic analysis in splenic marginal zone lymphoma. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:691493.
22. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia.* 2007; 21:2442-2451.
23. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, Malcikova J, Anagnostopoulos A, Glide S, Mould S, Stepanovska K, Brejcha M, Belessi C, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in

- chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014; 89:249-255.
24. Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, Altmüller J, Thiele H, Bahlo J, Kluth S, Crispatzu G, Herling M, Schiller J, Engelke A, Tausch E, Döhner H, et al. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*. 2016; 128:395-404
 25. Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, Saccenti E, Bardi A, Cavazzini F, Ciccone M, Nichele I, Pizzolo G, Zaja F, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012; 119:2310-2313.
 26. Rigolin GM, Saccenti E, Bassi C, Lupini L, Quaglia FM, Cavallari M, Martinelli S, Formigaro L, Lista E, Bardi MA, Volta E, Tammiso E, Melandri A, et al. Extensive next-generation sequencing analysis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis: clinical and biological correlations. *J Hematol Oncol*. 2016; 9:88.
 27. Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, Formigaro L, Lista E, Urso A, Guardalben E, Liberatore C, Faraci D, Saccenti E, Bassi C, Lupini L, Bardi MA, et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood*. 2017; 129:3495-3498.
 28. Rigolin GM, Formigaro L, Cavallari M, Quaglia FM, Lista E, Urso A, Guardalben E, Martinelli S, Saccenti E, Bassi C, Lupini L, Bardi MA, Volta E, et al. An extensive molecular cytogenetic characterization in high-risk chronic lymphocytic leukemia identifies karyotype aberrations and TP53 disruption as predictors of outcome and chemorefractoriness. *Oncotarget*. 2017; 8:28008-28020. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15883>.
 29. Le Bris Y, Struski S, Guièze R, Rouvellat C, Prade N, Troussard X, Tournilhac O, Béné MC, Delabesse E, Ysebaert L. Major prognostic value of complex karyotype in addition to TP53 and IGHV mutational status in first-line chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol*. 2017; 35:664-670.
 30. Mato AR, Hill BT, Lamanna N, Barr PM, Ujjani CS, Brander DM, Howlett C, Skarbnik AP, Cheson BD, Zent CS, Pu JJ, Kiselev P, Foon K, et al. Optimal sequencing of ibrutinib, idelalisib, and venetoclax in chronic lymphocytic leukemia: results from a multicenter study of 683 patients. *Ann Oncol*. 2017; 28:1050-1056.
 31. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenau P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129:424-447.
 32. Strickland SA, Sun Z, Ketterling RP, Cherry AM, Cripe LD, Dewald G, Fernandez HF, Hicks GA, Higgins RR, Lazarus HM, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. ECOG-ACRIN Cancer Research Group. Independent Prognostic Significance of Monosomy 17 and Impact of Karyotype Complexity in Monosomal Karyotype/Complex Karyotype Acute Myeloid Leukemia: Results from Four ECOG-ACRIN Prospective Therapeutic Trials. *Leuk Res*. 2017; 59:55-64.
 33. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenau P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120:2454-2465.
 34. Valcárcel D, Ademà V, Solé F, Ortega M, Nomdedeu B, Sanz G, Luño E, Cañizo C, de la Serna J, Ardanaz M, Marco V, Collado R, Grau J, et al. Complex, not monosomal, karyotype is the cytogenetic marker of poorest prognosis in patients with primary J Clin Oncol. 2011; 29:392-397.
 35. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, Van Dyke D, Hanson C, Wu W, Pardani A, Cervantes F, Passamonti F, Tefferi A. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011; 29:392-397.
 36. Tefferi A, Jimma T, Gangat N, Vaidya R, Begna KH, Hanson CA, Van Dyke DL, Caramazza D, Pardani A. Predictors of greater than 80% 2-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients. *Blood*. 2011; 118:4595-4598.
 37. Juliusson G, Robèrt KH, Ost A, Friberg K, Biberfeld P, Nilsson B, Zech L, Gahrton G. Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma. *Blood*. 1985; 65:134-141.
 38. Haferlach C, Dicker F, Weiss T, Schnittger S, Beck C, Grote-Metke A, Oruzio D, Kerm W, Haferlach T. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010; 49:851-859.
 39. Rigolin GM, del Giudice I, Formigaro L, Saccenti E, Martinelli S, Cavallari M, Lista E, Tammiso E, Volta E, Lupini L, Bassi C, Bardi A, Sofritti O, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015; 54:818-826.
 40. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012; 2012: 76-87.
 41. Martinelli S, Cuneo A, Formigaro L, Cavallari M, Lista E, Quaglia FM, Ciccone M, Bardi A, Volta E, Tammiso E, Saccenti E, Sofritti O, Daghia G, et al. Identifying High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia: A Pathogenesis-Oriented Appraisal of Prognostic and Predictive Factors in Patients Treated with Chemotherapy with or without

- Immunotherapy. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2016; 8:e2016047.
42. Burns A, Alsolami R, Becq J, Stamatoopoulos B, Timbs A, Bruce D, Robbe P, Vavoulis D, Clifford R, Cabes M, Dreau H, Taylor J, Knight SJL, et al. Whole-genome sequencing of chronic lymphocytic leukaemia reveals distinct differences in the mutational landscape between IgHVmut and IgHVunmut subgroups. *Leukemia.* 2018; 32:332-342.
 43. Guièze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2015; 126:445-453.
 44. Thomay K, Fedder C, Hofmann W, Kreipe H, Stadler M, Titgemeyer J, Zander I, Schlegelberger B, Göhring G. Telomere shortening, TP53 mutations and deletions in chronic lymphocytic leukemia result in increased chromosomal instability and breakpoint clustering in heterochromatic regions. *Ann Hematol.* 2017; 96:1493-1500.
 45. Lazarian G, Tausch E, Eclache V, Sebaa A, Bianchi V, Letestu R, Collon JF, Lefebvre V, Gardano L, Varin-Blank N, Soussi T, Stilgenbauer S, Cymbalista F, et al. TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes. *Int J Cancer.* 2016; 139:1759-1763.
 46. Roos G, Kröber A, Grabowski P, Kienle D, Bühler A, Döhner H, Rosenquist R, Stilgenbauer S. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008; 111:2246-2252.
 47. Mansouri L, Grabowski P, Degerman S, Svenson U, Gunnarsson R, Cahill N, Smedby KE, Geisler C, Juliusson G, Roos G, Rosenquist R. Short telomere length is associated with NOTCH1/SF3B1/TP53 aberrations and poor outcome in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol.* 2013; 88:647-651.
 48. Steinbrecher D, Jebaraj BMC, Schneider C, Edelmann J, Cymbalista F, Leblond V, Delmer A, Ibach S, Tausch E, Scheffold A, Bloehdorn J, Hallek M, Dreger P, et al. Telomere length in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: associations with disease characteristics and outcome. *Leuk Lymphoma.* 2018; 59:1614-1623.
 49. Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8:450-458.
 50. Brugat T, Nguyen-Khac F, Grelier A, Merle-Béral H, Delic J. Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal aberrations in resistant chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2010; 116:239-249.
 51. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, Kluth S, Bozic I, Lawrence M, Böttcher S, Carter SL, Cibulskis K, Mertens D, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.* 2015; 526:525-530.
 52. Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8:83-93.
 53. Siu KT, Xu Y, Swartz KL, Bhattacharyya M, Gurbuxani S, Hua Y, Minella AC. Chromosome instability underlies hematopoietic stem cell dysfunction and lymphoid neoplasia associated with impaired Fbw7-mediated cyclin E regulation. *Mol Cell Biol.* 2014; 34:3244-3258.
 54. Coste I, Le Corf K, Kfoury A, Hmitou I, Druillenec S, Hainaut P, Eychene A, Lebecque S, Renno T. Dual function of MyD88 in RAS signaling and inflammation, leading to mouse and human cell transformation. *J Clin Invest.* 2010; 120:3663-3667.
 55. Oliveira-Santos W, Rabello DA, Lucena-Araujo AR, de Oliveira FM, Rego EM, Pittella Silva F, Saldanha-Araujo F. Residual expression of SMYD2 and SMYD3 is associated with the acquisition of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol.* 2016; 37:9473-9481.
 56. Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature.* 2006; 444:629-632.
 57. Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, Maejima K, Yamane Y, Suzuki T, Dohmae N, Kogure M, Kang D, Neal DE, Ponder BA, Yamaue H, Nakamura Y, et al. RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia.* 2012; 14:476-486.
 58. Yang G, Mercado-Urbe I, Multani AS, Sen S, Shih IeM, Wong KK, Gershenson DM, Liu J. RAS promotes tumorigenesis through genomic instability induced by imbalanced expression of Aurora-A and BRCA2 in midbody during cytokinesis. *Int J Cancer.* 2013; 133:275-85.
 59. Lucena-Araujo AR, de Oliveira FM, Leite-Cueva SD, dos Santos GA, Falcao RP, Rego EM. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011; 35:260-264.
 60. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, Bauer K, Malchau G, Rabe KG, Stilgenbauer S, Döhner H, Jäger U, Eckart MJ, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014; 124:49-62.
 61. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, Ferrajoli A, Stingo F, Smith SC, Burger JA, Estrov Z, Jain N, Kantarjian HM, Keating MJ. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer.* 2015; 121:3612-3621.
 62. González-Gascón y Marín I, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, Puiggros A, Collado R, Luño E, González T, Ruiz-Xivillé N, Ortega M, Gimeno E, Muñoz C, Infante MS, Delgado J, et al. Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and Grupo Cooperativo

- Español de Citogenética Hematológica (GCECGH). Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018; 59:633-642.
63. Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, Ortega M, Ruiz-Xivillé N, Rivas-Delgado A, Luño E, González T, Navarro B, García-Malo M, Valiente A, Hernández JA, Ardanaz MT, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget*. 2017; 8:54297-54303. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17350>.
64. Gaidano G, Rossi D. The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017; 1:329-337.
65. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, Jares P, Navarro A, Martín-García D, Beà S, Salaverría I, Oldreive C, Aymerich M, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016; 127:2122-2130.
66. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017; 170:1062-1078.
67. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017; 66:801-817.
68. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S, Del Poeta G. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 111:865-873.
69. Geisler CH, Philip P, Hansen MM. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: clonal chromosome abnormalities and prognosis in 89 cases. *Eur J Haematol*. 1989; 43:397-403.
70. Juliusson G, Gahrton G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet*. 1990; 45:143-160.
71. Oscier DG, Stevens J, Hamblin TJ, Pickering RM, Lambert R, Fitchett M. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1990; 76:352-358.
72. Travella A, Ripollés L, Aventin A, Rodríguez A, Bezares RF, Caballín MR, Slavutsky I. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Cytogenetic and FISH analysis*. *Hematol Oncol*. 2013; 31:79-87.
73. Badoux XC, Keating MJ, Wang X, O'Brien SM, Ferrajoli A, Faderl S, Burger J, Koller C, Lerner S, Kantarjian H, Wierda WG. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy is highly effective treatment for relapsed patients with CLL. *Blood*. 2011; 117:3016-3024.
74. Badoux XC, Keating MJ, Wang X, O'Brien SM, Ferrajoli A, Faderl S, Burger J, Koller C, Lerner S, Kantarjian H, Wierda WG. Cyclophosphamide, fludarabine, alemtuzumab, and rituximab as salvage therapy for heavily pretreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 118:2085-2093.
75. Buhmann R, Kurzeder C, Rehkla J, Westhaus D, Bursch S, Hiddemann W, Haferlach T, Hallek M, Schoch C. CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2002; 118:968-975.
76. Foà R, Del Giudice I, Cuneo A, Del Poeta G, Ciolli S, Di Raimondo F, Lauria F, Cencini E, Rigolin GM, Corteleszi A, Nobile F, Callea V, Brugiatielli M, et al. Chlorambucil plus rituximab with or without maintenance rituximab as first-line treatment for elderly chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol*. 2014; 89:480-486.
77. Takahashi K, Hu B, Wang F, Yan Y, Kim E, Vitale C, Patel KP, Strati P, Gumbs C, Little L, Tippen S, Song X, Zhang J, et al. Clinical implications of cancer gene mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with lenalidomide. *Blood*. 2018; 131:1820-1832.
78. Blanco G, Puiggros A, Baliakas P, Athanasiadou A, García-Malo M, Collado R, Xochelli A, Rodríguez-Rivera M, Ortega M, Calasanz MJ, Luño E, Vargas M, Grau J, et al. Karyotypic complexity rather than chromosome 8 abnormalities aggravates the outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 aberrations. *Oncotarget*. 2016; 7:80916-80924. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13106>.
79. O'Brien S, Furman RR, Coutre S, Flinn IW, Burger JA, Blum K, Sharman J, Wierda W, Jones J, Zhao W, Heerema NA, Johnson AJ, Luan Y, et al. Single-Agent Ibrutinib in Treatment-Naïve and Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: A 5-Year Experience. *Blood*. 2018; 131:1910-1919.
80. Jones JA, Robak T, Brown JR, Awan FT, Badoux X, Coutre S, Loscertales J, Taylor K, Vandenberghe E, Wach M, Wagner-Johnston N, Ysebaert L, Dreiling L, et al. Efficacy and safety of idelalisib in combination with ofatumumab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2017; 4:e114-e126.
81. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, Owen C, Gerecitano J, Robak T, De la Serna J, Jaeger U, Cartron G, Montillo M, et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018; 378:1107-1120.
82. Kreuzer KA, Furman R, Stilgenbauer S, Dubowy RL, Kim Y, Munugalavadla V, Lilienweiss E, Reinhardt H, Pettitt A, Hallek M. Outcome of Patients with Complex Karyotype in a Phase 3 Randomized Study of Idelalisib Plus Rituximab for Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2016; 128:192.

83. Anderson MA, Tam C, Lew TE, Juneja S, Juneja M, Westerman D, Wall M, Lade S, Gorelik A, Huang DCS, Seymour JF, Roberts AW. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*. 2017; 129:3362-3370.
84. Jain P, Keating M, Wierda W, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, George B, James D, Kantarjian H, Burger J, O'Brien S. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood*. 2015; 125:2062-2067.
85. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, Xue L, Li DH, Steggerda SM, Versele M, Dave SS, Zhang J, Yilmaz AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014; 370:2286-94.
86. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013; 152:714-726.
87. Hébert J, Jonveaux P, d'Agay MF, Berger R. Cytogenetic studies in patients with Richter's syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994; 73:65-68.
88. Arranz E, Martínez B, Richart A, Echezarreta G, Román A, Rivas C, Benítez J. Increased C-MYC oncogene copy number detected with combined modified comparative genomic hybridization and FISH analysis in a Richter syndrome case with complex karyotype. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998; 106:80-83.
89. Woroniecka R, Rymkiewicz G, Grygalewicz B, Błachnio K, Rygiel J, Jarmuż-Szymczak M, Ratajczak B, Pieńkowska-Grela B. Cytogenetic and flow cytometry evaluation of Richter syndrome reveals MYC, CDKN2A, IGH alterations with loss of CD52, CD62L and increase of CD71 antigen expression as the most frequent recurrent abnormalities. *Am J Clin Pathol*. 2015; 143:25-35.
90. Rogers KA, Huang Y, Ruppert AS, Salem G, Stephens DM, Heerema NA, Andritsos LA, Awan FT, Byrd JC, Flynn JM, Maddocks KJ, Jones JA. A single-institution retrospective cohort study of first-line R-EPOCH chemoimmunotherapy for Richter syndrome demonstrating complex chronic lymphocytic leukaemia karyotype as an adverse prognostic factor. *Br J Haematol*. 2018; 180:259-266.
91. Miller CR, Ruppert AS, Heerema NA, Maddocks KJ, Labanowska J, Breidenbach H, Lozanski G, Zhao W, Gordon AL, Jones JA, Flynn JM, Jaglowski SM, Andritsos LA, et al. Near-tetraploidy is associated with Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia patients receiving ibrutinib. *Blood Adv*. 2017; 1:1584-1588.
92. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Chiorazzi N, Stilgenbauer S, Rai KR, Byrd JC, et al. Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2018; 131:2745-2760.
93. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2018; 391:1524-1537.
94. Ibbotson R, Athanasiadou A, Sutton LA, Davis Z, Gardiner A, Baliakas P, Gunnarsson R, Anagnostopoulos A, Juliusson G, Rosenquist R, Oscier D, Stamatopoulos K. Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. *Leukemia*. 2012; 26:170-172.
95. Baliakas P, Puiggros A, Xochelli A, Sutton LA, Nguyen-Khac F, Gardiner A, Plevova K, Minga E, Hadzidimitriou A, Walewska R, McCarthy H, Ortega M, Collado R, et al. Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. *Haematologica*. 2016; 101:e299-302.
96. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Xochelli A, Delgado J, Kotaskova J, Stalika E, Abrisqueta P, Durechova K, Papaioannou G, Collado R, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations with other biomarkers and clinical impact; a retrospective study on behalf of ERIC. (Abstract release date: May 18, 2017) EHA Learning Center. 2017; 181748.
97. Rigolin GM, Saccenti E, Guardalben E, Cavallari M, Formigaro L, Zagatti B, Visentin A, Mauro FR, Lista E, Bassi C, Lupini L, Quaglia FM, Urso A, et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biologic characteristics. *Br J Haematol*. 2018; 181:229-233.
98. Braggio E, Fonseca R, Kay NE. CGH protocols: chronic lymphocytic leukemia. *Methods Mol Biol*. 2013; 973:87-98.
99. Leeksa A, Baliakas P, Mellink C, Moysiadis T, Puiggros A, Plevova K, van den Berg E, Eldering E, Skaftason A, Mansouri L, Gunnarsson R, Ghia P, Espinet B, et al. Genomic Complexity in Chronic Lymphocytic Leukemia Defined By Array-Based Analysis: Definitions, Associations with Other Biomarkers and Clinical Impact. *Blood*. 2017; 130:4280.
100. Klintman J, Barmpouti K, Knight SJL, Robbe P, Dreau H, Clifford R, Ridout K, Burns A, Timbs A, Bruce D, Antoniou P, Sosinsky A, Becq J, et al. Clinical-grade validation of whole genome sequencing reveals robust detection of low-frequency variants and copy number alterations in CLL. *Br J Haematol*. 2018 May 29. [Epub ahead of print].

Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Table 1: Association between complex karyotype, gene mutations and other biomarkers[^]

Reference	*N. pts	CK	Binet B/C	P	<i>17p-/TP53^{MUT}</i>	P	<i>11q-/ATM^{MUT}</i>	P	<i>FBXW7^{MUT}</i>	P	<i>MYD88^{MUT}</i>	P	<i>U-IGHV</i>	P	<i>CD38+</i>	P
[22]	n=500	n=82 (16.4%)	-	-	23/82 (28%)	<0.0001	-	-	-	-	-	-	36/69 (52.2%)**	0.034	42/68 (61.8%)**	0.02
[23]	n=1001	n=157 (15.7%)	28/112 (22.9%)**	0.05	34/122 (28%)**	<0.001	42/150 (28%)**	<0.001	-	-	-	-	41/81 (50%)**	0.004	-	-
[29]	n= 110	n=38 (34.5%)	-	-	(9/38) 24%	0.02	16/38 (42%)	0.02	-	-	1/38 (2.6%)	∅	34/38 (89%)	0.001	-	-
[24]	n=154	n=30 (19.5%)	-	-	8/30 (26.7%)	0.005	7/30 (23.3%)	∅	5/30 (16.7%)	0.025	-	∅	22/30 (73.3%)	∅	-	-
[26]	n=195	n=28 (14.4%)	-	-	6/28 (21.4%)	0.003	4/28 (14.3%)	0.018	0/28 (0%)	∅	4/28 (14.3%)	0.001	-	-	-	-
[63] [§]	n=1043	n=99 (9.5%)	22/99 (22%)	0.001	40/99 (40.4%)	<0.001	25/99 (25.3%)	<0.001	-	-	-	-	15/21 (71%)**	<0.001	33/99 (33%)	0.007
[28]	n=101	n=21 (20.8%)	7/21 (33.3%)	∅	8/21 (38.1%)	0.021	4/21 (19%)	∅	-	-	-	-	19/21 (90.4%)	∅	14/21 (66.7%)	∅
[27]	n=287	n=41 (14.3%)	13/41 (31.7%)	0.013	7/33 (21.2%)**	0.001	9/41 (21.9%)	0.01	-	-	-	-	17/31 (54.8%)**	∅	25/41 (61%)	0.003

[^] the p values refer to the frequency of each biomarker in the subgroup of patients with CK as compared with patients without CK

* N. of patients assessed by conventional banding analysis

[§] MBL or CLL patients

**data available for a subgroup of patients

∅ = not significant

ALLEGATO 3

In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics

Gian Matteo Rigolin,¹  Elena Saccenti,¹ Emanuele Guardalben,¹ Maurizio Cavallari,¹ Luca Formigaro,¹ Barbara Zagatti,² Andrea Visentin,³ Francesca R. Mauro,⁴  Enrico Lista,¹ Cristian Bassi,² Laura Lupini,² Francesca Maria Quaglia,¹ Antonio Urso,¹ Maria Antonella Bardi,¹ Laura Bonaldi,⁵ Eleonora Volta,¹ Elisa Tammiso,¹ Caterina Ilari,⁴  Luciana Cafforio,⁴ Aurora Melandri,¹ Francesco Cavazzini,¹ Massimo Negrini,² Gianpietro Semenzato,³ Livio Trentin,³ Robin Foà⁴ and Antonio Cuneo¹

¹Haematology Section, Department of Medical Sciences, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Arcispedale S. Anna, University of Ferrara,

²Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine, and "Laboratorio per le Tecnologie delle Terapie Avanzate" (LTTA), University of Ferrara, Ferrara, ³Division of Haematology, Department of Medicine, University of Padua, Padua, ⁴Haematology, Department of Biomedical Sciences and Haematology, "Sapienza" University, Rome, and ⁵Immunology and Molecular Immunology Unit, Istituto Oncologico Veneto IOV-IRCCS, Padua, Italy

Received 23 October 2017; accepted for publication 21 January 2018

Correspondence: Gian Matteo Rigolin, MD, PhD, Haematology Section, Department of Medical Sciences, Azienda Ospedaliero-Universitaria Arcispedale S. Anna, University of Ferrara, Via Aldo Moro, 8, 44124, Cona, Ferrara, Italy.

E-mail: rglgmt@unife.it

Summary

Complex karyotype (CK) is a negative prognostic factor in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). However, CK is a heterogeneous cytogenetic category. Unbalanced rearrangements were present in 73.3% of 90 CLL patients with CK (i.e. ≥ 3 chromosome aberrations in the same clone), and were associated with a shorter overall survival ($P = 0.025$) and a shorter time to first treatment ($P = 0.043$) by multivariate analysis. Patients with unbalanced rearrangements presented a distinct mRNA expression profile. In conclusion, CLL patients with unbalanced rearrangements might represent a subset of very high-risk CLL patients with distinct clinical and biological characteristics.

Keywords: chronic lymphocytic leukaemia, complex karyotype, gene expression profile, overall survival, time to first treatment.

In chronic lymphocytic leukaemia (CLL), a complex karyotype (CK) represents a prognostic biomarker associated with an inferior outcome (Haferlach *et al*, 2007; Baliakas *et al*, 2014; Rigolin *et al*, 2015) and with a worse response to

treatment, including novel agents (Thompson *et al*, 2015; Herling *et al*, 2016; Anderson *et al*, 2017). The negative prognostic impact of a CK has also been shown to be independent of the International Prognostic Index for patients

with CLL (CLL-IPI) (Rigolin *et al*, 2017a) and of high-risk CLL features, including unmutated *IGHV* genes and/or 11q/17p deletions (Rigolin *et al*, 2017b).

CLL patients with CK may present a variety of cytogenetic aberrations, including numerical (i.e. monosomies and trisomies) and structural abnormalities (i.e. balanced and unbalanced translocations, derivative or marker chromosomes, isochromosomes, deletions, insertions and additions). It is unknown whether specific cytogenetic patterns within the CK may correlate with the clinical outcome.

We therefore investigated whether the presence of numerical or structural chromosomal abnormalities could be associated with distinct clinical or biological features in CLL patients with a CK.

Materials and methods

Patients

The study cohort included 90 patients with untreated CLL and a CK, diagnosed between 2000 and 2017. All patients were diagnosed and treated according to National Cancer Institute criteria (Hallek *et al*, 2008). The local ethics committee approved the study.

Cytogenetic analyses

Cytogenetic analysis was performed on PB samples and a karyotype was defined as complex in the presence of at least 3 chromosome aberrations in the same clone, as described by Rigolin *et al* (2017a). The following cytogenetic aberrations, each occurring at least in five patients, were considered: monosomies, trisomies, deletions, balanced translocations, unbalanced rearrangements (including chromosome additions, derivatives, insertions, duplications, ring, dicentric and marker chromosomes) and the presence of ≥ 5 abnormalities.

IGHV status, mutational analyses and gene expression profile (GEP) analysis

IGHV genes were amplified from genomic DNA and sequenced according to standard methods with the cut-off of 98% homology to the germline sequence to discriminate between mutated (<98%) and unmutated ($\geq 98\%$) cases, as previously reported (Rigolin *et al*, 2015). Mutations of *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* and *TP53* genes were analysed by next generation sequencing analysis using Ion Torrent PGM (Life Technologies, Foster City, CA), as described elsewhere (Rigolin *et al*, 2016). Details of GEP analysis are reported in Supplemental Methods (Appendix S1).

Statistical analysis

Fisher's exact test was applied for categorical variables. Time-to-first treatment (TTFT) was calculated as the interval

between diagnosis and the start of first line treatment. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis until death due to any cause or until the last patient follow-up. Proportional hazards regression analysis was used to identify the significant independent prognostic variables on TTFT. The stability of the Cox model was internally validated using bootstrapping procedures (Rigolin *et al*, 2017b). Statistical analysis was performed using Stata 14.0 (Stata Corp., College Station, TX).

Results

Patients and outcome

Patients' characteristics are reported in Table I. The median age of this CLL cohort was 67.4 years (range 40–94) and the median period of follow-up was 51.3 months.

In univariate analysis (Table II), an inferior OS was associated with age >65 years ($P = 0.007$), unbalanced rearrangements ($P = 0.015$) and the presence of 5 or more abnormalities ($P = 0.021$). Multivariate analysis (Table II) confirmed age >65 years ($P = 0.038$) and unbalanced rearrangements ($P = 0.025$; Figure S1A) to have a negative prognostic impact on OS.

A list of the karyotype abnormalities and of their distribution according to the presence of unbalanced rearrangements is presented in Table S1.

The principal clinical and biological characteristics of the patients with and without unbalanced rearrangements are reported in Table I. Patients with unbalanced rearrangements had a lower incidence of 11q deletion ($P = 0.029$) and trisomies ($P = 0.006$) and a higher incidence of *TP53* aberrations ($P = 0.014$), monosomies ($P = 0.004$) and a karyotype with more than 5 abnormalities ($P = 0.003$).

When considering TTFT, in univariate analysis (Table II), an inferior outcome was associated with advanced Binet stage ($P = 0.003$), unmutated *IGHV* ($P = 0.009$) and unbalanced rearrangements ($P = 0.018$; Figure S1B). In multivariate analysis (Table II), advanced stage ($P = 0.001$), unmutated *IGHV* ($P = 0.034$) and unbalanced rearrangements ($P = 0.043$) retained their negative prognostic impact on TTFT.

Gene expression profiling (GEP)

The analysis of mRNA expression profiles of 23 patients with ($n = 11$) and without ($n = 12$) unbalanced rearrangements identified 160 differentially expressed genes ($P < 0.1$, fold change cut-off >2.0). The cases investigated were representative of the entire cohort in terms of age, stage, TTFT and survival. A list of the most up- and down-regulated genes with the corresponding gene functions and deregulated pathways is reported in Table S2. Using this combined set of genes, a clear-cut separation of the analysed samples was evident (Figure S2). A heat-map representation of the average expression of the 30 most differentially expressed genes

Table I. Clinical and biological characteristics of the 90 patients with CK and according to the presence of unbalanced rearrangements.

Variable	Number of patients (%)	Unbalanced rearrangements		P
		Number of patients (%)		
		No	Yes	
Age ≤65/> 65 years	43/47 (47.8/52.2)	13/11 (54.2/45.8)	30/36 (45.5/54.5)	0.485
Gender male/female	58/32 (64.4/35.6)	16/8 (66.7/33.3)	42/24 (63.6/36.4)	1.000
Binet Stage A/B-C	63/27 (70.0/30.0)	19/5 (79.2/20.8)	44/22 (66.7/33.3)	0.306
CD38 negative/positive (cut-off 30%)	46/42 (52.3/47.7)	13/11 (54.2/45.8)	33/31 (51.6/48.4)	1.000
ZAP70 negative/positive (cut-off 30%)	36/24 (60.0/40.0)	11/3 (78.6/21.4)	25/21 (54.4/45.6)	0.130
IGHV mutated/unmutated	21/39 (35.0/65.0)	7/8 (46.7/53.3)	14/31 (31.1/68.9)	0.352
11q deletion yes/no	24/66 (26.7/73.3)	11/13 (54.2/45.8)	13/53 (80.3/19.7)	0.029
TP53 aberration yes/no	28/42 (40.0/60.0)	3/16 (15.8/84.2)	25/26 (49.0/51.0)	0.014
NOTCH1 mutated/wild type	5/41 (10.9/89.1)	2/12 (14.3/85.7)	3/29 (9.4/90.6)	0.633
SF3B1 mutated/wild type	6/31 (16.2/83.8)	2/11 (15.4/84.6)	4/20 (16.7/83.3)	1.000
BIRC3 mutated/wild type	2/35 (5.4/94.6)	1/12 (7.7/92.3)	1/23 (4.2/95.8)	1.000
Monosomies yes/no	42/48 (46.7/53.3)	5/19 (20.8/79.2)	37/29 (56.1/43.9)	0.004
Trisomies yes/no	34/56 (37.8/62.2)	15/9 (62.5/37.5)	19/47 (28.8/71.2)	0.006
Deletions yes/no	68/22 (75.6/24.4)	19/5 (79.2/20.8)	49/17 (74.2/25.8)	0.784
Balanced translocations yes/no	30/60 (33.3/66.7)	12/12 (50.0/50.0)	18/48 (27.3/72.7)	0.075
Unbalanced rearrangements yes/no	66/24 (73.3/26.7)	na	na	na
≥5 abnormalities yes/no	35/55 (38.9/61.1)	3/21 (12.5/87.5)	32/34 (48.5/51.5)	0.003

na, not applicable.

Table II. Univariate and multivariate analysis for overall survival and time to first treatment.

Overall survival	Univariate analysis		Multivariate analysis (n = 90)			
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	Bootstrap	
					HR (95% CI)	P
Age >65 vs. ≤65 years	2.553 (1.291–5.049)	0.007	2.126 (1.043–4.331)	0.038	2.126 (1.133–3.987)	0.019
Binet Stage B-C vs. A	1.243 (0.900–1.717)	0.187	–	–	–	–
IGHV unmutated vs. mutated	1.305 (0.530–3.215)	0.652	–	–	–	–
TP53 aberrations yes vs. no	1.134 (0.533–2.412)	0.744	–	–	–	–
CD38 positive vs. negative	1.847 (0.923–3.696)	0.083	–	–	–	–
ZAP70 positive vs. negative	1.388 (0.658–2.929)	0.390	–	–	–	–
Del11q yes vs. no	1.123 (0.564–2.237)	0.741	–	–	–	–
Unbalanced rearrangements yes vs. no	2.948 (1.237–7.029)	0.015	2.797 (1.135–6.897)	0.025	2.797 (1.159–6.753)	0.022
Deletions yes/no	0.811 (0.363–1.815)	0.612	–	–	–	–
Monosomies yes/no	1.420 (0.742–2.718)	0.290	–	–	–	–
≥5 abnormalities yes/no	2.131 (1.120–4.055)	0.021	0.716 (0.364–1.409)	0.334	0.716 (0.356–1.442)	0.350
Trisomies yes/no	0.717 (0.366–1.406)	0.334	–	–	–	–
Balanced translocations yes/no	0.881 (0.453–1.711)	0.708	–	–	–	–

Time to first treatment	Univariate analysis		Multivariate analysis (n = 60)			
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	Bootstrap	
					HR (95% CI)	P
Age >65 vs. ≤65 years	0.950 (0.579–1.559)	0.841	–	–	–	–
Binet Stage B-C vs. A	1.493 (1.148–1.942)	0.003	1.851 (1.305–2.627)	0.001	1.851 (1.305–2.627)	0.001
IGHV unmutated vs. mutated	2.624 (1.269–5.426)	0.009	2.238 (1.062–4.718)	0.034	1.911 (1.062–4.718)	0.034
TP53 aberrations yes vs. no	1.382 (0.800–2.388)	0.246	–	–	–	–
CD38 positive vs. negative	1.304 (0.789–2.155)	0.300	–	–	–	–
ZAP70 positive vs. negative	1.128 (0.603–2.113)	0.705	–	–	–	–
Del11q yes vs. no	1.156 (0.662–2.020)	0.609	–	–	–	–
Unbalanced rearrangements yes vs. no	2.007 (1.124–3.582)	0.018	2.375 (1.027–5.492)	0.043	2.375 (1.027–5.492)	0.043

HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

between patients with and without unbalanced rearrangements is presented in Figure S3. Among the differentially expressed mRNAs, there were genes involved in the response to DNA damage and cell cycle regulation.

Discussion

A CK is found in 10–15% of CLL (Baliakas *et al*, 2014; Rigolin *et al*, 2015) and has been associated with an inferior outcome when present at diagnosis (Baliakas *et al*, 2014; Rigolin *et al*, 2017a), disease progression (Herling *et al*, 2016) or in relapsed/refractory patients treated with ibrutinib (Thompson *et al*, 2015) or venetoclax (Anderson *et al*, 2017). Interestingly, in high-risk CLL (Rigolin *et al*, 2017b), the prognostic impact of a CK was independent of *TP53* status, while a CK has been associated with a stronger prognostic significance than *TP53* aberrations in relapsed/refractory CLL treated with novel agents (Thompson *et al*, 2015; Anderson *et al*, 2017).

We found that, in CLL patients with CK, unbalanced rearrangements were independently associated with a worse OS and TTFT and that they identified a subset of patients with distinct features, including a lower incidence of 11q deletions and a higher incidence of *TP53* aberrations (17p deletions and/or *TP53* mutations). Moreover, the negative prognostic impact of unbalanced rearrangements was independent of the *TP53* status.

In CLL patients, conventional cytogenetics with novel mitogens represents a robust and valuable tool for a more precise refinement of prognosis. It enables the identification of, not only a CK and prognostically relevant abnormalities undetectable by fluorescence *in situ* hybridisation (Rigolin *et al*, 2015), but also structural and numerical lesions that may predict a worse clinical outcome (Haferlach *et al*, 2007; Rigolin *et al*, 2012; Baliakas *et al*, 2014).

We also found that the presence of unbalanced rearrangements was associated with a distinct mRNA expression profile with a deregulation of genes involved in cell cycle control and DNA damage response. Among these, *TRPM4*, *RASGRF1*, *CTTNBP2* and *SLAMF1* may be of interest as they may have possible prognostic and therapeutic implications. Transient receptor potential channel melastatin 4 (*TRPM4*) is an ion channel that plays a critical role in the control of the membrane potential, leading to the regulation of cell cycle, DNA replication, intracellular signal transduction and inflammatory responses. *TRPM4* has been found up-regulated in diffuse large B-cell lymphomas, where it was associated with a significantly worse outcome (Loo *et al*, 2017). *RASGRF1* is a guanine exchange factor that plays a role in B-cell receptor (BCR) signalling. *RASGRF1* has been found overexpressed in CLL and its activation was blocked by Bruton Tyrosine Kinase inhibitors (Liao *et al*, 2014). Cortactin binding protein 2 (*CTTNBP2*) is an actin binding protein and Lyn substrate that is up-regulated in CLL patients and correlates to a poor prognosis, suggesting that this protein could be relevant in the pathogenesis and

aggressiveness of the disease (Martini *et al*, 2017). Finally, reduced *SLAMF1* levels have been associated with clinical and molecular markers of unfavourable prognosis. *SLAMF1* is involved in several pathways related to cell migration, cytoskeletal organization and intracellular vesicle formation. The loss of *SLAMF1* expression may affect responses to therapeutic agents, such as fludarabine and the BCL2 homology domain 3 mimetic, ABT-737 (Bologna *et al*, 2016).

In conclusion, we have shown that CLL patients with unbalanced rearrangements represent a subset of very high-risk CLL patients with distinct clinical and biological characteristics. These patients need to be identified at the time of treatment and should be considered upfront for alternative treatments, including combinations of novel agents.

Acknowledgements

This work was supported by the Fondo di Ateneo per la Ricerca 2013, 2014, 2016 of the University of Ferrara (G.M.R., A.C.), Programma Ricerca Regione Università 2007–2009, University of Ferrara (G.M.R., A.C.), Programmi di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) 2008 (A.C.), Ricerca Finalizzata Ministero della Sanità (A.C.; project RF-2011-02349712), Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca PRIN 2015 (A.C.; project 2015ZMRFEA), BEAT Leukemia Foundation Milan Italy, and AIL Ferrara. E.V. and E.S. are supported by AIL Ferrara.

Author contributions

G.M.R., M.C., L.T., G.S., R.F. and A.C., conceived and designed the study; G.M.R., M.C., F.M.Q., E.L., A.U., L.F., E.G., A.V. and F.R.M. acquired data and provided patient follow-up; M.A.B., E. T., C.I., L.C., E.V., A.M. and L.B. performed cytogenetic and molecular analyses; E.S., B.Z., C.B., L.L. and M.N. performed GEP studies; G.M.R., M.C., F.C., L.T., R.F. and A.C. analysed and interpreted data; and all of the authors contributed to the writing, approval and review of the manuscript.

Competing interests

The authors have no competing interests.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig S1. OS (in A; $P = 0.015$) and TTFT (in B; $P = 0.018$) in patients with and without unbalanced rearrangements.

Fig S2. Cluster analysis of CLL patients with and without unbalanced rearrangements.

Fig S3. Heat-map representation of the average expression of the 30 most differentially expressed gene between patients with and without unbalanced rearrangements.

Table S1. List of CK according to the presence of unbalanced rearrangements.

Table S2. List of consistently down-modulated and up-

modulated genes identified in CLL samples of patients with and without unbalanced rearrangements

Appendix S1. Materials and methods

References

- Anderson, M.A., Tam, C., Lew, T.E., Juneja, S., Juneja, M., Westerman, D., Wall, M., Lade, S., Gorelik, A., Huang, D.C.S., Seymour, J.F. & Roberts, A.W. (2017) Clinico-pathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*, **129**, 3362–3370.
- Baliakas, P., Iskas, M., Gardiner, A., Davis, Z., Plevoa, K., Nguyen-Khac, F., Malcikova, J., Anagnostopoulos, A., Glide, S., Mould, S., Stepanovska, K., Brejcha, M., Belessi, C., Davi, F., Pospisilova, S., Athanasiadou, A., Stamatopoulos, K. & Oscier, D. (2014) Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American Journal of Hematology*, **89**, 249–255.
- Bologna, C., Buonincontri, R., Serra, S., Vaisitti, T., Audrito, V., Brusa, D., Pagnani, A., Coscia, M., D'Arena, G., Mereu, E., Piva, R., Furman, R.R., Rossi, D., Gaidano, G., Terhorst, C. & Deaglio, S. (2016) SLAMF1 regulation of chemotaxis and autophagy determines CLL patient response. *Journal of Clinical Investigation*, **126**, 181–194.
- Haferlach, C., Dicker, F., Schnittger, S., Kern, W. & Haferlach, T. (2007) Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*, **21**, 2442–2451.
- Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R. & Kipps, T.J.; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, **111**, 5446–5456.
- Herling, C.D., Klauwünzer, M., Rocha, C.K., Altmüller, J., Thiele, H., Bahlo, J., Kluth, S., Crispatzu, G., Herling, M., Schiller, J., Engelke, A., Tausch, E., Döhner, H., Fischer, K., Goede, V., Nürnberg, P., Reinhardt, H.C., Stilgenbauer, S., Hallek, M. & Kreuzer, K.A. (2016) Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*, **128**, 395–404.
- Liao, W., Jordaan, G., Coriaty, N. & Sharma, S. (2014) Amplification of B cell receptor-Erk signaling by Rasgrf-1 overexpression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **55**, 2907–2916.
- Loo, S.K., Ch'ng, E.S., Md Salleh, M.S., Banham, A.H., Pedersen, L.M., Möller, M.B., Green, T.M. & Wong, K.K. (2017) TRPM4 expression is associated with activated B cell subtype and poor survival in diffuse large B cell lymphoma. *Histopathology*, **71**, 98–111.
- Martini, V., Gattazzo, C., Frezzato, F., Trimarco, V., Pizzi, M., Chiodin, G., Severin, F., Scomazon, E., Guzzardo, V., Saraggi, D., Raggi, F., Martinello, L., Facco, M., Visentin, A., Piazza, F., Brunati, A.M., Semenzato, G. & Trentin, L. (2017) Cortactin, a Lyn substrate, is a checkpoint molecule at the intersection of BCR and CXCR4 signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, **178**, 81–93.
- Rigolin, G.M., Cibien, F., Martinelli, S., Formigaro, L., Rizzotto, L., Tammiso, E., Saccenti, E., Bardi, A., Cavazzini, F., Ciccone, M., Nichele, I., Pizzolo, G., Zaja, F., Fanin, R., Galieni, P., Dalsass, A., Mestichelli, F., Testa, N., Negrini, M. & Cuneo, A. (2012) Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*, **119**, 2310–2313.
- Rigolin, G.M., del Giudice, I., Formigaro, L., Saccenti, E., Martinelli, S., Cavallari, M., Lista, E., Tammiso, E., Volta, E., Lupini, L., Bassi, C., Bardi, A., Sofritti, O., Daghia, G., Cavazzini, F., Marinelli, M., Tavoraro, S., Guarini, A., Negrini, M., Foà, R. & Cuneo, A. (2015) Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes and Cancer*, **54**, 818–826.
- Rigolin, G.M., Saccenti, E., Bassi, C., Lupini, L., Quaglia, F.M., Cavallari, M., Martinelli, S., Formigaro, L., Lista, E., Bardi, M.A., Volta, E., Tammiso, E., Melandri, A., Urso, A., Cavazzini, F., Negrini, M. & Cuneo, A. (2016) Extensive next-generation sequencing analysis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis: clinical and biological correlations. *Journal of Hematology and Oncology*, **9**, 88.
- Rigolin, G.M., Cavallari, M., Quaglia, F.M., Formigaro, L., Lista, E., Urso, A., Guardalben, E., Liberatore, C., Faraci, D., Saccenti, E., Bassi, C., Lupini, L., Bardi, M.A., Volta, E., Tammiso, E., Melandri, A., Negrini, M., Cavazzini, F. & Cuneo, A. (2017a) In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood*, **129**, 3495–3498.
- Rigolin, G.M., Formigaro, L., Cavallari, M., Quaglia, F.M., Lista, E., Urso, A., Guardalben, E., Martinelli, S., Saccenti, E., Bassi, C., Lupini, L., Bardi, M.A., Volta, E., Tammiso, E., Melandri, A., Negrini, M., Cavazzini, F. & Cuneo, A. (2017b) An extensive molecular cytogenetic characterization in high-risk chronic lymphocytic leukemia identifies karyotype aberrations and TP53 disruption as predictors of outcome and chemorefractoriness. *Oncotarget*, **8**, 28008–28020.
- Thompson, P.A., O'Brien, S.M., Wierda, W.G., Ferrajoli, A., Stingo, F., Smith, S.C., Burger, J.A., Estrov, Z., Jain, N., Kantarjian, H.M. & Keating, M.J. (2015) Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*, **121**, 3612–3621.

Figure S1

OS (in A; $p=0.015$) and TTFT (in B; $p=0.018$) in patients with and without unbalanced rearrangements.

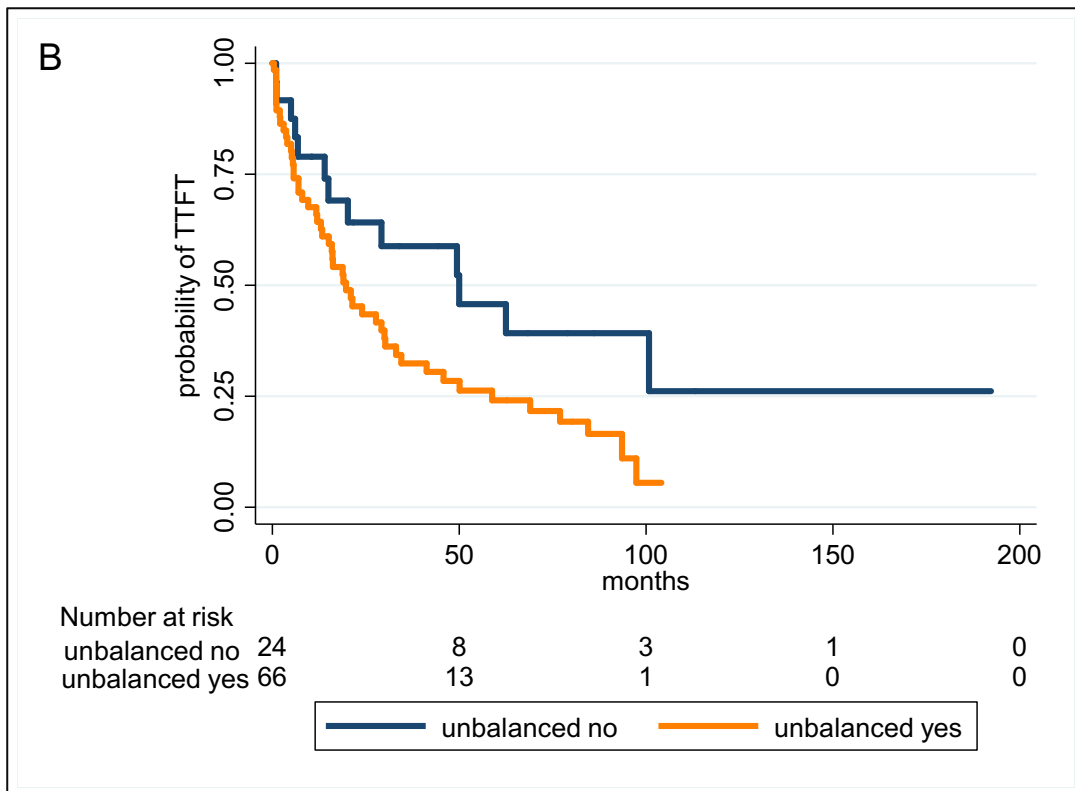
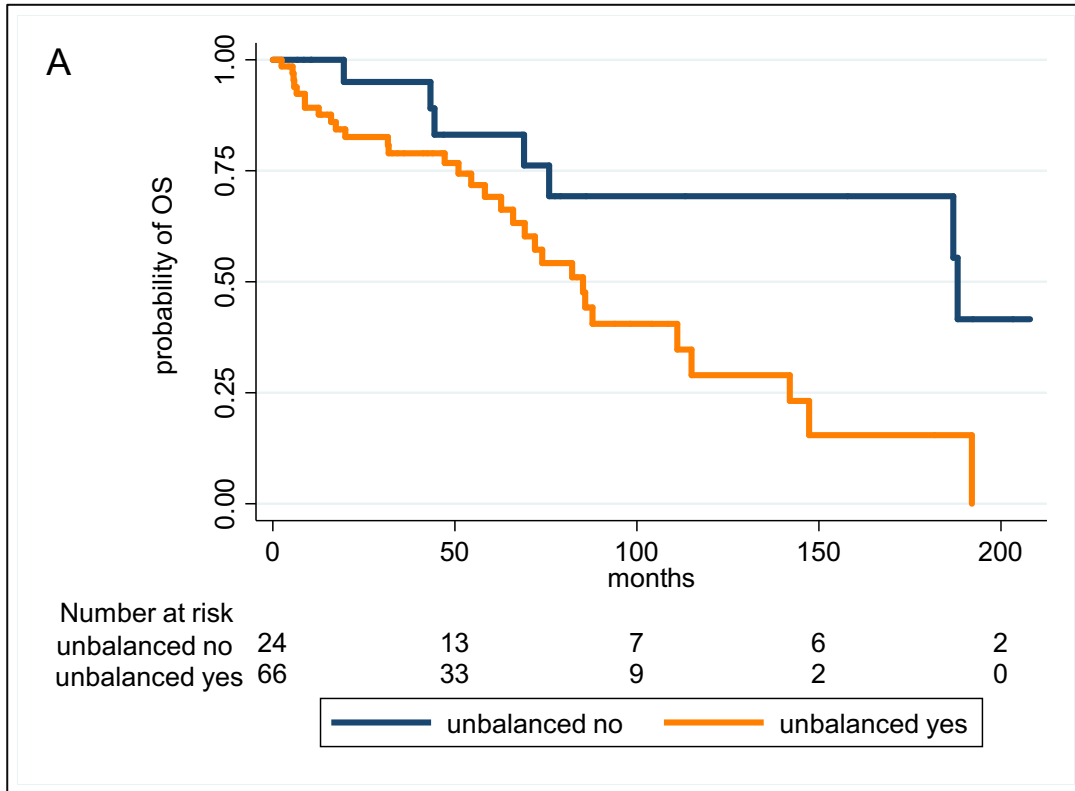


Figure S2. Cluster analysis of CLL patients with and without unbalanced rearrangements performed in accordance to the expression of commonly modulated genes, both annotated (with gene symbol) and not annotated (N/A). Genes are in rows, samples in columns. The colours of the genes represented on the heat map correspond to the values normalized on miRNA average expression across all samples (see colour bar); up-regulated genes are in red, down-regulated in green.

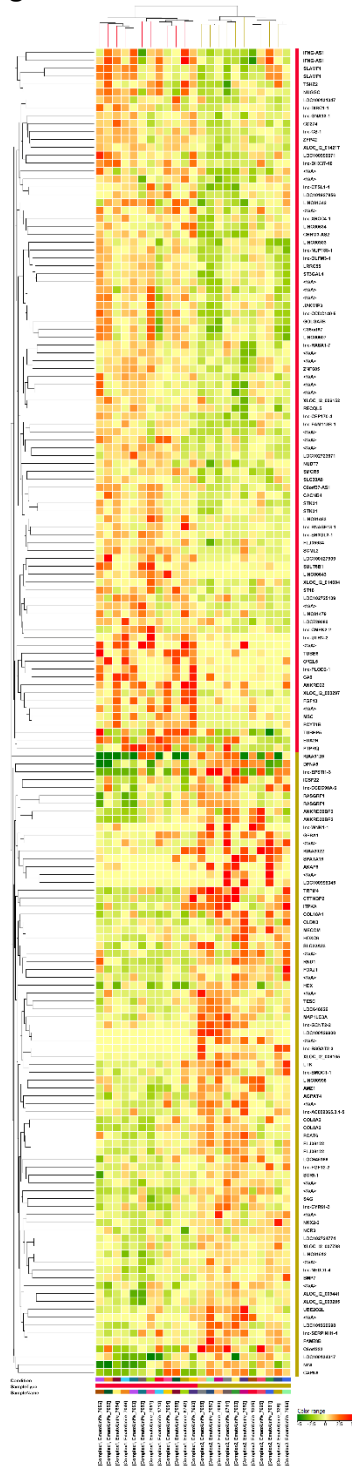


Figure S3

Heat-map representation of the average expression of the 30 most differentially expressed gene between patients with and without unbalanced rearrangements. The colours of the genes represented on the heat map correspond to the expression values normalized on gene mean expression across all samples: green indicates down-regulated; red indicates up-regulated. Legend: Complex1 = without unbalanced rearrangements; Complex2 = with unbalanced rearrangements

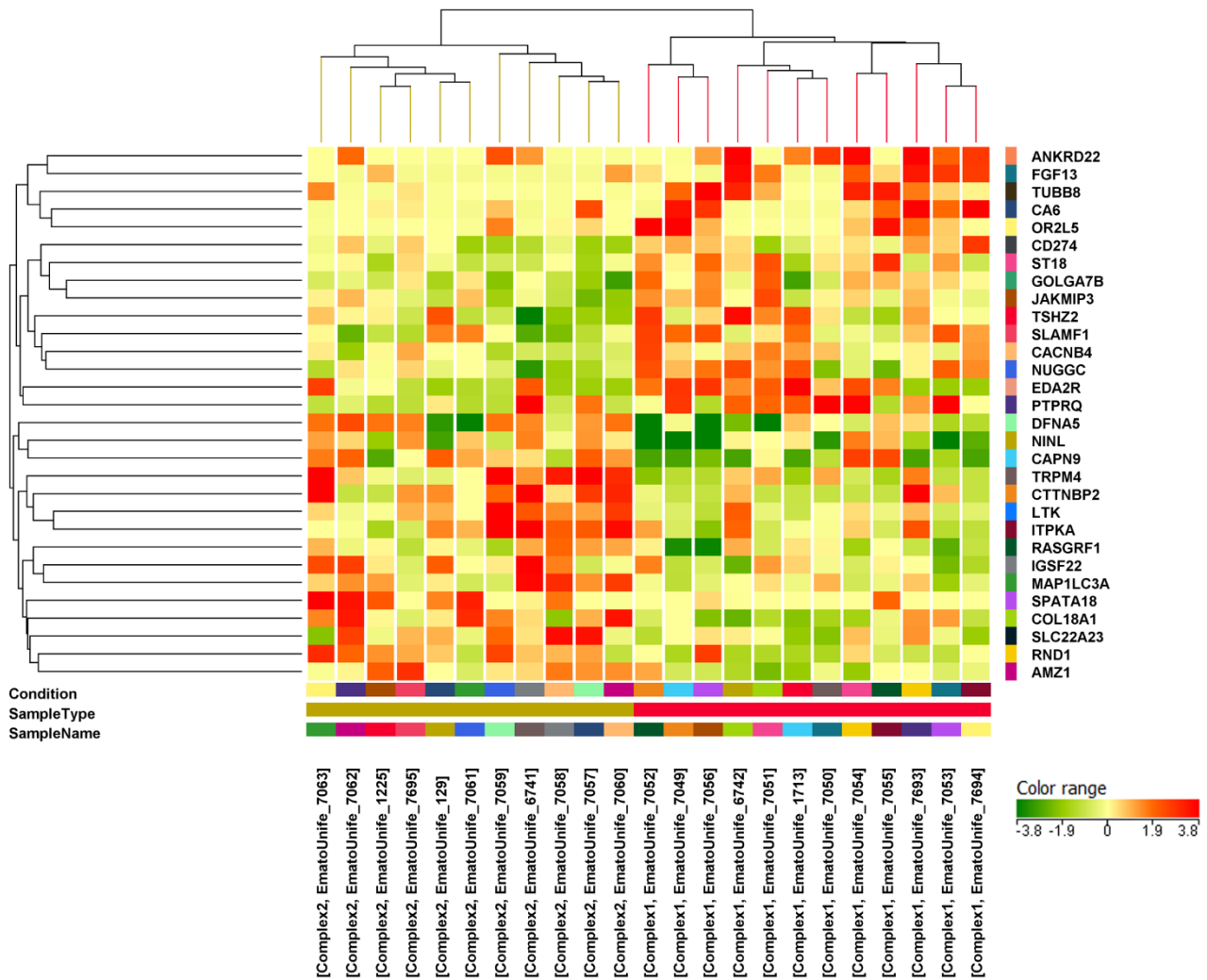


Table SI. List of CK karyotypes according to the presence of unbalanced rearrangements.

UPN	unbalanced rearrangements	Karyotype
1	no	48,XY,del(1)(p32),+del(1)(q11),+12,del(13)(q22),-14,+19[10]/46,XY[12]
2	no	46,XY,i(8)(q19),t(11;14)(q13;q32),del(11)(q14)[8]/46,idem,del(13)(q14)[2]/49,idem,+5,+12,+22[8]/46,XY[2]
3	no	46,XY,del(13)(q12q14)[5]/48,idem,+6,+12[8]/46,XY[7]
4	no	46,XX,t(6;10)(q25q22),del(11)(q13)[5]/46,idem,t(9;13)(q34q14)[4]/46,XX[11]
5	no	46,XY,del(11)(q22q23)[5]/46,idem,del(13)(q12q14)[8]/46,idem,del(13)(q12q14),del(14)(q32)[4]/46,XY[3]
6	no	46,XY,del(13)(q14q22)[2]/46,idem,-20,+22[13]/46,XY[5]
7	no	46,XY,del(11)(q21),t(13;14)(q14;q24)[8]/46,idem,del(13)(q14q22)[5]/46,XY[4]
8	no	46,XY,t(1;13)(p32q14),del(13)(q13q32)[6]/46,idem,del(11)(q14)[11]/46,XY[3]
9	no	46,XY,t(1;1)(p21;q43),del(11)(q21q23),del(13)(q14q22)[14]/46,XY[6]
10	no	49,XY,+12,+18,+19[4]/46,XY[16]
11	no	46,XX,del(6)(q21),del(11)(q13),del(13)(q14q22)[11]/46,XX[9]
12	no	48,XY,+12,+14,t(14;18)(q32;q21)[3]/46,XY[17]
13	no	46,XY,del(13)(q14q22)[3]/49,idem,+12,+18,+19[13]/46,XY[4]
14	no	45,X,-Y[3]/46,idem,+12[7]/47,idem,+12,+19[10]
15	no	46,X,-Y,+3[5]/46,idem,del(13)(q12q14)[9]/46,XY[6]
16	no	46,XX,t(6;15)(p23;q22),del(11)(q21q22),del(13)(q14q22)[8]/46,XX[12]
17	no	48,XX,+2,del(11)(q22),t(13;18)(q21p11),+18[14]/46,XX[6]
18	no	46,XY,del(13)(q14)[3]/46,idem,del(11)(q22)[2]/47,idem,del(11)(q22),+12[2]/46,XY[40]
19	no	49,XX,+12,+18,+19[24]/46,XX[1]
20	no	46,X,-X,t(1;5)(p21;q35),+12,del(21)(q22)[21]/46,XX[4]
21	no	48,XX,+X,+8,inv(11)(p11q22),?del(21)(q22)[20]/46,XX[7]
22	no	46,XY,del(11)(q13)[10]/47,idem,+12[2]/48,idem,+del(2)(p11),del(4)(q25),i(8)(q10),+del(8)(q22),t(11;12)(q25;q13),t(13;16)(q14;q24)[cp3]/46,XY[5]
23	no	46,XY,del(13)(q14q22),t(14;18)(q32q21)[13]/46,idem,del(7)(q22)[3]/46,XY[3]
24	no	46,XX,del(13)(q14q22),del(17)(p12)[6]/46,idem,del(6)(q21)[6]/46,XX[8]
25	yes	50,X,der(Y;13)(p11;p11)del(13)(q12q14),del(3)(p21p25),+12,+del(13)(q12q14),+18,+19,+del(20)(q11)[25]
26	yes	46~47,XX,add(2)(p25),add(2)(q36),add(3)(p26),add(4)(p16),del(11)(q21q23),del(13)(q14q21),add(14)(p13),add(15)(p13),add(18)(p11),+mar[21]/46,XX[1]
27	yes	47~48,XY,del(3)(q21),del(8)(p11),del(9)(q22),+12,del(14)(q22),+del(14)(q13),del(17)(q23),-18,+mar[cp19]/46,XY[1]
28	yes	48,XX,add(1)(p36),del(1)(q25),add(2)(q23),t(2;?14)(p25;?q22),-3,+6,+12,del(13)(q14q22),+14[19]/46,XX[1]
29	yes	45,XX,der(22)t(15;22)(q21;p11)[4]/45,idem,add(8)(p23)[10]/46,XX,del(6)(q22),-7,+10,add(10)(p15),-11,add(12)(q24),+17,+2mar[cp2]/46,XX[4]

30	yes	47,XY,add(1)(p36),der(2)t(2;?)p23;?),del(3)(p21),del(6)(q23),+12,del(13)(q12q14),del(14)(q24),der(17)t(17;?)(q25;?)[16]/46,XY[4]
31	yes	40-47,XY,del(1)(p11),+del(1)(q11),add(2)(p25),+4,-6,+3mar1[cp15]/46,XY[5]
32	yes	46,XY,-2,del(4)(q28),+del(11)(q11),add(16)(q24),add(17)(p13)[4]/46,idem,del(14)(q24q32)[3]/46XY[13]
33	yes	46,XY,-2,del(13)(q12q14),der(14)t(2;14)(?q31;q32),+del(15)(q22),der(18)t(18;?)(q21;?)[19]/46,XY[1]
34	yes	46,XY,del(13)(q14)[2]/45,idem,del(5)(q15),der(7)(p22),add(11)(q25),t(11;14)(q13;q32),-12,add(15)(q26),-22,+mar[4]/46,XY[16]
35	yes	46,XY,del(11)(q21)[8]/46,idem,+add(X)(p22),-4,add(10)(q25),add(17)(p13)[9]/46,XY[3]
36	yes	49,XY,dup(7)(q22q32),-8,-12,+del(13)(q21),del(14)(q31),+del(14)(q21),+15,-18,+add(20?)(p13?)x2,+mar[15]/46,XY[5]
37	yes	43,XY,add(2)(p25),-8,add(11)(p15),der(13)t(13;15)(p13q15),-13,der(14)t(13;14)(q14p13),-15,der(16)t(8;16)(q12p13)[cp19]/46,XY[1]
38	yes	46,XY,del(4)(q22q25)[3]/46,idem,del(3)(p22),add(5)(q35),del(6)(q23),-14,add(15)(q35),del(6)(q23),-14,add(15)(q23),+mar[2]/46,XY[21]
39	yes	43,XX,der(3)t(3;13)(q12;q14),-9,-13,-15,der(18;22)(q10;q10)t(15;22)(q15;q13),+r[12]/ 43,XX,del(8)(q23),-9,?inv(12)(p11q24),del(13)(q12q31),-15,add(17)(q25),-21[6]/46,XX[7]
40	yes	45,X,-Y,add(4)(p15),del(8)(p13),del(10)(p13),del(13)(q22)[cp6]/46,XY[15]
41	yes	46,XY,-7,del(12)(q21q23),der(13)add(13)(p10),del(13)(q14q21),+mar[25]
42	yes	45,XY,-15,der(19)t(15;19)(q15;q13)[15]/45,idem,?del(2)(p23),del(8)(p11),der(11)t(11;11)(p15;q13)[cp7]/46,XY,t(10;13)(q23;q14)[3]
43	yes	45,XY,del(11)(q21q23),add(18)(q23),der(18)t(18;22)(q21;q12),-22[7]/45,idem,t(8;14)(q24;q32)[17]/46,XY[1]
44	yes	46,XY,add(4)(p16),del(13)(q14q22)[17]/46,idem,t(3;6)(p23q15)[2]/46,XY[1]
45	yes	46,XX,del(7)(q33)[5]/46,idem,del(13)(q14q22),der(14)t(14;?)(q32;?)[7]/46,XX[11]
46	yes	47,XY,+12[16]/47,idem,+add(8)(p23),-18[3]/46,XY[1]
47	yes	47,XY,+12[11]/47,idem,t(7;13)(p22;q14)[5]/46,idem,-8,del(13)(q12q14),add(17)(p12)[2]/46,XY[2]
48	yes	39~84,XXX,+add(1)(q44),+del(1)(q11),+2,+3,+5,+6,del(6)(q21)x2,+7,+7,+9,+10,+add(10)(q26),+add(11)(p15)x2,+del(11)(q21)x2,+12,+12,+13,+15, +add(16)(q24)x2,+add(17)(p13),+add(20)(q13),+19,+19,+21,+22,+add(22)(q13)x2[cp15]/46,XX[5]
49	yes	46,XX,del(2)(p11),t(13;14)(q34;q13),der(18)t(2;18)(p11;q21)[3]/46,idem,del(13)(q12q14)[16]/46,XX[8]
50	yes	46,XY,del(8)(q21),der(11)t(11;17)(q11;q11),del(13)(q14),add(16)(p13)[cp19]/46,XY[1]
51	yes	47,XY,del(1)(q21),add(1)(p35),del(7)(q21),+mar[6]/46,XY[14]
52	yes	46,XX,del(13)(q14q22)[3]/46,XX,del(11)(q11)[2]/46,XX,add(4)(p16),del(11)(q11),del(13)(q14q22)[2]/46,XX[13]
53	yes	46,XY,t(14;18)(q32;q21)[5]/46,XY,del(1)(q32),add(9)(q34),-14,+mar[4]/46,XY[12]
54	yes	46,XY,t(2;7)(p23;q32),add(17)(p13)[9]/46,idem,add(1)(q44)[6]/46,idem,add(9)(q34)[4]/46,idem,add(1)(p36)[2]
55	yes	46,XX,del(1)(q23),der(3)t(3;?)(p24;?),der(13)(q34)[10]/46,XX[21]
56	yes	46,XX,add(1)(q32),add(18)(q23),add(19)(q13)[4]/47,XX,add(1)(p22),add(18)(q23)[4]/46,XX[11]
57	yes	46,XY,-18,+mar [8]/46,idem,del(13)(q12q14),del(14)(q24q32)[7]/46,XY[5]
58	yes	46,XX,del(13)(q14q22)[2]/46,idem,add(2)(q36),t(4;?11)(q22;?q21)[15]/46,XX[3]
59	yes	46,XY,del(13)(q12q14)[11]/45,X,-Y,der(11)t(11;?)(q24;?),del(13)(q12q14)[4]/46,XY[5]
60	yes	46,XY,t(1;14)(p35;q32)[6]/46,idem,-20,der(?)t(?)8)(?;?)7]/46,idem,t(10;13)(q24?;q14)[2]/46,XY[4]
61	yes	46,XX,del(11)(q22-23)[21]/46,XX,idem,del(13)(q14)[6]/46,XX,idem,del(17)(p11),der(17)t(13?;17)(q14?;p11)[2]/46,XX[22]
62	yes	46,XX,del(11)(q14q23),der(15)t(8;15)(q21;p11)[46]/46,idem,der(13)t(8;13)(q21;p13)[5]/46,idem,der(22)t(8;22)(q21;p13)[4]

63	yes	45,XX,der(16)t(16;17)(q12;q21),-17,i(21)(q10)[2]/46,del(6)(q21q23)[2]/46,XX[25]
64	yes	46,XY,add(6)(q23),del(13)(q12q21,add(14)(q32)[10]/46,XY[15]
65	yes	46,XY,add(8)(p23),del(11)(q21q24)[6]/46,idem,add(17)(p13)[14]/46,XY[5]
66	yes	46,XY,del(2)(q21q23),del(11)(q21q23),add(17)(p13)[25]
67	yes	46,XX,add(8)(q24),del(13)(q14q33),add(18)(p11),der(18)t(2;18)(p12;p11)[17]/46,XX,t(7;9)(q22;q24),add(8)(p12),del(13)(q14q33)[6]/46,XX[2]
68	yes	44,XY,add(10)(p13),-13,der(16)t(13;16)(q14;q13),-22[7]46,XY,add(4)(p16),?r(5)(p15q13),t(7;13)(q22;q14)[cp3](46,XY[18]
69	yes	42~45,XX,del(1)(p35),der(4)t(4;?11)(p16;?q13),del(7)(q22),add(8)(p23),-9,add(17)(q25),-17,+5mar[cp12][12]/ 43~45,XX,del(1)(p35),t(3;5)(q12;p14),der(4)t(4;?11)(p16;?q13),add(8)(p23),add(9)(p24),-14,-17,+dic(19;22)(p13),+2mar[cp7][7]/ 46,XX[1]45,XX,del(1)(p35),t(3;5)(q12;p14),der(4)t(4;?11)(p16;?q13),add(8)(p23),add(9)(p24),-14,-17,+dic(19;22)(p13),+mar,+mar1 [cp7] [7]/46,XX [1]
70	yes	45,XY,add(12)(q24),del(13)(q14q32),-16,add(17)(p11),add(18)(p11),-21[15]
71	yes	46,XY,-5,del(6)(q11),-8,der(10)t(10;?21)(q22;?q21),del(11)(q11),del(13)(q14),del(14)(q24),+der(14)t(5;14)(q21;q32),add(17)(p11),-21[13]/46,XY[5]
72	yes	44~45,XX,add(1)(p34),del(2)(p21),add(3)(p25),t(4;10)(q13;q25),-6,-8,del(11)(q23),+12,del(13)(q14),add(14)(q32),-17,-18,+22[18]/46,XX[2]
73	yes	42,X,dic(Y;13)(q12;p13),-4,add(5)(q35),-7, add(11)(q24),der(11)t(?4;11)(q?24;q21),-13,add(16)(q24),add(17)(p13)[19]/46,XY[2]
74	yes	47,XY,t(4;17)(q11;p13),t(5;15)(p15;q15),del(7)(q21),add(7)(q21),add(8)(p23),add(9)(p24),add(10)(p15),del(11)(q21q22)[19]/46,XY[2]
75	yes	45~48,XY,add(1)(p33),-3,-5,del(6)(q16),add(9)(q24),+add(11)(q25),del(13)(q14),add(14)(q32),-17[cp11]/45,XY,del(1)(p32p35),- 5,del(6)(q16),+add(11)(q25), add(12)(p13),del(13)(q14),add(14)(q32)-17[4]/46,XY[2]
76	yes	46,XX,der(6)t(6;15)(p25;q15),del(6)(q21q23),der(7)add(7)(q22),dic(11;20)(p15;q13),der(17)add(17)(p11),del(15)(q14)[11]/46,XX[1]
77	yes	44~45,XY,add(1)(q21),-5,-8,der(10)t(5;10;11)(q13;q21;p15),+11,t(11;14)(q13;q32),-12,der(17)t(8;17)(q12;p12),+mar[19]/46,XY[7]
78	yes	74~80,XXY,+Y,+1,+4,del(5)(q22q31),+7,+9,+12,+15,+16,del(17)(p11),+del(17)(p11),+21,+mar[cp7]/46,XY[18]
79	yes	42~44,XY,t(4;9)(q21;p23),-5,-9,del(10)(q24),add(11)(p15),-13,der(17)t(13;17)(q21;p12),+mar[6]/ 42~44,XY,-3-9,der(14)t(3;14)(q13;q32),der(16)t(13;16)(q21;q12),der(17)t(13;17)(q21;q12),-18,+22[6]/46,XY[20]
80	yes	45,XX,-6,del(13)(q12q14),del(14)(q32),der(17)t(6;17)(p23;p12)[8]/46,XX[12]
81	yes	46,XX,del(13)(q12q22)[8]/45,idem,add(10)(q24),-17[4]/46,XX[21]
82	yes	47,XY,der(4)t(4;15)(q12;q11),+12,-15,der(17)t(15;17)(q12;p11)[7]46,XY[6]
83	yes	45,XY,-13,add(17)(p12),add(18)(p11.2)[3]/45,XY,-14,add(17)(p12),add(18)(p11.2)[3]45,XY,- 15,add(17)(p12),add(10)(p11.2)[3]/46,XY,add(18)(p11.2)[48]/46,XY[9]
84	yes	42~45,XX,der(6)t(1;6)(q11;p25),add(7)(p22),der(16)t(15;16)(q15;p13),der(17;21)(q10;q10)[cp7]/43~44,XX,add(7)(p22),der(13;13)(q10;q10),der(17;21) (q10;q10),-21,+mar[cp5]/ 45~44,XX,add(5)(q35),add(7)(p22),der(17;21)(q10;q10)[cp3]/46,XX[6]
85	yes	45,XY,del(6)(q21q25),-9,del(12)(p12),add(17)(p11)[cp5]/46,XY[22]
86	yes	46,XY,add(7)(q32),t(10;10)(p11;p15),r(17)[13]/45,XY,der(9;17)(q12;p11)t(9;17)(q12;q25)[5]/46,XY,t(2;7)(q11;q32),r(17)[3]/ 46,XY,del(11)(q21q24)[2]/46,XY[2]
87	yes	45,XY,del(8)(q22),del(9)(q21),r(11)(p15q25),add(16)(p13)[9]/XY[11]
88	yes	46,XX,del(6)(q21q24),der(12)t(1;12)(p31;q24)[17]/46,XX,t(1;17)(p31;p22),add(2)(q37)[3]/46,X,add(X)(p22),t(1;7)(p31;p22),add(2)(q37),t(13;20)(q14;q 13)[4]/46,XX,t(1;7)(p31;p22),add(2)(q37),add(17)(p13)[2]
89	yes	46,XX,+12,der(12;17)(p10;q10)[5]/46,idem,add(19)(p13)[4]/46,XX[16]
90	yes	44,XY,der(4;17)(q10;q10),-6,der(12)t(6;12)(q12;q24)ins(12;?)(q24;?),del(13)(q14q21)[25]

Table SII. List of consistently down-modulated and up-modulated genes identified in CLL samples of patients with and without unbalanced rearrangements

GeneSymbol	Regulation ([Complex2] Vs [Complex1])	FC (abs) ([Complex2] Vs [Complex1])	Genbank Accession	Function	Process
PTPRQ	down	3,5648906	NM_001145026	Protein tyrosine phosphatase activity	Cell differentiation
EDA2R	down	3,306513	NM_001242310	Protein binding	Cell differentiation
SLAMF1	down	3,176605	NM_003037	Antigen binding	Immune response
TUBB8	down	3,0114088	NM_177987	GTP binding	Oocyte maturation
TSHZ2	down	2,9903665	NM_173485	DNA binding	Transcription
NUGGC	down	2,9847124	NM_001010906	GTP binding	Apoptosis
ANKRD22	down	2,7856324	NM_144590	Unknown	Unknown
GOLGA7B	down	2,6016355	NM_001010917	S-palmitoyltransferase activity	Protein targeting to membrane
FGF13	down	2,4722815	NM_004114	Protein binding	Cell-cell signalling
CA6	down	2,3647296	NM_001215	Zinc ion binding	Bicarbonate transport
ST18	down	2,3172858	NM_014682	Transcription factor activity	Cell proliferation
CD274	down	2,2295437	NM_014143	Protein binding	Immune response
OR2L5	down	2,1974697	NM_001258284	G-protein coupled receptor activity	Receptor signaling pathway
CACNB4	down	2,1795611	NM_001005747	Protein binding	Transport
JAKMIP3	down	2,1540303	NM_001105521	Kinase binding	Unknown
SULT6B1	down	2,0933867	NM_001032377	Aryl sulfotransferase activity	Metabolic process
STK31	down	2,092416	NM_032944	ATP binding	Protein phosphorylation
SLC39A8	down	2,0737295	NM_001135147	Zinc ion transmembrane transporter activity	Cellular zinc ion homeostasis
NUDT7	down	2,0587697	NM_001243657	Receptor binding	Metabolic process
LRR55	down	2,0510733	NM_001005210	Ion channel binding	Axonogenesis
PCYT1B	down	2,0487828	NM_004845	Choline-phosphate cytidylyltransferase activity	CDP-choline pathway
MSC	down	2,03104	NM_005098	Transcription corepressor activity	Transcription
SCML2	down	2,0165281	NM_006089	DNA binding	Transcription

TRPM4	up	6,7604585	NM_017636	ATP binding	Immune response
CAPN9	up	4,2220817	NM_006615	Calcium ion binding	Proteolysis
DFNA5	up	4,21781	NM_004403	Unknown	Unknown
COL18A1	up	4,0324183	NM_030582	Metal ion binding	Cell adhesion
NINL	up	3,9305727	NM_025176	Calcium ion binding	Cell cycle
CTTNBP2	up	3,6934845	NM_033427	Protein binding	Cell development
ITPKA	up	3,404099	NM_002220	ATP binding	Signal transduction
AMZ1	up	3,1241086	NM_133463	Zinc ion binding	Proteolysis
RND1	up	3,0805445	NM_014470	GTP binding	Signal transduction
SPATA18	up	2,8862832	NM_145263	Protein binding	Cell response to DNA damage
IGSF22	up	2,8180676	NM_173588	Actin filament binding	Actin filament organization
SLC22A23	up	2,6819832	NM_015482	Protein binding	Transmembrane transport
LTK	up	2,656249	NM_002344	ATP binding	Cell proliferation
MAP1LC3A	up	2,601866	NM_032514	Protein binding	Autophagosome assembly
RASGRF1	up	2,4888139	NM_002891	Guanyl-nucleotide exchange factor activity	signal transduction
SAG	up	2,4798243	NM_000541	Protein binding	Receptor signaling pathway
FOXJ1	up	2,3888195	NM_001454	DNA binding	Cell developmnet
COL8A2	up	2,3699336	NM_005202	Protein binding	Cell adhesion
MECOM	up	2,3657596	NM_004991	DNA binding	Apoptosis
AKAP6	up	2,3626182	NM_004274	Ion channel binding	signal transduction
CLDN3	up	2,2702425	NM_001306	Transmembrane signaling receptor activity	signal transduction
BMP7	up	2,2543273	NM_001719	BMP receptor binding	BMP signaling pathway
UBE2Q2L	up	2,249633	NM_001243531	Unknown	Unknown
HOXC6	up	2,1812747	NM_004503	Transcription activity	Cell developmnet
GFRA1	up	2,1431048	NM_005264	Receptor binding	Cell surface receptor signaling pathway
NKX2-2	up	2,090844	NM_002509	Chromatin binding	Cell developmnet
NCR3	up	2,0313516	NM_147130	Cell adhesion molecule binding	Immune response
TESC	up	2,0234954	NM_017899	Calcium ion binding	Cell proliferation
AGPAT4	up	2,0194757	NM_020133	Protein binding	Metabolic process
SCRN1	up	2,0113916	NM_001145513	Protein binding	Exocytosis

In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biologic characteristics

Rigolin GM¹, Saccenti E¹, Guardalben E¹, Cavallari M¹, Formigaro L¹, Zagatti B², Visentin A³, Mauro FR⁴, Lista E¹, Bassi C², Lupini L², Quaglia FM¹, Urso A¹, Bardi MA¹, Bonaldi L⁵, Volta E¹, Tammiso E¹, Ilari C⁴, Cafforio L⁴, Melandri A¹, Cavazzini F¹, Negrini M², Semenzato G³, Trentin L³, Foà R⁴, Cuneo A¹

Materials and Methods

Gene expression profile (GEP) analysis.

RNA was hybridized on Agilent whole human genome oligo microarray (#G4112F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). This microarray consists of 60-mer DNA probes which have been synthesized in situ and represent 41,000 unique human transcripts. One-color gene expression was performed according to the manufacturer's procedure. Labelled cRNA was synthesized from 500 ng of total RNA using the Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent Technologies) in the presence of cyanine 3-CTP (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA). Hybridizations were performed at 65 °C for 17 h in a rotating oven. Images at 5 µm resolution were generated by the Agilent scanner and the Feature Extraction 10.5 software (Agilent Technologies) was used to obtain the microarray raw data. Microarray raw data were analysed using the GeneSpring GX 10 software (Agilent Technologies). Data transformation was applied to set all the negative raw values at 1.0, followed by normalization at the 75th percentile. Samples were then grouped according to their differentiation status and compared. Differentially expressed genes were selected as having a 2.0-fold expression difference between their geometrical mean in two or more groups of interest, and a statistically significant P-value (<0.05) according to ANOVA (analysis of variance) and Benjamini and Hochberg correction for reduction of false-positive values

(Benjamini & Hochberg, 1995). Differentially expressed genes were employed for sample cluster analysis by use of the Pearson correlation as a measure of similarity.

Reference

Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach o multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*, 57, 289-300.

ALLEGATO 4



ARTICLE

Molecular Diagnostics

The combination of complex karyotype subtypes and IGHV mutational status identifies new prognostic and predictive groups in chronic lymphocytic leukaemia

Andrea Visentin^{1,2}, Laura Bonaldi³, Gian Matteo Rigolin⁴, Francesca Romana Mauro⁵, Annalisa Martines³, Federica Frezzato^{1,2}, Silvia Imbergamo^{1,2}, Edoardo Scmazzon^{1,2}, Stefano Pravato^{1,2}, Maria Antonella Bardi⁴, Maurizio Cavallari⁴, Eleonora Volta⁴, Francesco Cavazzini⁴, Maurizio Nanni⁵, Ilaria Del Giudice⁵, Monica Facco^{1,2}, Anna Guarini⁵, Gianpietro Semenzato^{1,2}, Robin Foà⁵, Antonio Cuneo⁴ and Livio Trentin^{1,2}

BACKGROUND: Complex karyotype (CK) is a heterogeneous category with a negative impact in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). Our group has recently reported that CK patients with major structural abnormalities (i.e. CK2) are characterised by a worse prognosis, as compared to other lesions within CK(CK1).

METHODS: We performed a multicentre retrospective study to test whether the combination of CK subtypes with *IGHV* status could be a relevant prognostic and predictive tool.

RESULTS: Among 522 patients 13% harboured CK2, 41% CK1 and/or U-IGHV (U-CK1) and 46% M-IGHV without any CK subtypes (M-noCK). After a median follow-up of 5.8 years, CK2 patients had the shortest TTFT (5-year TTFT 31%, 39 and 81%, $p < 0.0001$) and OS (5-year OS 67%, 85 and 93%, $p < 0.0001$) as compared to U-CK1 or M-noCK cases, regardless of TP53 abnormalities. CK2 patients also had the worst outcome after chemoimmunotherapy. In fact, the median TTNT after FCR or BR was 1.86 and 4.79 years for CK2 and U-CK1, but not reached for M-noCK patients ($p < 0.0005$).

CONCLUSIONS: We herein suggest that the combined assessment of the *IGHV* mutational status and CK subtypes refines the prognostication of CLL, allowing to identify M-IGHV patients without any CK subtypes who are characterised by an indolent disease and excellent outcome after chemoimmunotherapy.

British Journal of Cancer (2019) 121:150–156; <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0502-x>

BACKGROUND

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL), the most common leukaemia in western countries, is a remarkably heterogeneous disease, with some patients never requiring treatment and others with a highly aggressive and/or rapidly progressive clinical course.^{1,2} The three most important CLL prognostic factors, variables capable of defining subjects at a higher risk of progression or death, and predictive genetic markers, which identify subjects who will relapsed earlier after treatments, are represented by leukemic cell cytogenetic assessed by fluorescence in situ hybridisation (FISH), *TP53* abnormalities, including mutations and deletions, and the mutational status of the variable region of the immunoglobulin heavy chain (*IGHV*) genes.³

Recent studies have shown that current FISH analysis, according to Dohner's hierarchical model, underestimates the true genetic complexity revealed by chromosome banding analysis. In fact, 22–36% of CLL cases with "normal" FISH carry chromosomal aberration at karyotype. In particular, complex karyotype (CK), defined by the presence of at least three chromosome lesions in the same clone, is detectable in 14–34% of CLL cases^{4–7} and is emerging

as a new negative prognostic biomarker associated with an adverse outcome^{4,8} and worse response to chemoimmunotherapy^{5,9} as well as to novel agents,^{10,11} regardless of the CLL-IPI score, unmutated *IGHV* genes and 11q/17p deletions.⁶ However, the CK itself is a heterogeneous quantitative and qualitative cytogenetic category that includes numerical (i.e. monosomies and trisomies) and structural abnormalities (i.e. balanced and unbalanced translocations, marker chromosomes, isochromosomes, deletions, insertions and additions). Rigolin et al. recently demonstrated that among 90 CK cases the presence of major structural abnormalities at CLL diagnosis identifies a subset of patients with a poor outcome and distinct mRNA expression profile.¹² However, it is unknown whether the prognostic strength of CK could be improved when combined with a stable marker such as the *IGHV* mutational status, and whether this approach could help to identify patients who can gain the maximum benefit from chemoimmunotherapy.

In this multicentre retrospective study, we demonstrated that in 522 CLL patients the combination of CK subtypes and *IGHV* status provides relevant prognostic data, allowing to refine the prognostic stratification of CLL patients, and to identify M-IGHV patients

¹Hematology and Clinical Immunology Unit, Department of Medicine, University of Padua, Padua, Italy; ²Venetian Institute of Molecular Medicine, Padua, Italy; ³Immunology and Molecular Oncology Unit, Veneto Institute of Oncology IOV-IRCCS, Padua, Italy; ⁴Hematology section, Department of Medical Sciences, Azienda Ospedaliera-Universitaria, Arcispedale S. Anna, University of Ferrara, Ferrara, Italy and ⁵Hematology division, Department of Translational and Precision Medicine, "Sapienza" University, Rome, Italy
Correspondence: Livio Trentin (livio.trentin@unipd.it)

Received: 27 March 2019 Revised: 15 May 2019 Accepted: 22 May 2019
Published online: 18 June 2019

without any CK subtypes who are characterised by an indolent disease and excellent outcome after chemoimmunotherapy.

METHODS

Study design

Inclusion criteria for this study were diagnosis of CLL according to the 2008 iwCLL criteria,¹³ age >18 years and chromosome banding analysis performed within 1 year from diagnosis. Data included in the comparative analysis were gender, age, Binet stage,¹³ need for chemotherapy, CD38 expression (performed as previously reported² with a cut-off value of 30%), cytogenetics detected by fluorescence in situ hybridisation (FISH),¹⁴ IGHV mutational analysis¹⁵ and TP53 abnormalities including gene deletions or mutations.¹⁶ The primary endpoint was the impact of the combination of CK subtypes with IGHV status on the overall survival (OS) of patients. The correlation with clinico-biological variables and its impact on time to first treatment (TTFT) and relapse after chemoimmunotherapy were considered as secondary endpoints. This study was approved by the local research ethics committee and informed consent was obtained from all patients.

Chromosome banding analysis

Cytogenetic analysis was performed on peripheral blood after a 72 h exposure of 500 µM CpG ODN DSP30 (Roche, Risch, CH) mitogen + 20 U/mL IL2 (Roche). Cultures were exposed overnight to 0.1 µg/mL colcemid (Gibco® Karyomax Colcemid, ThermoFisher, Waltham, MA USA) to obtain metaphases and then they were harvested following standard procedures. Karyotype was described after the analysis of at least 25 G-banded metaphases using the IKAROS software (Metasystems, Altlusheim, Germany), according to International guidelines (ISCN 2016). Complex karyotype (CK) was defined by the presence of three or more chromosome abnormalities in the same clone.^{4,6,17,18} Moreover, based on the type of chromosome changes among CK, we termed Type-2 CK (CK2) those cases with major structural rearrangements (i.e. unbalanced translocations, chromosomes addition, insertion, duplications, ring, dicentric and marker chromosomes).¹² Whereas, complex karyotypes with balanced translocations, deletions, monosomies or trisomies were called as type 1 (CK1).¹²

IGHV mutational status

Analysis of the IGHV mutational status was performed within 12 months from diagnosis on peripheral blood CLL cells from fresh samples or frozen purified CLL cells harvested in DMSO. RNA was extracted from 2×10^6 B cells using the RNeasy™ Total RNA kit (Qiagen, Hilgen, Germany) and reverse transcribed using the SuperScript™ Preamplification System for first-strand cDNA synthesis (Life Technologies, Carlsbad, CA). The CLL B-cell HV gene family was assigned as previously described.^{19,20} HV gene sequences were determined by amplifying 5 µl of the original cDNA using the appropriate HV leader and HC primers. PCR products were sequenced directly after purification with Wizard PCR Preps (Promega, Madison, WI) using an automated genetic analyser (3130 ABI Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were analysed using the IMG/QUEST and BLAST softwares²¹ to detect VDJ junction. Sequences homology <98, from the corresponding germline gene, were considered mutated (M-IGHV), as opposite to unmutated (U-IGHV) cases.^{19,22}

Cytogenetic by fluorescence in situ hybridisation (FISH) and TP53 mutations

FISH was performed on standard cytogenetic preparations from peripheral blood.²⁰ The slides were hybridised with the multi-colour probe sets LSI p53/LSI ATM and LSI D13S319/LSI 13q34/CEP12 (Vysis-Abbott, Des Plaines, IL, USA), according to the manufacturer's protocol.²³ Three hundred interphase nuclei were

analysed for each probe and the cut-off for positive values were 10% for deletion of 11q22.3 (ATM), 13q14.3 (D13S319) and 17p13.1 (TP53) loci and 5% for trisomy 12. High-risk FISH refers to 11q- or 17p-. As opposite, Low-risk FISH included 13q14 deletion or normal FISH. Patients harbouring trisomy 12 were considered at intermediate risk. TP53 gene sequencing between and analysis were performed according to ERIC guidelines.¹⁶

Treatment

Patients were treated accordingly to the 2008 iwCLL guidelines.¹³ Fludarabine or bendamustine-based regimens, with or without rituximab were used as first-line treatment in fit patients; chlorambucil with or without antiCD20 monoclonal antibody was used in elderly and/or unfit patients. FCR (fludarabine, cyclophosphamide and rituximab)²⁴ and BR were administered at standard doses.²⁵ Since January 2015 patients with TP53 abnormalities were treated with BCR inhibitors, ibrutinib or idelalisib plus rituximab.

Statistical analysis

Categorical variables were compared by Chi-square test (for Binet stages and FISH) or Fisher exact's test (gender, treatment, CD38, TP53 and IGHV), when appropriate. Continuous variables (median age) were compared with Mann-Whitney test. TTFT was calculated starting from the date of diagnosis to treatment (event) or last known follow-up (censored).¹³ Time to next treatment (TTNT) was calculated as months from first-line FCR or BR to subsequent therapy or last known follow-up. OS were calculated starting from the date of diagnosis to death for any cause, or last known follow-up. Survival analyses were performed by the Kaplan-Meier method and the Log-rank test was used to compare survival curves between groups. Cox regression model was employed to estimate hazard ratios (HR). The cox proportional hazard assumption was assessed based on the scaled Schoenfeld residuals. The stability of our model was internally validated by bootstrap .632 method with B = 522. The Harrell concordance index (c-index; 1.0 indicates perfect discrimination while a value 0.5 indicates equivalence to chance) was used to compare our prognostic model with Dohner's,²³ FISH-IGHV and CLL-IPI models.²⁶ The prediction error was calculated as 1 - c-index, corrected for optimism and estimated by .632 bootstrap method. A p value >0.05 was considered as not significant. Statistical analysis was performed with R (an open source statistical package downloadable from <http://www.r-project.org>).

RESULTS

Patients' characteristics

We gathered data from 522 CLL patients with chromosome banding analysis and IGHV status assessed within 12 months from diagnosis (Table 1). The median age at diagnosis of the whole population was 65 years, 61% were males, 76% at Binet A stage, the median β2-microglobulin was 3.27 mg/L, 47% U-IGHV, 9% patients harboured TP53 abnormalities and 19% a CK. Two hundred and thirty-two patients received at least one line of therapy (31% FCR, 16% BR, 8% ibrutinib, 5% chlorambucil-antiCD20, 40% other treatments such as FC or chlorambucil alone, etc.) and 80 died over a median follow-up of 5.8 years. According to the subtype of CK, 30 (30%) showed a CK1 and 69 (70%) a CK2. In this latter group 35% were M-IGHV and 65% were non-mutated conformation of IGHV gene (Table 1).

As a preliminary step for our further analysis, we confirmed the established prognostic role of U-IGHV, CK and CK with major unbalanced abnormalities (i.e. CK2) in our dataset (Fig. S1A-F). The 10-year OS was 60% in U-IGHV and 89% M-IGHV group ($p < 0.0001$, Fig. S1D); 58% for CK and 79% for no-CK patients, respectively ($p < 0.0001$, Fig. S1E); 49% vs 66% vs 79% for CK2, CK1 and no-CK ($p < 0.0001$, Fig. S1F), respectively. Due to the superimposable

Table 1. Clinical and biological features of patients

	Population (n = 522)	M-noCK (n = 240)	U-CK1 (n = 213)	CK2 (n = 69)	p values
Gender					
Female	203 (39%)	88 (37%)	87 (41%)	28 (41%)	0.6298
Male	319 (61%)	152 (63%)	126 (59%)	41 (59%)	
Age (years)					
Median ± sd	65 ± 10	59 ± 11	65 ± 12	70 ± 10	0.0053
Binet stage					
A	396 (76%)	164 (69%)	189 (89%)	43 (62%)	<0.0001
B	91 (17%)	66 (27%)	8 (4%)	17 (25%)	
C	35 (7%)	10 (4%)	16 (7%)	9 (13%)	
β2-microglobulin (mg/L)					
Median ± sd	2.92 ± 1.53	2.47 ± 1.55	3.17 ± 1.34	3.27 ± 1.78	<0.0001
CD38 ^a					
<30%	388 (74%)	207 (88%)	140 (67%)	41 (62%)	<0.0001
≥30%	121 (23%)	27 (12%)	69 (33%)	25 (38%)	
IGHV status					
M-IGHV	279 (53%)	240 (100%)	15 (7%)	24 (35%)	n.a.
U-IGHV	243 (47%)	0 (0%)	198 (93%)	45 (65%)	
FISH ^a					
Normal	153 (29%)	86 (38%)	59 (28%)	8 (12%)	<0.0001
13q	196 (38%)	122 (54%)	56 (27%)	18 (26%)	
+12	76 (15%)	17 (8%)	52 (25%)	7 (10%)	
11q	50 (10%)	4 (2%)	33 (16%)	13 (19%)	
17p	36 (7%)	3 (1%)	10 (5%)	23 (33%)	
TP53 ^a					
Normal	469 (90%)	229 (97%)	197 (92%)	43 (62%)	<0.0001
Abnormal	48 (9%)	6 (3%)	16 (8%)	26 (38%)	
N. Chr. abn.					
0	167 (32%)	117 (49%)	50 (24%)	0 (0%)	<0.0001
1–2	258 (49%)	123 (51%)	135 (63%)	0 (0%)	
3–4	53 (10%)	0 (0%)	25 (12%)	28 (41%)	
≥5	44 (9%)	0 (0%)	3 (1%)	41 (59%)	

sd standard deviation, M-IGHV mutated IGHV gene, U-IGHV unmutated IGHV gene, N. Chr. abn. number of chromosomal abnormalities, CK complex karyotype, M-noCK M-IGHV without CK, U-CK1 U-IGHV and/or type 1 CK, CK2 type 2 CK. n.a. not applicable

^aMissing data = 3% about CD38 expression, 1% cytogenetic by FISH and 1% for TP53 abnormalities (including deletions and/or mutations)

trend and absence of any statistical difference between OS curves of the CK1 and U-IGHV groups, these patients were grouped and analysed together (U-CK1), as well as M-IGHV and no-CK patients (M-noCK) (Figure S1G). Sixty-nine (13%) patients of the whole population harboured CK2, 213 (41%) CK1 or U-IGHV (U-CK1) and 240 (46%) M-IGHV without any subtype of CK (M-noCK). The former group was characterised by a more advanced stage at diagnosis (Binet C, 13% vs 7% vs 4%, $p < 0.0001$), higher levels of β2-microglobulin (2.47 mg/L vs 3.17 mg/L vs 3.27 mg/L, $p < 0.0001$), lower number of cases with low-risk FISH (i.e. 13q- or normal FISH, 38% vs 55% vs 92%, $p < 0.0001$), but an increased prevalence of TP53 aberrations (38% vs 8% vs 3%, $p < 0.0001$) and number of chromosomal abnormalities (≥5 lesions, 0% vs 1% vs 59%), as compared to the other two groups (Table 1).

Prognostic impact of CK subtypes and IGHV combination

We observed that patients with CK2 have a significantly shorter TTFT and OS compared to U-CK1 or M-noCK cases (Fig. 1c, d). The median OS was 7.1 years for CK2 patients but was not reached for U-CK1 and M-noCK patients ($p < 0.0001$). The 5-year OS was 67%, 85%, and 93% for CK2, U-CK1 and M-noCK cases, respectively

(Fig. 1d, $p < 0.0001$). The median and 5-year TTFT were 1.97 vs 3.40 vs 19.1 and 31% vs 39% vs 81% for CK2, U-CK1 and M-noCK cases (Fig. 1c, $p < 0.0001$), respectively. For both TTFT and OS, each curve was statistically different from the all others (Fig. 1c, d). Moreover, the worse prognosis of CK2 patients was independent of the TP53 (Fig. S2A-B, $p = 0.0845$ and 0.8122 for TTFT and OS) and IGHV status (Fig. S2C-D, $p = 0.0755$ and 0.2230 for TTFT and OS). In particular, multivariate analysis confirmed that U-CK1 patients have a 3-fold higher risk of starting treatment and of dying than M-noCK patients (Table 2, $p < 0.0001$). Similarly, CK2 patients have 5- and 7-fold risk of undergoing first-line therapy and of dying compared to M-noCK subjects (Table 2, $p < 0.0001$). Other variables associated with shorter TTFT and OS at univariate and multivariate analysis were advanced Binet stage, CD38+, U-IGHV, 11q-, 17p- and TP53 abnormalities (Table S1-S2). Age >65 years at diagnosis also predicted a shortened OS at multivariate analysis (Table S2).

Our model was also internally validated by bootstrap .632 method, showing a prediction error of 0.31 and 0.34 for TTFT and OS, respectively. Finally, the c-indexes for the FISH hierarchical model were 0.64 and 0.61 (Fig. S3A-B), the IGHV-FISH system 0.69

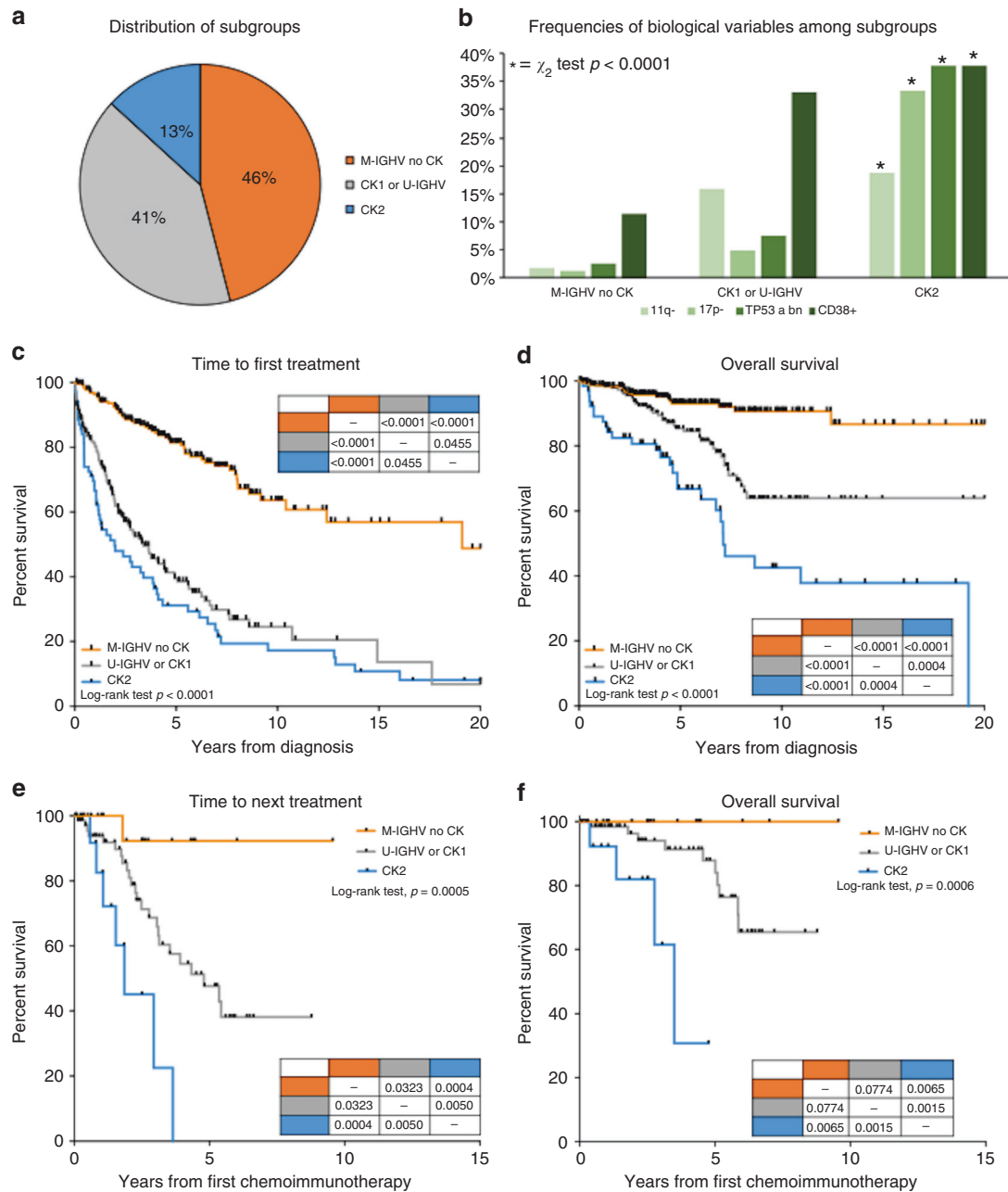


Fig. 1 In the upper-left panel **a** the apple-pie graph represents the distribution of patients harbouring type 2 complex karyotype (CK2, 13%), type 1 CK or unmutated *IGHV* gene (U-CK1, 41%) and mutated *IGHV* gene without any CK subtypes (M-noCK, 46%). The upper-right panel **b** shows histograms for frequencies of biological variables among identified subgroups. CK2 subgroups was significantly enriched for CD38 \geq 30% (CD38+), 11q deletion (11q-), 17p deletions (17p-), *TP53* abnormalities (*TP53* abn) cases compared to M-noCK or U-CK1 subjects. Panels **c-f** show Kaplan–Meier curves for survival analysis. Patients with CK2 (light grey curve) had the shortest time to first treatment (**c**) and overall survival (**d**) from diagnosis, as well as the worst time to next treatment (**e**) and overall survival (**f**) after chemoimmunotherapy with FCR or BR as compared with U-CK1 (dark grey curves) and M-noCK cases (black curves)

and 0.63 (Fig. S3C-D), CLL-IPI 0.67 and 0.62 (Fig. S3E-F) while for our proposed model they were 0.70 and 0.69 for TTFT and OS, respectively. These results indicate that our model was slightly better than other commonly used prognostic scores applied to our population.

Predictive impact of CK subtypes and IGHV combination

The combination of the *IGHV* status and CK subtypes also provides predictive information after first-line therapy ($n = 160$ patients, $p < 0.0001$ for both TTNT and OS, Fig. S2G-H). In particular, focusing on 107 patients treated with FCR or BR, 20% were M-noCK, 67% U-CK1

and 13% CK2. We observed that only one of the M-noCK cases relapsed and that no patient has died after a median follow-up of 43 months as compared with the other two subgroups (Fig. 1e, f). The median TTNT was 1.86 and 4.79 years for CK2 and U-CK1, but not reached for M-noCK patients ($p < 0.0005$, Fig. 1e). The estimated 3-year TTNT was 92%, 69 and 23%, for M-noCK, U-CK1 and CK2 patients ($p < 0.0005$, Fig. 1e), respectively. The median OS was 3.5 years for CK2 but not reached for both U-CK1 and M-noCK cases ($p = 0.0006$, Fig. 1f). The 3-year OS was 100%, 94 and 62% for M-noCK, U-CK1 and CK2 patients ($p = 0.0006$, Fig. 1f), respectively. Variables associated with TTNT and OS at univariate and

Table 2. Hazard ratios (HR) for the combination of IGHV mutational status with CK subtypes

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% C.I.	<i>p</i> values	HR	95% C.I.	<i>p</i> values
TTFT						
M-noCK	1.00	–	–	1.00	–	–
U-CK1	4.31	3.14–5.90	<0.0001	3.98	2.87–5.52	<0.0001
CK2	4.89	2.99–7.99	<0.0001	5.12	3.5–7.47	<0.0001
OS						
M-noCK	1.00	–	–	1.00	–	–
U-CK1	3.10	1.81–5.30	<0.0001	3.14	1.75–5.64	0.0001
CK2	7.07	3.13–15.08	<0.0001	7.37	3.97–13.69	<0.0001

95% C.I. 95% confidential interval, M-noCK mutated IGHV without complex karyotype, U-CK1 unmutated IGHV and/or type 1 complex karyotype, CK2 type 2 complex karyotype, TTFT time to first treatment, OS overall survival

multivariate analysis were reported in Table S3 and S4. CK2 predicted a shorter TTNT and OS also at multivariate analysis ($p = 0.0055$ and $p = 0.0113$, respectively).

Subsequently, we compared CK2 patients treated with FCR or BR ($n = 14$) with those who received ibrutinib first-line ($n = 7$). Although the 3-year TTFT and OS for patients treated with chemoimmunotherapy and those with ibrutinib were 67% vs 22% and 100% vs 62%, respectively, these differences were not statistically significant ($p = 0.2479$ for TTNT and $p = 0.2011$ for OS, Fig. S4A-B).

DISCUSSION

Chromosome banding analysis in CLL is capable of identifying chromosomal abnormalities that are missed by FISH analysis, sometimes fulfilling the criteria of CK.^{4,18,27,28} In this retrospective study we confirmed in a large cohort of patients that CK is not a single entity but is a quantitative and qualitative cytogenetic heterogeneous category. CK patients with major structural lesions (i.e. CK2) have a dismal outcome. Furthermore, the combination of IGHV mutational status with data derived from chromosome banding analysis allows to identify a subset of patients characterised by M-IGHV without any CK subtypes with a very indolent disease, 90% alive after 10 years of follow-up, who can achieve long-term remission after a short-course of chemoimmunotherapy.

The availability of BCR- and BCL2-inhibitors, alone or in combination, is able to overcome some of the poor-risk prognostic factors associated with CLL, such as clinical stage, TP53 abnormalities and U-IGHV, and new predictive parameters are now emerging.^{1,3} In recent years, the prognostic and predictive role of CK, defined by the presence of at least three chromosomal lesions, is becoming evident at diagnosis,^{4,6} at disease progression⁵ and in relapsed/refractory patients treated with ibrutinib¹¹ or venetoclax.¹⁰ Although CK is found in 14–35% of CLL depending on the studies,^{4,8} it is a heterogeneous cytogenetic category from a quantitative and qualitative point of view. Data from the literature have documented that patients with +12, +18 and +19 although resembling a CK are characterised by an indolent CLL with peculiar clinical features (i.e. female predominance, young age at diagnosis, etc.).²⁷ On the other hand the presence of at least five chromosomal aberrations predicted for a very aggressive clinical course independently of the IGHV status and TP53 lesions.²⁹ The number of chromosomal lesions was also assessed in our study population, confirming that patients 5 or more aberrations had the shortest TTFT and OS (Fig. S5). Recently, our

collaborative group has demonstrated that almost 70% of CK cases harboured major structural aberrations (such as unbalanced translocations, ring or marker chromosomes). This subset, herein called CK2, was associated with a higher incidence of TP53 aberrations, chemo-refractoriness and a shorter OS at multivariate analysis.¹² Furthermore, CK2 CLL cases have a distinct mRNA expression profile with a deregulation of genes involved in cell-cycle control and DNA damage response.¹² In the present study we included 522 patients and we combined data derived from stimulated chromosome banding analysis with the IGHV mutational status in order to improve the prognostic and predictive power of these markers. We demonstrated that M-IGHV patients without any CK subtypes at diagnosis, corresponding to 45% of our cohort, are characterised by a very indolent disease with a median TTFT of 19 years and more 90% of them still alive after 10 years from diagnosis. Although patients with CK2 was a relatively rare subgroup, representing 13% of the cases, most of them (81%) required a treatment within 5 years from the diagnosis, almost all needed a second line of treatment after 3 years from chemoimmunotherapy and the median OS was 7 years.

Although the exact mechanisms which favour the development of a CK are unknown, the strong association between CK and TP53 disruption herein and by other authors^{8,28,29} could play a relevant role. Patients with TP53 mutations are characterised by short telomeres and high hTERT expression, a condition known to cause chromosome instability.^{30,31} Patients with TP53 disrupted showed telomere deletion and chromosomal end-to-end fusion in cells with CK.³⁰ Thomay et al.³² reported that loss or mutation of TP53 caused an increased number of chromosomal break events leading to dicentric chromosome and whole-arm translocation. In addition, a recent paper from the German CLL Study Group found an association between short telomere length, TP53 abnormalities, early relapse after chemoimmunotherapy and adverse survival.³³ In particular, cases with 17p- or TP53 mutations had the shortest telomeres length, increase genomic complexity as well as clonal evolution.³³

The challenge of contemporary CLL treatment involves attempts to tailor therapy according to the patients' specific biological risk profile. To responsibly and effectively advance the development of new targeted therapies, novel drugs should be specifically offered to patient subgroups who can gain the greatest benefit compared with established chemoimmunotherapy strategies. Rossi D³⁴ et al. demonstrated that OS of M-IGHV patients without 11q or 17p deletions is superimposable to that of the age-matched general population, while U-IGHV subjects and those with high-risk FISH aberrations (i.e. 11q- or 17p-) invariably relapsed after FCR. This observation has been also confirmed in the re-analysis of pivotal clinical trials from the German CLL study group and MD Cancer institute.^{35,36} Gentile M³⁷ et al. published a multicentre retrospective study on BR in treatment-naïve patients showing that, also with this chemoimmunotherapy, M-IGHV CLL without 11q/17p deletions experienced the best disease control and OS. All these observations clearly identified CLL patients with a low-risk biological profile who can achieve excellent long-term results and disease control with six cycles of chemoimmunotherapy. Our data confirm the above result^{34–36} and extend the observation supporting the notion that front-line chemoimmunotherapy, FCR or BR, represents a highly effective treatment option for physically fit M-IGHV CLL patients without a CK.

Given the disappointing results of CK2 patients with chemoimmunotherapy, we hypothesised that new agents, ibrutinib, would improve the outcome of this unfavourable subset. We compared CK2 patients treated with FCR or BR and those who received ibrutinib as first-line therapy. Although we found some differences between TTNT and OS curves, these were not statistically significant, likely related to the short follow-up (14 months for ibrutinib-treated patients) and the low number of patients (seven

CK2 cases treated with ibrutinib). The best first and subsequent therapies for patients with CK are still matter of debate. While the presence of CK has been associated to early relapse in relapsed/refractory patients treated with ibrutinib or venetoclax,^{10,11} the activity of ibrutinib in treatment-naïve subjects with a CK has so far not been reported. Overall the literature and current data support the importance of evaluating IGHV mutational status accordingly to recently updated iwCLL guidelines, and suggest that the outcome of CK patients with chemoimmunotherapy is disappointing due to a high rate of chemo-refractoriness, early relapse and short survival.^{5,9}

CONCLUSIONS

Thanks to stimulated cytogenetic analysis we identified a CK in 19% of 522 CLL patients. We herein suggest that the combination of IGHV mutation and data derived from chromosome banding analysis allows to refine the prognostic stratification of CLL, to identify M-IGHV patients without any CK subtypes who are characterised by an indolent disease and excellent outcome after chemoimmunotherapy. At the other end, CK2 patients are enriched in cases with *TP53* abnormalities, have unsatisfactory responses to chemotherapy and aggressive diseases with only 40% alive after 10 years of follow-up. New clinical trials incorporating a combination, or a sequence of novel agents should be envisaged for patients with CK, in particular with the CK2 subtype.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.V. designed the study, performed statistical analysis, visited patients and wrote the article; S.I., E.S., S.F., M.C., E.V. and F.C. and provided intellectual inputs and visited patients; L.B., A.M., M.A.B. and M.N. performed cytogenetic tests; F.F., I.D.G., F.M. and A.G. performed cytofluorimetric and IGHV analysis; F.R.M., G.M.R., G.S., R.F., A.C. and L.T. visited patients, provided intellectual inputs and reviewed the article.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0502-x>.

Competing interests: A.V. received honoraria from Janssen and Abbvie. L.T. received research funding by Gilead and Janssen, advisory board for Roche, Shire and Abbvie. G.M.R. received research funding by Gilead. F.R.M. advisory board for Janssen, Shire and Abbvie. A.C. advisory board and speaker bureau for Roche, Abbvie, Gilead and Janssen. G.S. board member of Abbvie, Roche, Janssen and Celgene. R.F. advisory board or speaker bureau for Roche, Abbvie, Celgene, Incyte, Amgen, Janssen, Celtrion, Gilead and Novartis. The remaining authors declare no competing interests.

Ethical approval and consent to participate: This study was approved by the local research ethics committee of Padua hospital and informed consent was obtained from all patients.

Funding: This work was supported by funds from Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (A.I.R.C.) projects to L.T. (IG-15397), Gilead fellowship program 2017 and 2018 to L.T., Special Program 'Metastatic disease: the key unmet need in oncology', AIRC 5 × 1000 (No. 21198) to R.F., Fondo di Ateneo per la Ricerca 2016, 2017 of the University of Ferrara to G.M.R. and F.C., Fondo di Incentivazione alla Ricerca 2017 of the University of Ferrara to G.M.R., Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca PRIN 2015 to A.C. (2015ZMRFEA). A.V. received a research fellowship from the University of Padua supported by ONLUS Ricerca per Credere nella Vita (RCV), Padua, Italy.

Consent to publish: All patients gave consent to the publication of anonymous data.

Data availability: The datasets generated and analysed during the current study are not publicly available due to the data protection and lack of consent from the patients. Access to data is strictly limited to the researchers who have obtained permission for data processing.

Note: This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- Scarfo, L., Ferreri, A. J. & Ghia, P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **104**, 169–182 (2016).
- Visentin, A., Facco, M., Frezzato, F., Castelli, M., Trimarco, V., Martini, V. et al. Integrated CLL scoring system, a new and simple index to predict time to treatment and overall survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **15**, 612–20 e1-5 (2015).
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H. et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* **131**, 2745–2760 (2018).
- Baliakas, P., Iskas, M., Gardiner, A., Davis, Z., Plevova, K., Nguyen-Khac, F. et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am. J. Hematol.* **89**, 249–255 (2014).
- Herling, C. D., Klaumunzer, M., Rocha, C. K., Altmüller, J., Thiele, H., Bahlo, J. et al. Complex karyotypes and *KRAS* and *POT1* mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood* **128**, 395–404 (2016).
- Rigolin, G. M., Cavallari, M., Quaglia, F. M., Formigaro, L., Lista, E., Urso, A. et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood* **129**, 3495–3498 (2017).
- Le Bris, Y., Struski, S., Guieze, R., Rouvellat, C., Prade, N., Troussard, X. et al. Major prognostic value of complex karyotype in addition to *TP53* and IGHV mutational status in first-line chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol.* **35**, 664–670 (2017).
- Rigolin, G. M., del Giudice, I., Formigaro, L., Saccenti, E., Martinelli, S., Cavallari, M. et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer* **54**, 818–826 (2015).
- Badoux, X. C., Keating, M. J., Wang, X., O'Brien, S. M., Ferrajoli, A., Faderl, S. et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy is highly effective treatment for relapsed patients with CLL. *Blood* **117**, 3016–3024 (2011).
- Anderson, M. A., Tam, C., Lew, T. E., Juneja, S., Juneja, M., Westerman, D. et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood* **129**, 3362–3370 (2017).
- Thompson, P. A., O'Brien, S. M., Wierda, W. G., Ferrajoli, A., Stingo, F., Smith, S. C. et al. Complex karyotype is a stronger predictor than *del(17p)* for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer* **121**, 3612–3621 (2015).
- Rigolin, G. M., Saccenti, E., Guardalben, E., Cavallari, M., Formigaro, L., Zagatti, B. et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. *Br. J. Haematol.* **181**, 229–233 (2018).
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* **111**, 5446–5456 (2008).
- Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am. J. Hematol.* **90**, 446–460 (2015).
- Langerak, A. W., Davi, F., Ghia, P., Hadzidimitriou, A., Murray, F., Potter, K. N. et al. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia* **25**, 979–984 (2011).
- Malcikova, J., Tausch, E., Rossi, D., Sutton, L. A., Soussi, T., Zenz, T. et al. ERIC recommendations for *TP53* mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* **32**, 1070–1080 (2018).
- Blanco, G., Puiggros, A., Baliakas, P., Athanasiadou, A., Garcia-Malo, M., Collado, R. et al. Karyotypic complexity rather than chromosome 8 abnormalities aggravates the outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with *TP53* aberrations. *Oncotarget* **7**, 80916–80924 (2016).
- Kreinitz, N., Polliack, A. & Tadmor, T. Chronic lymphocytic leukemia is becoming more complex: how to define complex karyotype? *Leuk. Lymphoma* **59**, 521–522 (2018).

19. Visentin A., Facco A., Gurrieri C., Pagnin E., Martini V., Imbergamo S., et al. Prognostic and predictive impact of IGHV mutational status and load in chronic lymphocytic leukemia: focus on FCR and BR treatments. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.03.002> (2019).
20. Raponi S., Del Giudice I., Marinelli M., Wang J., Cafforio L., Illari C. et al. Genetic landscape of ultra-stable chronic lymphocytic leukemia patients. *Ann. Oncol.* **29**, 966–972 (2018).
21. Brochet X., Lefranc M. P. & Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* **36**(Web Server issue), W503–W508 (2008).
22. Hamblin T. J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D. G. & Stevenson F. K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848–1854 (1999).
23. Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Krober A., Bullinger L. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1910–1916 (2000).
24. Hallek M., Fischer K., Fingerle-Rowson G., Fink A. M., Busch R., Mayer J. et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **376**, 1164–1174 (2010).
25. Eichhorst B., Fink A. M., Bahlo J., Busch R., Kovacs G., Maurer C. et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* **17**, 928–942 (2016).
26. Delgado J., Doubek M., Baumann T., Kotaskova J., Molica S., Mozas P. et al. Chronic lymphocytic leukemia: a prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *Am. J. Hematol.* **92**, 375–380 (2017).
27. Baliakas P., Puiggros A., Xochelli A., Sutton L. A., Nguyen-Khac F., Gardiner A. et al. Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. *Haematologica* **101**, e299–e302 (2016).
28. Puiggros A., Collado R., Calasanz M. J., Ortega M., Ruiz-Xiville N., Rivas-Delgado A. et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget* **8**, 54297–54303 (2017).
29. Baliakas P., Jeromin S., Iskas M., Puiggros A., Plevova K., Nguyen-Khac F. et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations and clinical impact. *Blood* **133**, 1205–1216 (2019). <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-873083>
30. Guieze R., Pages M., Veronese L., Combes P., Lemal R., Gay-Bellile M. et al. Telomere status in chronic lymphocytic leukemia with TP53 disruption. *Oncotarget* **7**, 56976–56985 (2016).
31. Rampazzo E., Bojnik E., Trentin L., Bonaldi L., Del Bianco P., Frezzato F. et al. Role of miR-15a/miR-16-1 and the TP53 axis in regulating telomerase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **102**, e253–e256 (2017).
32. Thomay K., Fedder C., Hofmann W., Kreipe H., Stadler M., Titgemeyer J. et al. Telomere shortening, TP53 mutations and deletions in chronic lymphocytic leukemia result in increased chromosomal instability and breakpoint clustering in heterochromatic regions. *Ann. Hematol.* **96**, 1493–1500 (2017).
33. Jebaraj B. M. C., Tausch E., Landau D. A., Bahlo J., Robrecht S., Taylor-Weiner A. N., et al. Short telomeres are associated with inferior outcome, genomic complexity, and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0446-4>.
34. Rossi D., Terzi-di-Bergamo L., De Paoli L., Cerri M., Ghilardi G., Chiarenza A. et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **126**, 1921–1924 (2015).
35. Fischer K., Bahlo J., Fink A. M., Goede V., Herling C. D., Cramer P. et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* **127**, 208–215 (2016).
36. Thompson P. A., Tam C. S., O'Brien S. M., Wierda W. G., Stingo F., Plunkett W. et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **127**, 303–309 (2016).
37. Gentile M., Shanafelt T. D., Reda G., Mauro F. R., Zirlik K., Ciolli S. et al. Validation of a biological score to predict response in chronic lymphocytic leukemia patients treated front-line with bendamustine and rituximab. *Leukemia* **32**, 1869–1873 (2018).

THE COMBINATION OF COMPLEX KARYOTYPE SUBTYPES AND IGHV MUTATIONAL STATUS IDENTIFIES NEW PROGNOSTIC AND PREDICTIVE GROUPS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Visentin A, MD^{1,2}, Bonaldi L, MD³, Rigolin GM, MD, PhD⁴, Mauro FR, MD⁵, Martines A, PhD³, Frezzato F, PhD^{1,2}, Imbergamo S, MD^{1,2}, Scomazzon E, MD^{1,2}, Pravato S, MD^{1,2}, Bardi, MA PhD⁴, Cavallari M, MD⁴, Volta E, MD⁴, Cavazzini F, MD PhD⁴, Nanni M, PhD⁵, Del Giudice I, MD PhD⁵, Facco M, MS^{1,2}, Guarini A, PhD⁵, Semenzato G, MD^{1,2}, Foà R, MD⁵, Cuneo A, MD, PhD⁴, Trentin L, MD^{1,2,+}.

1 Hematology and Clinical Immunology Unit, Department of Medicine, University of Padua, Padua, Italy. 2 Venetian Institute of Molecular Medicine, Padua, Italy. 3 Immunology and Molecular Oncology Unit, Veneto Institute of Oncology IOV-IRCSS, Padua, Italy. 4 Hematology section, Department of Medical Sciences, Azienda Ospedaliera-Universitaria, Arcispedale S. Anna, University of Ferrara, Ferrara. 5 Hematology division, Department of Translational and Precision Medicine, "Sapienza" University, Rome, Italy.

SUPPLEMENTARY FILES

Legends to figures	pag. 2
Karyotypes of patients with CK	pag. 3
Supplementary table S1	pag. 4
Supplementary table S2	pag. 4
Supplementary table S3	pag. 4
Supplementary table S4	pag. 5
Figure S1	pag. 6
Figure S2	pag. 7
Figure S3	pag. 8
Figure S4	pag. 9
Figure S5	pag. 10

LEGENDS TO FIGURES

Figure S1. Kaplan-Meier curves according to IGHV mutational status, presence of complex karyotype and subset of complex karyotype. In the upper part of the figure we report Kaplan-Meier curves for time to first treatment according to IGHV mutational status (A, mutated vs unmutated IGHV genes), complex karyotype (B, CK vs no CK) and CK subtypes (C, type 2 CK vs type 1 CK vs no CK). In the upper part of the figure Kaplan-Meier curves for overall survival according to IGHV mutational status (D, mutated vs unmutated IGHV genes), complex karyotype (E, CK vs no CK) and the combination of CK subtypes and IGHV status (F, type-2 CK vs type-1 CK vs no CK) are reported. In the bottom (G) part of the figure we compared survival curves according to IGHV mutational status and CK subtypes. The survival curves of patients with mutated-IGHV and unmutated-IGHV genes are superimposable to the one of subjects without CK ($p=0.1083$) and with type-1 CK ($p=0.7988$), respectively). Patients with type 2 CK showed the worst prognosis.

Figure S2. Kaplan-Meier curves of CK2 according to IGHV mutational status and TP53 abnormalities. In upper panels we report time to first treatment (A) and overall survival (B) of CK2 patients according to the presence of TP53 abnormalities (TP53 abn, including deletions and mutations) or not (TP53 wild type). In lower panels we report time to first treatment (C) and overall survival (D) of CK2 patients according to the IGHV mutational status (M-IGHV, mutated, or U-IGHV, unmutated).

Figure S3. Kaplan-Meier curves for time to first treated and overall survival according to different prognostic models. Panels A and B show time to first treatment and overall survival curves according to Dohner's hierarchical model applied to our cohort of patients. Panels C and D shown time to first treatment and overall survival curves according to Barcelona-Brno score that combined data of IGHV mutational status with the presence of high-risk FISH (i.e. 11q or 17p deletions). Panels E and F shown time to first treatment and overall survival curves according to CLL-IPI score. In the bottom panels we evaluated time to next treatment (i.e. all second line therapy) (G) and overall survival (H) after first line treatment according to the combination of CK subtype with IGHV status. Patients with type 2 CK showed the shorter time to next treatment and survival as compared with U-CK1 (unmutated IGHV and/or CK1) and M-noCK (mutated IGHV without CK).

Figure S4. Kaplan-Meier curves of CK2 patients. Time to next treatment (A) and overall survival (B) after start of first line therapy among CK2 patients treated with ibrutinib or chemoimmunotherapy (CIT) FCR or BR.

Figure S5. Prognostic impact of the number of chromosomal abnormalities. Time to first treatment (A) and overall survival (B) after diagnosis according to the number of chromosomal abnormalities. Patients with 5 or more aberrations had the shortest time to first treatment and overall survival.

TABLES

Table S1. Univariate and multivariate analysis for time to first treatment

	UNIVARIATE ANALYSIS			MULTIVARIATE ANALYSIS		
	HR	95% C.I	p values	HR	95% C.I	p values
MALE	1.03	0.79-1.34	0.8298	-	-	-
AGE>65yy	1.03	0.79-1.34	0.7949	-	-	-
Binet B-C	3.75	2.64-5.32	<0.0001	3.98	3.05-5.16	<0.0001
CD38>30%	1.75	1.27-2.40	<0.0001	1.94	1.46-2.58	<0.0001
U-IGHV	3.93	2.97-5.20	<0.0001	4.20	3.15-5.61	<0.0001
11q-	2.78	1.64-4.71	<0.0001	2.83	1.98-4.03	<0.0001
17p-	2.01	1.15-3.49	0.0008	2.01	1.33-3.05	0.0010
TP53 abn	1.97	1.23-3.17	0.0002	1.98	1.37-2.85	0.0003

Table S2. Univariate and multivariate analysis for overall survival

	UNIVARIATE ANALYSIS			MULTIVARIATE ANALYSIS		
	HR	95% C.I	p values	HR	95% C.I	p values
MALE	1.35	0.86-2.13	0.2070	-	-	-
AGE>65yy	4.49	2.83-7.13	<0.0001	5.05	3.06-8.34	<0.0001
Binet B-C	2.00	1.19-3.36	0.0022	2.00	1.27-3.15	0.0027
CD38>30%	2.19	1.27-3.77	0.0005	2.49	1.56-3.97	0.0001
U-IGHV	2.91	1.81-4.69	<0.0001	2.94	1.78-4.85	<0.0001
11q-	2.82	1.27-6.29	0.0001	2.84	1.63-4.93	0.0002
17p-	2.70	1.12-6.46	0.0007	2.69	1.48-4.88	0.0011
TP53 abn	1.86	0.88-3.93	0.0378	1.86	1.03-3.28	0.0408

Table S3. Univariate and multivariate analysis for time to next treatment after FCR or BR

	UNIVARIATE ANALYSIS			MULTIVARIATE ANALYSIS		
	HR	95% C.I	p values	HR	95% C.I	p values
MALE	2.18	1.01-4.72	0.0473	2.93	1.03-8.33	0.0435
AGE>65yy	2.75	1.23-6.11	0.0036	3.49	1.58-7.73	0.0020
Binet B-C	1.49	0.72-3.09	0.1808	-	-	-
CD38>30%	1.24	0.59-1.24	0.1552	-	-	-
U-IGHV	2.35	1.08-5.13	0.0316	2.24	0.78-6.42	0.1340
11q-	2.14	0.77-5.94	0.1459	-	-	-
17p-	5.38	1.06-7.24	0.0419	2.00	0.91-6.58	0.0640
TP53 abn	5.75	1.66-8.50	0.0093	4.47	0.86-7.05	0.0418
M-noCK	1.00	-	-	1.00	-	-
U-CK1	2.84	1.09-7.39	0.0323	4.28	1.03-10.73	0.0496
CK2	7.27	3.52-9.12	0.0004	6.74	2.40-2.16	0.0055

Table S4. Univariate and multivariate analysis for overall survival after FCR or BR

	UNIVARIATE ANALYSIS			MULTIVARIATE ANALYSIS		
	HR	95% C.I	p values	HR	95% C.I	p values
MALE	1.16	0.34-4.02	0.8212	-	-	-
AGE>65yy	4.54	2.94-8.27	0.0006	3.95	2.17-6.38	0.0028
Binet B-C	2.47	0.83-6.35	0.1097	-	-	-
CD38>30%	3.97	1.27-7.93	0.0230	3.11	1.20-6.81	0.0391
U-IGHV	2.18	1.03-9.27	0.0289	1.97	0.98-5.92	0.0704
11q-	4.11	1.81-7.96	0.0297	3.73	2.14-7.19	0.0317
17p-	3.70	1.28-8.35	0.0316	3.19	0.89-7.73	0.0619
TP53 abn	3.15	1.56-8.12	0.0391	2.79	1.06-6.52	0.0475
M-noCK	1.00	-	-	1.00	-	-
U-CK1	3.36	0.62-8.12	0.1581	2.37	0.29-9.04	0.4160
CK2	6.19	2.25-10.70	0.0065	5.23	1.65-8.66	0.0113

Karyotypes of patients classified as harboring a complex karyotype.

CENTER	KARYOTYPES
FE-001	46,XY,del(13)(q12q14)[5]/48,idem,+5,+12[8]/46,XY[7]
FE-002	46,XY,del(11)(q21),t(11;14)(q14;q24)[8]/46,idem,del(13)(q14q22)[5]/46,XY[4]
FE-003	49,XY,+12,-18,+19[4]/46,XY[1]
FE-004	46,XY,del(13)(q14q22)[2]/49,idem,+12,-18,+19[3]/46,XY[4]
FE-005	48,XY,+12,+14,t(14;18)(q32;q21)[3]/46,XY[17]
FE-006	46,XY,del(13)(q14q22)[2]/46,idem,-20,+22[13]/46,XY[5]
FE-007	48,XX,+2,del(11)(q22)t(13;18)(q21;p11)+18[14]/46,XX[6]
FE-008	46,XX,del(13)(q14q22),del(17)(p12)[6]/46,idem,del(6)(q21)[6]/46,XX[8]
FE-009	45,X,-Y[3]/46,idem,+12[7]/47,idem,+12,+19[10]
FE-010	46,XY,(8)(q19),t(11;14)(q13;q32),del(11)(q14)[8]/46,idem,del(13)(q14)[2]/49,idem,+5,+12,+22[8]/46,XY[2]
FE-011	46,XY,del(11)(q22q23)[5]/46,idem,del(13)(q12q14)[8]/46,idem,del(13)(q12q14),del(14)(q32)[4]/46,XY[3]
FE-012	46,XY,del(13)(q14q22)[2]/46,idem,-16,+21[13]/46,XY[5]
FE-013	46,XY,(8)(q19),del(11)(q14)[9]/46,idem,del(15)(q14)[2]/49,idem,+5,+12[8]/46,XY[4]
PO-001	46,X,-X,t(15)(p21;q35),+12,del(21)(q22)[21]/46,XX[4]
PO-002	46,XY,(9;13)(q13;q14),ish t(9;13)(D13S319,-LAMP1-)/(D13S319,-LAMP1-),D13S319,-LAMP1-),ins(13;7)(q14;7),ish ins(13)(D13S319,-LAMP1-)+[6]/46,XY,t(11;14)(q13;q32)[4]/46,XY[13]
PO-003	47,XY,del(11)(q14q23),+12[6]/idem,del(13)(q14q22)[19]
PO-004	50,XY,del(3)(p21p25),+12,+del(13)(q12q14),+18,+19cp8[46,XY[6]
PO-005	49,XY,+12,+18,+19[18]/46,XY,del(20)(q11)[3]/46,XY[4]
PO-006	46,XX,t(14;19)(q32;q13),del(14)(q24),ish t(14;19)(IGH3+,IGHV-,IGHV+),del(14)(q24q32)(IGH3-,IGHV+)[25]
PO-007	45,XY,-6,t(17)(q10)[22]/45,idem,del(7)(q13)[5]
PO-008	49,XX,+12,+18,+19[24]/46,XX[1]
PO-009	46,XX,t(14;18)(q32;q21)[8]/46,idem,t(12;13)(q13;q14)[10]/46,idem,t(12;13)(q13;q14),del(13)(q14q22)[3]/46,XX[4]
PO-010	45,XY,-6,del(11)(q22q23),ish del(11)(ATM-),46,XY,t(1;15;13)(q21;q25;q14)[7]/46,XY[9]
PO-011	46,XX,t(6;13)(q21;q24),ish t(6;13)(D13S319,-LAMP1-),D13S319,-LAMP1-,del(13)(q14q14)[D13S319,-LAMP1-],del(21)(q22)[28]/46,XX[2]
PO-012	46,X,-Y,+12,del(17)(p13)[25]
PD-013	48,XX,-X,+8,inv(11)(p11q12),7,del(21)(q22)[20]/46,XX[7],ish inv(11)(q11)(ATM+)[q22](ATM-)
ROME-001	48,XY,+12,+18,+19[9]/46,XY[1]
ROME-002	47,XY,+12[5]/48,XY,+12,-8,-9,+19[8]/46,XY[1]
ROME-003	46,XY,del(13)(q14)[3]/46,idem,del(11)(q22),47,idem,del(11)(q22),+12[1]/46,XY[40]
ROME-004	46,XY,del(13)(q14)[3]/46,XY,del(11)(q22)[47],XY,del(11)(q22),+12[1]/46,XY[40]
FE-014	47,XY,+12[16]/47,XY,+add(8)(p23),+12,-18[3]/46,XY[1]
FE-015	46,XY,del(13)(q14)[2]/45,del(5)(p15),der(7)(p22),add(1)(q25)t(11;14)(q13;q32)-12,add(15)(q26),-22,+mar[4]/46,XY[16]
FE-016	46,XY,t(14;18)(q32;q21)[5]/46,XY,del(13)(q32),add(9)(q34),-14,+mar[4]/46,XY[12]
FE-017	46,XX,del(1)(q23),der(3)(t3;7)(p24;7),der(13)(q34)[10]/46,XX[21]
FE-018	46,XY,-2,del(13)(q12q14),der(14)(t2;14)(q31;q32),+del(15)(q22),der(18)(t18;7)(q21;7)[19]/46,XY[1]
FE-019	47,XY,add(1)(p36),der(2)(t2;7)(p23;7),del(3)(p21),del(6)(q23),+12,del(13)(q12q14),del(14)(q24),der(17)(t17;7)(q25;7)[16]/46,XY[4]
FE-020	47,XY,+12[17]/47,idem,t(7;13)(p22;q14),+13,-15,del(8),del(13)(q12q14),add(17)(p12)[2]/46,XY[2]
FE-021	43,XX,der(3)(t3;13)(q12;q14),-9,-13,-15,der(18;22)(q10;q10)[15;22],+12[12]/43,XX,del(8)(q23),-9,7,inv(12)(p11q24),del(13)(q12q31),-15,add(17)(q25),-21[6]/46,XX[7]
FE-022	46,XY,del(11)(q21)[8]/46,del(13)(q14q32),-4,add(10)(q25),add(17)(p13)[9]/46,XY[3]
FE-023	46,XX,del(13)(q14q22)[2]/46,del(2)(q36),t(4;7)(q22;q21)[15]/46,XX[3]
FE-024	46,XY,t(2;7)(p23;q32),add(17)(p13)[9]/46,del(11)(q22),t(4;7)(q22;q21)[15]/46,XX[3]
FE-025	45,XX,-6,del(13)(q12q14),del(14)(q32),der(17)(p23;p12)[8]/46,XX[12]
FE-026	45,XY,add(12)(q24),del(13)(q14q32),-16,add(17)(p11),add(18)(p11),-21[15]
FE-027	46,XY,del(13)(q12q14)[11]/45,X,-Y,der(11)(t1;7)(q24;7),del(13)(q12q14)[46,XY[5]
FE-028	45,XX,der(22)(t15;22)(q21;p11)[4]/45,del(8)(p23)[10]/46,XX,del(6)(q22),-7,+10,add(10)(p15),-11,add(12)(q24),+17,+2mar[cp2]/46,XX[4]
FE-029	45,X,-X,der(1)(t1;13)(q42;q14),del(6)(q21q25),del(9)(q12),der(11)(t11;21)(q23;q21),+12,-13,+19,-21[cp25]
FE-030	43,XY,add(2)(p25),-8,add(11)(p15),der(13)(t13;15)(p13q15),-13,der(14)(t13;14)(q14p13),-15,der(16)(t8;16)(q12p13)[cp19]/46,XY[1]
FE-031	46,XY,-5,del(6)(q11),-8,der(10)(t10;7)(q22;q21),del(11)(q11),del(13)(q14),del(14)(q24),+der(14)(t5;14)(q21;q32),add(17)(p11),-21[13]/46,XY[5]
FE-032	45,XY,del(6)(q21q25),-9,del(12)(p12),add(17)(p11)[cp5]/46,XY[22]
FE-033	46,XX,add(1)(q32),add(18)(q23),add(19)(q13)[4]/47,XX,add(1)(p22),add(18)(q23)[47]/46,XX[11]
PO-014	47,XY,+4,del(17)(q11),del(13)(q12q14),+15,-15[cp15],del(7)(q21),add(7)(q21),add(8)(p23),add(9)(p24),add(10)(p15),del(11)(q21q22)[19]/46,XY[2]
PO-015	47-48,XY,del(5)(q21),der(8)(p11),del(9)(q22),+12,del(14)(q22),+del(14)(q13),del(17)(q23),-18,+mar[cp19]/46,XY[1]
PO-016	47,XY,der(4)(t4;15)(q12;q11),+12,-15,der(17)(t15;17)(q12;p11)[746,XY[8]
PO-017	46,XY,del(5)(q13),ins(9;5)(q54;q13q31),der(13)(del(13)(q32)[5;13](q32;q33)[20]/46,del(11)(q22),q12,p11)[3][4]
PO-018	46,XX,del(11)(q14q23),der(15)(t8;15)(q21;p11)[46]/46,del(13)(t8;13)(q12;p13)[5]/46,del(der(22)(t8;22)(q21;p13)[4]
PO-019	47,XY,+12,del(11)(q21),der(15)(t9;15)(q21;p11)[10]/46,XY[6]
PO-020	44,XY,der(4;17)(t10;q10),-6,der(12)(t6;12)(q12;q24)ins(12;7)(q24;7),del(13)(q14q21)[25]
PO-021	46,XY,del(14)(q21)[20]/42,der(X)(X;13)(p22;q12)ins[?](p22;7),-Y,-2,der(3;17)(q10;q10),add(1)(q6),-13,del(14)(q2),doc(20;21)(q13;q22),+maj[4]/46,XY[1]
PO-022	47,+2,[?](p10),del(11)(q13q13q23)[cp6]/44-45,XY,+der(2)(t2;6)(q31;q13)-[6]cp4/46,XY[14] altro 45,Y,der(X;6)(p22;p25)del(6)(q12;q23),-6[25]
PO-023	46,XX,add(8)(q24),del(13)(q14q33),add(18)(p11),ish der(8)(t3;8)(q25;q24)[wcp8+, wcp3+],der(18)(t2;18)(p12;p11)[wcp2+, wcp18+][17]/46,XX,t(7;9)(q22;q24),add(8)(p12),del(13)(q14q33),ish der(8)(t2)(p12;p12)[wcp2+, wcp8+][6]/46,XX[2]
PO-024	46,XY,del(8)(p23),del(11)(q12q24)[6]/46,del(17)(p13)[14]/46,XY[5]
PO-025	44,XX,del(1)(q23),del(9)(q22),der(13)(t13;7)(q14;7),der(17)(t17;7)(p13;7),-18,-21[13]/46,XX[2]
PO-026	47,XX,+12,t(14;19)(q32;q13)[20]/47,X,+12,der(14)(t14;19)(q32;q13)(t;14)[p11;q32],add(22)(q13)[5]
PO-027	46,XY,dup(1)(q25q44),t(3;5)(q27;q13),c,add(8)(p21),del(11)(q13q23)[21]/46,XY,t(3;5)(q27;q13)[c4]
PO-028	45,X,-Y,add(4)(p15),del(8)(p13),del(10)(p13),del(13)(q22)[cp6]/46,XY[15]
PO-029	46,XY,-7,del(12)(q21q23),der(13)add(13)(p10)del(13)(q14q21),+mar[25]
PO-030	46,XX,del(13)(q14q22),der(15)(t15;18)(q24;q21),ish der(15)(t15;18)ins(15;13)[14]/46,XX[11]
PO-031	45,XX,der(16)(t16;17)(q12;q21),-17,-21[cp12]/46,del(6)(q21q23)[2]/46,XX[25],ish der(16)(t16;17)(TP53-)
PO-032	46,XY,add(7)(q32),t(10;10)(p11;p15),r(17)(13)/45,XY,der(9;17)(q12;p11)(9;17)(q12;q25)[5]/46,XY,t(2;7)(q11;q32),r(17)[3]/46,XY,del(11)(q21q24)[2]/46,XY[2]
PO-033	44-47,XX,add(5)(p15),t(13;17)(q14;q11),t(16;18)(p11;p11)[cp5]/42-44,XX,-4,add(8)(p21),-13,der(13)(t13;17)(q14;q11),der(17)(14;17)(q12;p13)[cp7]
PO-034	44-45,XY,add(1)(q21),-5,-8,der(10)(t5;10)[11](q13;q21;p15)+11,t(11;14)(q13;q32),-12,der(17)(t8;17)(q12;p12),+mar[19]/46,XY[7]
PO-035	42-45,XX,der(6)(t1;6)(q11;p25),add(7)(p22),der(16)(t15;16)(q15;p13),der(17;21)(q10;q10)[cp7]/43-44,XX,add(7)(p22),der(13)(q10;q10),der(17;21)(q10;q10),-21,+mar[cp5]/45-44,XX,add(5)(q35),add(7)(p22),der(17;21)(q10;q10)[cp3]/46,XX[6]
PO-036	74-80,XX,Y,+1,+4,del(5)(q22q31),+7,+9,+12,-15,+16,del(17)(p11),+del(17)(p11),+21,+mar[cp7]/46,XY[18]
PO-037	44,XY,add(3)(p21),-13,der(17)(t13;7)(q21;p13),ish inv(11)(p13)D13S319,-13q34,-D13S319,-13q34,-20[15]/44,del(18)(q21)(q32),+4,del(6)(p22),add(10)(q26),add(11)(q13),-13,add(14)(p12),der(17)(t13;17)(q21;p13),+1mar,inc[cp5]
PO-038	45,XY,del(11)(q21q23),add(18)(q23),der(18)(t18;22)(q12;q12),-22,ish der(18)(t18;22;18)(t18;22)[7]/45,del(18)(q24;q32)[17]/46,XY[1]
PO-039	89-89,XXX,t(1)(t10),t(2;8)(p11;q24;q2)(t3;13)(q27;q14)x2,ish t(3;13)(D13S319,-LAMP1+,D13S319,-LAMP1-),-4,-8,-9,t(14;19)(q32;q13),ish t(14;19)(IGH3+,IGHV-,IGH3-,IGHV+),-15,add(19)(q13;q21)[6]/46,XY[9]
PO-040	45,XY,-15,der(19)(t19;19)(q15;q13)[22]/46,XY,t(10;13)(q23;q14)[2]/46,XY[1] pos 45,XY,-15,der(19)(t19;19)(q15;q13)[22]/45,del(2)(p23),del(8)(p11),der(11)(t11;11)[p15;q13][cp7]/46,XY,t(10;13)(q23;q14)[3]
PO-041	46,XY,der(8)(q24q21)[9]/46,del(13)(q21q14)[8]/46,del(13)(q21q14)[8],46,del(12)(q24q31)[2]/46,del(12)(q24q31)[2]/46,XY,t(10;13)(q23;q14)[3]
PO-042	46,XX,del(13)(q12q14)[9]/46,XX,der(11)(t11;p11)(t15;11;13)(q11;q22;q34),del(13)(q12q14)[6]/46,XX[10]
PO-043	47,XY,+3,t(11;14)(q13;q32)[14]/46,del(der(3)(8)(t10;q10)[11]
PO-044	46,XY,add(6)(q23),del(13)(q12q21),add(14)(q21)[10]/46,XY[15],46,XY,t(14;19)(q32;q13)[17]/46,t(14;19)(q32;q13),der(6)inv(6)(p21p23)del(6)(q21)[6]/46,XY,t(14;19)(q32;q13),t(6;13)(p21;q14)[2]
PO-045	45,XX,-21[4]/47,XX,del(13)(q12q21),add(19)(p13),+add(19)(p13)[6]/46,XX[9]
PO-046	88-92,XXX,-4,-4,-7,-8,add(15)(p13)x2,add(17)(p12),der(19)(t4;19)(q12;q13),+add(19)(t4;19)(q12;q13),+2-2mar[cp12]/44-45,XY,-15,der(16)(t15;16)(q21;p13),add(17)(p12)[cp6]/46,XY[7]
PO-047	44,XY,del(10)(p13),-13,der(16)(t13;16)(q14;q13),-22[746,XY,add(4)(p16),?(5)(p15q13),t(7;13)(q22;q14)[cp3]/46,XY[18]
PO-048	46,XX,del(13)(q12q21)/46,XX,del(11)(p12),add(13)(q12),ish der(13)(t13;17)(wcp17+),ins(13;11)(wcp11+),ins(17;11)(q12;7),ish inv(17;11)(wcp11+)[4]/46,XX[20]
PO-049	42-44,XY,t(4;9)(q21;p23),-5,-9,del(10)(q24),add(11)(p15),-13,der(17)(t13;17)(q21;p12),ish(wcp13+),mar[6]/42-44,XY,-3-9,der(14)(t3;14)(q13;q32),der(16)(t13;16)(q21;q12),der(17)(t13;17)(q21;q12),ish(wcp13),-18,+22[6]/46,XY[20]
PO-050	45,XY,del(8)(q22),del(9)(q21),r(11)(p15q25),add(16)(p13)inc[9],XY[11]
PO-051	49,XX,+12,der(15)(t1;15)(p22;q26),+18,+19[22]/46,XX[3]
PO-052	46,XY,del(2)(q21q23),del(11)(q21q23),add(17)(p13)
ROME-005	46,XX,del(2)(p11),t(13;14)(q34;q13),der(18)(t2;18)(p11;q21)[3]/46,del(13)(q12q14)[16]/46,XX[8]
ROME-006	46,XX,del(13)(q14q22)[3]/46,XX,del(11)(q11)[2]/46,XX,del(4)(p16),del(11)(q11),del(13)(q14q22)[2]/46,XX[13]
ROME-007	45,XY,-13,add(17)(p12),add(18)(p11.2)[3]/45,XY,-14,add(17)(p12),add(18)(p11.2)[3]/45,XY,-15,add(17)(p12),add(10)(p11.2)[3]/46,XY,add(18)(p11.2)[48]/46,XY[9]
ROME-008	45,XY,-13,add(17)(p12),add(18)(p11.2)[5]/45,XY,-15,add(17)(p12),add(10)(p11.2)[4]/46,XY[9]
ROME-009	46,XX,der(6)(t6;15)(p25;q15)del(6)(q21q23),der(7)add(7)(q22),dic(11;20)(p15;q13),der(17)add(17)(p11),del(15)(q14)[11]/46,XX[1]
ROME-010	47,XY,del(4)(q21),der(5)(t5;8)(p15;7)ins(8;4)(?;7)(q14;7)(?;7),del(8)(?;7),der(11)(t11;11)(q7;q14),del(13)(q14),+mar[15]
ROME-011	46,XY,t(1;14)(p35;q32)[10]/46,del(8;20)(q;q)[3]/46,del(10;13)(q24;q13)[2]/46,XY[1]
ROME-012	46,XX,t(1;19)(p31;p13.3),del(3)(p23),del(6)(q),del(17)(p13)[9]/46,X,-X,-5,+mar1,+mar2[3]/46,XX[1]
ROME-013	46,XX,t(1;10)(q21;p11),del(14)(q24)(cp16)/45,XX,del(3)(p13),der(6)(t6;13)(q21;q21),-13,del(14)(q24),del(18)(q21)[2]/46,XX[7],nuc ish (5'BC12.3'BC12)x2(5'BC12.3'BC12)x2[100]
ROME-014	46,XX,del(6)(q21q24),der(12)(t1;12)(p31;q24)[17]/46,XX,t(1;17)(p31;p22),add(2)(q37)[3]/46,XX,del(X)(p22),t(1;7)(p31;p22),add(2)(q37),t(13;20)(q14;q13)[4]/46,XX,t(1;7)(p31;p22),add(2)(q37),add(17)(p13)[2]

Figure S1

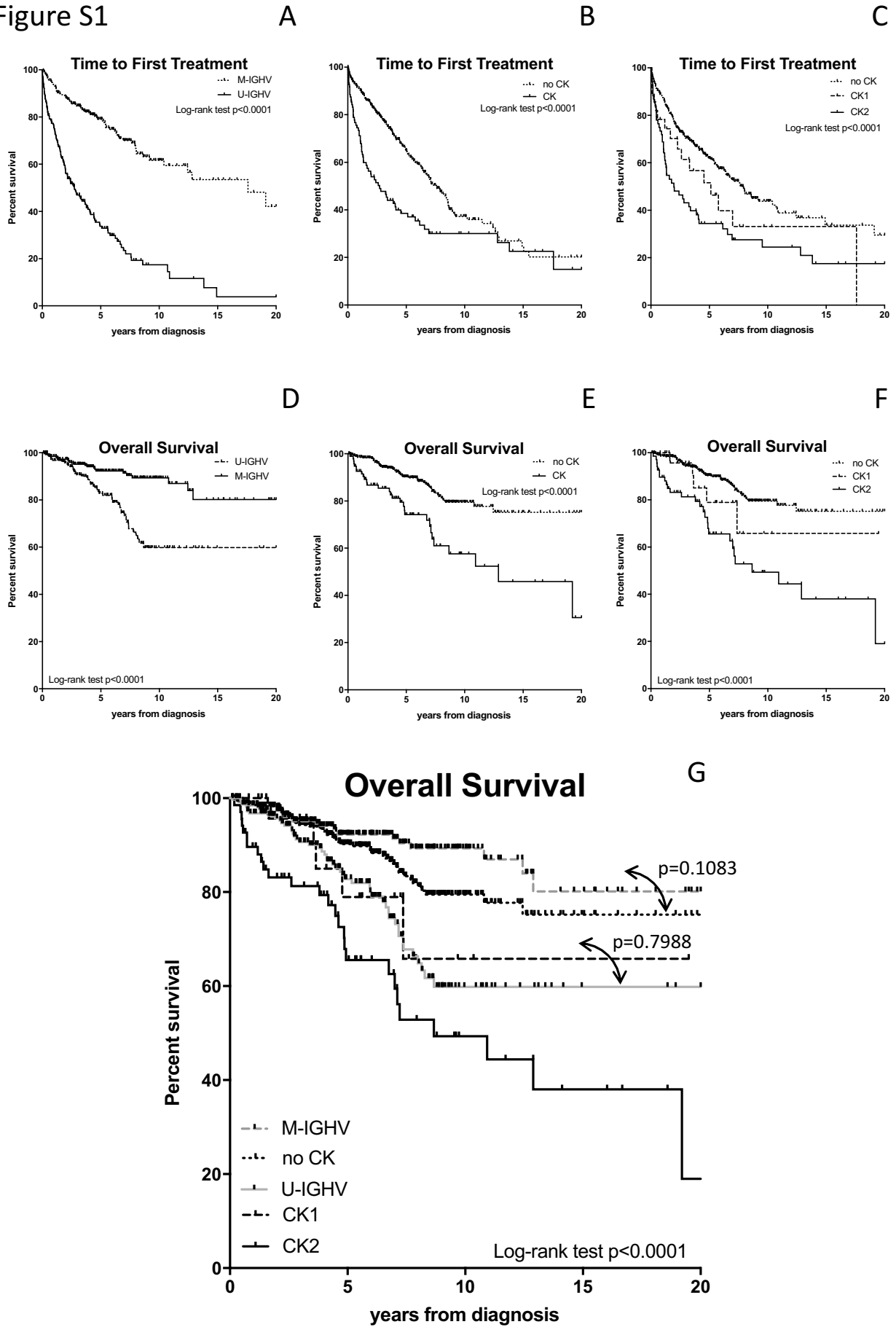
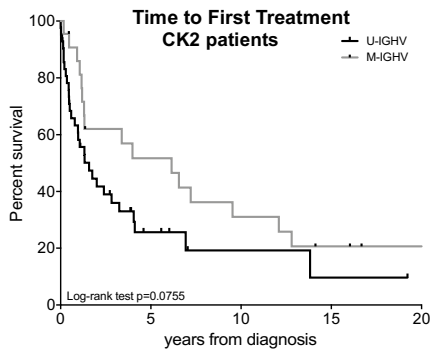
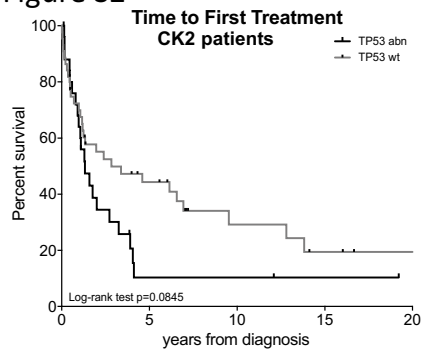
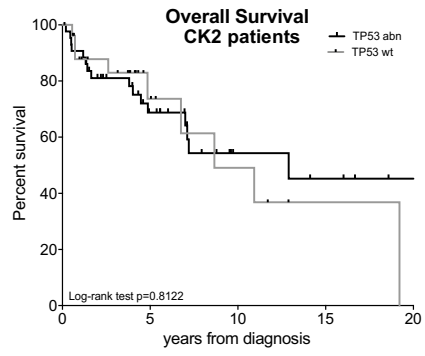


Figure S2

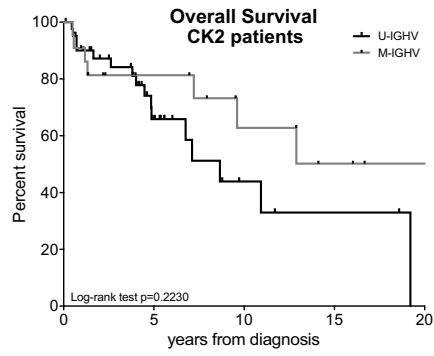


A



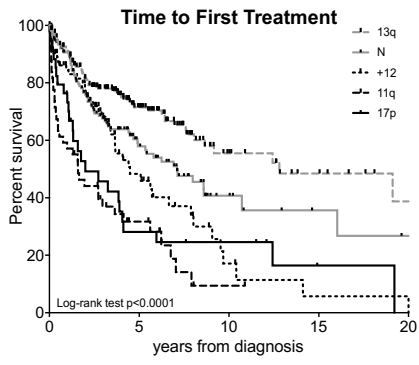
B

C



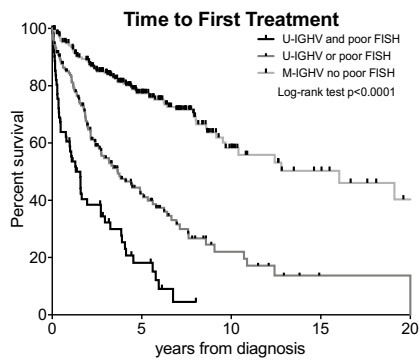
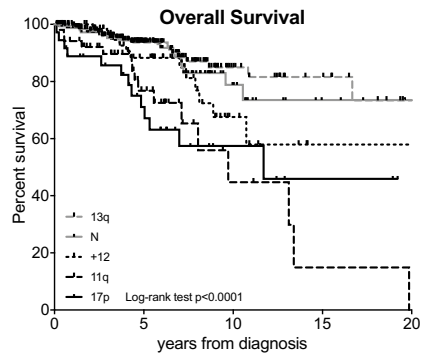
D

Figure S3



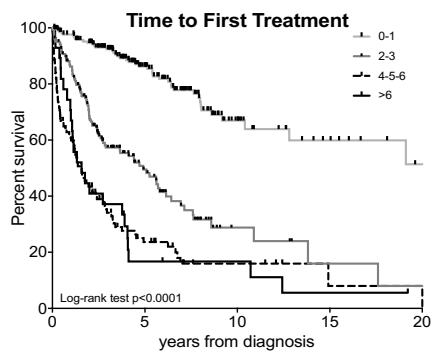
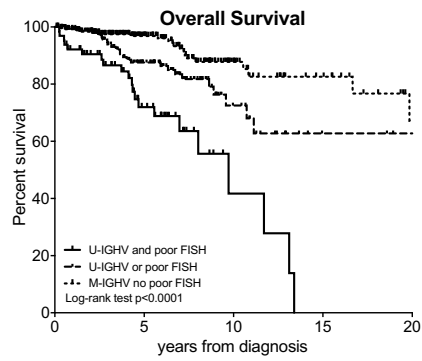
A

B



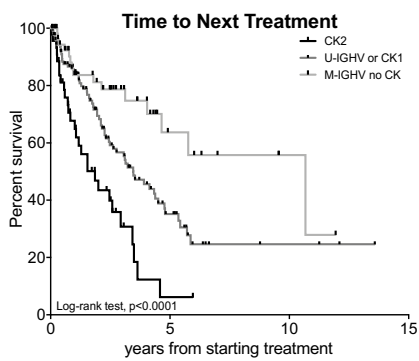
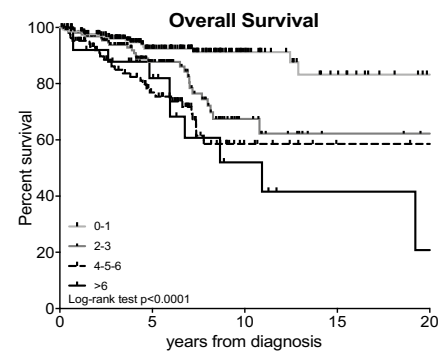
C

D



E

F



G

H

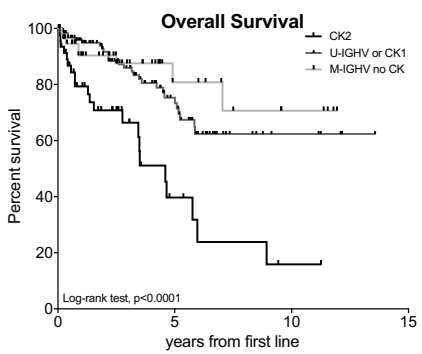
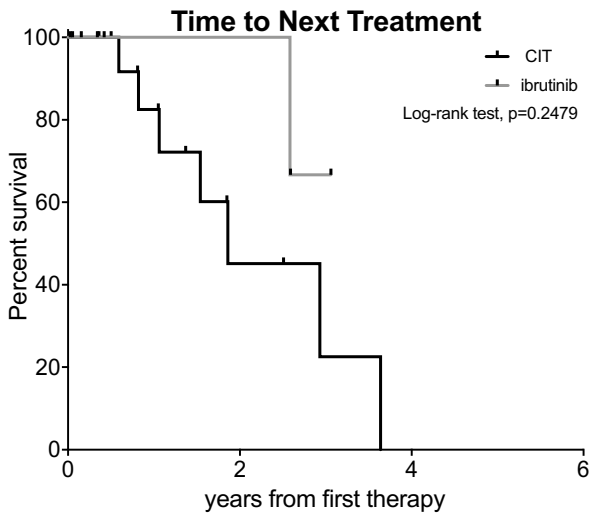


Figure S4

A



B

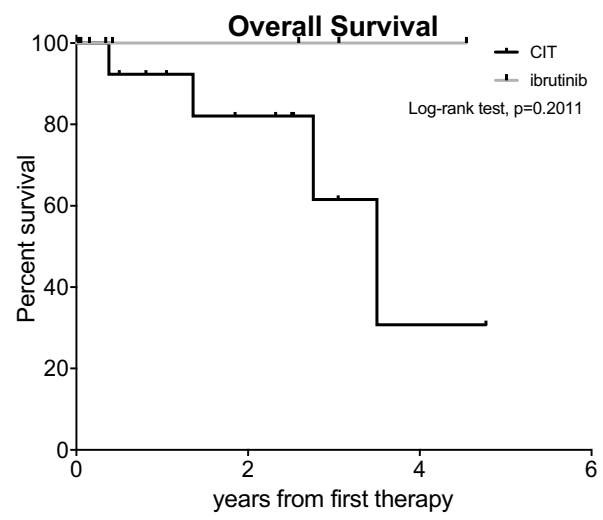
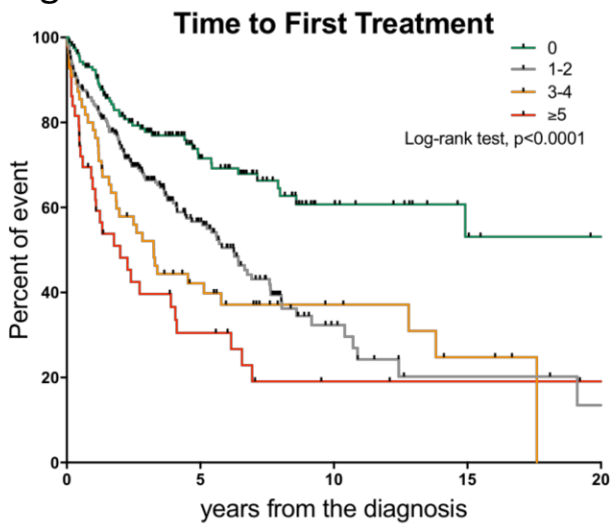
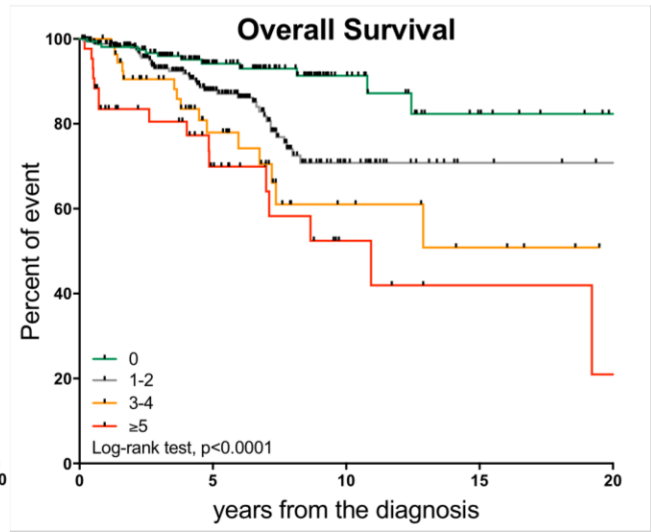


Figure S5

A




B



ALLEGATO 5

In chronic lymphocytic leukaemia, *SLAMF1* deregulation is associated with genomic complexity and independently predicts a worse outcome

Gian Matteo Rigolin,^{1,†}  Elena Saccenti,^{1,2,†} Aurora Melandri,¹ Maurizio Cavallari,¹ Antonio Urso,¹ Francesco Rotondo,¹ Anita Betulla,¹ Lucia Tognolo,¹ Maria Antonella Bardi,¹ Marika Rossini,¹ Elisa Tammiso,¹ Christian Bassi,² Francesco Cavazzini,¹ Massimo Negrini² and Cuneo Antonio¹
¹Hematology Section, Department of Medical Sciences, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Arcispedale S. Anna, University of Ferrara, and ²Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine, and “Laboratorio per le Tecnologie delle Terapie Avanzate” (LTTA), University of Ferrara, Ferrara, Italy

Received 4 April 2020; accepted for publication 16 May 2020

Correspondence: Gian Matteo Rigolin, Hematology Section, Department of Medical Sciences, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Arcispedale S. Anna, University of Ferrara Via Aldo Moro, 8, 44124, Cona, Ferrara, Italy.
 E-mail: rlgmt@unife.it

[†]G.M.R. and E.S. contributed equally to this study.

Key point

In CLL, *SLAMF1* downregulation is strictly associated with genomic complexity and represents an independent predictor of inferior outcome.

Signalling lymphocytic activation molecule family member 1 (*SLAMF1*) is a self-ligand adhesion/co-stimulatory molecule that belongs to a family of nine membrane receptors.¹

In chronic lymphocytic leukaemia (CLL), *SLAMF1* was shown to modulate responses to chemokines and to regulate autophagy¹, while its loss predicted an unfavourable outcome.^{2,3}

In CLL, cytogenetic complexity emerged as an adverse independent prognostic biomarker^{4,5} and for these reasons

Abstract

In a series of 349 patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL), we found lower levels of signalling lymphocytic activation molecule family member 1 (*SLAMF1*) expression in cases with highly complex karyotypes, as defined by the presence of five or more chromosomal abnormalities (CK5; $P < 0.001$) and with major chromosomal structural abnormalities ($P < 0.001$). *SLAMF1* downregulation was significantly associated with advanced Binet Stage ($P = 0.001$), CD38 positivity ($P < 0.001$), high β_2 -microglobulin levels ($P < 0.001$), immunoglobulin heavy chain variable region gene (*IGHV*) unmutated status ($P < 0.001$), 11q deletion ($P < 0.001$), tumour protein p53 (*TP53*) disruption ($P = 0.011$) and higher risk CLL International Prognostic Index categories ($P < 0.001$). Multivariate analysis showed that downregulated *SLAMF1* levels had independent negative prognostic impact on time-to-first treatment ($P < 0.001$) and overall survival ($P < 0.001$).

recent guidelines included conventional karyotyping as a desirable test in the work up of clinical trials.⁶ However, the definition of cytogenetic complexity is still a matter of debate and recent analyses have shown that the highly complex karyotype, as defined by the presence of five or more chromosomal abnormalities (CK5)⁷ and the occurrence of major chromosomal structural abnormalities (MSA)^{8,9}, might identify subsets of very high-risk patients with dismal prognosis.

Recently, a downregulation of *SLAMF1* was found in patients with CLL with complex karyotype and MSA suggesting a possible association with high-risk genomic features.⁸

The aim of the present study was to investigate in a large series of patients with CLL at diagnosis the prognostic

relevance of *SLAMF1* expression and its correlations with cytogenetic findings and genomic features.

Patients and methods

Patients

The study cohort consisted of 349 untreated patients with CLL diagnosed and followed at our centre between 2004 and 2019, as previously described.⁵ All patients were diagnosed and treated according to National Cancer Institute (NCI) criteria.⁶ The study was approved by the local Ethics Committee. Fludarabine or bendamustine containing regimens, with rituximab were used as first-line treatment in fit patients; chlorambucil with rituximab was used in elderly and/or unfit patients according to the treatment policy adopted at our centre. Since 2015, ibrutinib, idelalisib plus rituximab or venetoclax was offered to patients.

Biological studies

Interphase fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), cytogenetics and immunoglobulin heavy chain variable region gene (*IGHV*) sequencing analyses were performed on peripheral blood (PB) samples as described.^{10,11} A karyotype was defined as complex or highly complex in the presence of three or more (CK3) or CK5 chromosome aberrations in the same clone respectively. The following cytogenetic abnormalities were considered as MSA: chromosome additions, derivatives, insertions, duplications, rings, dicentric and marker chromosomes as previously reported.⁸ Mutations of Notch receptor 1 (*NOTCH1*), splicing factor 3b subunit 1 (*SF3B1*), baculoviral IAP repeat containing 3 (*BIRC3*) and tumour protein p53 (*TP53*) genes were analysed by next-generation sequencing analysis using Ion Torrent PGM (Life Technologies, Foster City, CA, USA), as described elsewhere.¹¹

SLAMF1 and droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)

The expression of *SLAMF1* was assessed on PB mononuclear cells with >95% tumour cells within 1 year from diagnosis using the QX200TM ddPCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described.¹² The ddPCR reactions were performed using Taqman Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For each gene one set of primers and a probe were chosen from the Applied Biosystems list of TaqMan® Gene Expression Assays (Hs00234149_m1 for *SLAMF1* and Hs99999903_m1 for β -actin [*ACTB*], as endogenous reference control). Synthesised complementary DNA (cDNA) was diluted 20-fold for *SLAMF1* and 10 000-fold for *ACTB* quantification and assayed according to manufacturer's protocol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A ratio *SLAMF1/ACTB* was finally calculated.

Statistical analysis

The Mann–Whitney test and the Fisher's exact test were applied for quantitative and categorical variables, respectively. Time-to-first treatment (TTFT) was calculated as the interval between diagnosis and the start of first-line treatment. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis until death due to any cause or until the last patient follow-up. Survival curves were compared by the log-rank test. Proportional hazards regression analysis was used to identify the significant independent prognostic variables on TTFT and OS. Statistical analysis was performed using Stata: release 16.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

Results and discussion

Baseline characteristics of this series are presented in Table SI. A CK3 and a CK5 were observed in 37 (11.3%) and 13 patients (4.0%), respectively, while 39 (11.9%) had MSA. In all, 25 (64.1%) and 11 (28.2%) of these 39 patients with MSA presented a CK3 and a CK5, respectively. A lower *SLAMF1* expression (Table SII) was observed in patients with CK3 as compared to patients without CK3 ($P < 0.001$) and in patients with CK5 as compared to those without CK5 ($P < 0.001$). A lower *SLAMF1* expression was also observed in patients with MSA as compared to those without MSA ($P < 0.001$) and in patients with MSA and CK5 as compared to those with MSA without CK5 ($P = 0.018$), while no difference was observed between patients with MSA and CK3 as compared to patients with MSA without CK3.

To further investigate the clinical and biological impact of *SLAMF1* expression, patients were subdivided into tertiles based on the level of *SLAMF1* expression: patients with a *SLAMF1* level ≤ 2.81 were categorised as low-*SLAMF1*, those with a level ≥ 6.24 were considered as high-*SLAMF1*, all the other cases as int-*SLAMF1*.

The three tertiles of patients differed significantly according to known relevant prognostic factors Table SI including: CD38 positivity, high levels of β_2 -microglobulin, *IGHV* unmutated status, 11q deletion and higher risk CLL International Prognostic Index (IPI)¹³ categories. No correlation was found with *NOTCH1*, *SF3B1* and *BIRC3* mutations. In comparison to the int-*SLAMF1* tertile, patients with low-*SLAMF1* levels presented a distinct high-risk genomic and clinical profile with a higher incidence of *TP53* disruption, CK3, CK5, MSA and need of treatment, while patients in the high *SLAMF1* tertile had a lower incidence of advanced Binet Stage. We also found an association between trisomy 12 and a low level of *SLAMF1*, supporting the idea that *SLAMF1* downregulation might concur, along with myeloid differentiation primary response protein MyD88 (*MYD88*) and ATM serine/threonine kinase (*ATM*) mutations or insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) expression, to identify subset of these patients with a worse outcome.¹⁴

Table I. Univariate and multivariate analyses for TTFT and OS.

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis Model 1		Multivariate analysis Model 2	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
TTFT						
CLL IPI high–very high	2.61 (2.19–3.12)	<0.001	2.43 (2.01–2.95)	<0.001	2.51 (2.08–3.04)	<0.001
CK5	6.52 (3.53–12.06)	<0.001	1.44 (0.72–2.86)	0.304	1.76 (0.89–3.49)	0.105
Low <i>SLAMF1</i>	3.16 (2.29–4.35)	<0.001	2.27 (1.61–3.21)	<0.001	–	–
Low–int <i>SLAMF1</i>	2.96 (2.01–4.37)	<0.001	–	–	2.50 (1.65–3.77)	<0.001
OS						
CLL IPI high–very high	2.23 (1.81–2.75)	<0.001	2.07 (1.64–2.60)	<0.001	2.03 (1.62–2.55)	<0.001
CK5	4.89 (2.34–8.24)	<0.001	1.15 (0.55–2.43)	0.707	1.29 (0.62–2.68)	0.489
Low <i>SLAMF1</i>	2.58 (1.76–3.80)	<0.001	1.79 (1.17–2.76)	0.008	–	–
Low–int <i>SLAMF1</i>	3.27 (1.98–5.39)	<0.001	–	–	2.77 (1.57–4.88)	<0.001

CI, confidence interval; CK5, five or more chromosomal abnormalities; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; HR, hazard ratio; IPI, International Prognostic Index; OS, overall survival; *SLAMF1*, signalling lymphocytic activation molecule family member 1; TTFT, time-to-first treatment.

In univariate analysis, lower levels of *SLAMF1* were significantly associated with a worse TTFT ($P < 0.001$, Table I, Fig 1A) and with a worse OS ($P < 0.001$, Table I and Fig 1B). An inferior TTFT and OS were also associated with higher-risk CLL IPI prognostic scores and the CK5 that was recently identified as the most relevant independent prognostically adverse cytogenetic biomarker.⁷

Given the distinct genetic features, we considered low-*SLAMF1* cases as an independent subgroup in multivariate analysis, while int- and high-*SLAMF1* cases were merged into one subgroup. Interestingly, multivariate analysis showed that low-*SLAMF1* levels confirmed their negative prognostic impact on TTFT and OS, independently of high-risk CLL IPI, while in this model, the CK5 did not retain statistical significance. We also evaluated an alternative model by merging low- and int-*SLAMF1* cases. In this second model, the negative prognostic impact on TTFT and OS of lower levels of *SLAMF1* was confirmed, independently of high-risk CLL IPI, while the CK5 did not retain statistical significance.

These observations may have relevant practical and clinical implications. The strict correlation between low *SLAMF1* levels, cytogenetic complexity and high-risk genetic features suggests that *SLAMF1* could represent a marker that may surrogate genomic complexity when cytogenetic analysis is not possible or is not available. Moreover, in contrast to cytogenetic analysis, *SLAMF1* levels can be evaluated by relatively simple, reproducible and affordable techniques including ddPCR and flow cytometry, as previously reported.³ In this analysis *SLAMF1* expression demonstrated to be more informative and efficient than conventional cytogenetics for risk assessment. In line with a recent large retrospective analysis on 5290 patients with CLL,⁷ by cytogenetics only 4% and 11.2% our patients had CK5 and CK3, respectively, which means that 20 or 10 karyotypic analyses should be performed to identify one patient with a CK5 or CK3 respectively. By contrast a lower *SLAMF1* expression showed a very

significant and independent prognostic impact in nearly one-third of patients in a multivariate model including CLL IPI and CK5. However, further studies are needed to define the best and most relevant cut-off for clinical applications. Of interest is also the observation that patients with int-*SLAMF1* levels showed an intermediate outcome (Fig 1), possibly correlated with an intermediate level of high-risk genomic characteristics including 11q deletion and *IGHV* mutational status, without cytogenetic features of complexity (Table SI). It is also noteworthy that *SLAMF1* levels were associated with response to therapeutic agents.¹ A downregulated *SLAMF1*, by modulating the genetic pathways that regulate chemotaxis and autophagy, may render CLL cells potentially unresponsive to autophagy-inducing drugs, including B-cell leukaemia/lymphoma 2 (BCL-2) inhibitors.³ If confirmed in prospective analyses, these observations could be of clinical utility to predict response in patients requiring the BCL-2 inhibitor venetoclax, which, as recently described, has similar efficacy in cases with and without complex karyotype.¹⁵

In conclusion, our present data support *SLAMF1* level determination as a simple, reliable and cost-effective biomarker with potential prognostic and predictive significance to be tested in larger series of patients, particularly in the era of new agents.

Acknowledgements

This work was supported by the Fondo di Ateneo per la Ricerca (FAR) 2017, 2018, 2019 of the University of Ferrara (Gian Matteo Rigolin, Cuneo Antonio, Francesco Cavazzini), Fondo di Incentivazione alla Ricerca (FIR) 2017 (Gian Matteo Rigolin), Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca PRIN 2015 (Cuneo Antonio; project 2015ZMRFEA), BEAT Leukemia Foundation Milan Italy (Cuneo Antonio), Gilead Fellowship Award 2018 (Gian Matteo Rigolin) and AIL Ferrara.

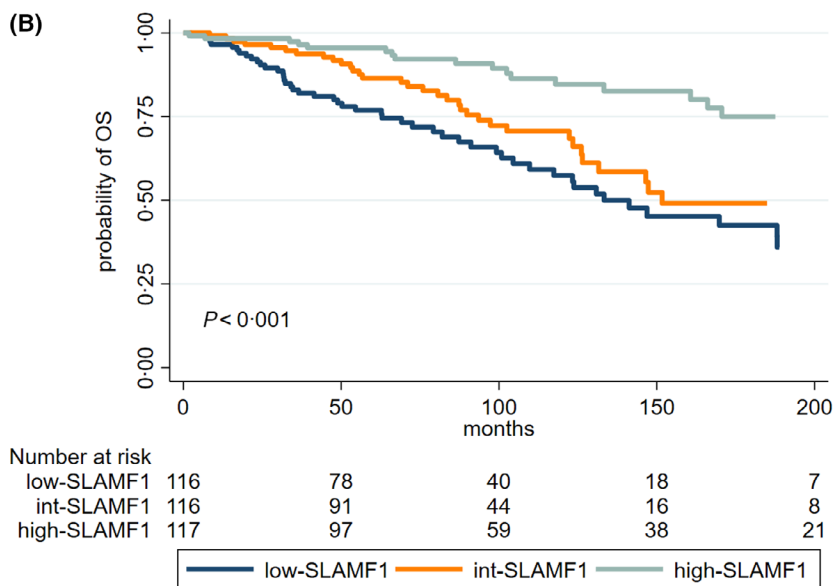
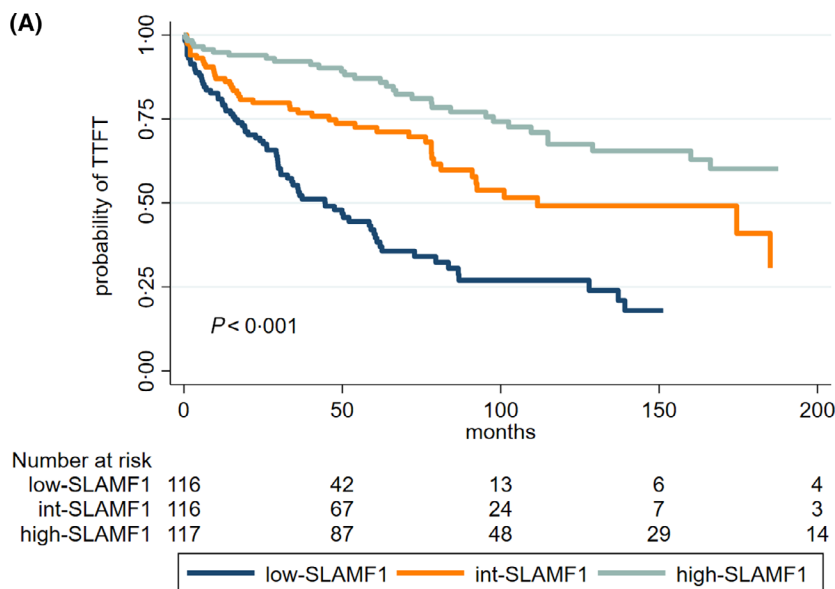


Fig 1. Time-to-first treatment (TTFT) (A) and overall survival (OS) (B) according to signalling lymphocytic activation molecule family member 1 (*SLAMF1*) levels. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Author contributions

Gian Matteo Rigolin, Elena Saccenti, Massimo Negrini and Cuneo Antonio conceived and designed the study; Gian Matteo Rigolin, Maurizio Cavallari, Antonio Urso, Francesco Rotondo, Anita Betulla, Lucia Tognolo and Francesco Cavazzini acquired data and provided patient follow-up; Aurora Melandri, Maria Aantonella Bardi, Elisa Tammissio, Elena Saccenti, Massimo Negrini, Christian Bassi and Marika Rossini performed cytogenetic and molecular analyses; Gian Matteo Rigolin, Elena Saccenti and Cuneo Antonio analysed and interpreted data; and all of the authors contributed to the writing, approval and review of the manuscript.

Conflict of interest

Research funding from Gilead (G.M.R.). The other authors have no competing interests.

Supporting Information

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

Table SI. Clinical and biological characteristics and correlations with *SLAMF1* levels.

Table SII. *SLAMF1* levels according to cytogenetic subgroups.

References

1. Bologna, C, Deaglio S. Linking SLAMF1 to autophagy and sensitivity to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cell Oncol.* 2018;5:e1143077.
2. Schweighofer, CD, Coombes KR, Barron LL, Diao L, Newman RJ, Ferrajoli A, et al. A two-gene signature, SKI and SLAMF1, predicts time-to-treatment in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2011;6:e28277.
3. Bologna, C, Buonincontri R, Serra S, Vaisitti T, Audrito V, Brusa D, et al. SLAMF1 regulation of chemotaxis and autophagy determines CLL patient response. *J Clin Invest.* 2016;126:181–94.
4. Baliakas, P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol.* 2014;89:249–55.
5. Rigolin, GM, Cavallari M, Quaglia FM, Formigaro L, Lista E, Urso A, et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood.* 2017;129:3495–8.
6. Hallek, M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 2018;131:2745–60.
7. Baliakas, P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood.* 2019;133:1205–16.
8. Rigolin, GM, Saccenti E, Guardalben E, Cavallari M, Formigaro L, Zagatti B, et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. *Br J Haematol.* 2018;181:229–33.
9. Visentin, A, Bonaldi L, Rigolin GM, Mauro FR, Martines A, Frezzato F, et al. The combination of complex karyotype subtypes and IGHV mutational status identifies new prognostic and predictive groups in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer.* 2019;121:150–6.
10. Rigolin, GM, del Giudice I, Formigaro L, Saccenti E, Martinelli S, Cavallari M, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015;54:818–26.
11. Rigolin, GM, Saccenti E, Bassi C, Lupini L, Quaglia FM, Cavallari M, et al. Extensive next-generation sequencing analysis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis: clinical and biological correlations. *J Hematol Oncol.* 2016;9:88.
12. Raponi, S, Del Giudice I, Marinelli M, Wang J, Cafforio L, Ilari C, et al. Genetic landscape of ultra-stable chronic lymphocytic leukemia patients. *Ann Oncol.* 2018;29:966–72.
13. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2016;17:779–90.
14. Autore, F, Strati P, Laurenti L, Ferrajoli A. Morphological, immunophenotypic, and genetic features of chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12: a comprehensive review. *Haematologica.* 2018;103:931–8.
15. Al-Sawaf, O, Lilienweiss E, Bahlo J, Robrecht S, Fink AM, Patz M, et al. High efficacy of venetoclax plus obinutuzumab in patients with complex karyotype and chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2020;135:866–70.

Short report

In chronic lymphocytic leukaemia, *SLAMF1* deregulation is associated with genomic complexity and independently predicts a worse outcome.

Supplemental table 1. Clinical and biological characteristics and correlations with *SLAMF1* levels.

variable	N (%)	<i>SLAMF1</i> N (%)			p	<i>SLAMF1</i>	<i>SLAMF1</i>
		low	intermediate	high		int vs high	int vs low
Age ≤ 65/> 65 years	167/182 (47.8/52.2)	52/64 (44.8/51.2)	56/60 (48.3/51.7)	59/58 (50.4/49.6)	0.685	0.794	0.693
Gender M/F	207/142 (59.3/40.7)	71/45 (61.2/38.8)	69/47 (59.5/40.5)	67/50 (57.3/42.7)	0.847	0.791	0.893
Binet stage A/B-C	284/65 (81.4/18.6)	85/31 (73.3/26.7)	92/24 (79.3/20.7)	107/10 (91.5/8.5)	0.001	0.010	0.354
CD38 neg/pos§	214/134 (61.5/38.5)	44/71 (38.3/61.7)	76/40 (65.5/34.5)	94/23 (80.3/19.7)	<0.001	0.012	<0.001
b2m >3.5 mg/L no/yes	268/79 (77.2/22.8)	73/43 (62.9/37.1)	90/24 (78.9/21.1)	105/12 (89.7/10.3)	<0.001	0.029	0.009
<i>IGHV</i> mut/unmut	203/136 (59.9/40.1)	37/78 (32.2/67.8)	68/41 (62.4/37.6)	98/17 (85.2/14.8)	<0.001	<0.001	<0.001
Normal FISH yes/no	104/245 (29.8/70.2)	26/90 (22.4/77.6)	35/81 (30.2/69.8)	43/74 (36.8/63.2)	0.058	0.332	0.233
13q14 deletion yes/no	185/164 (53.0/47.0)	52/64 (44.8/55.2)	66/50 (56.9/43.1)	67/50 (57.3/42.7)	0.104	1.000	0.088
Trisomy 12 yes/no	64/285 (18.3/81.7)	37/79 (31.9/68.1)	17/99 (14.7/85.3)	10/107 (8.6/91.4)	<0.001	0.158	0.003
11q22 deletion yes/no	30/329 (8.6/91.4)	22/94 (19.0/81.0)	8/108 (6.9/93.1)	0/117 (0.0/100.0)	<0.001	0.003	0.010
<i>TP53</i> disruption* yes/no	21/327 (6.0/94.0)	13/103 (11.2/88.8)	2/114 (1.7/98.3)	6/110 (5.2/94.8)	0.011	0.280	0.006
CK3 yes/no	37/291 (11.3/88.7)	22/90 (19.6/80.4)	9/101 (8.2/91.8)	6/100 (5.7/94.3)	0.002	0.595	0.019
CK5 yes/no	13/315 (4.0/96.0)	11/101 (9.8/90.2)	0/110 (0.0/100.0)	2/104 (1.9/98.1)	<0.001	0.240	0.001
MSA yes/no	39/289 (11.9/88.1)	27/85 (24.1/75.9)	6/104 (5.5/94.5)	6/100 (5.7/94.3)	<0.001	1.000	<0.001
CLL IPI low/int/high very high	168/107/68 (48.9/31.2/19.8)	28/44/43 (24.3/38.3/37.4)	56/42/15 (49.5/37.2/13.3)	84/21/10 (73.0/18.3/8.7)	<0.001	0.001	<0.001
<i>NOTCH1</i> mut/wt	17/211 (7.5/92.5)	7/68 (9.3/90.7)	5/75 (6.3/93.7)	5/68 (6.9/93.1)	0.815	1.000	0.555
<i>SF3B1</i> mut/wt	14/214 (6.1/93.9)	6/69 (8.0/92.0)	6/74 (7.5/92.5)	2/71 (2.7/97.3)	0.330	0.280	1.000
<i>BIRC3</i> mut/wt	9/219 (3.9/96.1)	3/72 (4.0/96.0)	4/76 (5.0/95.0)	2/71 (2.7/97.3)	0.912	0.683	1.000
Treatment yes/no	156/193 (44.7/55.3)	78/38 (67.2/32.8)	45/71 (38.8/61.2)	33/84 (28.2/71.8)	<0.001	0.407	<0.001

Legend: MSA, major structural abnormalities; CK3, complex karyotype with ≥ 3 cytogenetic abnormalities; CK5, complex karyotype with ≥ 5 cytogenetic abnormalities

*17p13 deletion and/or *TP53* mutation

§ cut off 30%

Supplemental table 2. *SLAMF1* levels according to cytogenetic subgroups.

	Median value	Range	p	
CLL with CK3 (n=37)	1.87	0.24-13.29		
CLL without CK3 (n=291)	4.14	0.08-31.13	<0.001	
CLL with CK5 (n=13)	1.05	0.26-9.42		
CLL without CK5 (n=315)	4.05	0.08-31.13	<0.001	
CLL with MSA (n=39)	1.63	0.24-21.23		
CLL without MSA (n=289)	4.18	0.08-31.13	<0.001	
CLL with MSA and CK3 (n=25)	1.54	0.24-13.29		
CLL with MSA without CK3 (n=14)	1.97	0.84-21.23	0.193	
CLL with MSA and CK5 (n=11)	2.36	0.24-21.23		
CLL with MSA without CK5 (n=28)	1.05	0.26-7.72	0.018	

Legend:

MSA, major structural abnormalities:

CK3, complex karyotype with ≥ 3 cytogenetic abnormalities:

CK5, complex karyotype with ≥ 5 cytogenetic abnormalities.

ALLEGATO 6

ORIGINAL RESEARCH

Efficacy of bendamustine and rituximab in unfit patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia. Indirect comparison with ibrutinib in a real-world setting. A GIMEMA-ERIC and US study

Antonio Cuneo¹ | Anthony R. Mato²  | Gian Matteo Rigolin^{1*}  | Alfonso Piciocchi³ | Massimo Gentile⁴ | Luca Laurenti⁵ | John N. Allan⁶ | John M. Pagel⁷ | Danielle M. Brander⁸ | Brian T. Hill⁹ | Allison Winter⁹  | Nicole Lamanna¹⁰ | Constantine S. Tam¹¹ | Ryan Jacobs¹² | Frederick Lansigan¹³  | Paul M. Barr¹⁴ | Mazyar Shadman¹⁵ | Alan P. Skarbnik¹⁶ | Jeffrey J. Pu¹⁷  | Alison R. Sehgal¹⁸ | Stephen J. Schuster¹⁹ | Nirav N. Shah²⁰  | Chaitra S. Ujjani¹⁵ | Lindsey Roeker² | Ester Maria Orlandi²¹ | Atto Billio²² | Livio Trentin²³ | Martin Spacek²⁴ | Monia Marchetti²⁵  | Alessandra Tedeschi²⁶ | Fiorella Ilariucci²⁷ | Gianluca Gaidano²⁸ | Michael Doubek²⁹ | Lucia Farina³⁰ | Stefano Molica³¹  | Francesco Di Raimondo³² | Marta Coscia³³ | Francesca Romana Mauro³⁴  | Javier de la Serna³⁵ | Angeles Medina Perez³⁶ | Isacco Ferrarini³⁷ | Giuseppe Cimino³⁸ | Maurizio Cavallari¹ | Rosalba Cucci³ | Marco Vignetti³ | Robin Foà³⁴ | Paolo Ghia³⁹ | the GIMEMA, European Research Initiative (ERIC) on CLL, US study group

¹Hematology, Department of Medical Sciences, St. Anna University Hospital, Ferrara, Italy

²Division of Hematological Oncology, CLL Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

³Italian Group for Adult Hematologic Diseases (GIMEMA), Data Center and Health Outcomes Research Unit, Rome, Italy

⁴Department of Onco-Hematology, Hematology Unit, A.O. of Cosenza, Cosenza, Italy

⁵Department of Radiological, Radiotherapeutic and Hematological Sciences, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Rome, Italy

⁶Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA

⁷Center for Blood Disorders and Stem Cell Transplantation, Swedish Cancer Institute, Seattle, WA, USA

⁸Division of Hematologic Malignancies and Cellular Therapy, Duke University, Durham, NC, USA

⁹Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA

¹⁰Columbia University Medical Center, New York, NY, USA

¹¹Peter McCallum Cancer Centre, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia

¹²Department of Hematologic Oncology and Blood Disorders, Levine Cancer Institute, Carolinas Healthcare System, Charlotte, NC, USA

¹³Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH, USA

¹⁴Wilmot Cancer Institute, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA

Antonio Cuneo, Anthony R. Mato and Gian Matteo Rigolin contributed equally.

Robin Foà and Paolo Ghia contributed equally.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Cancer Medicine* published by John Wiley & Sons Ltd.

- ¹⁵Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle Cancer Care Alliance, Seattle, WA, USA
- ¹⁶Lymphoproliferative Disorders Program, Novant Health Cancer Institute, Charlotte, NC, USA
- ¹⁷SUNY Upstate Medical University, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY, USA
- ¹⁸University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA
- ¹⁹Division of Hematology and Oncology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA
- ²⁰Division of Hematology & Oncology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA
- ²¹Hematology Unit, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy
- ²²Hematology and Transplant Unit, San Maurizio Hospital, Azienda Sanitaria dell'Alto Adige, Bolzano, Italy
- ²³Hematology and Clinical Immunology, Department of Medicine, University of Padua, Padua, Italy
- ²⁴Department of Medicine, Department of Hematology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic
- ²⁵Oncology Unit, Cardinal Massaia Hospital, Asti, Italy
- ²⁶Hematology, Niguarda Cancer Center, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan, Italy
- ²⁷Hematology, Azienda USL-IRCCS, Reggio Emilia, Italy
- ²⁸Division of Hematology, Department of Translational Medicine, University of eastern Piedmont, Novara, Italy
- ²⁹Department of Internal Medicine - Hematology and Oncology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic
- ³⁰Hematology Department, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano, Italy
- ³¹Hematology Unit, A. Pugliese Hospital, Azienda Ospedaliera Pugliese Ciaccio, Catanzaro, Italy
- ³²Catania Università di Catania, Cattedra di Ematologia, Catania, Italy
- ³³Division of Hematology, A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino and Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, University of Torino, Torino, Italy
- ³⁴Hematology, Department of Translational and Precision Medicine, "Sapienza" University, Rome, Italy
- ³⁵Hematology Unit, Hospital Universitario, Madrid, Spain
- ³⁶Hospital Costa del Sol, Marbella, Spain
- ³⁷Hematology, Department of Cell Therapy and Hematology, University Hospital, Verona, Italy
- ³⁸Department of Translational and Precision Medicine, University "La Sapienza", UOC di Ematologia con Trapianto, Ospedale S. Maria Goretti, Latina, Italy
- ³⁹Strategic Research Program on CLL, Division of Experimental Oncology, IRCCS Ospedale San Raffaele, Università Vita-Salute San Raffaele, Milan, Italy

Correspondence

Antonio Cuneo, Hematology, Department of Medical Sciences, St. Anna University Hospital, via Aldo Moro, 8 44124, Ferrara, Italy.

Email: cut@unife.it

Funding information

Ricerca Finalizzata, Grant/Award Number: RF-2011-02349712; Ministero della Salute, Grant/Award Number: 2015 ZMRFEA_004; Ministry of Health, Grant/Award Number: VFN64165

Abstract

Limited information is available on the efficacy of front-line bendamustine and rituximab (BR) in chronic lymphocytic leukemia (CLL) with reduced renal function or coexisting conditions. We therefore analyzed a cohort of real-world patients and performed a matched adjusted indirect comparison with a cohort of patients treated with ibrutinib. One hundred and fifty-seven patients with creatinine clearance (CrCl) <70 mL/min and/or CIRS score >6 were treated with BR. The median age was 72 years; 69% of patients had ≥ 2 comorbidities and the median CrCl was 59.8 mL/min. 17.6% of patients carried TP53 disruption. The median progression-free survival (PFS) was 45 months; TP53 disruption was associated with a shorter PFS ($P = 0.05$). The overall survival (OS) at 12, 24, and 36 months was 96.2%, 90.1%, and 79.5%, respectively. TP53 disruption was associated with an increased risk of death ($P = 0.01$). Data on 162 patients ≥ 65 years treated with ibrutinib were analyzed and compared with 165 patients ≥ 65 years treated with BR. Factors predicting for a longer PFS at multivariable analysis in the total patient population treated with BR and ibrutinib were age (HR 1.06, 95% CI 1.02-1.10, $P < 0.01$) and treatment with ibrutinib (HR 0.55, 95% CI 0.33-0.93, $P = 0.03$). In a post hoc analysis of patients in advanced

stage, a significant PFS advantage was observed in patient who had received ibrutinib ($P = 0.03$), who showed a trend for OS advantage ($P = 0.08$). We arrived at the following conclusions: (a) BR is a relatively effective first-line regimen in a real-world population of unfit patients without TP53 disruption, (b) ibrutinib provided longer disease control than BR in patients with advanced disease stage.

KEYWORDS

bendamustine, chronic lymphocytic leukemia, ibrutinib, real-world analysis, unfit patients

1 | INTRODUCTION

With 20,720 estimated new cases and 3930 deaths in 2019 in the United States, chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent leukemia in western countries.¹ Because the median age at diagnosis is around 70 years and many patients carry one or more comorbidities, the most effective chemoimmunotherapy (CIT) regimen, fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR), cannot be safely administered, thus making other options like a combination of the anti CD20 monoclonal antibody rituximab with bendamustine (BR) or chlorambucil² a widely employed therapeutic strategy in the clinical practice. The efficacy and safety of these combinations in the front-line setting have been documented in phase-2 and phase-3 trials including fit patients randomized to either FCR or BR,³⁻⁵ or patients deemed ineligible for fludarabine due to coexisting conditions and/or reduced renal function who were treated with chlorambucil and anti CD20 monoclonal antibodies.⁶⁻¹⁰ The BR combination was also tested in a limited number of patients not deemed fit to receive fludarabine-based regimens at physician's discretion⁹ and in older patients with preserved or moderately impaired renal function.¹¹

In recent years, evidence has been provided that a longer progression-free survival (PFS) can be achieved with ibrutinib than with CIT in previously untreated CLL¹⁰⁻¹² and expert opinions recommended ibrutinib upfront, especially in older patients with CLL and in younger patients with TP53 disruption or less favorable unfavorable immunogenetic characteristics, that is, unmutated configuration of the variable portion of the immunoglobulin (*IGHV*) gene.¹³⁻¹⁵

Interestingly, an observational study of CIT in the "real-world" setting showed that these regimens may prove safe and effective,¹⁶⁻¹⁸ even though dose reductions may occur commonly in clinical practice and may impact on outcome.¹⁹ Likewise, the rates of ibrutinib discontinuation and survival are likely to be worse in a real-world setting than in a clinical trial possibly due to inclusion of patients with poorer performance status and more comorbidities.²⁰⁻²² A matched-adjusted indirect comparison of patients who had received BR or ibrutinib as first salvage treatment outside of clinical trials showed no OS difference.¹⁷

Because limited information is available on the efficacy and safety of BR in unfit patients, we analyzed the efficacy of this regimen in a cohort treated outside clinical trials and we carried out an indirect comparison with a cohort of older patients treated with ibrutinib front-line in a real-world setting.²³

2 | METHODS

2.1 | Patients

The patients included in this report were retrospectively selected as outlined below from a cohort of patients treated front-line with BR between 2008 and 2014 at GIMEMA and European Research Initiative on CLL (ERIC) centers and from a cohort of CLL patients treated front-line with ibrutinib at 20 community and academic US centers.^{16,22}

2.2 | BR regimen in unfit CLL

Inclusion criteria in this analysis were (a) CLL progression according to the NCI criteria²⁴ (b) no previous treatment for CLL, (c) creatinine clearance <70 mL/min and/or CIRS > 6 , that is unfit patients as previously defined,⁶ (d) and received at least 1 day of treatment with the BR regimen.²⁵ Patients were excluded from the study if they had transformation of CLL into Richter's syndrome before starting treatment, known HIV infection, active and uncontrolled HCV and/or HBV infections. Treatment response and disease progression were assessed according to the NCI criteria.²⁴ The primary endpoint was 12-month progression-free survival (PFS). Secondary endpoints were overall response rate (ORR), time to next anti-leukemic treatment (TTNT), and overall survival (OS) as previously defined.¹⁷ Safety data were reported according to the NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0. The study was registered at ClinicalTrials.gov (NCT02491398). The study was approved by the institutional review board of each participating institution.

2.3 | Indirect comparison with ibrutinib

For the purpose of this analysis, we retrieved pertinent data by reviewing clinical charts, electronic medical records, and related databases in patients ≥ 65 years enrolled in the GIMEMA ERIC study who had received BR in first line and in patients ≥ 65 years of a US study who had received single agent ibrutinib.²² The patients with del(17p) or *TP53* mutations were excluded. The endpoints for this analysis were the PFS and OS.

2.4 | Statistical analysis

The analyses were performed following the intention-to-treat principle as previously described.¹⁷ All analyses were performed using the SAS software (version 9.4 or later); all tests were two-sided, at a significance level of 0.05. Study data were collected and managed using REDCap electronic data capture tools.²⁶ The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

3 | RESULTS

3.1 | Treatment with BR in unfit patients

One hundred fifty-seven patients treated at 31 centers (24 GIMEMA centers and 7 ERIC centers) were included. The demographic data at baseline have been outlined in Table 1. The median age was 72 years; 80.9% of patients was >65 years; 69.2% had 2 or more comorbidities, the median creatinine clearance was 59.8 mL/min and 58.9% had Binet stage B-C. Fifty-one percent (data available in 56.7% of the patients) had an unmutated *IGHV* gene configuration, 17.6% carried 17p- and/or *TP53* mutation (data available in 83.4% of the patients).

One hundred and fourteen of 157 patients (73.1%) received the planned number of cycles; treatment was discontinued as a result of toxicity in 18% patients ($n = 28$), withdrawal of consent in 2% ($n = 3$), or other reasons in 7% ($n = 11$). The number of cycles actually administered to patients who discontinued treatment was ≥ 4 in 71% of cases. The starting dose of bendamustine was 90 mg/m² in 45.8% of the patients, 70 mg/m² in 33.1% of the patients and 50-70 mg/m² in 21.1% of the patients. A dose reduction $>10\%$ of the planned dose of bendamustine was recorded in 24.2% of cases; treatment delay occurred in 22.9% of patients.

Second-line treatment was offered at symptomatic progression according to local guidelines.

3.2 | Efficacy

The ORR to BR was 91.7%. The probability of attaining a response was significantly lower in patients with del(17p)/*TP53*

TABLE 1 Baseline characteristics of 157 patients in the bendamustine and rituximab (BR) cohort

Variable (n. of patients)	N. of patients (%)
age $\leq 65/>65$ years ($n = 157$)	30 (19.1)/127 (80.9)
median age (range) ($n = 157$)	72.5 (39-89)
stage ^a early/intermediate-advanced ($n = 129$)	53 (41.1)/76 (58.9)
gender male/female ($n = 157$)	95 (60.5)/62 (39.5)
ECOG PS 0/1/ ≥ 2 ($n = 154$)	68 (43.3)/70 (44.6)/ 16 (10.2)
N. of comorbidities 0-1/ ≥ 2 ($n = 156$)	48 (30.8)/108 (69.2)
Median Cr Cl ml/min (range) ($n = 157$)	59.8 (22.0–137.0)
beta 2 microglobulin $\geq 3.5/<3.5$ mg/L ($n = 113$)	94 (83.2)/19 (16.8)
<i>IGHV</i> Mutated/Unmutated ($n = 89$)	44 (49.4)/45 (50.6)
17p- and/or <i>TP53</i> mutated yes/no ($n = 131$)	23 (17.6)/108 (82.4)
FISH abns 13q-/+12/11q-/17p-/normal ($n = 111$)	34 (30.6)/24 (21.6)/10 (9.0)/7 (6.3)/36 (32.4)

Note: Legend: ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; Cr Cl, Creatinine clearance.

^aEarly: Binet A.

mutations as compared to patients without del(17p)/*TP53* mutations (50% vs 85.1%, $P = 0.02$). Other variables had no significant impact on the ORR (Table S2).

The median PFS was 45 months (Figure 1(A)), with a 12-month PFS rate of 93% (95% CI 89.0%-97.1%). The estimated PFS at 24 and at 36 months were 81% (95% CI 74.5%-88.2%) and 66.8% (95% CI 74.5%-88.2%), respectively. Factors associated with a shorter PFS in univariate analysis were represented by del(17p)/*TP53* mutations, ECOG performance status and by the presence of 2 or more comorbidities, as shown in Table 2, whereas an intermediate/advanced stage and an *IGHV*-unmutated status were of borderline significance. Age (cut-off 65 years) and other clinicobiologic parameters had no impact on PFS. del(17p)/*TP53* mutations represented the only adverse parameter in multivariable analysis (Table 2, Figure 1(B)).

A second-line treatment was administered to 3.2% (95% CI 1.2%-6.9%), 8.3% (95% CI 4.3%-13.9%), and 21.5% (95% CI 13.1%-31.1%) of patients at 12, 24, and 36 months, respectively (Figure S1). A shorter TTNT was associated with del(17p)/*TP53* mutation ($P < 0.01$; Table S2).

The OS at 12, 24, and 36 months were 96.2% (95% CI 93.2%-99.2%), 90.1% (95% CI 85.0%-95.5%), and 79.5% (95% CI 70.0%-90.5%), respectively, with a median OS that was not reached with a 26-month median follow-up (Figure 2). The presence of del(17p)/*TP53* mutation ($P < 0.01$) and lack of response to treatment ($P < 0.01$) were associated with a shorter OS in univariate as well as

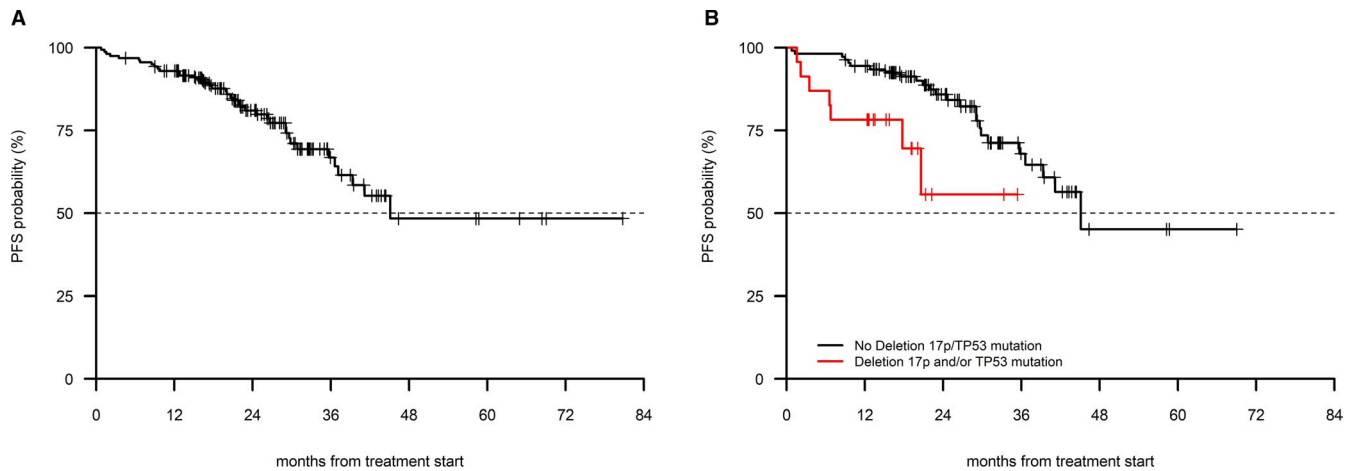


FIGURE 1 PFS in 157 patients treated with BR (A) in the entire cohort, (B) in patients with and without 17p-/TP53 mutation

TABLE 2 Progression-free survival (PFS): univariate and multivariate analyses in the bendamustine and rituximab (BR) cohort

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age > 65 vs ≤ 65 years	1.85 (0.66-5.24)	0.24		
Binet B-C vs Binet A	2.16 (0.95-4.92)	0.07		
beta 2 microglobulin ≥ 3.5 vs < 3.5 mg/L	1.64 (0.57-4.70)	0.36		
<i>IGHV</i> unmutated vs mutated	2.29 (0.92-5.69)	0.07		
17p- and/or <i>TP53</i> mutated yes vs no	3.14 (1.29-7.63)	0.01	2.52 (1.00-6.39)	0.05
Gender female vs male	0.60 (0.31-1.17)	0.13		
ECOG 0 vs 1	1.64 (0.78-3.46)	0.19		
ECOG 0 vs ≥ 2	3.12 (1.25-7.81)	0.02		
Comorbidities 0-1 vs ≥ 2	2.91 (1.14-7.45)	0.03		
Creatinine clearance ≤ 70 vs > 70 mL/min	1.76 (0.69-4.54)	0.24		

in multivariate analysis (Table 3). Other clinicobiologic parameters had no impact on OS. Twenty-two patients died ($n = 2$ due to CLL, 9.1%; $n = 12$ infection with or without active CLL, 54.6%; $n = 3$ second primary tumors, 13.6%; 1 each cardiac disease and sudden death). In three patients, the cause of death was not reported.

3.3 | Safety

Forty-two percent of the BR patients reported at least one grade 3-4 adverse event. Overall, cytopenias were recorded in 34% of patients. Grade 3-4 neutropenia occurred in 24% of cases. Grade 3-4 infections including febrile neutropenia were recorded in 11% of patients. One case of fatal infection was reported. Grade 3-4 rash and/or dermatitis were reported 3% of patients.

3.4 | Comparison of BR in the GIMEMA-ERIC dataset and ibrutinib in the US dataset

Data on 165 and 162 older patients without del(17p)/*TP53* aberrations treated with BR and ibrutinib, respectively, were analyzed. The median follow-up in the BR and in the ibrutinib cohorts was 29 months (95% CI 26-31) and 13 months (95% CI 10-14), respectively. As shown in Table 4, the two cohorts were comparable in terms of age and frequency of del(11q). Patients with advanced Rai stage were more frequently represented in the ibrutinib cohort than in the BR cohort, and the interval between diagnosis and treatment was significantly longer in the ibrutinib cohort.

Factors associated with a longer PFS in multivariate analysis in the combined patient population treated with BR and ibrutinib were represented by age as a continuous

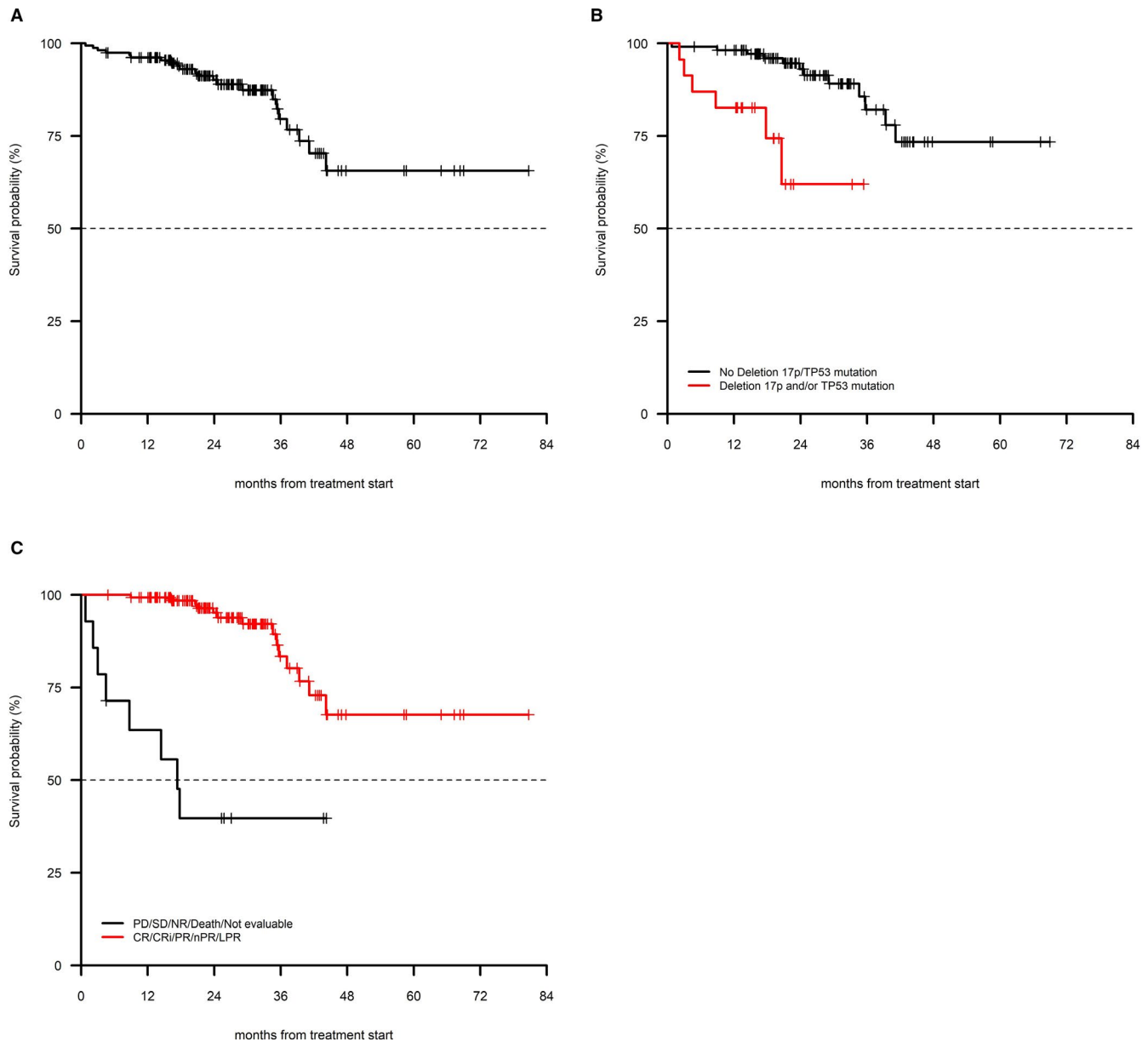


FIGURE 2 OS in 157 patients treated with BR (A) in the entire cohort, (B) in patients with and without 17p-/TP53 mutation, (C) in patients who had a response to treatment vs patients who did not respond to treatment

variable and by treatment with ibrutinib (Table 5). Age was the only factor predicting for shorter OS at multivariable analysis (HR 1.10, 95% CI 1.04 - 1.15, $P < 0.01$).

In a post hoc analysis including patients in advanced stage (ie Rai III-IV), the ibrutinib cohort ($n = 96$ patients), and the BR cohort ($n = 46$ patients) were comparable in terms of age (cut-off 70 years) and interval between diagnosis and first-line treatment (cut-off 36 months), as shown in Table 6. A significant PFS advantage was observed in the ibrutinib cohort ($P = 0.03$), which also showed a trend for an advantage in terms of OS ($P = 0.08$, Figure 3(A) and (B)). Patients in early/intermediate stage in the BR ($n = 79$) and in the ibrutinib cohort ($n = 59$) had similar age and similar

interval between diagnosis and first-line treatment characteristics (Table 6). No difference was noted in terms of PFS ($P = 0.89$) and OS ($P = 0.66$) in these patients (Figure 4(A) and (B)).

4 | DISCUSSION

This is the first robust report of the efficacy and safety of BR in unfit patients treated outside clinical trials, as these patients were usually enrolled in trials using chlorambucil and an anti CD20 monoclonal antibody.^{6,27} Even though chlorambucil is the preferred option as chemotherapy backbone in this subset

TABLE 3 Overall survival (OS): univariate and multivariate analyses in the bendamustine and rituximab (BR) cohort

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age > 65 vs ≤ 65 years	3.95 (0.53-29.50)	0.18		
Binet B-C vs Binet A	2.42 (0.79-7.41)	0.12		
β2 microglobulin ≥ 3-0.5 vs < 3.5 mg/L	4.11 (0.55-30.92)	0.17		
IGHV unmutated vs mutated	0.81 (0.22-3.05)	0.76		
17p- and/or TP53 mutated yes vs no	6.14 (2.08-18.13)	<0.01	4.47 (1.37-14.56)	0.01
NR vs CR or PR	8.43 (3.52-20.19)	<0.01	15.21 (5.72-40.74)	<0.01
Gender female vs male	0.68 (0.29-1.64)	0.39		
ECOG 0 vs 1	2.28 (0.79-6.59)	0.13		
ECOG 0 vs ≥ 2	4.90 (1.48-16.19)	0.01		
Comorbidities 0-1 vs ≥ 2	1.79 (0.60-5.29)	0.29		
Creatinine clearance ≤ 70 vs > 70 mL/min	3.02 (1.01-9.09)	0.05		
no-aberrations vs 13q	0.74 (0.12-4.45)	0.74		
11q- vs 13q	3.18 (0.52-19.37)	0.21		
+12 vs 13q	3.88 (0.90-16.71)	0.07		
17p- vs 13q	11.29 (2.08-61.14)	<0.01		

Legend: NR, no response; CR, complete response; PR, partial response.

TABLE 4 Baseline characteristics of the bendamustine and rituximab (BR) and the ibrutinib cohorts

	BR n = 165 (%)	ibrutinib = 162 (%)	P
Age ≤ 70/ >70 years	53 (32.1)/ 112 (67.9)	53 (32.7)/ 109 (67.3)	1.00
gender Male/ Female	106 (64.2)/ 59 (35.8)	102 (63.0)/ 60 (37.0)	0.90
Time dx-trx ^a < 36/≥36 months	99 (60.0)/ 66 (40.0)	69 (42.6)/ 93 (57.4)	<0.01
RAI ^b stage 0-2/ 3-4	79 (63.2)/ 46 (36.8)	59 (38.1)/ 96 (61.9)	<0.01
del11q no/ yes	101 (89.4)/ 12 (10.6)	125 (87.4)/ 18 (12.6)	0.77

^aInterval between diagnosis and treatment.

^bThe Rai staging system was used here because it was adopted in the US cohort.

TABLE 5 Univariate and multivariable analysis of PFS in the total patient population treated with bendamustine and rituximab (BR) and ibrutinib

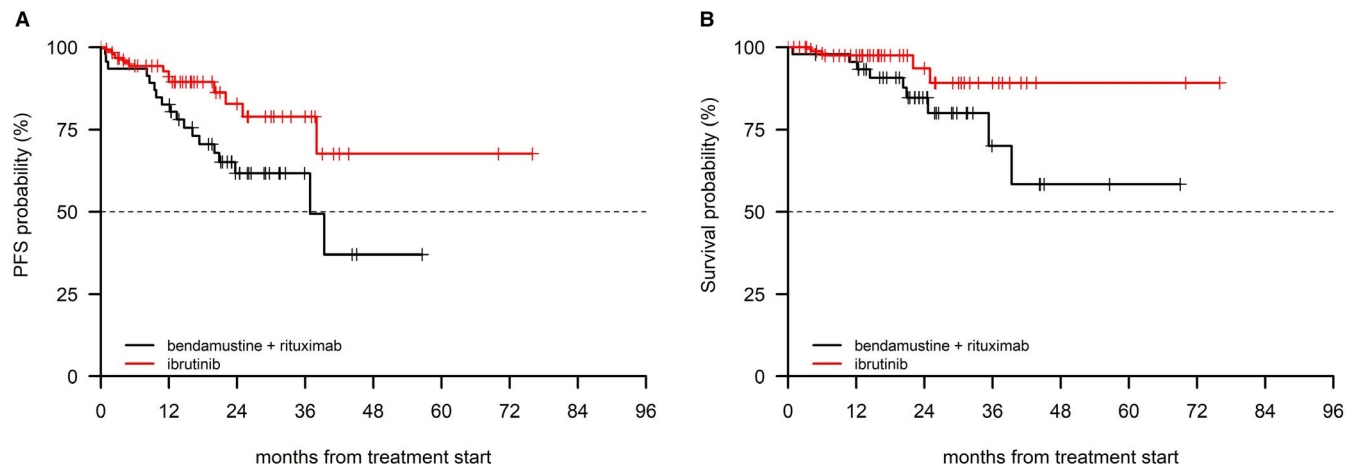
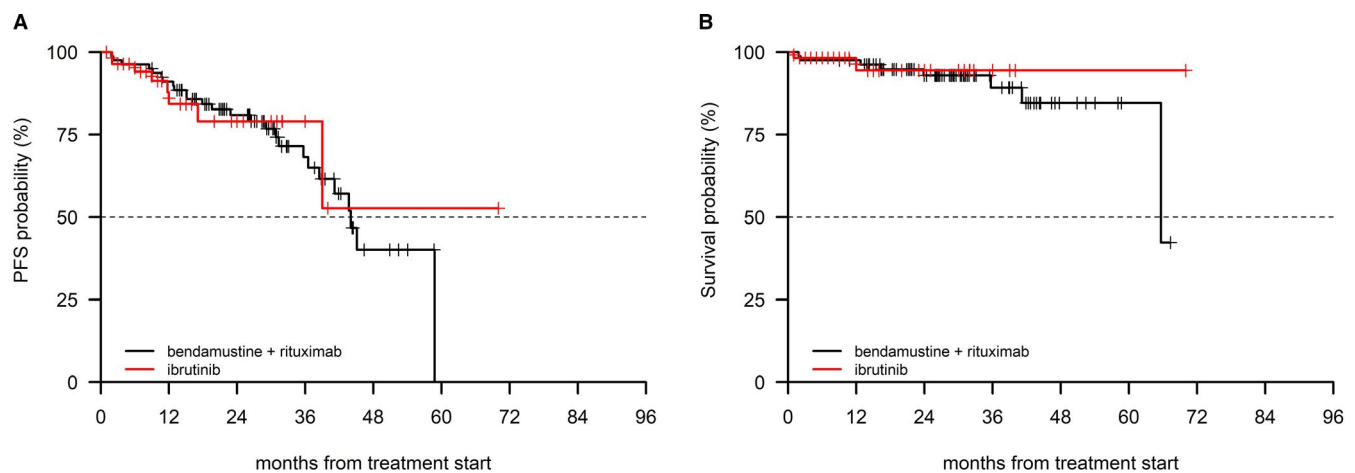
Variable	univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age (as continuous variable)	1.05 (1.02-1.09)	<0.01	1.06 (1.02-1.10)	<0.01
RAI 3-4 vs 0-2	1.09 (0.66-1.79)	0.73	—	—
11q- yes vs no	2.13 (1.04-4.37)	0.04	—	—
Time dx-trx ^a (continuous variable)	1.00 (0.99-1.00)	0.62	—	—
interval dx-trx ^a ≥ 36 vs < 36 months	0.89 (0.57-1.38)	0.61	—	—
Ibr vs. BR	0.60 (0.36-1.01)	0.05	0.55 (0.33-0.93)	0.03

^aInterval between diagnosis and treatment

TABLE 6 Baseline characteristics in patients with advanced (Rai III-IV) and early/intermediate stage (Rai 0-II) in the bendamustine and rituximab (BR) and ibrutinib cohorts

		Advanced stage		<i>P</i>	Early/intermediate stage		<i>P</i>
		BR n = 46 (%)	ibrutinib n = 96 (%)		BR n = 79 (%)	ibrutinib n = 59 (%)	
Age	≤70 years	16 (34.8)	27 (28.1)	0.54	31 (39.2)	22 (37.3)	0.96
	>70 years	30 (65.2)	69 (71.9)		48 (60.8)	37 (62.7)	
Gender	Male	31 (67.4)	58 (60.4)	0.54	49 (62.0)	38 (64.4)	0.91
	Female	15 (32.6)	38 (39.6)		30 (38.0)	21 (35.6)	
Time dx-trx ^a	<36 months	25 (54.3)	35 (36.5)	0.07	50 (63.3)	30 (50.8)	0.20
	≥36 months	21 (45.7)	61 (63.5)		29 (36.7)	29 (49.2)	
del11q	No	26 (78.8)	77 (88.5)	0.29	55 (96.5)	41 (83.7)	0.06
	Yes	7 (21.2)	10 (11.5)		2 (3.5)	8 (16.3)	

^aTime dx-trx: Interval between diagnosis and treatment.

**FIGURE 3** PFS (A) and OS (B) in the BR and in the ibrutinib cohort in (Rai stage III-IV)**FIGURE 4** PFS (A) and OS (B) in the BR and in the ibrutinib cohort in (Rai stage 0-II)

of CLL,¹⁵ BR is a widely adopted front-line regimen in the clinical practice for elderly CLL patients with coexisting conditions.^{28,29}

Even though this study is not based on a registry reporting the efficacy of BR and ibrutinib in all the incident CLL cases and accepting the limitations of a retrospective analysis, to ensure

accuracy in data collection we encouraged each participating center to include all patients who started BR and we performed consistency checks on each case report form. Furthermore, we included, in addition to PFS, objective measures of efficacy such as OS and TTNT. Because bone biopsy was not mandatory, we were not able to assess complete response.

Our BR cohort resembled closely patients with CLL treated in the daily clinical practice in terms of age, creatinine clearance, performance status and comorbidities.³⁰ The percentage of patients with early stage disease in our analysis (41.1%) was higher than in GCLLSG and in UK trials, where 23% and 33% of the patients, were in Binet stage A, respectively.^{6,31} This finding reflects the tendency to initiate treatment in the presence of a short lymphocyte doubling time or of symptomatic disease in this unfit patient population.

The proportion of patients who completed the planned therapy in our analysis (73.1%) is in line with the data from the MABLE trial that compared chlorambucil and rituximab with the BR regimen in a fludarabine-ineligible CLL population.⁹

Grade 3-4 infections in this study (11%) occurred at a similar frequency as in clinical trials (7.7%-19%).^{9,11,25} We observed a lower incidence of grade 3-4 cytopenia (34%) compared to other studies reporting a 52.1%-56% incidence of cytopenia due to fact that many investigators did not perform a blood count at the nadir time point.

With a median PFS of 45.1 months and a projected OS rate at 24 and 36 months of 90.1% and 79.5%, respectively, our data show that BR is an effective front-line treatment option for an unfit patient population treated outside of clinical trials. The only baseline characteristics with a significant negative impact on the efficacy endpoints in this study were represented by the *TP53* disruption and, interestingly, failure to respond to BR was an independent dynamic prognostic factor for OS, a finding probably reflecting the lack of effective salvage treatment for a proportion of patients during the study period. The *IGHV*-unmutated configuration was associated with a shorter PFS, that was of borderline significant probably as a consequence of the limited number of patients assessed.

In our analysis PFS is similar to that observed in the MABLE trial (median 39.6 months).⁹ Interestingly, a median PFS of 33.9 months was observed in the subset of patients with creatinine clearance <70 in a phase-2 study²⁵ and a median PFS of 43 months with a 74% PFS rate at 24 months was reported in a trial enrolling older CLL patients.¹¹ Notably, OS was similar in our analysis and in prospective trials which reported an OS rate of approximately 80% at 36 months and an OS rate of 90%-95% at 24 months.^{11,25}

It is worth noting that chlorambucil and rituximab produced an 87% ORR with an OS rate at 48 and 60 months of 86.1% (95% CI: 79.4-93.5) and 81.2% (95% CI: 72.4-91.2),

respectively, in elderly patients treated outside clinical trials.¹⁸ Likewise, an 80.3% ORR and estimated 2-year OS of 88% was recorded by the Israeli end ERIC group in elderly patients who received chlorambucil and obinutuzumab, without unexpected adverse events.³² Taken together, these data show that the efficacy and safety of different CIT regimens in routine clinical practice are consistent with those reported in clinical trials.

Because there is evidence that treatment continuation and efficacy with ibrutinib may be inferior outside of clinical trials,^{21,22} and given the growing importance of real world evidence which can provide invaluable information to supplement randomized clinical studies,³³ we elected to compare PFS and OS in a cohort treated with ibrutinib in a real-world experience in the USA²³ with a similar patient population treated with BR at the GIMEMA-ERIC centers.

Although the two groups were treated in different time periods with consequent difference in follow-up time, we performed an indirect comparison trying to minimize the effect of the heterogeneity of patient populations.

First, we documented that in the total study population (excluding patients with 17p-) age and treatment with ibrutinib were associated with a longer PFS in multivariate analysis.

When restricting our analysis to patients with advanced stage (Rai III-IV) with comparable baseline characteristics, we were able to show that ibrutinib was associated with a longer PFS and a trend of longer OS as compared with BR, whereas no difference was observed in patients with early intermediate stage. Though caution should be exercised when interpreting these data, as they were obtained in quite a small number of patients treated outside of clinical trial, it is noteworthy that similar findings were reported in a randomized prospective study.³⁴

Taken together our data show that (a) BR is a safe and effective first-line regimen in a real-world cohort of unfit CLL patients, with the exception of patients with unfavorable genetic characteristics (ie del(17p)/*TP53* aberrations and *IGHV*-unmutated configuration), (b) there are no appreciable differences in terms of efficacy and safety between BR in clinical trials that enrolled older patients with CLL and this real world experience on unfit patients with reduced renal function and with coexisting conditions and, (c) ibrutinib provided more durable disease control than BR in the front-line setting in patients treated outside of clinical trials, especially in patients with advanced disease stage.

While providing evidence that BR is an effective first-line regimen in unfit patients, these data reinforce the notion that ibrutinib has an established place in the front-line treatment of older patients with CLL.^{11,15,35} These findings may have practical implications in the definition of treatment algorithms, especially in those countries with restrictions to the use of ibrutinib or other oral agents.^{36,37}

ACKNOWLEDGMENTS

Work supported by Ricerca Finalizzata project RF-2011-02349712 Ministero della Salute, Rome, Italy to AC, GG; MIUR-PRIN 2015 ZMRFEA_004, Rome, Italy to AC, AIL-Ferrara, Italy to AC; Beat Leukemia to AC. Ministry of Health, Czech Republic, grant VFN64165 to MS.

CONFLICT OF INTEREST

- Antonio Cuneo: advisory board and lecturing for Janssen, Gilead, Abbvie, Roche.
- Anthony R. Mato: consultancy for TG Therapeutics (in addition DSMB), Abbvie, Pharamacyclics, Johnson & Johnson, Regeneron, Astra Zeneca, and Celgene and research funding from TG Therapeutics, Abbvie, Pharamacyclics, Johnson & Johnson, Regeneron, Portola, DTRM, and Acerta.
- Gian Matteo Rigolin: lecturing for Abbvie, Gilead and research funding from Gilead.
- Luca Laurenti advisory board and lecturing for Janssen, Gilead, Abbvie, Roche and Astra Zeneca
- John N. Allan Advisory board/Consultant for Sunesis, PCYC, Abbvie, Genentech and research funding from Janssen, Genentech
- John M. Pagel: Consultancy for Astrazeneca, Pharamacyclics, and Gilead.
- Constantine S. Tam honorarium and research funding from Janssen.
- Paul M. Barr: consultancy for from Abbvie/Pharamacyclics, Gilead, Janssen, TG therapeutics, AstraZeneca, Celgene, Morphosys, Seattle Genetics.
- Alan P. Skarbnik: consultancy for Abbvie, Pharamacyclics, Celgene, Kite, AstraZeneca, Genentech, Seattle Genetics; Speakers Bureau for Abbvie, Pharamacyclics, Celgene, Kite, Gilead Sciences, Jazz Pharma, Beigene, AstraZeneca, Genentech, Seattle Genetics, Verastem, Novartis; Stock Ownership in COTA Healthcare.
- Nirav N. Sha: honoraria, travel support, and research funding from Miltenyi Biotec, honoraria and travel support from Incyte, and Celgene; advisory boards for Kite, Celgene, and Cellectar; research support for clinical trials from BMS
- Chaitra S. Ujjani: research support from Pharamacyclics, Astra Zeneca and Abbvie; consulting for Astra Zeneca and Abbvie.
- Lindsey Roeker: ASH grant funding for work outside of this manuscript, minority ownership interest in AbbVie and Abbott Laboratories
- Gianluca Gaidano: Advisory Boards for Janssen, Abbvie, Astra-Zeneca, Sunesis
- Michael Doubek: Honoraria and Research grants from Roche, AbbVie, AOP Orphan, Janssen-Cilag, Gilead and Amgen.
- Lucia Farina: advisory board for Janssen; lecturing for Abbvie.

- Marta Coscia: advisory board and lecturing from Janssen for Gilead, Abbvie, and esearch funding from Janssen and Karyopharm Therapeutics
- Robin Foà34: Editorial boards and/or speaker's bureau for Janssen, AbbVie, Amgen, Novartis, Roche, Pfizer.
- Paolo Ghia: honoraria from AbbVie, Adaptive, ArQule, BeiGene, Celgene/Juno, Dyname, Gilead, Janssen, Sunesis and research funding from AbbVie, Gilead, Janssen, Novartis.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AC, ARM, GMR, AP, MV, RF and PG designed the study and interpreted the data. AC, ARM, GMR, MG, LL, JNA, JMP, DMB, BTH, AW, NL, CST, RJ, FL, PMB, MS, APS, JJP, ARS, SJS, NNS, CSU, LR, EMO, AB, LT, MS, MM, AT, FI, GG, MD, LF, SM, FDR, MC, FRM, JdIS, AMP, IF, GC and PG collected data. AP and RC performed statistical analyses. AC and GMR wrote the manuscript. All the authors reviewed the manuscript for important intellectual contents and approved the final version of the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

- Anthony R. Mato  <https://orcid.org/0000-0001-8724-1875>
 Gian Matteo Rigolin  <https://orcid.org/0000-0002-8370-5190>
 Allison Winter  <https://orcid.org/0000-0002-8437-7539>
 Frederick Lansigan  <https://orcid.org/0000-0001-6027-3359>
 Jeffrey J. Pu  <https://orcid.org/0000-0001-7498-3159>
 Nirav N. Shah  <https://orcid.org/0000-0002-4336-1071>
 Monia Marchetti  <https://orcid.org/0000-0001-7615-0572>
 Stefano Molica  <https://orcid.org/0000-0003-2795-6507>
 Francesca Romana Mauro  <https://orcid.org/0000-0003-2425-9474>

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
2. Zoellner A-K, Höhler T, Fries S, et al. Altered treatment of chronic lymphocytic leukemia in Germany during the last decade. *Ann Hematol.* 2016;95(6):853-861.
3. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al. Early results of a chemotherapeutic regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005;23(18):4079-4088.
4. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, et al. Long-term remissions after FCR chemotherapeutic in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood.* 2016;127(2):208-215.

5. Eichhorst B, Fink A-M, Bahlo J, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):928-942.
6. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2014;370(12):1101-1110.
7. Foà R, Del Giudice I, Cuneo A, et al. Chlorambucil plus rituximab with or without maintenance rituximab as first-line treatment for elderly chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol.* 2014;89(5):480-486.
8. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA, et al. Rituximab plus chlorambucil as first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia: final analysis of an open-label phase II study. *J Clin Oncol.* 2014;32(12):1236-1241.
9. Michallet A-S, Aktan M, Hiddemann W, et al. Rituximab plus bendamustine or chlorambucil for chronic lymphocytic leukemia: primary analysis of the randomized, open-label MABLE study. *Haematologica.* 2018;103(4):698-706.
10. Moreno C, Greil R, Demirkan F, et al. Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(1):43-56.
11. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, et al. Ibrutinib regimens versus chemoimmunotherapy in older patients with untreated CLL. *N Engl J Med.* 2018;379(26):2517-2528.
12. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE, et al. Ibrutinib-rituximab or chemoimmunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2019;381(5):432-443.
13. Jain N. Selecting front-line therapy for CLL in 2018. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2018;2018(1):242-247.
14. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:16096.
15. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94(11):1266-1287.
16. Gentile M, Zirlik K, Ciolli S, et al. Combination of bendamustine and rituximab as front-line therapy for patients with chronic lymphocytic leukaemia: multicenter, retrospective clinical practice experience with 279 cases outside of controlled clinical trials. *Eur J Cancer.* 2016;60:154-165.
17. Cuneo A, Follows G, Rigolin GM, et al. Efficacy of bendamustine and rituximab as first salvage treatment in chronic lymphocytic leukemia and indirect comparison with ibrutinib: a GIMEMA, ERIC and UK CLL FORUM study. *Haematologica.* 2018;103(7):1209-1217.
18. Laurenti L, Innocenti I, Autore F, et al. Chlorambucil plus rituximab as front-line therapy for elderly and/or unfit chronic lymphocytic leukemia patients: correlation with biologically-based risk stratification. *Haematologica.* 2017;102(9):e352-e355.
19. Herishanu Y, Goldschmidt N, Bairey O, et al. Efficacy and safety of front-line therapy with fludarabine-cyclophosphamide-rituximab regimen for chronic lymphocytic leukemia outside clinical trials: the Israeli CLL Study Group experience. *Haematologica.* 2015;100(5):662-669.
20. UK CLL Forum. Ibrutinib for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a UK and Ireland analysis of outcomes in 315 patients. *Haematologica.* 2016;101(12):1563-1572.
21. Ghia P, Cuneo A. Ibrutinib in the real-world patient: many lights and some shades. *Haematologica.* 2016;101(12):1448-1450.
22. Mato AR, Roeker LE, Allan JN, et al. Outcomes of front-line ibrutinib treated CLL patients excluded from landmark clinical trial. *Am J Hematol.* 2018;93(11):1394-1401.
23. Mato AR, Nabhan C, Thompson MC, et al. Toxicities and outcomes of 616 ibrutinib-treated patients in the United States: a real-world analysis. *Haematologica.* 2018;103(5):874-879.
24. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446-5456.
25. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol.* 2012;30(26):3209-3216.
26. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap) - a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42(2):377-381.
27. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, et al. Venetoclax and obinutuzumab in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2019;380(23):2225-2236.
28. Al-Sawaf O, Cramer P, Goede V, Hallek M, Pflug N. Bendamustine and its role in the treatment of unfit patients with chronic lymphocytic leukaemia: a perspective review. *Ther Adv Hematol.* 2017;8(6):197-205.
29. Mato A, Nabhan C, Kay NE, et al. Real-world clinical experience in the Connect chronic lymphocytic leukaemia registry: a prospective cohort study of 1494 patients across 199 US centres. *Br J Haematol.* 2016;175(5):892-903.
30. Knauf W, Abenhardt W, Dörfel S, et al. Routine treatment of patients with chronic lymphocytic leukaemia by office-based haematologists in Germany-data from the prospective tumour registry lymphatic neoplasms. *Hematol Oncol.* 2015;33(1):15-22.
31. Hillmen P, Robak T, Janssens A, et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet.* 2015;385(9980):1873-1883.
32. Herishanu Y, Shaulov A, Fineman R, et al. Frontline treatment with the combination obinutuzumab ± chlorambucil for chronic lymphocytic leukemia outside clinical trials: results of a multinational, multicenter study by ERIC and the Israeli CLL study group. *Am J Hematol.* 2020;95(6):604-611.
33. Islam P, Mato AR. Real-world evidence for chronic lymphocytic leukemia in the era of targeted therapies. *Cancer J.* 2019;25(6):442-448.
34. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2015;373(25):2425-2437.
35. Brown JR, Wierda WG. Evolving strategies in first-line chronic lymphocytic leukemia: is there a role for chemoimmunotherapy? *J Natl Compr Canc Netw.* 2019;17(11.5):1408-1410.

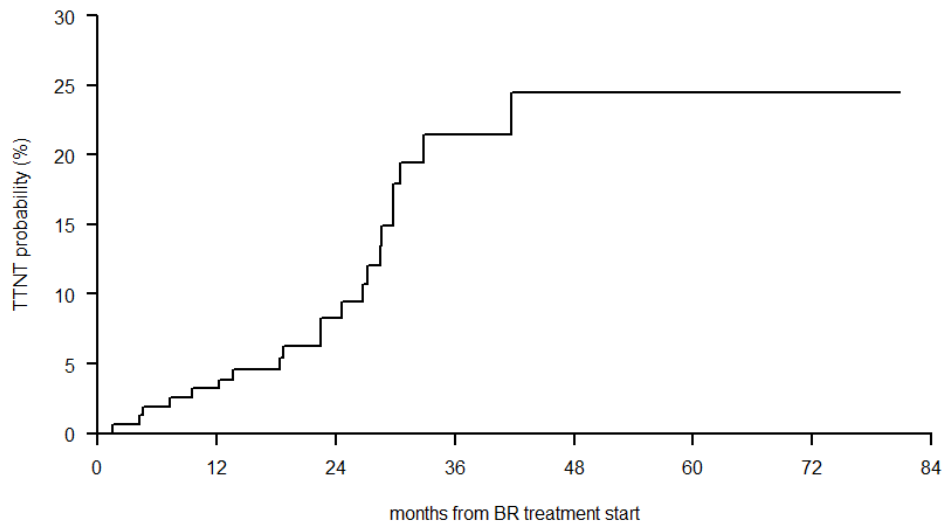
36. Chen Q, Jain N, Ayer T, et al. Economic burden of chronic lymphocytic leukemia in the era of oral targeted therapies in the United States. *J Clin Oncol*. 2017;35(2):166-174.
37. Iovino L, Shadman M. Novel therapies in chronic lymphocytic leukemia: a rapidly changing landscape. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21(4):24.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Cuneo A, Mato AR, Rigolin GM, et al; the GIMEMA, European Research Initiative (ERIC) on CLL, US study group. Efficacy of bendamustine and rituximab in unfit patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia. Indirect comparison with ibrutinib in a real-world setting. A GIMEMA-ERIC and US study. *Cancer Med*. 2020;00:1–12. <https://doi.org/10.1002/cam4.3470>

Supplementary Figure 1 Time to Next Treatment (death was considered as a competitive risk)



months	estimate	lower 95%CI	Upper 95%CI
12	3.2	1.2	6.9
24	8.3	4.3	13.9
36	21.5	13.1	31.1

Supplementary Table 1. ORR and univariate analyses

	PD/SD/NR/Death n = 14 (%)	CR/PR n= 143 (%)	p
age ≤65 / >65 years	1 (7.1) / 13 (92.9)	29 (20.3) / 114 (79.7)	0.40
stage †early/ intermediate-advanced	3 (27.3) / 8 (72.7)	50 (42.4) / 68 (57.6)	0.51
beta 2 microglobulin ≤3.5 / >3.5 mg/L	0 (0.0) / 11 (100.0)	19 (18.6) / 83 (81.4)	0.25
<i>IGHV</i> Mutated / Unmutated	3 (60.0) / 2 (40.0)	54 (49.5) / 55 (50.5)	1.00
17p- and/or <i>TP53</i> mutated yes /no	5 (50.0) / 5 (50.0)	18 (14.9) / 103 (85.1)	0.02

†early: Binet A

Legend: CR: complete response; PR Partial response; PD: progressive disease, SD stable disease, NR; no response.

Supplementary table 2. TTNT: univariate and multivariate analyses in the BR cohort.

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Age >65 vs ≤ 65 years	2.47 (0.70-8.05)	0.13		
Binet B-C vs Binet A	1.99 (0.88-4.51)	0.10		
beta 2 microglobulin ≥3.5 / <3.5 mg/L	1.55 (0.54-4.50)	0.41		
<i>IGHV</i> unmutated vs mutated	1.99 (0.80-5.00)	0.14		
17p- and/or <i>TP53</i> mutated (no / yes)	0.25 (0.10-0.63)	<0.01	0.30 (0.12-0.80)	0.02
CR-PR no vs yes	10.65 (3.26-34.76)	<0.01	8.34 (3.59-19.37)	<0.01

Supplementary table 3. OS: univariate and multivariate analyses in the combined BR and ibrutinib cohorts.

Variable	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Age (continuous variable)	1.10 (1.04 - 1.15)	<0.01	1.10 (1.04 - 1.15)	<0.01
Age >70 vs. ≤70 years	0.50 (0.20 - 1.24)	0.14		
Gender female vs male	0.73 (0.34 - 1.54)	0.41		
Time dx-trx* (continuous variable)	1.00 (0.99 - 1.01)	0.92		
interval dx-trx >36 vs <36 months	0.82 (0.40 - 1.68)	0.59		
IGHV (Mutated vs. Not Mutated)	0.65 (0.20 - 2.10)	0.47		
Rai (continuous variable)	1.49 (1.01 - 2.18)	0.04		
RAI 3-4 vs 0-2	1.64 (0.71 - 3.76)	0.24		
11q- Yes vs. No	3.40 (1.10 - 10.52)	0.03		
Ibr vs. BR	0.50 (0.20 - 1.24)	0.14		

*Time dx-trx: Interval between diagnosis and treatment