



Tratamiento de primera línea con rituximab combinado con fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone (RFCM) y mantenimiento con rituximab en pacientes con leucemia linfática crónica

Pau Abrisqueta Costa

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Tratamiento de primera línea con rituximab combinado con fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone (R-FCM) y mantenimiento con rituximab en pacientes con leucemia linfática crónica

Barcelona 2014



**Tratamiento de primera línea con rituximab combinado con fludarabina,
ciclofosfamida y mitoxantrone (R-FCM) y mantenimiento con rituximab en
pacientes con leucemia linfática crónica**

Tesis presentada por

Pau Abrisqueta Costa

Para aspirar al grado de Doctor en Medicina

Director de la tesis: Dr. Francesc Bosch Albareda

Tutor de la tesis: Dr. Emili Montserrat Costa

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Barcelona, 2014

Agradecimientos.

Pararse un momento y mirar atrás...uno ve la gran cantidad de gente que ha hecho que seamos la persona que somos. Este trabajo es un buen momento para ello, para agradecer a todos los que habéis contribuido no sólo a esta tesis sino también a la persona que soy. No pretendo hacer un repaso exhaustivo, tarea que sólo me llevaría a errores y olvidos injustos, pero sí plasmar algunas pinceladas de estos últimos diez años de mi vida.

Para empezar, mi familia. A mis padres, que siempre me habéis apoyado en todo, gracias. A Ariadna, por hacer que todo esto tenga sentido. A Enric, Jone y Lluc, mis pequeños. A Pedro y Iñaki, porque aunque nos veamos poco, siempre estáis. A Enric y Resu, por vuestro tiempo y ayuda.

A Francesc Bosch, no sólo por hacer posible esta tesis sino también por cuidar de mi formación, por haber sido y ser un tutor en el sentido más amplio de la palabra, y un amigo, gracias.

A Emili Montserrat, haber tenido la oportunidad de trabajar bajo tu dirección ha sido un privilegio.

A mi primera casa, el Servicio de Hematología del Hospital Clínic.

A Paco Cervantes, para mi has sido un ejemplo de rigor profesional, pero también un gran apoyo.

Al profesor Ciril Rozman, no olvidaré haber tenido la oportunidad de trabajar junto a usted.

A Armando López Guillermo, Jordi Esteve, Benet Nomdedeu, Montse Rovira, Carmen Martínez, Enric Carreras, Francesc Fernández, Álvaro Urbano, Joan Bladé, y a todos los demás miembros del Servicio, donde empecé a aprender qué significaba ser médico y hematólogo.

A mis coerres, Gonzalo Gutiérrez y Rolando Vallansot, qué suerte tuve! A mis R mayores, por la paciencia que tuvisteis, gracias Marta Pratcorona, y Santi Mercadal. A mis R pequeños, gracias Gabi Ghita por compartir tantos momentos de reflexión.

A la Unidad de Hematopatología, a Neus Villamor por tu ayuda en mi incursión al mundo del laboratorio, a Josep Lluís Aguilar por tu amabilidad y paciencia, a Maria Rozman, Marta Aymerich, Dolores Colomer y a todos los demás miembros de la Unidad.

A mi segunda casa, el Hospital Vall d'Hebron.

A Andrés López por acogerme desde el primer día, darme consejo y estar siempre disponible para mis múltiples dudas. A Javier Bueno, Isabel Massagué, por vuestra amabilidad. A mis compañeros actuales, Pere Barba, David Valcárcel, Merche Gironella, Olga Salamero, Sabela Bobillo, Julia Montoro, Guillermo Ortí, Mireia Olivé.

A la Unidad de Ensayos Clínicos, a Oriol Olivé, por hacer que esta Unidad funcione como una unidad, a Cecilia Carpio, a Eva Calpe, a Elisenda Alonso.

Al Laboratori de Recerca, a Marta Crespo y Noelia Purroy, por aportarnos la ilusión de seguir creciendo en la Hematología.

Y a todos, residentes, enfermeras, auxiliares, secretarias, con los que he compartido momentos en la planta, las consultas, las guardias, momentos buenos y no tan buenos, pero que han formado parte de forma muy importante de estos diez últimos años de mi vida.

Finalmente, a todos los investigadores que habéis colaborado en el ensayo R-FCM, a María José Melero, por tu inestimable ayuda, y por su puesto a todos los pacientes que habéis participado en el estudio.

ÍNDICE.**I. INTRODUCCIÓN.**

1. Leucemia linfática crónica: características biológicas y clínicas	1
1.1. Biología de la leucemia linfática crónica	3
1.1.1. Origen celular de la leucemia linfática crónica	4
1.1.2. Linfocitosis B monoclonal	7
1.1.3. Receptor de la célula B y estado mutacional	8
1.1.4. Alteraciones genéticas y epigenéticas	11
1.1.4.1. Deleción 13q14	12
1.1.4.2. Trisomía 12	12
1.1.4.3. Deleción 11q22-q23	13
1.1.4.4. Deleción 17p13	13
1.1.4.5. Nuevas mutaciones	14
1.1.4.6. Evolución clonal en la LLC	16
1.1.4.7. Alteraciones epigenéticas	16
1.1.5. Microambiente	18
1.1.5.1. Señalización a través del receptor de la célula B en la LLC	19
1.2. Diagnóstico de la LLC	21
1.2.1. Morfología de los linfocitos de LLC	22

1.2.2.	Inmunofenotipo de las células de LLC	23
1.2.3.	Histología de la biopsia ganglionar y de la médula ósea	24
1.3.	Factores pronósticos	25
1.3.1.	Sistemas de estadiaje clínicos	26
1.3.2.	Parámetros biológicos	28
1.3.2.1.	Alteraciones genéticas	28
1.3.2.2.	Relevancia clínica de las nuevas mutaciones en la LLC	32
1.3.2.3.	Estado mutacional de los genes <i>IGHV</i>	34
1.3.2.4.	ZAP-70	35
1.3.2.5.	CD38	36
1.3.2.6.	CD49d	37
1.3.3.	Marcadores séricos	38
1.3.4.	Parámetros cinéticos: tiempo de duplicación linfocitaria	39
1.3.5.	Biopsia de médula ósea	40
1.3.6.	Respuesta al tratamiento como factor pronóstico: impacto de la enfermedad mínima residual	41
1.4.	Manifestaciones clínicas de la LLC	43
2.	Tratamiento de la leucemia linfática crónica	45
2.1.	Indicaciones de tratamiento en la LLC	47

2.2.	Evaluación de la respuesta al tratamiento	49
2.2.1.	Evaluación de la enfermedad mínima residual	51
2.3.	Tratamiento de quimioterapia en la LLC	53
2.3.1.	Agentes alquilantes	53
2.3.1.1.	Clorambucilo	53
2.3.1.2.	Quimioterapia en combinación frente a clorambucilo en monoterapia	54
2.3.2.	Análogos de las purinas	55
2.3.2.1.	Fludarabina en combinación	55
2.3.2.2.	Combinación de fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone	56
2.3.3.	Tratamiento ajustado a las comorbilidades	58
2.4.	Tratamiento de inmunquimioterapia en la LLC	61
2.4.1.	Rituximab en la LLC	62
2.4.2.	Rituximab en combinación con quimioterapia	63
2.4.2.1.	Combinaciones de inmunquimioterapia más allá de FCR	67
2.4.3.	Inmunquimioterapia en los pacientes con comorbilidades	69
2.5.	Tratamiento de mantenimiento en la LLC	71
2.5.1.	Alemtuzumab como tratamiento de consolidación	72
2.5.2.	Rituximab como tratamiento de mantenimiento en la LLC	73
2.5.3.	Lenalidomida como tratamiento de consolidación / mantenimiento	76
2.6.	Nuevos tratamientos en la LLC	77

2.6.1.	Inhibidores del receptor de células B (BCR)	78
2.6.1.1.	Inhibidores de BTK	79
2.6.1.2.	Inhibidores de PI3K	80
2.6.1.3.	Inhibidores de SYK	80
2.6.2.	Fármacos antiapoptóticos en la LLC	81
2.6.3.	Fármacos inmunomoduladores	82
2.6.4.	Nuevos anticuerpos monoclonales en la LLC	84
2.7.	Trasplante de progenitores hematopoyéticos	87
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	91
III.	RESULTADOS	93
	PRIMER TRABAJO	
1.1.	Resumen.	95
1.2.	Rituximab, Fludarabine, Cyclophosphamide, and Mitoxantrone: A New, Highly Active Chemoimmunotherapy Regimen for Chronic Lymphocytic Leukemia. J Clin Oncol, 2009 Sep 27(27): 4578-4584.	101
	SEGUNDO TRABAJO	
2.1.	Resumen.	109
2.2.	Rituximab Maintenance in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) After Upfront Treatment with Rituximab Plus	

Fludarabine, Cyclophosphamide, and Mitoxantrone (R-FCM):
Final Results of a Multicenter Phase II trial On Behalf of the Spanish
CLL Study Group (GELLC). *Blood*, 2013 Dec 122(24): 3951-3959. 113

IV. DISCUSIÓN 123

V. CONCLUSIONES 133

VI. BIBLIOGRAFÍA 135

Abreviaturas

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

AID: activation-induced cytidine deaminase

APRIL: proliferation-inducing ligand

ATM: ataxia telangiectasia mutada

BAFF: b cell activating factor

BCR: B-cell receptor, receptor de célula B

BIRC3: baculoviral IAP repeat-containing protein 3

BTK: Bruton's tyrosine kinase

CCR7: C-C chemokine receptor type 7

CDC: citotoxicidad dependiente de complemento

CDR3: región determinante de complementariedad-3

CIRS: Cumulative Illness Rating Scale

EMR: enfermedad mínima residual

ERIC: European Research Initiative in CLL

FC: combinación de fludarabina y ciclofosfamida

FCM: combinación de fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone

FCR: combinación de fludarabina, ciclofosfamida y rituximab

FISH: fluorescence in situ hybridization, hibridación in situ con sondas fluorescentes

GCLLSG: german chronic lymphocytic leukemia study group

GVL: graft versus leucemia

IG: inmunoglobulina

IGHV: regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas

IWCLL: International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia

LBM: linfocitosis B monoclonal

LLC: leucemia linfática crónica

MDM2: murine double minute-2

NCHS: National Centre for Health Statistics

NCI/WG: National Cancer Institute-sponsored Working Group

NK: natural killer

NLC: nurse-like cells

NOTCH1: neurogenic locus notch homolog protein 1

PI3K: Phosphatidylinositide 3-kinase

PLC γ 2: 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2

RB1: gen del retinoblastoma

RC: respuesta completa

RG: respuesta global

SDF1: cell-derived factor 1

SEER: Surveillance Epidemiology and End Results

Segmento D: segmento diversidad

Segmento J: segmento unión, del inglés "joint"

Segmento V: segmento variable

SF3B1: splicing factor 3B subunit 1

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

SLT: supervivencia libre de tratamiento

SYK: spleen tyrosine kinasa

TCR: T-cell receptor, receptor de célula T

TDL: tiempo de duplicación linfocitaria

TK: timidin kinasa

TLR: Toll-like receptors

VCAM1: vascular-cell adhesion molecule-1

ZAP-70: zeta-associated protein-70

I. INTRODUCCIÓN.

1. Leucemia linfática crónica: características biológicas y clínicas.

La leucemia linfática crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en la edad adulta en los países occidentales. La mediana de edad al diagnóstico es de 72 años y predomina en los hombres, con una ratio hombre:mujer de alrededor de 1,5. Su tasa de incidencia es de alrededor de 5 casos por 100.000 habitantes por año, y se incrementa con la edad hasta los 12,8 casos por 100.000 habitantes por año a los 65 años.(1-3) En los Estados Unidos, datos procedentes del SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) y del NCHS (National Centre for Health Statistics) indican una incidencia ajustada a la edad de 4,2 por 100.000 habitantes por año, 5,8 por 100.000 hombres por año y 3 por 100.000 mujeres por año.(4)

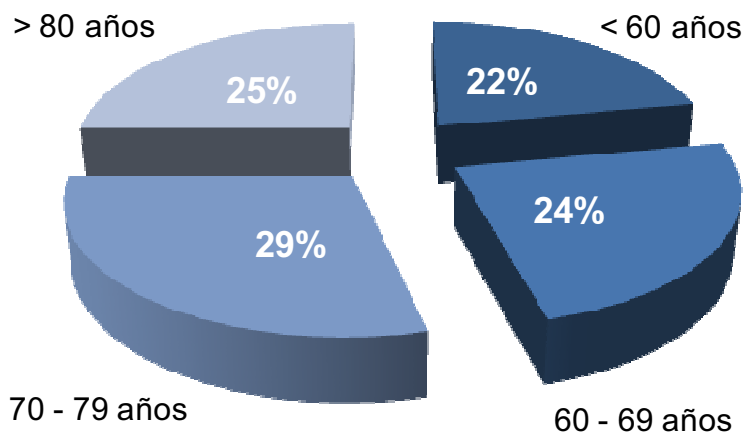


Figura 1. Distribución de la incidencia de la LLC según la edad al diagnóstico. "Surveillance, Epidemiology, and End Results Program" del "US National Cancer Institute" REPORT 2004 (www.seer.cancer.gov).

La LLC se caracteriza por la acumulación y proliferación de linfocitos clonales B maduros CD5 positivos en la sangre, médula ósea, y ganglios linfáticos. Actualmente la mayoría de pacientes con LLC se diagnostican por el hallazgo incidental de un recuento linfocitario elevado. La mediana de supervivencia de los pacientes es de alrededor de 10 años aunque su curso clínico es heterogéneo; mientras que algunos pacientes presentan una evolución indolente con una larga supervivencia, otros progresan de forma precoz y fallecen por causas relacionadas con la enfermedad.(5-7)

En la población sana se pueden identificar pequeñas poblaciones clonales u oligoclonales de linfocitos B con fenotipo de LLC. Esta situación, definida como linfocitosis B monoclonal, precedería a la LLC y se puede hallar hasta en el 3,5% de los individuos mayores de 40 años de edad.(8, 9)

1.1. Biología de la leucemia linfática crónica

La Leucemia linfática crónica es una neoplasia linfoide B madura con una patogenia todavía no bien conocida. No se conoce con exactitud cuál es el origen de la célula tumoral ni los mecanismos involucrados en su transformación neoplásica. Además, cabe destacar que en el desarrollo de esta enfermedad juegan un papel importante no sólo eventos de la propia célula tumoral, genéticos y epigenéticos, sino también factores externos a ella, como los estímulos antigénicos y el microambiente celular no tumoral.

1.1.1. Origen celular de la leucemia linfática crónica

En oncología, y particularmente en la hematología oncológica, determinar la contrapartida “normal” de la célula neoplásica es una condición importante para conocer su biología y los mecanismos implicados en la transformación de la misma. En la LLC todavía no se conoce con certeza cuál sería la contrapartida “normal” de la cual procede la célula leucémica. Durante los últimos años se han propuesto diversos candidatos que han ido cambiando a medida que, gracias fundamentalmente a los avances tecnológicos, se ha ido obteniendo un conocimiento más preciso de la biología de la LLC.

La primera hipótesis, formulada a partir del estudio de la expresión de antígenos de la superficie celular apuntaba como contrapartida normal de la LLC a la población linfocito B del manto folicular, debido en gran medida a que ambos tipos celulares expresan el antígeno CD5. Este antígeno que se expresa de forma frecuente en los linfocitos T, se encuentra normalmente ausente en la gran mayoría de linfocitos B. Sin embargo, el descubrimiento de que aproximadamente la mitad de los casos de LLC presentan mutaciones somáticas en los genes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (*IGHV*) puso en duda esta hipótesis. La hipermutación de los genes de las *IGHV* supone que estos casos probablemente han pasado por la reacción del centro germinal.(10) Además, la detección de mutaciones de *BCL6* en pacientes con LLC, un gen regulador esencial del programa de diferenciación de las células B en el centro germinal, reforzó la hipótesis de un origen post centro germinal.(11, 12) En este sentido, los estudios que inicialmente se realizaron de expresión génica mostraron que las células de LLC tenían un patrón de expresión más parecido a las células B memoria que a linfocitos B naïve, de centro germinal, o CD5+ de sangre de cordón.(13, 14) Este hecho junto con la expresión de antígenos de activación celular como el CD27 sugería que estas células habían

recibido un contacto antigénico previo.(15) En conjunto, todos estos datos favorecían como origen de la LLC una célula B memoria post centro germinal.

Por otro lado, el hecho de que la presencia o no de hipermutaciones en los genes *IGHV* distinga en la LLC a dos subgrupos de pacientes, LLC mutada y LLC no mutada, con distinta evolución clínica, y con diferencias en el repertorio de genes de *IGHV* utilizados,(10, 16) así como en la señalización a través del a través del receptor de la célula B (BCR, del inglés “B-cell receptor”) sugería un origen celular diferente para ambos subgrupos.(17-21) En busca de armonizar estos datos, se propusieron nuevos candidatos como los linfocitos B de la zona marginal esplénica,(22-24) o la célula B transicional o una población humana similar o equivalente a los linfocitos B-1 murinos.(25-30)

Recientemente un estudio comparativo del perfil de expresión génica de las células de LLC con el de diferentes subpoblaciones de linfocitos B normales ha aportado una mayor luz sobre el origen celular de la LLC.(31) En este nuevo análisis, se extendió y se afinó el repertorio de poblaciones de linfocitos B normales que se compararon con la LLC. A diferencia de los estudios de expresión génica anteriores,(13, 14) se incluyeron una población de linfocitos B de la zona marginal esplénica, y una población B CD5+ madura. Previamente, los linfocitos B CD5+ utilizados se obtuvieron de sangre de cordón, con lo que la mayoría de ellos eran linfocitos B transicionales y no linfocitos B CD5+ maduros.(29, 32) Con este nuevo enfoque, de las cinco poblaciones de células B incluidas, linfocitos B naïve, de la zona marginal esplénica, CD5+ maduros, células B memoria IgM+ o memoria “class switched”, la población con el perfil de expresión génica más concordante con la LLC fue la CD5+ madura. Además, se identificaron dos subtipos de linfocitos CD5+ maduros, pre centro germinal, CD5+/CD27-, y post centro germinal, CD5+/CD27+, que se asemejarían a la LLC no mutada y mutada, respectivamente.(31)

Finalmente, hay que destacar que la transformación leucémica de estas células probablemente sea un proceso secuencial con eventos sucesivos múltiples. El subtipo celular en el cual ocurriría el último evento marcaría en gran parte las características estructurales y funcionales de la leucemia, aunque esto no significa que todos los eventos transformadores tengan que ocurrir en este último estado. En este sentido, datos recientes apuntan que las células madre hematopoyéticas de los pacientes con LLC tendrían ya unas ciertas alteraciones todavía por dilucidar que las haría más propensas a formar linfocitos B clonales.(33)

1.1.2. Linfocitosis B monoclonal

En alrededor de un 3,5% de los individuos sanos mayores de 40 años se detectan pequeñas poblaciones de linfocitos B clonales con un inmunofenotipo propio de LLC, a pesar de presentar una cifra linfocitaria normal o muy discretamente aumentada. Esta situación se ha definido como linfocitosis B monoclonal (LBM).(8, 9) La aparición de estas clonas aumenta con la edad, con porcentajes superiores al 8% en los mayores de 70 años.(8) Además, aumentando la sensibilidad de las técnicas de citometría de flujo utilizadas, pueden detectarse linfocitos B clonales hasta en un 12% de los individuos sanos mayores de 40 años.(34) En la mayoría de los casos, estos clones presentan mutaciones de los genes *IGHV*.

Frente a la pregunta de si la LBM es un estado precursor de la LLC, la evidencia hasta el momento parece indicar que sí. Por un lado, la LBM aparece en mayor frecuencia en familiares de pacientes con LLC.(35) Además, datos recientes sugieren que prácticamente todos los casos de LLC estarían precedidos por una LBM.(36) Asimismo, se ha observado que las LBM presentan alteraciones genéticas características de la LLC, como la delección de 13q14.(37) En resumen, estas observaciones apuntarían a que la LBM no es sólo una simple expansión clonal relacionada con la edad sino un precursor pre-maligno neoplásico. El hecho de que la mayoría de los casos de LBM tengan hipermutaciones de los genes *IGHV* podría estar reflejando un comportamiento más agresivo de la LLC no mutada, la cual no persistiría mucho tiempo en una forma estable de LBM. Finalmente, debe resaltarse que sólo una pequeña fracción de las LBM progresará a una LLC. La frecuencia de la LBM es aproximadamente 100 veces superior a la de la LLC y se estima un riesgo de progresión a LLC de entre un 1 - 2% por año.(37, 38)

1.1.3. Receptor de la célula B y estado mutacional

El receptor de la célula B (BCR) es una inmunoglobulina altamente variable que permite reconocer una amplia diversidad de antígenos de forma específica. Esta variabilidad está determinada por la recombinación de los segmentos variable (V), diversidad (D) y unión (J) en las regiones variables de las cadenas pesadas y de los segmentos V y J de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas. Además, mediante el proceso de hipermutación somática se introducen nuevos puntos de mutación en las regiones variables. Para este fenómeno se requiere de la unión previa del BCR con el antígeno y de la cooperación de los linfocitos T y otras células con el linfocito B en el centro germinal.(39)

La LLC puede dividirse en 2 grandes subgrupos con pronósticos marcadamente diferentes en función del número de hipermutaciones somáticas en los genes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (*IGHV*). (10, 17, 18, 40) La LLC se define como no mutada cuando la clona de LLC presenta una homología de al menos el 98% en *IGHV* en relación con la secuencia germinal. Alrededor de la mitad de los pacientes presentan una LLC no mutada y la otra mitad una LLC mutada. Los pacientes con una LLC no mutada tienen un curso clínico más agresivo y una evolución desfavorable en comparación con los que presentan una LLC mutada. Aunque los fenómenos que condicionan este desigual curso clínico todavía no se conocen con exactitud, sí que se han hallado diversas diferencias biológicas remarcables entre ambos subgrupos. En este sentido, en la LLC no mutada existe una mayor asociación con otros factores biológicos de mal pronóstico, como una alta expresión de ZAP-70 y CD38, alteraciones genéticas desfavorables, una diferente longitud de los telómeros y una mayor señalización a través del BCR en comparación con la LLC mutada.(15, 17, 21, 40-46)

Las células de la LLC utilizan ciertas familias de genes *IGHV* en una distribución diferente a la observada en los linfocitos normales. Los genes más

utilizados dentro de estas familias son *VH1-69*, *VH3-07*, *VH3-23* y *VH4-34*. Además, se observan también reordenamientos estereotipados de los segmentos V, D y J con una región determinante de complementariedad-3 (CDR3) similar entre pacientes. Alrededor de un 30% de los pacientes cae dentro de algún subgrupo de receptor estereotipado.(47-53) Este hecho indica que probablemente la LLC deriva de una célula B con contacto antigénico previo.(13-15) De esta manera, la selección clonal mediada por antígenos podría ser la responsable del repertorio sesgado de *IGHV* observado tanto de la LLC mutada como no mutada.(10, 16) Recientemente se ha propuesto que algunos de estos antígenos podrían corresponder a autoantígenos derivados de las células apoptóticas. Por otro lado, algunos de estos epítomos reconocidos parecen ser altamente similares con antígenos microbianos.(54, 54-57) En conjunto, todas estas observaciones sugieren que la estimulación y selección antigénica tendrían un papel relevante en el desarrollo y evolución de la LLC.

Asimismo, la estructura del BCR es diferente entre la LLC mutada y no mutada. En la LLC no mutada existe una mayor proporción de reordenamientos V, D y J estereotipados con regiones CDR3 estrechamente similares, y el BCR suele ser polirreactivo y dirigido contra autoantígenos.(19, 47, 50, 52, 53, 56, 58) Por el contrario, los pacientes con LLC mutada presentan BCR oligo o monorreactivos con una unión antigénica más restringida y con una menor proporción de casos estereotipados.(19) Además, la presencia o ausencia de mutaciones somáticas se asocia también a familias diferenciales de los genes de las *IGHV*. En el subgrupo mutado predomina la familia de genes *VH3* y *VH4* y, en el subgrupo no mutado, la familia de genes *VH1* como por ejemplo *IGHV1-69*.(59) Por otro lado, ciertos BCRs estereotipados se han correlacionado con el pronóstico de los enfermos. Así, la presencia de *IGHV3-21* se ha asociado a un curso clínico agresivo de la enfermedad con independencia del estado mutacional.(47, 48, 53, 58, 60, 61)

Recientemente, diferentes observaciones abren un nuevo enfoque en el papel del BCR en la patogénesis de la LLC. Si bien lo expuesto hasta ahora sugería que la estimulación antigénica tendría un papel muy relevante en el desarrollo de la LLC, recientemente se ha propuesto que el BCR podría presentar una estimulación autónoma independiente de estímulos antigénicos extrínsecos. Esta señalización autónoma del BCR estaría mediada por el reconocimiento de ciertos epítomos intrínsecos del BCR y dependería de la configuración del CDR3 de la cadena pesada.(62) En conjunto, todos estos datos resaltan la importancia del BCR en el desarrollo y evolución de la LLC.

1.1.4. Alteraciones genéticas y epigenéticas

Las alteraciones genéticas y moleculares han contribuido de forma importante a dilucidar las bases biológicas de la diversidad clínica hallada en la LLC. A diferencia de lo que ocurre en otros síndromes linfoproliferativos B, las translocaciones cromosómicas balanceadas no son frecuentes en la LLC. Asimismo, tampoco se observa otro mecanismo común de lesión genética, como es la hipermutación somática aberrante, frecuente en otros síndromes linfoproliferativos como el linfoma de células grandes B.(63) Sin embargo, sí son muy frecuentes las amplificaciones y deleciones cromosómicas. En este sentido, mediante técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH), se ha demostrado que en más del 80% de pacientes con LLC se pueden detectar alteraciones genéticas. Las más frecuentes son la deleción de 13q14 (55%), la trisomía 12 (16%), la deleción de 11q22-23 (18%) y la deleción de 17p13 (7%). Su presencia, en el momento del diagnóstico o durante la evolución de la enfermedad, se ha correlacionado tanto con diferencias en cuanto al tiempo hasta la progresión y la supervivencia de los pacientes como con la respuesta al tratamiento.(64, 65) Sin embargo, estas alteraciones citogenéticas no explican por ellas mismas de forma global las bases biológicas de la heterogeneidad clínica de los pacientes con LLC. En este sentido, durante los últimos años se ha ido obteniendo una valiosa información adicional mediante la definición de las alteraciones moleculares que se correlacionan con las alteraciones genéticas previamente halladas. Así, tanto *TP53* como *ATM*, genes supresores de tumores afectados en la pérdida de 17p13 y de 11q22-q23, respectivamente, no sólo se hallan delecionados, sino que se encuentran recurrentemente mutados en la LLC. Además, mutaciones en estos genes, incluso en ausencia de una deleción, tienen un impacto pronóstico de forma adicional a la estratificación citogenética por FISH.(66-73)

1.1.4.1. Delección 13q14

Es la alteración genética más frecuente en la LLC ya que se observa en el 55% de los casos al diagnóstico, y está asociada a un pronóstico favorable.(65) La gran mayoría de deleciones son monoalélicas (76%), pero pueden ser también bialélicas (24%).(65) Se han descrito numerosas regiones delecionadas de tamaños entre 130 y 550 kb y se ha identificado una región mínima delecionada de 29kb (74, 75) localizada entre los exones 2 y 5 del gen *DLEU2*. Esta región abarca el locus de dos microRNAs, hsa-mir-16.1 y hsa-mir-15a. Además, puede también incluir la región codificante del gen del retinoblastoma (*RB1*).(76, 76-78) La pérdida de estos 2 microRNAs podría tener un papel relevante en la patogénesis de la LLC.(76, 79) Los mir-15a y mir-16-1 producen una regulación negativa de la proteína antiapoptótica BCL-2, por lo que su deleción conlleva una sobreexpresión de esta proteína. Además, la deleción de estos dos microRNAs en un modelo murino favoreció el desarrollo de síndromes linfoproliferativos con características muy parecidas a la LLC.(80)

1.1.4.2. Trisomía 12

La trisomía 12 se encuentra en un 15% de los pacientes con LLC. Aunque inicialmente se asoció a un mal pronóstico, actualmente se considera como una alteración de pronóstico intermedio.(81, 82) A pesar del estudio del papel de varios genes con locus en el cromosoma 12, como *MDM2*, *CCND2* o *CLLU1*, todavía se desconoce qué alteración estaría implicada en la patogenia de la enfermedad en estos pacientes.(83, 84)

1.1.4.3. Delección 11q22-q23

La delección 11q22-23 se observa en un 18% de los pacientes con LLC y está asociada a un pronóstico desfavorable y a casos con adenopatías de gran tamaño.(65, 82, 85) Esta delección afecta al gen *ATM* (ataxia telangiectasia mutada) en prácticamente todos los casos. *ATM* codifica una proteína kinasa con un papel fundamental en la mediación de la respuesta celular a roturas de doble cadena del DNA. Por un lado puede inducir apoptosis como respuesta al daño al DNA, o también puede actuar directamente en la reparación de las roturas de doble cadena del DNA.(86) Su inactivación disminuye la respuesta a agentes quimioterápicos que actúan a través de rupturas en las cadenas de DNA. De todas formas, para perder de forma completa la función de *ATM*, el otro alelo del gen debe estar mutado. Sin embargo, sólo en un tercio de los pacientes con delección de 11q se ha observado la inactivación bialélica de *ATM* por mutación del segundo alelo. Este hecho sugiere que otros genes situados en la región 11q22-23, como por ejemplo *NPAT*, *CUL5*, *PPP2R1B*, podrían estar también implicados en esta alteración.(87, 87, 87-89)

1.1.4.4. Delección 17p 13

Es la alteración genética con mayor impacto en el pronóstico de los pacientes con LLC. La del 17p13.1 se encuentra en una pequeña fracción de los pacientes al diagnóstico (4% - 9%) pero su incidencia aumenta a lo largo de la evolución de la enfermedad.(65, 81, 82, 90) Esta delección afecta a *TP53* y confiere un pronóstico claramente desfavorable. *TP53* es un factor de transcripción que se activa por la ruptura de las cadenas de DNA, y provoca apoptosis celular y/o arresto del ciclo celular, como mecanismo para preservar la integridad del genoma. Las mutaciones de *TP53*, asociadas o no a esta delección, también se relacionan con un peor pronóstico en la LLC, y pueden hallarse hasta en un 10% de los pacientes sin delección de

17p13.(66) La gran mayoría de casos con delección monoalélica de 17p13 presentan la mutación del segundo alelo de *TP53* (>80%).(66)

1.1.4.5. Nuevas mutaciones

No se ha encontrado todavía una mutación común causante de la LLC. A pesar de ello, mediante las técnicas de secuenciación de nueva generación se han hallado diferentes mutaciones recurrentes en diversos genes con una probable implicación en la patogenia y en el curso clínico de la enfermedad, como *NOTCH1*, *XPO1*, *MYD88*, *KLHL6*, *SF3B1*, *ZMYM3*, *MAPK1*, *FBXW7*, *DDX3X*, *POT1* o *BIRC3*.(91-94) De entre ellos, por su frecuencia e implicación clínica cabe destacar las mutaciones en *NOTCH1*, *SF3B1* y *BIRC3*.

NOTCH1 codifica una proteína transmembrana que actúa como un factor de transcripción y que regula diversos genes como *MYC*, *TP53* y moléculas implicadas en la vía de NFκB.(95, 96) Las mutaciones halladas en este gen afectan predominantemente el dominio PEST, incluyendo la delección recurrente c.7544_7545delCT, que comprende el 80% - 95% de todas las mutaciones.(91, 92, 97-99) El dominio PEST C-terminal es el responsable de la degradación proteosómica de la forma activada de *NOTCH1*. Así, su disrupción resulta en la estabilización de su forma activa, y la desregulación de su señalización, lo que afectaría a vías implicadas en el metabolismo celular y en el control del ciclo celular. *NOTCH1* se ha hallado mutado en un 4% - 12,2% de los pacientes con LLC, aunque su frecuencia aumenta en el subgrupo de LLC no mutada y con trisomía 12. Además, la presencia de esta mutación en la LLC se ha asociado a un curso clínico más agresivo y a un mayor riesgo de transformación a un linfoma agresivo, síndrome de Richter.(91-93, 97-104)

SF3B1 es un componente central del espliceosoma, un complejo formado por 5 ribonucleoproteínas que participan en la maduración del RNA mensajero mediante la escisión de intrones en los genes codificantes de proteínas.(105) En la LLC, las

mutaciones halladas de este gen se encuentran prácticamente todas en los dominios HEAT y se han detectado en un 5% - 15% de los pacientes, siendo este porcentaje mayor en pacientes con refractariedad a fludarabina y en casos con delección de 11q. Asimismo, la presencia de esta mutación se ha correlacionado con un peor pronóstico de los pacientes con LLC.(93, 100, 106) Las consecuencias funcionales de estas mutaciones en *SF3B1* todavía no se han dilucidado y siguen siendo objeto de estudio actualmente.

Finalmente, *BIRC3* es un regulador negativo de la serín-treonín quinasa MAP3K14, el principal activador de la vía de señalización no canónica de NFκB.(107) Asimismo, *BIRC3* también participa en el mantenimiento de los niveles de TP53 mediante la regulación de MDM2.(108) En la LLC, la mutación de *BIRC3* se traduce probablemente en una activación constitutiva de la vía no canónica de NFκB. Las mutaciones de *BIRC3* son poco frecuentes al diagnóstico de la LLC, inferior al 5%. Sin embargo, su alteración, tanto por delección como por mutación, se ha hallado en casi una cuarta parte de una población de pacientes con LLC refractarios a fludarabina, y de forma excluyente a mutaciones de *TP53*.(109)

Aunque el tamaño de las poblaciones estudiadas para estas nuevas alteraciones genéticas no permite todavía establecer correlaciones definitivas con las alteraciones genéticas previamente conocidas, sí que los datos obtenidos hasta la fecha sugieren que al diagnóstico y primer tratamiento *NOTCH1* y *SF3B1* tienden a ser mutuamente exclusivas entre ellas, y con las alteraciones de *TP53*. De esta manera, constituirían mecanismos genéticos que promoverían una enfermedad de mayor riesgo de forma alternativa a otras alteraciones conocidas como *TP53*.(91-93, 100, 106)

A pesar de todo ello, aun considerando los 50 genes más frecuentemente mutados en la LLC, en una parte importante de los pacientes no se halla ninguna de esas mutaciones, en comparación con lo que ocurre en otros tipos de tumores.

1.1.4.6. Evolución clonal en la LLC

La evolución clonal juega un papel importante en la progresión de los tumores y en su recaída. En la LLC, la delección de 13q14 y la trisomía 12 se hallan en frecuencias similares en las diferentes fases de la enfermedad.(37, 65, 110, 111) Las demás alteraciones genéticas se acumulan en las fases más avanzadas, con lo que probablemente representen segundas lesiones que son seleccionadas o adquiridas durante la evolución de la enfermedad. Recientemente, Landau y cols.(112) a través del estudio de la heterogeneidad intratumoral en casos de LLC mediante secuenciación del exoma, aportaron nuevos datos sobre la evolución clonal en esta enfermedad. Los resultados del estudio indican que la presencia de determinadas mutaciones, incluso en una pequeña fracción de la población tumoral, predicen un tiempo a la recaída más corto tras el tratamiento. De hecho, sugieren que mutaciones en genes como *SF3B1* o *TP53* estarían ya presentes a nivel subclonal al diagnóstico, y que el tratamiento con quimioterapia favorecería su expansión a lo largo de la evolución de la enfermedad. En cambio, las mutaciones en *MYD88*, la trisomía 12 y la delección de 13q14 se hallaron de forma predominantemente clonal, lo que sugiere que se trate de eventos iniciales en el desarrollo de la enfermedad.(112)

1.1.4.7. Alteraciones epigenéticas

La metilación aberrante del DNA parece tener un papel relevante en la génesis tumoral de diversos tipos de cáncer, donde predomina una mayor hipometilación global del genoma y una hipermetilación de determinadas regiones promotoras de diferentes genes supresores de tumores.(113) En la LLC, se ha hallado un perfil de metilación aberrante en el 2,5% - 8,1% de las islas CpG,(114) y en diversos genes que se creen implicados en la patogenia de la enfermedad, como *BCL2*, *TCL1*, *Aiolos*, *ID4* y *DAPK1*, este último asociado con la LLC familiar.(114, 115, 115-119) En este

sentido, en un modelo murino, se observó un patrón de metilación aberrante de secuencias de promotores de forma muy temprana, antes de la aparición de la enfermedad.(120)

Por otro lado, el estado de metilación de algunos genes (*CD38*, *HOXA4* o *BTG4*) se ha correlacionado con el pronóstico de los pacientes.(121) Además, los niveles de expresión de *ZAP-70* parecen relacionarse también con la metilación de determinadas islas CpG.(117) Asimismo, se han identificado diferentes patrones de metilación en diferentes subgrupos de LLC según el estado mutacional. En este sentido, se hallaron metilados diversos genes supresores de tumores en el grupo de LLC no mutada, como *VHL*, *ABI3* y *IGSF4*, y demetilados genes involucrados en mecanismos de progresión tumoral como proliferación celular, *ADORA3* y *PRF1*, y antiapoptóticos, como *BCL2*, entre otros.(122) Recientemente se han reportado los datos del primer estudio de análisis a gran escala de las alteraciones epigenéticas en la LLC.(123) En él, se ha confirmado que los dos grupos de LLC en función del estado mutacional tienen diferentes metilomas. Además, se asemejan a los patrones de metilación de distintas subpoblaciones de linfocitos B normales. Así, la LLC no mutada presenta un patrón de metilación propio de una célula B pre germinal y la LLC mutada, semejante a un linfocito B post centro germinal.

Sin embargo, a pesar de todos estos datos, todavía queda mucho camino por recorrer para esclarecer cuál es el papel preciso que juegan estos mecanismos epigenéticos en la patogenia y evolución clínica de los enfermos con LLC.

1.1.5. Microambiente

Las señales provenientes del microambiente juegan un papel primordial en la supervivencia de las células leucémicas en la LLC. La relevancia del microambiente en esta enfermedad se aprecia fácilmente por la incapacidad que tienen las células de LLC de permanecer viables en cultivos *ex vivo* en ausencia de determinados estímulos (p. ej. IL-4 o CD40 ligando).(124) *In vivo*, las células de LLC interactúan con todo un conjunto de células no tumorales, como linfocitos T CD40+CD4+, células del estroma, células dendríticas foliculares o células “nurse-like”, a través de contactos célula-célula o mediante factores solubles.(125) Estos fenómenos predominan en ciertas regiones anatómicas concretas, como el ganglio linfático y la médula ósea. En estas regiones, el microambiente provee a las células de LLC de señales antiapoptóticas y estímulos de proliferación, lo que origina, de forma característica en esta enfermedad, los centros de proliferación.(126) Además, las propias células de LLC reclutarían estas células accesorias, como linfocitos T CD4+ CD40+, que ayudarían a configurar este microambiente favorable.(127-129) Este contacto con células no leucémicas es de gran importancia para el mantenimiento de las células tumorales. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+ presentes en los ganglios linfáticos y en la médula ósea producen citoquinas, como la IL-4 e interferon α , que inhiben la apoptosis de las células de LLC. Además, a través del CD40 ligando (CD154), promueven la expresión de proteínas antiapoptóticas como la survivina y el BCL-2.(129) En este sentido, diversos estudios ponen de manifiesto que el co-cultivo *ex vivo* de células de LLC con fibroblastos transfectados con CD40 ligando, lo que reproduciría la señal recibida por los linfocitos T *in vivo*, aumentan la supervivencia de las células leucémicas y les confieren mayor resistencia a fármacos anti-tumorales.(130) Otras células que podrían estar implicadas en el mantenimiento de las células leucémicas son las “nurse-like cells” (NLC). Las NLCs se pueden obtener *in vitro* a partir de monocitos CD14+ a través de su interacción con células de LLC.(131) Las NLCs secretan el factor SDF1 (cell-derived

factor 1) y los factores APRIL (proliferation-inducing ligand) y BAFF (b cell activating factor), los cuales protegen a las células de LLC de la apoptosis.(132-134) Por otro lado, se cree que podrían interactuar directamente con las células de LLC a través de la unión del CD31 con el CD38 expresado en las células de LLC.(135, 136) Finalmente, Otros receptores que parecen jugar un papel importante son los receptores Toll-like (TLR), los cuales reconocen diferentes patrones moleculares (PAMPs) encontrados en componentes microbianos y promueven señales que inducen la maduración y proliferación de los linfocitos B. De entre ellos, las células de LLC presentan una alta expresión del TLR9, el cual puede estimularse mediante oligodeoxinucleótidos-CpG.(137)

1.1.5.1 Señalización a través del receptor de la célula B en la LLC

Las células leucémicas de la LLC requieren de las vías que utilizan los linfocitos B normales para su mantenimiento y expansión. De ellas, la activación y señalización a través del BCR probablemente sea la más relevante, aunque todavía sea poco conocido el mecanismo preciso de su estimulación y la naturaleza de los antígenos que lo activarían.(138, 139) El BCR consiste en una inmunoglobulina (Ig) transmembrana de superficie asociada con las cadenas Ig α (CD79a) y Ig β (CD79b),(140) y puede señalizar de dos maneras: una señal “tónica” de supervivencia y una señal de activación inducida por un antígeno.(141) La expresión de un BCR funcional es necesaria para el desarrollo y supervivencia de todas las células B maduras. La señal de supervivencia “tónica” es independiente de antígeno y está mediada por PI3K α (Phosphatidylinositide 3-kinase) y PI3K δ . Por otro lado, la estimulación antigénica del BCR activa, además de PI3K δ , otras tirosín quinasas que promueven señales de crecimiento, proliferación y maduración celular. Cuando un antígeno se une al BCR, las tirosín quinasas LYN y SYK inician una cascada de transducción de señales que implican otros elementos esenciales en la señalización

del BCR como las quinasas BTK, PI3K δ , y la fosfolipasa PLC γ 2 (1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2).

El estudio comparativo de perfiles de expresión génica de células de LLC aisladas de la sangre periférica, médula ósea y ganglios linfáticos, proporcionó una evidencia directa de la importancia de la señalización del BCR *in vivo* en la LLC.(142) Las células de LLC procedentes de los ganglios linfáticos exhibían un mayor nivel de activación de SYK, así como una mayor expresión de genes que indicaban activación del BCR y de proliferación tumoral. Esto indica que durante el curso de la enfermedad se mantiene una señalización antigénica activa. Además, la activación del BCR en estudios *ex vivo* aumenta la supervivencia de las células de LLC y en un cierto grado su proliferación,(143-147) y una respuesta intensa del BCR se correlaciona clínicamente con una enfermedad más agresiva.(142, 148)

En conjunto, todos estos datos, implican que la activación del BCR es una vía primordial en la patogénesis de la LLC. De esta manera, esta vía se ha convertido en una atractiva diana terapéutica y se han desarrollado diferentes agentes dirigidos a inhibir su señalización, principalmente inhibidores de quinasas como SYK, PI3K y BTK. La inhibición *ex vivo* de estas quinasas consigue bloquear señales esenciales de supervivencia y migración procedentes del microambiente. En este sentido, el inhibidor de SYK R406 bloquea la activación de AKT inducida mediante cocultivo con células estromales, así como la migración promovida por CXCL12.(149, 150) De una manera similar, CAL-101, inhibidor de PI3K δ , reduce la viabilidad de las células de LLC en cocultivo con células “nurse-like” y disminuye los niveles de diversas quemoquinas y citoquinas en estos cultivos.(151) Finalmente, el inhibidor de BTK PCI-37265, también bloquea la supervivencia celular inducida con el cocultivo de células estromales, así como antagoniza las señales protectoras de TNF- α y BAFF provenientes del microambiente.(152) Estos prometedores hallazgos han dado paso a toda una serie de ensayos clínicos con estas nuevas moléculas con resultados muy esperanzadores.

1.2. Diagnóstico de la LLC

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud de tejidos hematopoyéticos y linfoides define la leucemia linfática crónica / linfoma linfocítico de célula pequeña como una neoplasia compuesta de linfocitos B pequeños, monomórficos, redondos a ligeramente irregulares, en sangre periférica, médula ósea, bazo y ganglios linfáticos, junto con prolinfocitos y parainmunoblastos formando los centros de proliferación en los tejidos infiltrados.(153) Para el diagnóstico de la LLC se requiere la presencia en sangre periférica de $\geq 5 \times 10^9/L$ linfocitos clonales con un inmunofenotipo de LLC durante al menos 3 meses. La clonalidad de los linfocitos circulantes debe confirmarse por citometría de flujo.(154) En ausencia de adenopatías, visceromegalias, citopenias o síntomas relacionados con la enfermedad, la presencia de menos de $5 \times 10^9/L$ linfocitos clonales se define como una linfocitosis B monoclonal.(9) Si existen citopenias causadas por infiltración medular debe considerarse una LLC con independencia del número de linfocitos B en sangre periférica. Por otro lado, la definición de linfoma linfocítico de célula pequeña requiere la presencia de adenopatías junto con una cifra de linfocitos B en sangre periférica $< 5 \times 10^9/L$ y sin citopenias secundarias a infiltración medular. Su diagnóstico debería confirmarse con una biopsia ganglionar siempre que fuera posible.(154)

1.2.1. Morfología de los linfocitos de LLC

El estudio morfológico en sangre periférica muestra linfocitos de pequeño tamaño, con una alteración de la relación núcleo-citoplasma a favor del núcleo. El citoplasma generalmente es agranular, basófilo y escaso, y el núcleo es redondo y está compuesto por cromatina densa. Los linfocitos de la LLC son anormalmente frágiles, por lo que al momento de realizar el frotis sanguíneo se rompen con facilidad. Por este motivo es frecuente observar los restos de estos linfocitos en la extensión de sangre periférica, que son conocidos como sombras de Gümprrecht.(155) Según el aspecto morfológico, se describen 2 variantes de LLC:

- La forma típica: se observa la presencia de un 90% de linfocitos de aspecto típico (el mencionado anteriormente).
- La forma atípica: puede tener 2 tipos de presentación, la forma prolinfocítica, en la que se observa, junto con los linfocitos típicos de LLC, un porcentaje superior al 10% e inferior al 55% de linfocitos con morfología de prolinfocito (tamaño mediano, cromatina densa pero no cuarteada y nucléolo prominente), y la forma mixta, en la que se observa la presencia de una porcentaje superior al 15% de linfocitos atípicos, como prolinfocitos, centrocitos, centroblastos o linfocitos estimulados.

1.2.2. Inmunofenotipo de las células de LLC

Las células de LLC coexpresan el antígeno CD5 comúnmente expresado en los linfocitos T junto con los antígenos de linfocito B CD19, CD20, CD79b y CD23. De forma característica, los niveles de expresión tanto de las inmunoglobulinas de superficie, como de los antígenos CD20 y CD79b son bajos en comparación con los linfocitos B normales,(155, 156) aunque pueden existir variaciones en la intensidad de expresión de estos antígenos entre diferentes pacientes. Los linfocitos de la LLC son negativos para FMC7, CD10 y ciclina D1, y en general, expresan IgM o IgM e IgD en su superficie. Mediante la técnica de citometría de flujo, la clonalidad de las células de LLC se demuestra mediante la presencia de restricción en la expresión de cadenas ligeras kappa o lambda.

1.2.3. Histología de la biopsia ganglionar y de la médula ósea

La histología de la biopsia ganglionar en la LLC se caracteriza por la pérdida de la arquitectura ganglionar normal debido a una infiltración difusa por células tumorales, y a la presencia de áreas pálidas que se corresponden con pseudofolículos o centros de proliferación. Estos pseudofolículos están constituidos por linfocitos de mayor tamaño, paraimmunoblastos y prolinfocitos, rodeados de linfocitos pequeños, linfocitos T CD4+ y células dendríticas foliculares. Recientemente se ha identificado un subgrupo de pacientes que presentan un aumento de proliferación ganglionar con pseudofolículos expandidos con un mayor número de mitosis o Ki-67. Estos pacientes con una “LLC acelerada” presentan un curso clínico más agresivo.(157)

El estudio de la médula ósea no es prioritario en el diagnóstico de la LLC. La infiltración medular es un hecho constante y puede adoptar diferentes patrones: intersticial, nodular, mixto o difuso. En el patrón intersticial, la infiltración linfocitaria no altera la arquitectura medular normal. El patrón nodular es el más infrecuente; se define por la presencia de nódulos de contorno regular formados por linfocitos pequeños y sin infiltración intersticial. El patrón mixto es la combinación del patrón nodular e intersticial. Finalmente, el patrón difuso se caracteriza por la sustitución del tejido hematopoyético normal por linfocitos leucémicos con desaparición de la celularidad grasa. En la médula ósea, la presencia de pseudofolículos es menos frecuente que en el ganglio linfático.(158)

1.3. Factores pronósticos

El curso clínico de la LLC es muy heterogéneo. En este sentido, la supervivencia de los pacientes varía entre menos de 1 - 2 años hasta más de 15 años.(5-7) Los sistemas de estadiaje clínico de Rai y Binet continúan siendo actualmente el pilar para distinguir aquellos pacientes con un estado avanzado de la enfermedad, quienes presentarán una supervivencia global y una supervivencia libre de tratamiento generalmente inferiores a los pacientes con estadios precoces de la enfermedad.(159, 160) Sin embargo, estos sistemas de estadiaje clínicos, no nos aportan una estratificación del riesgo de progresión en los estadios iniciales, así como tampoco predicen la respuesta a los tratamientos empleados.

En el momento actual la gran mayoría de los pacientes con LLC se encuentran en estadios iniciales al diagnóstico, sin requerir tratamiento. Establecer factores que puedan predecir la evolución clínica de la enfermedad en este momento es fundamental para determinar qué pacientes progresarán a estadios más avanzados y requerirán tratamiento. Durante los últimos años ha habido un gran progreso en la identificación de marcadores celulares y moleculares que predicen la tendencia a la progresión de los pacientes con LLC. Así, junto con los factores pronósticos clásicos como los estadios clínicos de Rai y Binet, el patrón de infiltración de la médula ósea o el tiempo de duplicación linfocitario, disponemos también de otros factores biológicos como las alteraciones genéticas, el estado mutacional de los genes de las inmunoglobulinas o la expresión de ZAP-70, CD38 y CD49d, entre otros, que nos ayudan a predecir cuál puede ser el curso clínico de la enfermedad. Finalmente, cabe destacar que aunque la mayoría de estos parámetros son útiles para predecir el curso clínico de los enfermos, aportan poca información en la respuesta a los tratamientos utilizados y en la toma de decisiones terapéuticas. En este sentido, actualmente sólo la presencia de algunas alteraciones genéticas, principalmente la delección de 17p, parecen tener un impacto en la decisión del plan terapéutico de los enfermos. (154)

1.3.1. Sistemas de estadiaje clínicos

En la LLC existen dos sistemas de estadiaje utilizados de forma universal: los sistemas de Rai(159) y de Binet(160). La clasificación original de Rai se modificó posteriormente para reducir el número de grupos pronósticos de cinco a tres.(161) Los dos sistemas describen tres subgrupos de pacientes con supervivencias claramente diferenciadas: estadio inicial (Rai 0, Binet A; supervivencia estimada >10 años), estadio intermedio (Rai I/II, Binet B; supervivencia estimada entre 5 y 7 años) y estadio avanzado (Rai III/IV, Binet C; supervivencia estimada de 1 a 3 años). Ambos sistemas son muy sencillos y pueden aplicarse de forma amplia. Ambos se fundamentan en la exploración física y en un test de hemograma, sin requerir técnicas de imagen (ver tabla 1 y tabla 2).

Tabla 1. Sistema de estadiaje de Rai

	Linfocitosis	Adenopatías	Hepato/esplenomegalia	Hemoglobina	Plaquetas
0	+	-	-	≥ 11g/dL	≥ 100x10 ³ /μl
I	+	+	-	≥ 11g/dL	≥ 100x10 ³ /μl
II	+	(+/-)	+	≥ 11g/dL	≥ 100x10 ³ /μl
III	+	(+/-)	(+/-)	< 11g/dL	≥ 100x10 ³ /μl
IV	+	(+/-)	(+/-)	>> 11g/dL	< 100x10 ³ /μl

Tabla 2. Sistema de estadiaje de Binet

	Linfocitosis	Regiones adenopáticas	Hemoglobina	Plaquetas
A	+	<3 regiones	≥ 10g/dL	≥ 100x10 ³ /μl
B	+	≥ 3 regiones	≥ 10g/dL	≥ 100x10 ³ /μl
C	+	(+/-)	<10g/dL ó <100x10 ³ /μl	

Fueron los primeros factores pronósticos usados de forma extensa en la LLC y continúan siendo actualmente una valiosa herramienta que de forma sencilla y poco costosa predice la supervivencia de los pacientes. Pero a pesar de su utilidad, cabe también destacar que existe una gran heterogeneidad en el comportamiento clínico de los pacientes dentro de cada una de las categorías. Además, a esta limitación se le suma el hecho de que la mayoría de los pacientes actualmente se diagnostican en estadios iniciales, Rai 0 y Binet A, con lo que el estadio por sí mismo no predice adecuadamente el riesgo de progresión para un paciente concreto.

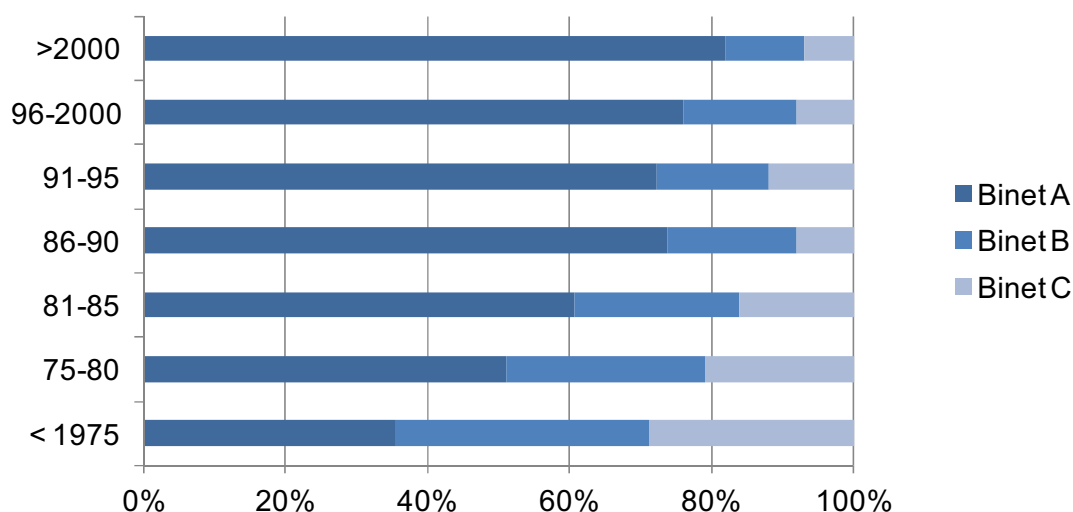


Figura 2. Visión histórica del estadio al momento del diagnóstico de la LLC.
 Abrisqueta p, et al. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2008; 112: 48.

1.3.2. Parámetros biológicos

Durante los últimos años se han identificado un conjunto de nuevos factores pronósticos, principalmente las alteraciones genéticas, el estado mutacional y la expresión de diversas proteínas, que reflejan las diferencias biológicas entre los enfermos y que nos ayudan a predecir su evolución clínica.

1.3.2.1. Alteraciones genéticas

En el año 2000, Döhner y cols., mediante técnicas de FISH, identificaron la presencia de alteraciones genéticas en más del 80% de los pacientes con LLC.(65) Además, correlacionaron la evolución clínica de los pacientes con las alteraciones detectadas, obteniendo un modelo jerárquico con cinco categorías de riesgo claramente diferenciadas. Los pacientes que presentaban la delección de 17p13, con una prevalencia del 7%, tenían el peor pronóstico con una mediana de supervivencia de tan sólo 32 meses, independientemente de si tenían o no otras alteraciones. A continuación se hallaban los pacientes con delección de 11q22-q23 con una prevalencia del 18% y una mediana de supervivencia de 79 meses, la trisomía 12, con una prevalencia del 16% y mediana de supervivencia de 114 meses, el cariotipo normal, prevalencia del 18% y supervivencia de 111 meses, y finalmente la delección de 13q14, siendo la alteración más prevalente, 55% de los pacientes, y con la mayor supervivencia global, 133 meses.(65)

De entre ellas, las delecciones y/o mutaciones del gen *TP53*, constituyen el factor pronóstico adverso más importante en la LLC, y no sólo porque pronostican una evolución precoz a una enfermedad sintomática, (90, 162-165) sino porque también predicen una peor respuesta a los tratamientos empleados comúnmente en la LLC, como los agentes alquilantes, los análogos de purina, e incluso las nuevas combinaciones de inmunoterapia.(81, 82, 166, 167) *TP53* es un factor de

transcripción que se activa cuando se producen roturas en las cadenas de DNA. Una vez activado, actúa desencadenando la apoptosis de la célula y/o parando el ciclo celular, (168) por lo que su función es de vital importancia para la actividad de la mayoría de fármacos utilizados en el tratamiento de la LLC. La delección de 17p13 se asocia a otros factores de pronóstico adverso como la ausencia de hipermutaciones en *IGHV*, y la expresión elevada de ZAP-70 y CD38.(65, 169, 170) *TP53* puede estar mutado tanto en presencia como en ausencia de delecciones de 17p13.(44, 171, 172). Además, es importante destacar que la presencia de mutaciones de *TP53* en ausencia de delección de 17p13 se asocia también a un curso clínico adverso parecido al que presentan los pacientes con delección de 17p13.(66, 67, 69, 70) En el estudio del grupo alemán GCLLSG CLL4 (fludarabina vs. fludarabina junto con ciclofosfamida)(166) ninguno de los enfermos con *TP53* mutado consiguió una respuesta completa, y tanto la mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) (23.3 meses vs. 62.2 meses), como de supervivencia global (SG) (29.2 meses vs. 84.6 meses) fueron claramente inferiores en comparación con los pacientes sin *TP53* mutado.(173) Se obtuvieron unos resultados similares cuando se analizó el impacto de las mutaciones en *TP53* en el estudio LRF CLL4 del grupo inglés (clorambucilo vs. fludarabina vs. fludarabina junto con ciclofosfamida), con una tasa de respuestas completas (RC) de tan sólo 5%, una SLP a los 5 años del 5%, y una SG a los 5 años del 20% en los pacientes con *TP53* mutado.(174)

La delección del brazo largo del cromosoma 11 también se asocia a un pronóstico desfavorable en la LLC y a veces, de forma característica, a adenopatías de gran tamaño. Esta delección es más frecuente en casos de LLC no mutada y con expresión alta de ZAP-70 o CD38.(65, 68, 89, 170) *ATM* participa en la vía de respuesta al daño al DNA con lo que su pérdida de función disminuye la respuesta de las células de LLC al tratamiento.(89, 175) Por otro lado, *ATM* puede estar mutado tanto en presencia como en ausencia de delecciones de 11q22-q23, siendo un factor

pronóstico adverso de forma independiente.(68, 71-73) Al diagnóstico, los pacientes con mutaciones en *ATM* presentan una SG y una supervivencia libre de tratamiento (SLT) significativamente más cortas que los pacientes con *ATM* germinal. (68, 71-73) A pesar de ello, el impacto de las mutaciones en *ATM* en la respuesta al tratamiento de quimioterapia todavía es una cuestión por esclarecer. En estudios *ex vivo*, las células de LLC con delección de 11q22-q23 con el otro alelo de *ATM* germinal conservan una respuesta adecuada al daño al DNA, lo que sugiere que la pérdida de un único alelo no sería suficiente para inducir quimiorrefractoriedad.(89) De forma consistente con estos datos, los pacientes del estudio LRF CLL4 del grupo inglés con delección de 11q22-q23 y mutación del otro alelo de *ATM* presentaban una SLP (mediana de 7.4 meses) significativamente inferior a aquellos pacientes con delección de *ATM* pero con un segundo alelo no mutado (17.1 meses), *ATM* germinal (28.6 meses), o sólo con un alelo mutado de *ATM* (30.8 meses). Además, los pacientes con la pérdida bialélica de *ATM* tenían una SG inferior a los pacientes con *ATM* germinal, o con sólo *ATM* mutado (mediana 42.2 meses vs. 85.5 meses vs. 77.6 meses, respectivamente).(176) Además, cabe destacar que a pesar del mal pronóstico observado en los pacientes tratados con agentes alquilantes o análogos de las purinas, los regímenes de inmunquimioterapia parecen superar el efecto adverso de esta alteración. En este sentido, los pacientes con delección de 11q22-q23 tratados con la combinación de FCR consiguieron una tasa de respuestas y una SLP similares a los pacientes de riesgo citogenético estándar.(167)

Además de las mutaciones y delecciones de *TP53* y *ATM*, existen otros factores que podrían jugar un papel relevante en la alteración de la vía de reconocimiento de daño en el DNA. Estos mecanismos incluirían alteraciones de *MDM2*, gen que regula la función de *TP53*.(89, 177, 178) La presencia de polimorfismos de *MDM2* que causan una expresión aberrante de *MDM2* se ha asociado a un pronóstico adverso en la LLC.(89, 175, 178)

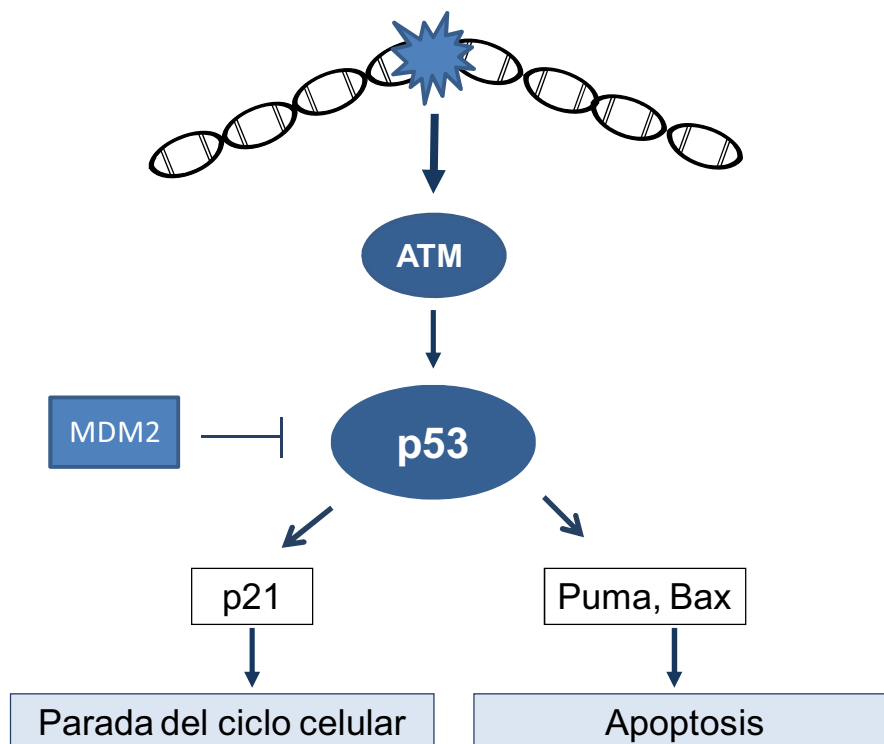


Figura 3. Vía del daño inducido al DNA. Mecanismo de acción empleado por diferentes fármacos utilizados comúnmente en el tratamiento de la LLC, como los agentes alquilantes y los análogos de las purinas. (Elaboración personal).

Al diagnóstico, las alteraciones de peor pronóstico como la delección de 11q y la delección de 17p son poco frecuentes, pero pueden aparecer durante la evolución de la enfermedad. Dado que su presencia puede influir en la elección del tratamiento escogido y predecir la respuesta al mismo, su detección debería repetirse en el momento de la progresión de la enfermedad o antes de administrar un nuevo tratamiento. Además, debido al impacto pronóstico de las mutaciones de *TP53* de forma independiente a la delección de 17p, el análisis mutacional de *TP53* podría ser también aconsejable en el momento de la progresión de la enfermedad.

Tanto las mutaciones de *TP53* como de *ATM* tienen notables implicaciones clínicas en los pacientes con LLC.(167, 173) Así, está bien establecido que en aquellos pacientes con disfunción de *TP53* deberían plantearse tratamientos

específicos e incluso el trasplante alogénico como estrategia terapéutica ya en la primera línea de tratamiento,(179-191) y que los pacientes con disrupción de *ATM* serían candidatos a regímenes con combinaciones de inmunoterapia.

A pesar de todo ello, las alteraciones de *TP53* explican sólo alrededor de un 40% de los casos que presentan refractariedad al tratamiento de quimioterapia, con lo que todavía queda por dilucidar qué alteraciones son las responsables de la falta de respuesta al tratamiento en más de la mitad de los casos.(192) En este sentido, las nuevas alteraciones moleculares descubiertas en los últimos años deben aportar mayor luz a la patogénesis de la LLC de alto riesgo.

1.3.2.2. Relevancia clínica de las nuevas mutaciones en la LLC

Más allá de las mutaciones en *TP53* o *ATM*, el hallazgo de nuevas mutaciones mediante las técnicas de secuenciación completa del genoma, debe ayudar a clarificar las bases moleculares de los subgrupos de pacientes con una LLC con un curso de la enfermedad más agresivo. Aunque sus implicaciones clínicas precisas todavía deben ser validadas, diversos estudios retrospectivos han mostrado que las mutaciones en *NOTCH1*, *SF3B1* y *BIRC3* se correlacionan con el pronóstico y con la evolución de los pacientes con LLC. Los pacientes con *NOTCH1* mutado tienen una progresión de la enfermedad más rápida y presentan una supervivencia acortada (21% - 45% a los 10 años) en comparación con los pacientes con *NOTCH1* germinal (56% - 66% a los 10 años). Además, la mutación de *NOTCH1* se ha asociado a un mayor riesgo de transformación a síndrome de Richter.(91, 92, 98, 99) De forma similar, los pacientes con *SF3B1* mutado presentan un tiempo hasta requerir tratamiento más corto así como una supervivencia inferior (10% - 48% a los 10 años) a los pacientes con *SF3B1* germinal (60% - 77% a los 10 años).(93, 100, 106) Actualmente, la relevancia clínica de estas mutaciones está siendo validada en diversos estudios prospectivos y en ensayos clínicos. En este sentido, en una cohorte de pacientes con LLC bien

caracterizada desde el diagnóstico incluida en el estudio escandinavo Scandinavian Lymphoma Etiology study, tanto las mutaciones de *NOTCH1* como de *SF3B1* se han asociado a una evolución desfavorable de la enfermedad, tanto en términos de un corto tiempo hasta la necesidad de tratamiento como de supervivencia.(193) El análisis de estas mutaciones en el ensayo LRF CLL4 del grupo inglés, también corrobora el impacto negativo de estas alteraciones. En este estudio, tanto los pacientes con *NOTCH1* mutado como *SF3B1* mutado presentaban una supervivencia inferior a los pacientes sin mutación en estos de genes (55 meses, 54 meses, vs. 83 meses), aunque mayor a la que presentaban los pacientes con *TP53* mutado (26 meses).(194) Finalmente, en el momento actual sólo disponemos de datos preliminares sobre el impacto de las alteraciones de *BIRC3* en la evolución de los pacientes con LLC. Aún así, su alta prevalencia en una población de enfermos refractarios a fludarabina sugiere la asociación de esta alteración con la quimiorrefractoriedad de los enfermos y la progresión de la enfermedad.(109)

Mediante la integración de estos datos al modelo jerárquico del FISH, se ha propuesto un nuevo modelo pronóstico con la intención predecir de forma más precisa la evolución de los pacientes. Así, se han formulado cuatro grupos genéticos de riesgo:(195)

1. Alto riesgo: pacientes con alteraciones en *TP53* y/o en *BIRC3* de forma independiente a la presencia o no de otras alteraciones, con una prevalencia al diagnóstico entorno al 15% - 20% de los enfermos, y con una supervivencia esperada a los 10 años del 29%.
2. Riesgo intermedio: pacientes con mutaciones en *NOTCH1* o *SF3B1*, o delección de 11q22-q23, con una prevalencia al diagnóstico del 15% - 20%, y una supervivencia calculada a los 10 años del 37%.

3. Bajo riesgo: pacientes con trisomía 12 o con una citogenética normal, que comprenderían el 40% de los pacientes al diagnóstico, con una supervivencia a los 10 años del 57%.
4. Muy bajo riesgo: pacientes con la presencia de delección de 13q14 sin otras alteraciones, con una prevalencia al diagnóstico del 20% - 25%, y una supervivencia parecida a la de la población general, 69% a los 10 años.

1.3.2.3.- Estado mutacional de los genes *IGHV*

En función del estado mutacional de los genes de *IGHV* se describen dos formas clínicas de LLC, la LLC con hipermutación de *IGHV* (LLC mutada) y la LLC sin hipermutación de *IGHV* (LLC no mutada). Los pacientes con LLC no mutada presentan un pronóstico claramente desfavorable en comparación con los pacientes con una LLC mutada,(17, 18) y se relaciona con factores pronósticos adversos (p.ej. del 11q22-23 o del 17p13.1), a la necesidad de tratamiento precoz y a una menor supervivencia. Por el contrario, la LLC mutada se asocia a una evolución clínica menos agresiva de la enfermedad y a una supervivencia de los pacientes superior a los 10 años. El valor pronóstico del estado mutacional es independiente de los estadios clínicos y de las alteraciones citogenéticas. Por otro lado, aunque los datos reportados hasta el momento no evidencian que pueda predecir la respuesta al tratamiento, sí parece ser un buen predictor de su duración.(81, 175, 196)

Además del estado mutacional, la presencia de ciertas familias de genes VH también se ha relacionado con la evolución de de los enfermos. En este sentido, *IGHV3-21* se ha asociado a un curso clínico agresivo de la enfermedad con independencia del estado mutacional.(197)

1.3.2.4.- ZAP-70

ZAP-70 (zeta-associated protein-70) es una proteína tirosín-kinasa intracelular miembro de la familia Syk que se asocia a la cadena ζ del complejo CD3 de los linfocitos T.(198) Originalmente fue identificada en los linfocitos T y natural killer (NK), donde juega un papel fundamental en la señalización a través del receptor de la célula (TCR).(198-200) Después de la estimulación del TCR, ZAP-70 se fosforila y participa en la transducción de señales de diferenciación celular, proliferación y desarrollo de funciones efectoras de los linfocitos T. En la LLC, se observó que una proporción variable de sus linfocitos expresaban esta proteína, y que su nivel de expresión se correlacionaba con el estado mutacional.(14, 41, 201-203) La expresión alta de ZAP-70, usualmente utilizando un punto de corte del 20% mediante citometría de flujo, se asocia de forma consistente a la ausencia de mutaciones *IgVH*, y a su vez, los casos con expresión baja a *IgVH* mutados. Además, la expresión de ZAP-70 se correlaciona con un pronóstico adverso en la LLC, de forma independiente del estado mutacional. Los casos con expresión alta presentan un tiempo a la progresión y una supervivencia global inferiores a los casos con expresión baja. (41, 41, 201, 201-204) Sin embargo, no existe una evidencia clara que la expresión de ZAP-70 pueda predecir una peor respuesta al tratamiento.(82, 175)

Las razones por las que se expresa ZAP-70 en las células tumorales de LLC y los mecanismos biológicos que determinan un curso de la enfermedad más agresiva, todavía no están bien clarificados. El pronóstico negativo de la expresión de ZAP-70 podría explicarse, en parte, por la mayor capacidad de respuesta antigénica a través de la señalización del BCR de estas células. ZAP-70 puede modular la señalización a través del BCR en los linfocitos de LLC, y aumentar y prolongar la señalización de otras moléculas como Syk.(46, 46, 205, 206) Además, recientemente se ha asociado la expresión de ZAP-70 a una mayor capacidad de migración de las células de LLC

como consecuencia de una mayor expresión de determinados receptores como CCR7 y un aumento en la respuesta a sus ligandos CCL19 y CCL21.(207-209) Esta ventaja en la migración y en la respuesta a estímulos de supervivencia procedentes del microambiente podría explicar la mayor agresividad clínica observada en estos pacientes.

1.3.2.5.- CD38

CD38 es una glicoproteína de membrana tipo II de 45-kDa que se comporta a la vez como receptor y como enzima de superficie celular.(210) CD38 se encuentra ampliamente expresado dentro del sistema hematopoyético en células progenitoras de la médula ósea, monocitos, plaquetas y eritrocitos.(211) En la LLC, varios estudios demostraron la asociación entre la expresión alta de CD38 y la ausencia de mutaciones *IGH*, así como con una evolución desfavorable de la enfermedad.(17, 40, 212-217)

Desde un punto de vista biológico, la interacción entre CD38 y CD31 expresado por diferentes tipos celulares como células endoteliales, estromales y “nurse-like cells”, confiere señales de supervivencia a las células de LLC.(218) Estas interacciones probablemente predominan en los ganglios linfáticos y en la médula ósea.(134, 219, 220) Además, las células de LLC CD38 positivas presentan un aumento en su capacidad migratoria hacia CXCL21, especialmente si coexpresan ZAP-70.(207, 209)

1.3.2.6.- CD49d

CD49d o integrina $\alpha 4$, actúa como molécula de adhesión en interacciones célula-célula a través de su unión con VCAM-1 (vascular-cell adhesion molecule-1), y en interacciones con componentes de la matriz extracelular mediante su unión con fibronectina o con Emilin-1 (elastin microfibril interfacier-1).(221, 222) Estas interacciones aportan señales de supervivencia a las células de LLC.(223) Desde un punto de vista clínico, varios grupos relacionaron la expresión elevada de CD49d en las células de LLC (> 30% determinada por citometría de flujo), con un curso más agresivo de la enfermedad.(224-227)

1.3.3.- Marcadores séricos

Varios estudios muestran que el análisis del valor sérico de CD23, timidin kinasa (TK) y de la β_2 -microglobulina puede predecir la supervivencia libre de progresión o la supervivencia global de los pacientes con LLC.(228-231) De ellos, el más ampliamente utilizado es la determinación de la β_2 -microglobulina sérica, el cual se ha correlacionado de forma robusta en varios estudios con el pronóstico de los pacientes con LLC.(231-233) La timidin kinasa es una enzima celular implicada en la síntesis del DNA. Su medida refleja probablemente el grado de proliferación de las células de LLC.(234) El CD23 sérico es otro parámetro en el que sus niveles elevados predicen un riesgo de progresión más precoz en la LLC.(235)

1.3.4.- Parámetros cinéticos: tiempo de duplicación linfocitaria

El tiempo de duplicación linfocitaria (TDL) se define como el periodo de tiempo necesario para doblar el recuento linfocitario en sangre periférica. Es un parámetro sencillo de calcular, que si bien no está disponible al diagnóstico, se puede calcular por extrapolación en un breve periodo de tiempo. Es un parámetro útil en pacientes en estadios precoces, Binet A o Rai 0-1, que nos permite evaluar la cinética de la enfermedad. Un TDL inferior a 12 meses predice un curso clínico más agresivo y una supervivencia inferior en comparación con los pacientes que presentan un TDL mayor o cifras linfocitarias estables.(236-238) Incluso, de forma aún más simple que el TDL, el recuento linfocitario absoluto, demostró también la capacidad de predecir la SLP y SG de los pacientes con LLC.(231)

1.3.5.- Biopsia médula ósea

La médula ósea en la LLC suele estar infiltrada por > 30% de linfocitos. El tipo de infiltración de la biopsia medular, difusa vs. no difusa, refleja la carga tumoral de los enfermos y proporciona información pronóstica.(158) La presencia de un patrón de infiltración difuso se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad en comparación con el patrón intersticial, nodular o mixto (intersticial y nodular).(158)

1.3.6.- Respuesta al tratamiento como factor pronóstico: impacto de la enfermedad mínima residual

La calidad de la respuesta al tratamiento recibido es un predictor de la duración de la misma y de la supervivencia en la mayoría de las enfermedades oncológicas. En este sentido, numerosos estudios en la LLC han demostrado que los pacientes que consiguen una mejor respuesta al tratamiento, fundamentalmente cuando se logra negativizar la EMR, presentan una duración de la respuesta y una supervivencia mayor.(182, 239-246) Cada vez disponemos de datos más sólidos sobre el valor predictivo de la EMR y de su impacto sobre la evolución de los enfermos en la LLC. Recientemente, los datos del estudio CLL8 del German CLL Study Group (GCLLSG) corroboraron el valor predictivo de la cuantificación de la EMR en una serie amplia de enfermos dentro de un estudio prospectivo aleatorizado. En este estudio se analizaron de forma prospectiva los niveles de EMR obtenidos tras el tratamiento con fludarabina y ciclofosfamida (FC) o rituximab, ciclofosfamida y fludarabina (FCR) en 493 pacientes. Los niveles de EMR fueron categorizados como bajos ($<10^{-4}$), intermedios ($\geq 10^{-4}$ a $<10^{-2}$), y altos ($\geq 10^{-2}$). La mediana de SLP en los pacientes agrupados según los niveles de EMR obtenidos tras el tratamiento fue de 68,7 meses, 40,5 meses y 15,4 meses para los niveles de EMR bajo, intermedio y alto. Los niveles de EMR también fueron predictores de la supervivencia de los enfermos con una mediana de SG de 48,4 meses para los pacientes en el grupo de EMR alto, en contraste con una mediana de SG todavía no alcanzada en el grupo de EMR bajo. Además, demostraron que el valor de la EMR es independiente de otros factores pronósticos, así como de la terapia previa empleada (FCR vs. FC).(244)

A pesar de todo ello, todavía está actualmente en discusión si el conseguir una EMR negativa debe ser uno de los objetivos del tratamiento.(239, 243) Además, no existen datos sólidos sobre el posible beneficio de intensificar el tratamiento de los pacientes con persistencia de EMR positiva tras un tratamiento inicial, por ejemplo con

estrategias de consolidación o mantenimiento, o de retratar aquellos pacientes con EMR negativa cuando la positivizan. En este sentido, en la actualidad no se recomienda su evaluación en la práctica clínica habitual y se reserva su análisis dentro del contexto de ensayos clínicos con tratamientos dirigidos a obtener respuestas profundas y duraderas.(154) Finalmente, todavía se desconoce cuál será su valor en los pacientes tratados con los nuevos fármacos, como los inhibidores de tirosín quinasa, los cuales consiguen un muy buen control de la enfermedad aunque no se obtenga en la mayoría de los casos una respuesta completa de la misma.(247, 248)

1.4. Manifestaciones clínicas de la LLC

La presentación clínica de la LLC es variable. La gran mayoría de diagnósticos se realizan en pacientes asintomáticos por el hallazgo casual de una linfocitosis en una analítica de rutina. A pesar de ello, algunos pacientes pueden referir síntomas, tanto al diagnóstico como durante la evolución de la enfermedad. Los pacientes pueden presentar crecimiento adenopático, organomegalias, como hepatomegalia o esplenomegalia, hipertrofia amigdalar y/o alteraciones cutáneas, y aunque de forma infrecuente, pueden también referir síntomas B como son sudoración nocturna, fiebre, o pérdida de peso, así como cansancio e intolerancia física progresiva.(159, 160) Además, pueden presentar infecciones de repetición, favorecidas por la hipogammaglobulinemia que se encuentra de forma frecuente en estos pacientes (60%).

Otros fenómenos asociados a la enfermedad son las alteraciones autoinmunes, de entre las cuales las más frecuentes son la anemia hemolítica (10% a 25% de los casos) y la trombocitopenia (2%).(249) De forma más infrecuente (<1%) los pacientes pueden desarrollar una eritroblastopenia.

Finalmente, los pacientes con LLC pueden presentar una transformación a un síndrome linfoproliferativo de alto grado. Entre un 2% - 8% de los pacientes pueden desarrollar un linfoma difuso de células grandes B, síndrome de Richter, y de forma muy infrecuente, un linfoma de Hodgkin, <1%.(250, 251) Otra consideración a tener en cuenta, es una mayor asociación a segundas neoplasias.

2. Tratamiento de la leucemia linfática crónica.

Durante varias décadas el tratamiento de la LLC se ha basado en el empleo de agentes alquilantes como el clorambucilo, en los análogos de la purinas, principalmente la fludarabina, o en la asociación de ambos, como la combinación de fludarabina y ciclofosfamida.(252-257) Posteriormente, las combinaciones de inmunoterapia han revolucionaron el tratamiento de esta enfermedad, consiguiendo mejorar la tasa de respuestas y la calidad de ellas, con la negativización de la EMR, lo que se ha traducido en intervalos de supervivencia libre de progresión superiores a los cinco años y en una mayor supervivencia de los enfermos.(167, 258-260)

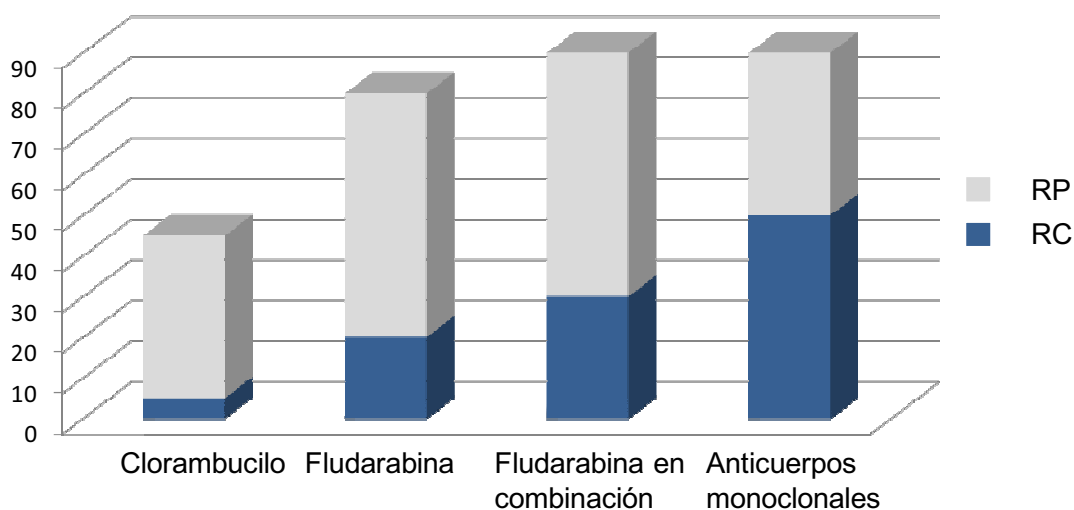


Figura 4. Visión histórica del tratamiento de primera línea en los pacientes con LLC. RP: respuesta parcial; RC: respuesta completa. (Elaboración personal).

A pesar de ello, los pacientes con LLC siguen recayendo y la LLC continúa siendo una enfermedad incurable más allá del trasplante de progenitores hematopoyéticos. Por este motivo, se han ensayado diversas estrategias terapéuticas

con el fin de disminuir el riesgo de recaída de los enfermos como es el control de la enfermedad mínima residual mediante los tratamientos de mantenimiento. Asimismo, todavía no disponemos de tratamientos eficaces en diversos subgrupos de pacientes con esta enfermedad. En este sentido, los pacientes con determinadas alteraciones genéticas, fundamentalmente con disfunción de *TP53*, no responden de forma adecuada a las combinaciones de inmunoterapia y presentan todavía actualmente un pronóstico infausto como consecuencia de su enfermedad.(81, 82, 166, 167) Por otro lado, la LLC es una leucemia que predomina en pacientes mayores lo cual deriva en que gran parte de los pacientes no puedan beneficiarse de las combinaciones de tratamiento más activas, pero también más intensivas, y que se deba adaptar el tratamiento de acuerdo con el estado físico de los pacientes.

Finalmente, fruto del mayor conocimiento adquirido de la biología de la enfermedad, se están desarrollando toda una serie de nuevos fármacos dirigidos contra dianas biológicas propias de la LLC. De entre ellos deben destacarse los inhibidores de tirosín quinasa capaces de bloquear las señales derivadas del BCR, los inhibidores de señales antiapoptóticas como *BCL2* y los fármacos inmunomoduladores, los cuales están obteniendo unos resultados muy esperanzadores y que podrían cambiar el paradigma del tratamiento de esta enfermedad.(261-265)

2.1. Indicación de tratamiento en la LLC

El inicio del tratamiento en los pacientes con LLC actualmente está únicamente indicado en los estadios avanzados y en la enfermedad sintomática o progresiva. En los pacientes en estadio inicial, Binet A y Rai 0, se debe mantener una conducta expectante hasta que se observe la progresión de la enfermedad. El tratamiento en estadios iniciales no modifica la historia natural de la enfermedad ni la expectativa de vida de los pacientes.(266) Por lo tanto, estos pacientes no deben tratarse salvo que existan signos claros de actividad de la enfermedad, como son los siguientes criterios recomendados por el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) (154):

- 1) Síntomas generales: fiebre, superior a 38°C durante 2 meses sin evidencia de infección, sudoración nocturna o pérdida de peso de más del 10% del peso corporal en los últimos 6 meses.
- 2) Linfadenopatías: sintomáticas, de crecimiento progresivo o masivo, más de 10 cm.
- 3) Esplenomegalia: sintomática, de crecimiento progresivo o de gran tamaño, más de 6 cm por debajo del reborde costal derecho.
- 4) Fallo medular progresivo: aparición o empeoramiento de la anemia o trombocitopenia.
- 5) Linfocitosis progresiva: tiempo de duplicación linfocitario en un periodo menor de 6 meses o incremento en más del 50% del recuento linfocitario en un periodo menor de 2 meses.
- 6) Anemia hemolítica o trombocitopenia inmune que no respondan al tratamiento corticoesteroideo.

7) Astenia severa que interfiera con las actividades de la vida diaria.

Los pacientes con un estadio de Binet B y de Rai I y II deben ser tratados cuando se evidencie progresión de la enfermedad o enfermedad sintomática. En los pacientes con un estadio de Binet C y de Rai III o IV puede considerarse el inicio del tratamiento de forma precoz.

2.2. Evaluación de la respuesta al tratamiento

La evaluación de la respuesta se realiza en base a los criterios establecidos por el IWCLL.(154)

Tabla 3. Criterios de evaluación de la respuesta en la LLC.

	RC	RP	EP	ES
Adenopatías	< 1.5 cm	Disminución \geq 50%	Incremento \geq 50%	Cambio de - 49% a + 49%
Tamaño hígado y/o bazo	Tamaño normal	Disminución \geq 50%	Incremento \geq 50%	Cambio de - 49% a + 49%
Síntomas constitucionales	Ninguno	Alguno	Alguno	Alguno
Leucocitos polimorfonucleares	> 1500/ μ l	> 1500/ μ l o Aumento del 50% sobre la cifra basal	Cualquier valor	Cualquier valor
Linfocitos B clonales circulantes	Ninguno	Descenso \geq 50% del basal	Incremento \geq 50% del basal	Cambio de - 49% a + 49%
Recuento plaquetario	> 100.000/ μ l	> 100.000/ μ l o incremento \geq 50% del basal	Descenso \geq 50% del basal secundario a LLC	Cambio de - 49% a + 49%
Hemoglobina	> 11,0 g/dl	> 11 g/dl o incremento \geq 50% del basal	Descenso > 2 g/dl del basal secundario a	Incremento < 11,0 g/dl o < 50%

			LLC	del basal, o descenso < 2 g/dl
Médula ósea	Normocelular, < 30% linfocitos, no nódulos linfoides B; la médula ósea hipocelular define la RCi	≥ 30% linfocitos, o nódulos linfoides B, o no realizada	Incremento de linfocitos > 30%	Infiltrado medular sin cambios

RC: remisión completa, deben cumplirse todos los criterios; RP: remisión parcial, al menos debe cumplirse uno de los criterios; EP: enfermedad progresiva, al menos debe cumplirse uno de los criterios; ES: enfermedad estable, deben cumplirse todos los criterios

2.2.1. Evaluación de la enfermedad mínima residual

La detección de la enfermedad mínima residual tras un tratamiento en la LLC se realiza mediante PCR alelo-específica o mediante citometría de flujo. Ambos métodos son suficientemente sensibles como para detectar una célula de LLC de entre 10^4 leucocitos.(267) Así, la remisión con enfermedad mínima residual negativa (EMR) se define como la presencia de menos de una célula de LLC por 10^4 leucocitos tras el tratamiento.(154) La citometría de flujo, por su mayor simplicidad, es el método utilizado en la mayoría de centros. Para ello se utilizan combinaciones de cinco tubos con cuatro colores de anticuerpos según el método descrito por Rawstron y cols.,.(267) Actualmente existen varias iniciativas, fundamentalmente desde el grupo europeo ERIC (European Research Initiative in CLL), para optimizar la técnica con combinaciones de seis y ocho fluorocromos, lo que debe permitir simplificar el análisis y disminuir la cantidad de células y reactivos utilizados.(268) Sin embargo, todavía quedan varios aspectos por determinar en el análisis de la EMR en la LLC. Uno de ellos es si la EMR debe determinarse en la sangre periférica o en la médula ósea, particularmente en los pacientes tratados con anticuerpos monoclonales como alemtuzumab o rituximab los cuales son más activos en eliminar la enfermedad de la sangre periférica, o el momento más adecuado para el análisis.

2.3. Tratamiento de quimioterapia en la LLC

2.3.1. Agentes alquilantes

2.3.1.1. Clorambucilo

Durante años el tratamiento de la LLC ha estado ligado al uso de agentes alquilantes, principalmente el clorambucilo, aunque sin conseguir prácticamente ningún impacto sobre la historia natural de la enfermedad.(252, 253) El clorambucilo es un fármaco derivado de la mostaza nitrogenada que actúa mediante el entrecruzamiento de la hélice del ADN interfiriendo en la replicación.(269) En la LLC, el fármaco se usó ampliamente tanto en monoterapia como en combinación con esteroides antes de la era de los análogos de la purina. Es un medicamento bien tolerado y de bajo coste, de administración oral de forma continua (0.1mg/kg/día), o intermitente (0.4-1 mg/kg cada 15 - 28 días). En la LLC, el clorambucilo consigue respuestas en alrededor del 40 - 60% de los pacientes, aunque estas rara vez son completas, 0% - 7%, y los enfermos progresan de forma constante con una mediana de SLP entorno a los 9 - 18 meses.(81, 182, 254, 266, 270, 271) La administración de clorambucilo asociado a corticoides no demostró ser superior al clorambucilo en monoterapia en la tasa de respuestas obtenida, ni en la supervivencia de los pacientes. Además se observó una mayor incidencia de infecciones con el uso combinado. Finalmente, varios estudios aleatorizados no hallaron ninguna ventaja con el tratamiento precoz con clorambucilo de los pacientes en estadios iniciales de la enfermedad.(266, 271-273) Estos estudios mostraron que el tratamiento citotóxico de los pacientes con LLC en estadios iniciales podía diferirse sin perjudicar la evolución de los pacientes.

2.3.1.2. Quimioterapia en combinación frente a clorambucilo en monoterapia

Posteriormente se exploró la posibilidad de que tratamientos más intensivos de quimioterapia consiguieran mejorar los resultados obtenidos en estos pacientes. Sin embargo, el empleo de combinaciones más intensivas de quimioterápicos como ciclofosfamida, vincristina y prednisona (COP), incluso añadiendo adriamicina (CHOP) no obtuvo ningún beneficio en la supervivencia de los enfermos en comparación con el tratamiento con clorambucilo.(270, 274-276)

2.3.2. Análogos de las purinas

La aparición de los análogos de las purinas, principalmente la fludarabina, la cladribina y la pentostatina, en la década de los noventa supuso un avance importante en el tratamiento de la LLC. De entre ellos, la fludarabina ha sido el más estudiado y es actualmente el más utilizado. Su mecanismo de acción se desarrolla a través de sus derivados fosforilados que producen la inhibición de la ribonucleótido reductasa y de la DNA polimerasa, y la disminución de la síntesis del DNA. Su efecto adverso más frecuente es la mielosupresión. La fludarabina es un fármaco muy activo en el tratamiento de la LLC con una tasa de respuesta del 80% en pacientes previamente no tratados, porcentajes superiores a los conseguidos con los agentes alquilantes. Además se obtuvo una mayor duración de la respuesta obtenida en comparación con clorambucilo, aunque no se observó un beneficio significativo en la supervivencia global de los enfermos.(254-257)

2.3.2.1. Fludarabina en combinación

Con el fin de mejorar estos resultados, diferentes estudios evaluaron la combinación de fludarabina con otros agentes quimioterápicos, principalmente con la ciclofosfamida. Tres ensayos clínicos aleatorizados estudiaron el uso de fludarabina en combinación con ciclofosfamida (FC) en comparación con fludarabina en monoterapia en pacientes con LLC previamente no tratados,(81, 166, 277) y un estudio comparó la combinación de cladribina con ciclofosfamida enfrente de cladribina sola.(278) La tasa de respuesta y la SLP obtenidas fueron significativamente mejores con la adición de ciclofosfamida.

Tabla 4. Resultados de los estudios randomizados de fludarabina en combinación con ciclofosfamida como tratamiento de primera línea en la LLC.

	RG		RC		SLP mediana	
	FC (%)	F (%)	FC (%)	F (%)	FC (meses)	F (meses)
LRF CLL4 trial⁸¹	94	80	38	15	43	23
GCLLSG¹⁶⁶	94	83	24	7	48	20
US Intergroup Trial E2997²⁷⁷	74,3	59,5	23,4	4,6	31,6	19,2

RG: tasa respuesta global; RC: tasa respuesta completa; SLP: supervivencia libre de progresión; FC: fludarabina y ciclofosfamida; F: fludarabina.

2.3.2.2. Combinación de fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone

A pesar de los buenos resultados obtenidos con la introducción de los análogos de las purinas en el tratamiento de la LLC, en ninguno de los trabajos previamente citados se observó un beneficio en la supervivencia global de los pacientes. Con el fin de mejorar estos resultados obtenidos con fludarabina y ciclofosfamida (FC) se diseñaron nuevas combinaciones de quimioterapia. Uno de los regímenes con resultados más prometedores fue la combinación de FC con mitoxantrone (FCM). Mitoxantrone es una anthracenedione con capacidad de inhibir la topoisomerasa II. En estudios *in vitro* se observó que la adición de mitoxantrone a fludarabina y ciclofosfamida aumentaba la citotoxicidad de esta combinación en algunos casos.(279, 280) La combinación de FCM demostró ser activa en pacientes con LLC tanto en pacientes en situación de recaída o refractariedad como en primera línea.(243, 245, 281) De estos estudios cabe destacar que se obtuvo un porcentaje de respuestas completas en las que no se detectaba la presencia de enfermedad mínima residual

(RC EMR negativa), incluso en pacientes previamente tratados. (243, 245, 281) Estos enfermos con RC EMR negativa presentaban una duración de la respuesta significativamente mayor que los enfermos con enfermedad detectable al finalizar el tratamiento.(243)

2.3.3. Tratamiento ajustado a las comorbilidades

La población de pacientes con LLC de edad avanzada está poco representada en la gran mayoría de ensayos clínicos, a pesar de que la mediana de edad de presentación de esta enfermedad esté por encima de los 70 años. Así, aunque las nuevas combinaciones de quimioterapia hayan conseguido las mejores tasas de respuesta en la LLC, éstas suelen ser mal toleradas en los pacientes de edad avanzada y en los pacientes con comorbilidades asociadas. En este sentido, el grupo alemán de estudio de la LLC comparó en un ensayo fase III aleatorizado el tratamiento con fludarabina vs. clorambucilo en pacientes con LLC de edad avanzada. Cabe destacar que aunque la tasa de respuestas globales y de respuestas completas fue superior en la rama de tratamiento con fludarabina (72% vs. 51%; 7% vs. 0%, respectivamente), no se observó ninguna diferencia en la SLP (19 meses vs. 18 meses) o en la SG (46 meses vs. 64 meses) entre los dos brazos de tratamiento.(282)

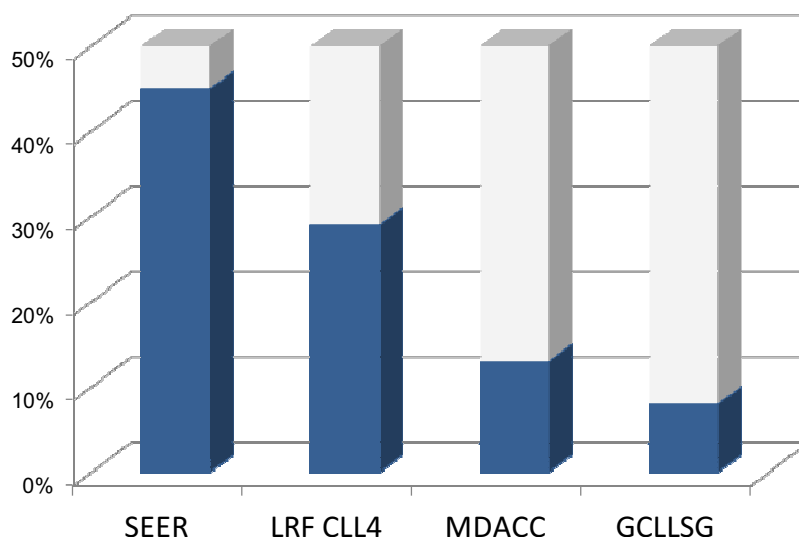


Figura 5. Pacientes con edad > 70 años en diferentes ensayos clínicos y en la población general.

SEER: Surveillance Epidemiology and End Results; LRF CLL4: FC vs. F⁸⁴, MDACC: FCR²³⁵; GCLLSG: FCR vs. FC¹⁶⁹. (Elaboración personal).

Hay que tener en cuenta también que además de la edad, es importante valorar las comorbilidades de los pacientes en el momento de elegir el tratamiento más apropiado para cada uno de ellos. Una proporción significativa de los pacientes con LLC tienen comorbilidades que pueden limitar sus opciones de tratamiento. La prevalencia de comorbilidades en la LLC fue investigada por el grupo de la Clínica Mayo donde hallaron que el 89% de los pacientes recién diagnosticados de LLC presentaban al menos una comorbilidad, siendo ésta una comorbilidad mayor en un 46% de ellos.(283) Actualmente se están desarrollando escalas para valorar estas comorbilidades con el fin de poder elegir la mejor opción de tratamiento para los pacientes. En este sentido, el grupo alemán de estudio de la LLC ha introducido en sus ensayos clínicos el uso de la escala CIRS (Cumulative Illnes Rating Scale) (284) como una herramienta para distinguir entre los pacientes con o sin un adecuado estado físico.

2.4. Tratamiento de inmunoterapia en la LLC

La adición de anticuerpos monoclonales, principalmente el rituximab, a la quimioterapia convencional ha supuesto un importante avance en el tratamiento de los síndromes linfoproliferativos B. El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico humano y murino dirigido contra el antígeno CD20 presente en la superficie de la gran mayoría de los linfocitos B, a excepción de los progenitores linfoides y de las células plasmáticas. Aunque el mecanismo de acción del rituximab no es del todo bien conocido, se cree que actuaría a través de tres mecanismos diferentes: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, citotoxicidad dependiente de complemento y por apoptosis directa. Además, cabe resaltar que estudios *in vitro* han demostrado que el rituximab potencia la citotoxicidad de varios citostáticos, como fludarabina y mitoxantrona entre otros.(285) En la LLC, las combinaciones de rituximab junto con fludarabina o con fludarabina y ciclofosfamida han obtenido las tasas de respuesta más altas publicadas hasta la fecha.(167, 258-260)

Entre sus efectos adversos destacan los relacionados con su infusión, como son los escalofríos, la fiebre y la hipotensión, debidos principalmente a la liberación de citoquinas inflamatorias. Estas reacciones infusionales pueden minimizarse enlenteciendo su perfusión y escalando la dosis. Además, en aquellos pacientes con un recuento elevado de linfocitos, puede desarrollarse un síndrome de lisis tumoral, por lo que se recomienda que este tipo de pacientes reciban una adecuada hidratación durante la primera infusión del fármaco.

2.4.1. Rituximab en la leucemia linfática crónica

En el ensayo fase II pivotal de rituximab en síndromes linfoproliferativos B la respuesta obtenida en los pacientes con LLC fue claramente inferior a la de otros linfomas, con una tasa de respuesta global del 13% vs. un 50% en los pacientes con linfoma folicular.(286) En otros pequeños ensayos utilizando rituximab en monoterapia en el tratamiento de pacientes con LLC en situación de refractariedad o en recaída se obtuvieron también unos resultados bastante modestos.(286-291) Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar las diferencias de respuesta observadas en el tratamiento con rituximab en la LLC en comparación con otros síndromes linfoproliferativos B. En la LLC habría un mayor aclaramiento del rituximab por un mayor número de linfocitos B circulantes y/o por la presencia de CD20 circulante en el plasma. Asimismo, la LLC presenta una expresión de CD20 más baja en la superficie celular de sus linfocitos. Finalmente, se han propuesto también mecanismos de modulación antigénica e internalización del complejo CD20/anticuerpo.(292-294) Sin embargo, hasta la fecha, el efecto de ninguno de estos mecanismos se ha podido demostrar de forma sólida en los pacientes con LLC.

Con la intención de aumentar la eficacia del rituximab en el tratamiento de la LLC se exploró tanto el aumento del número de ciclos como el de la dosis de rituximab.(295, 296) El grupo de M.D. Anderson Cancer Center (MDACC) escaló la dosis de rituximab desde los 350 mg/m² hasta los 2250 mg/m². Cabe resaltar que se halló una correlación entre la dosis de rituximab y la respuesta obtenida, con una tasa de respuesta global del 22% en los pacientes tratados con dosis de 500 mg/m² a 825 mg/m² y del 75% en aquellos tratados a la dosis más alta, de 2250 mg/m².(295)

2.4.2. Rituximab en combinación con quimioterapia

La combinación de rituximab con agentes quimioterápicos ha supuesto un paso adelante muy importante en el tratamiento de la LLC. A pesar de la limitada respuesta obtenida con el tratamiento con rituximab en monoterapia en la LLC, los resultados de varios ensayos clínicos fase II ya sugirieron que la adición de rituximab a regímenes de quimioterapia basados en fludarabina mejoraba de forma significativa la tasa de respuestas completas y la SLP tanto en pacientes previamente no tratados como en pacientes en recaída con LLC.(232, 233, 242, 258, 259, 297, 298) En estos trabajos, la dosis estándar de rituximab de 375mg/m² utilizada en otros síndromes linfoproliferativos B se aumentó a 500mg/m².(232) En este sentido, la comparación retrospectiva de dos ensayos multicéntricos del CALGB (Cancer and Leukemia Group B) sugirió que la adición de rituximab a la fludarabina aportaba una mejor tasa de respuestas globales, respuesta completas, así como una mayor SLP e incluso SG en comparación con la fludarabina sola.(258) Por otro lado, en base a los buenos resultados obtenidos con la combinación de fludarabina y ciclofosfamida, el grupo de MDACC evaluó la eficacia de esta combinación asociada a rituximab, FCR (fludarabina 25 mg/m², ciclofosfamida 250 mg/m² días 1-3, y rituximab 375 mg/m² el día 1 del ciclo 1 y 500 mg/m² el día 1 de los ciclos 2-6, cada 4 semanas por 6 ciclos) en pacientes con LLC. Con esta combinación se obtuvo una tasa de respuestas globales del 73% con un 25% de respuestas completas en sujetos con LLC refractaria o en recaída, (233) y hasta del 95% con un elevado porcentaje de respuestas completas, 72%, cuando se utilizó este régimen como tratamiento de primera línea.(232) Además, la actualización del seguimiento de este estudio mostró que estas repuestas eran duraderas, con una mediana de tiempo hasta la progresión de 80 meses.(259)

Tabla 5. Inmunoquimioterapia con rituximab en combinación en la LLC: estudios fase 2

	Tratamiento previo	Agentes	Nº Pacientes	RG% (RC)%
Schulz y cols., 2002²⁹⁸	Sí	F	31	87 (32)
Wierda y cols., 2005²³³	Sí	FC	177	73 (25)
Byrd y cols., 2003²⁹⁷	No	F	51	90 (47)
Tam y cols., 2008²⁵⁹	No	FC	300	94 (72)
Kay y cols., 2007³⁹²	No	PC	64	91 (41)

F: fludarabina; FC: fludarabina y ciclofosfamida; PC: pentostatina y ciclofosfamida; RG: tasa de respuesta global; RC: tasa de respuesta completa.

Los excelentes resultados obtenidos con las combinaciones de inmunoquimioterapia promovieron la realización de un ensayo multicéntrico aleatorizado fase III por el grupo Alemán GCLLSG (German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group). En este estudio, se comparó la eficacia de la combinación de FC con o sin asociar rituximab, FC vs. FCR, en pacientes con LLC previamente no tratados.(167) Tanto la tasa de respuestas globales, 90% vs. 80%, como completas, 44% vs. 22%, fueron significativamente mayores en la rama de FCR en comparación con la de FC. Además, esta mejoría en la respuesta obtenida se observó en los diferentes subgrupos de pacientes, tanto en los diferentes estadios de Binet como en los diferentes subgrupos categorizados según las alteraciones genéticas detectadas por FISH, excepto en aquellos pacientes con delección de 17p o aquellos sin anomalías detectables. Asimismo, la duración de la respuesta obtenida también fue

significativamente mayor en el grupo de inmunoquimioterapia, con una mediana de SLP de 51.8 meses en la rama de FCR en comparación con 32.8 meses en la de FC. Además, se observó un beneficio en la mayoría de los subgrupos genéticos, incluyendo los pacientes con delección de 17p, 11q,13q, y trisomía 12. A pesar de ello, cabe destacar que el subgrupo de pacientes con delección de 17p seguían presentando la mediana de SLP más corta en comparación con los demás subgrupos de pacientes, de tan sólo 11.3 meses con FCR y únicamente de 6.5 meses con FC. La delección de 17p, el tratamiento de quimioterapia, la ausencia de mutaciones de los genes *IGHV*, la β_2 -microglobulina sérica mayor de 3.5 mg/L, y la leucocitosis superior a $50 \times 10^9/L$ fueron predictores de una SLP más corta.

Un punto que debe resaltarse de este estudio es que por primera vez en un ensayo aleatorizado en primera línea en la LLC se observó una mejoría en la supervivencia global en los enfermos.(167) La supervivencia global fue superior en el grupo de pacientes tratados con inmunoquimioterapia, 87% a los tres años, en comparación con los pacientes que únicamente recibieron quimioterapia, 83% a los tres años. Las variables predictivas de una menor SG fueron el tratamiento con quimioterapia, la delección de 17p, la β_2 -microglobulina sérica ≥ 3.5 mg/L, valores de timidin kinasa séricos ≥ 10 U/L, y un ECOG performance status ≥ 1 . La presencia de la delección de 17p fue el predictor negativo más relevante tanto para SLP como para la SG, independientemente del tratamiento recibido. Por el contrario, la combinación de inmunoquimioterapia pareció abrogar el pronóstico adverso de la delección de 11q que se había observado previamente con el uso de quimioterapia. Finalmente, aunque la combinación de FCR causó un mayor número de episodios de neutropenia, no hubo diferencias en el número de eventos infecciosos graves entre ambas ramas de tratamiento.

La mayor eficacia de la combinación de inmunoterapia FCR frente a FC también se comprobó en pacientes con LLC en recaída en otro extenso estudio fase 3 aleatorizado.(299)

Estos excelentes resultados han motivado que actualmente se considere la combinación de FCR como el tratamiento estándar de primera línea en los pacientes con LLC que requieren tratamiento y presenten un estado físico adecuado para recibir este tratamiento. Sin embargo, cabe resaltar que un porcentaje importante de los pacientes con LLC son de edad avanzada y presentan comorbilidades asociadas, lo que hace que gran parte de ellos no sean candidatos a recibir estas combinaciones de tratamiento. Por otro lado, los resultados claramente insatisfactorios obtenidos en el subgrupo de pacientes con delección de 17p obliga a que deban buscarse otras alternativas terapéuticas en estos pacientes.

Tabla 6. Inmunoterapia en la LLC: estudios randomizados fase 3.

	Régimen	Nº pacientes	Tratamiento previo	RG (%)	RC (%)	SLP
Hallek y cols., 2010¹⁶⁷	FCR	408	No	90	44	65% 45% (a los 3 años)
	FC	409		80	22	
Robak y cols., 2010²⁹⁹	FCR	276	Sí	70	24	30 meses 20 meses (mediana)
	FC	276		58	13	

RG: tasa respuesta global; RC: tasa respuesta completa; SLP: supervivencia libre de progresión; FCR: fludarabina, ciclofosfamida y rituximab; FC: fludarabina y ciclofosfamida.

2.4.2.1. Combinaciones de inmunquimioterapia más allá de FCR

La combinación de inmunquimioterapia basada en FCR ha demostrado ser un régimen altamente eficaz en el tratamiento de los enfermos con LLC. A pesar de ello, los pacientes siguen recayendo de su enfermedad, y la toxicidad asociada al tratamiento, fundamentalmente a nivel hematológico e infeccioso, no es despreciable. Estos motivos han promovido la investigación de otras combinaciones de quimioterapia asociadas a rituximab, con la intención de mejorar los resultados de FCR, tanto desde el punto de vista de su eficacia como de su perfil de toxicidad.

La bendamustina es un agente alquilante que contiene un anillo benzimidazólico que confiere a la molécula propiedades como análogo de las purinas.(300) En monoterapia es un fármaco eficaz en la LLC, con una mayor tasa de respuestas y SLP que el clorambucilo en esta enfermedad.(301) La combinación de bendamustina junto con rituximab (BR) mostró ser un régimen eficaz y con un perfil de toxicidad muy aceptable en el tratamiento de los pacientes con LLC, tanto como tratamiento de rescate como en primera línea. Como tratamiento de rescate la dosis empleada fue de 70 mg/m² los días 1 y 2 cada 28 días en combinación con rituximab. Este régimen alcanzó una tasa de respuestas globales del 59% en una población de enfermos con LLC donde el 28.4% de los cuales eran refractarios a fludarabina.(302) En pacientes con LLC no tratados la combinación de BR alcanzó una mayor tasa de respuesta, 90.9%, que la obtenida en pacientes previamente tratados.(303) La principal toxicidad observada con el uso de bendamustina fue la mielotoxicidad y las infecciones de ella derivadas. A pesar de ello, los episodios de fiebre neutropénica o infecciones graves fueron poco frecuentes.

La bendamustina ha demostrado no sólo tener un papel como opción de tratamiento en aquellos pacientes recaídos tras un esquema basado en fludarabina, sino que también se presenta como una opción de quimioterapia a asociar con el rituximab con un perfil de toxicidad probablemente mejor que el de la fludarabina. En

este sentido cabe destacar su buena tolerancia en pacientes con alteraciones de la función renal, a diferencia de lo que ocurre con las combinaciones de fludarabina.

En base a estos buenos resultados, el grupo GCLLSG inició en 2008 un estudio fase III (CLL10) con la finalidad de comparar la combinación de BR en frente de FCR en pacientes con LLC previamente no tratados. Los resultados preliminares de este estudio apuntan a una mayor eficacia de FCR, tanto en la tasa de respuestas completas, 47,4% vs. 38,1%, como en la SLP, 85% a los 2 años en el brazo de FCR en comparación con una 78,2% en el de BR. Sin embargo, el tratamiento con FCR se asoció a una mayor tasa de neutropenia e infecciones.(304)

2.4.3. Inmunoquimioterapia en los pacientes con comorbilidades

La adición de rituximab a la combinación de fludarabina y ciclofosfamida ha conseguido prolongar la supervivencia de los pacientes con LLC. Sin embargo, la población de pacientes de estos ensayos no presentaban comorbilidades importantes y tenía una edad claramente inferior a la observada habitualmente en la población general con esta enfermedad. Por estos motivos no podemos extrapolar los resultados obtenidos con estos regímenes a gran parte de los pacientes con LLC. Para estos pacientes de edad más avanzada y con comorbilidades, que por otra parte representan un porcentaje importante de los pacientes con esta enfermedad, se ensayaron combinaciones menos tóxicas como la adición de rituximab al clorambucilo. Los ensayos fase 2 con esta combinación sugirieron que esta aproximación terapéutica podría ser apropiada para esta población de enfermos y que podría mejorar los resultados obtenidos con el clorambucilo en monoterapia.(305)(306) Recientemente, estos resultados han sido confirmados en un amplio estudio randomizado promovido por el GCLLSG donde se exploró no sólo si la combinación de clorambucilo con un anticuerpo anti-CD20 podría ser superior al clorambucilo, sino también si obinutuzumab, un nuevo anti-CD20 humanizado podría mejorar los resultados obtenidos con rituximab.(307) Cabe destacar que la mediana de edad de los pacientes en este estudio fue de 73 años con una puntuación de 8 en la escala de medida de comorbilidades CIRS (*Cumulative Illness Rating Scale*). Tanto la combinación de obinutuzumab con clorambucilo como la de rituximab con clorambucilo mejoraron la tasa de respuestas y la SLP en comparación con el clorambucilo en monoterapia. Además, obinutuzumab con clorambucilo consiguió una mejor supervivencia global de los enfermos en comparación con clorambucilo. Finalmente, cuando se compararon los resultados de ambos anti-CD20 con clorambucilo entre sí, la combinación de obinutuzumab alcanzó una mayor tasa de respuestas y una mayor SLP en comparación con rituximab.(307) Este trabajo ayuda a consolidar el papel de la

inmunoquimioterapia como tratamiento de primera línea también en la población de pacientes mayores con comorbilidades asociadas.

2.5. Tratamiento de mantenimiento en la LLC

A pesar de la alta tasa de respuestas conseguidas con los nuevos tratamientos los pacientes continúan recayendo de su enfermedad. Esta recaída se debe presumiblemente a la persistencia de EMR tras el tratamiento. Por lo tanto, el uso de estrategias dirigidas a mantener la respuesta conseguida y así retardar el aumento de la EMR y finalmente la recaída de la enfermedad podrían mejorar el pronóstico de los pacientes con LLC. Varios estudios han evaluado el efecto de diferentes tipos de estrategias que persiguen el control de la EMR obtenida tras el tratamiento inicial, como son los tratamientos de mantenimiento o las terapias de consolidación. Estos tratamientos incluyen fármacos como el interferon-alfa (308, 309), el alemtuzumab (310, 311), el rituximab (312, 313), y más recientemente la lenalidomida.(314)

2.5.1. Alemtuzumab como tratamiento de consolidación

El Alemtuzumab (Campath-1H) es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el antígeno de membrana CD52 que está presente en los linfocitos B y T así como también en los monocitos y macrófagos.(315) Su principal mecanismo de acción está mediado por citotoxicidad directa y citotoxicidad dependiente de complemento. La toxicidad más frecuente relacionada con este fármaco son las reacciones infusionales, las citopenias, y las infecciones relacionadas con la inmunosupresión que produce. Es necesario realizar una adecuada profilaxis frente a *Pneumocystis jiroveci* y frente al virus de la Varicela-zoster, así como monitorizar las reactivaciones del Citomegalovirus. Alemtuzumab demostró ser activo en pacientes con LLC con refractariedad a fludarabina, lo que motivó su aceptación por la FDA para esta indicación.(316) Además, utilizado como tratamiento de primera línea en pacientes con LLC, alemtuzumab obtuvo una mayor eficacia que el clorambucilo en términos de tasa de respuestas y SLP.(182) Finalmente, cabe destacar que alemtuzumab es activo en el subgrupo de pacientes con alteraciones de p53.(179-183)

Varios estudios han explorado su uso como tratamiento de consolidación en la LLC con la finalidad de mejorar las respuestas obtenidas tras el tratamiento inicial.(239, 310, 311, 317-320) En este contexto, alemtuzumab fue capaz de erradicar la enfermedad mínima residual en algunos pacientes, lo que se asoció a una mayor SLP en estos enfermos. Sin embargo, su uso se asoció también a un aumento de la incidencia de complicaciones infecciosas.(310, 311) Estos estudios, relativamente pequeños, no han podido todavía demostrar de forma sólida el beneficio de esta estrategia de tratamiento.

2.5.2. Rituximab como tratamiento de mantenimiento en la LLC

El uso de rituximab como tratamiento de mantenimiento en varios síndromes linfoproliferativos ha demostrado ser una estrategia eficaz para alargar la SLP de los enfermos.(321-323) Sin embargo, en la LLC los datos disponibles actualmente sobre su uso como terapia de mantenimiento son muy escasos.

Hainsworth y cols. analizaron el uso de rituximab tanto como tratamiento inicial como de mantenimiento en 44 pacientes con LLC.(312) El tratamiento consistió en cuatro dosis semanales de rituximab en intervalos de seis meses por un total de cuatro ciclos. Aunque la mediana de SLP fue de 18.6 meses, claramente inferior a la observada en otros síndromes linfoproliferativos como el linfoma folicular, el uso de rituximab de mantenimiento en estos pacientes demostró ser un tratamiento con un buen perfil de tolerabilidad. Posteriormente Del Poeta y cols. evaluaron la eficacia del mantenimiento con rituximab tras un tratamiento de inicial con fludarabina en 54 pacientes con LLC.(313) Aquellos pacientes que permanecieron con una EMR positiva fueron retratados con 4 ciclos mensuales de rituximab seguidos de un tratamiento de mantenimiento que consistía en 12 dosis mensuales de rituximab a dosis de 150 mg/m². Esta estrategia consiguió alargar la SLP de los enfermos con EMR positiva al finalizar el tratamiento inicial en comparación con un grupo de pacientes que no recibió rituximab.(313) Sin embargo, a pesar de que este estudio sugiere un aumento en la duración de la respuesta con el uso de rituximab como tratamiento de mantenimiento cabe resaltar que no hubo aleatorización de los enfermos y que las ramas de tratamiento y observación no estaban bien balanceadas ni en número ni en las características de los pacientes.

Más recientemente, se han comunicado los datos de dos estudios fase 2 con rituximab como tratamiento de mantenimiento. En el primero de ellos, los pacientes recibían rituximab tras un tratamiento inicial con dosis bajas de fludarabina y

ciclofosfamida junto con rituximab a dosis altas (FCR-Lite).(324) La mediana de SLP obtenida fue de 5.8 años, superior a la obtenida con FCR sin mantenimiento;(167) sin embargo, el bajo número de pacientes en este estudio junto con una relativa alta frecuencia de estadios iniciales, hace difícil establecer comparaciones entre ambas estrategias de tratamiento. Finalmente, en el segundo estudio reportado, los pacientes recibieron un tratamiento inicial con rituximab en combinación con clorambucilo y posteriormente eran aleatorizados a observación o a un mantenimiento con rituximab.(306) Este estudio es el primero en analizar un mantenimiento tras un tratamiento inicial con la combinación de clorambucilo y rituximab, y mostró un buen perfil de toxicidad en una población de enfermos de edad avanzada. Aunque en este trabajo no se pudo demostrar de forma clara la ventaja de un mantenimiento con rituximab, los resultados sí apuntaban hacia una mejoría en la SLP de los pacientes de la rama de mantenimiento en comparación con la de observación. De todas maneras, hay que tener en cuenta que el mantenimiento no era el objetivo primario del estudio y el número de enfermos incluidos fue relativamente pequeño. Los pacientes que parecieron beneficiarse en una mayor medida del mantenimiento fueron los enfermos en RP tras el tratamiento inicial y los pacientes con *IGHV* no mutados.

Por lo tanto, aunque los estudios previos sugieren un beneficio del tratamiento de mantenimiento con rituximab en los pacientes con LLC, los pocos datos disponibles hasta la fecha no permiten poder extraer conclusiones sólidas sobre cuál es el beneficio real de esta estrategia en esta enfermedad. En este sentido, los resultados de varios estudios fase 3 actualmente todavía no finalizados serán de gran ayuda. En estos estudios se explora el papel de rituximab como terapia de mantenimiento tras diferentes tratamientos iniciales: en el grupo austríaco (NCT01118234) tras un tratamiento inicial con un régimen de rituximab en combinación, en el grupo polaco (NCT00718549) tras rituximab, ciclofosfamida y cladribina, y finalmente en el grupo

francés, (NCT00645606) tras un tratamiento inicial abreviado (4 ciclos) de FCR en pacientes mayores de 65 años.

2.5.3. Lenalidomida como tratamiento de consolidación / mantenimiento

La acción de lenalidomida sobre el microambiente y su capacidad para mejorar la función efectora de los linfocitos T así como su eficacia clínica ya demostrada en pacientes con LLC hacen de este fármaco un buen candidato como tratamiento de mantenimiento en esta enfermedad. Sin embargo, los datos disponibles actualmente de lenalidomida como tratamiento de mantenimiento son todavía muy preliminares. Recientemente se han comunicado los resultados de lenalidomida tras un tratamiento inicial con pentostatina, ciclofosfamida y rituximab (PCR).(314) A pesar del limitado número de enfermos tratados con esta estrategia, 34 pacientes, el mantenimiento con lenalidomida pareció aportar un beneficio a estos pacientes. En este sentido, el 24% de los pacientes mejoró la respuesta inicial tras PCR, y una comparación retrospectiva con una serie histórica de pacientes tratados con PCR sugirió también una mayor duración de la respuesta obtenida.(314) Con el fin de corroborar estos datos iniciales, en este momento se hallan en curso varios estudios para evaluar esta estrategia. En este sentido, se están llevando a cabo dos estudios aleatorizados entre lenalidomida vs. observación tanto como estrategia posterior a un tratamiento de primera línea en pacientes con LLC con alto riesgo de recaída precoz (CLLM1; NCT01556776), como tras una segunda línea de tratamiento (CONTINUUM - CLL-002; NCT00774345).

2.6. Nuevos tratamientos en la LLC

Los nuevos conocimientos adquiridos de la biología de la enfermedad han permitido el desarrollo de toda una serie de nuevos fármacos dirigidos contra dianas biológicas propias de la LLC. Estas nuevas moléculas actúan sobre diferentes proteínas de señalización de las células de LLC y de su microambiente, con un mecanismo de acción antitumoral más específico y con un perfil de toxicidad más favorable que los tratamientos de quimioterapia previamente utilizados. Estos nuevos fármacos comprenden fundamentalmente los inhibidores de tirosín quinasa capaces de bloquear las señales derivadas del receptor de célula B (B-cell receptor, BCR), los inhibidores de señales antiapoptóticas como BCL2, los fármacos inmunomoduladores, y los nuevos anticuerpos monoclonales.(261-263, 265, 325).

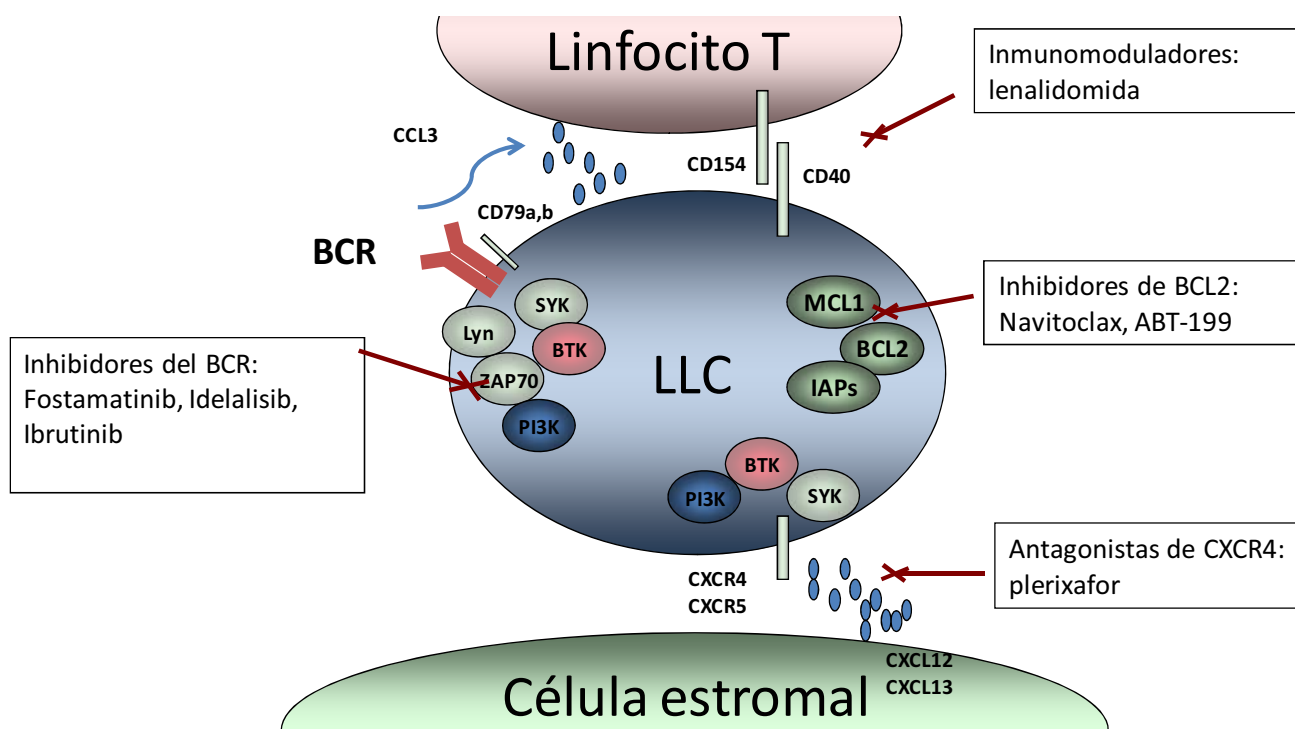


Figura 6. Nuevos fármacos en la LLC y sus dianas terapéuticas.

2.6.1. Inhibidores del receptor de célula B (BCR)

Las células leucémicas de la LLC requieren de las vías que utilizan los linfocitos B normales para su mantenimiento y expansión. De ellas, la activación y señalización a través del BCR probablemente sea la más relevante, aunque todavía sea poco conocido el mecanismo preciso de su estimulación y la naturaleza de los antígenos que lo activarían.(138, 139) De esta manera, esta vía se ha convertido en una atractiva diana terapéutica que ha motivado el desarrollo de diferentes agentes dirigidos a bloquear su señalización, principalmente a través de la inhibición de tirosin quinasa como SYK (Spleen tyrosine kinase), BTK (Bruton's tyrosine kinase), y PI3K (phosphoinositide 3-kinase).(326-328)

2.6.1.1. Inhibidores de BTK

Ibrutinib (PCI-32765) es un potente inhibidor oral de BTK a través de su unión covalente al aminoácido cisteína-481.(329) Los datos derivados de los estudios preclínicos mostraron que ibrutinib era capaz de bloquear diferentes vías importantes para la supervivencia celular como ERK y NF- κ B, así como también la migración de las células tumorales.(152, 330, 331) Este último punto explica en parte la respuesta clínica característica común a los diferentes inhibidores del BCR que consiste en una rápida disminución del tamaño de las adenopatías junto con un aumento transitorio de la linfocitosis la cual mejora de forma gradual tras semanas o meses de tratamiento. Recientemente se han comunicado los resultados clínicos de los estudios iniciales tanto fase 1 como fase 2 con ibrutinib, con unos resultados altamente prometedores. Su uso en monoterapia como tratamiento de rescate en pacientes con LLC en recaída o refractaria obtuvo una tasa de respuestas globales del 71% con casi un 20% adicional de pacientes con respuesta parcial con linfocitosis. Cabe destacar además, que la respuesta al tratamiento de aquellos pacientes con marcadores biológicos de

alto riesgo, como la delección de 17p, sería similar a la respuesta obtenida en los demás pacientes.(189, 247) Estos buenos resultados han promovido ya su uso en ensayos como tratamiento de primera línea en pacientes con LLC de edad avanzada, donde parecen confirmarse los excelentes resultados de los estudios previos, con una supervivencia libre de progresión de los enfermos estimada a los 2 años del 96.3%.(248)

2.6.1.2. Inhibidores de PI3K

A diferencia de lo que ocurre en los tumores sólidos, donde PI3K suele estar activada por mutaciones,(332) en la LLC su activación depende de señales provenientes del microambiente, principalmente a través del BCR.(333) Esta vía promovería señales de proliferación y supervivencia en las células de LLC.(334) Además, datos recientes sugieren que inhibiendo esta vía también se inhibe la función de varios receptores de quimiocinas implicados en la migración de las células de LLC.(335) Idelalisib (GS-1101, CAL-101) es un potente inhibidor oral de la isoforma delta de PI3K con unos resultados preclínicos muy prometedores en la LLC.(264) Recientemente se han comunicado los resultados de un ensayo multicéntrico fase 3 de idelalisib en combinación con rituximab vs. Rituximab en monoterapia en una población de enfermos con LLC en recaída y no tributarios a tratamientos de rescate con quimioterapia con unos resultados muy esperanzadores.(336) El estudio mostró un claro beneficio de la rama con Idelalisib tanto en la tasa de respuestas, como en la SLP e incluso en la SG de los enfermos. Actualmente se hallan en marcha varios estudios con Idelalisib en monoterapia o en combinación con otros agentes tanto en pacientes con LLC previamente tratados como en primera línea.

2.6.1.3. Inhibidores de Syk

SYK es otra de las tirosín quinasa con un papel fundamental en la vía de señalización del BCR. El primer fármaco que se exploró como inhibidor de SYK en la LLC fue el R406(337), y posteriormente el fostamatinib disodium (R788; FosD) un profármaco de R406 con una formulación oral. La seguridad y eficacia de fostamatinib se exploró en un estudio fase 1 / 2 en pacientes con LLC y linfoma no Hodgkin en recaída o refractarios. Las toxicidades limitantes de dosis fueron la neutropenia, trombocitopenia y diarrea, y la mayor tasa de respuestas se obtuvo en los pacientes con LLC, donde 6 de los 11 pacientes (55%) respondieron al tratamiento.(338) Actualmente se hallan en curso estudios con nuevos fármacos inhibidores de SYK con una especificidad mayor para esta quinasa en comparación con el fostamatinib, pero de los cuales todavía no disponemos de datos clínicos.(339)

2.6.2. Fármacos antiapoptóticos en la LLC

La expresión elevada de BCL2 es un factor importante en la supervivencia de las células de LLC. Por este motivo, durante años BCL2 ha sido considerada una diana terapéutica prioritaria en esta enfermedad. Sin embargo, los primeros intentos de inhibir BCL2 en la clínica mediante fármacos como oblimersen y obatoclax, no obtuvieron una actividad antileucémica relevante.(340, 341) Posteriormente navitoclax (ABT-263), un nuevo BH3 mimético, demostró ser activo en pacientes con LLC, incluso en aquellos con enfermedad refractaria a fludarabina y delección de 17p. A pesar de estos prometedores resultados iniciales, navitoclax inhibe también BCL-x_L lo que conlleva el desarrollo de trombopenia, que fue la toxicidad limitante de dosis hallada en el estudio fase 1 con esta molécula en pacientes con LLC.(342) Más recientemente, se ha desarrollado una nueva molécula, ABT-199, con una mayor especificidad sobre BCL2, sin presentar así la trombopenia limitante asociada al navitoclax.(191) Este fármaco está siendo actualmente evaluado en pacientes con LLC en varios ensayos clínicos.

2.6.3. Fármacos inmunomoduladores

La lenalidomida pertenece a la familia de fármacos denominados como inmunomoduladores. Su mecanismo de acción no es del todo bien conocido, pero se cree que su eficacia como anticancerígeno se debería a efectos anti-angiogénicos, inmunomoduladores y de citotoxicidad directa. La importancia de cada uno de ellos varía de forma importante en función del tipo de neoplasia. De esta manera, por ejemplo, en la LLC no se ha demostrado un efecto citotóxico directo a diferencia de lo observado en otras neoplasias. Los efectos inmunomoduladores observados en la LLC incluyen principalmente un aumento de la función de los linfocitos T y NK, un descenso del número de células T reguladoras, así como un aumento en la producción de inmunoglobulinas y un restablecimiento de una correcta formación de sinapsis inmunes.(343, 344, 344, 344-353) Este último mecanismo facilita el reconocimiento inmune de las células de LLC por los linfocitos T.(344) Además, el tratamiento con lenalidomida podría restablecer la función de los linfocitos B no neoplásicos y así revertir el deterioro de la inmunidad humoral observado en los pacientes con LLC.(343) La activación inmune de las células de LLC con el aumento de expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD86 podría ser la responsable de la reacción de exacerbación tumoral “tumor flare” observada en algunos pacientes con LLC tratados con lenalidomida.(261, 262)

Lenalidomida en monoterapia ha demostrado eficacia en el tratamiento de pacientes con LLC en recaída o refractarios con una tasa de RG entorno del 35 – 50%, incluyendo algunas RC,(261, 262, 354), y en pacientes previamente no tratados con una tasa de RG del 56%.(355) Aunque inicialmente surgió la preocupación sobre su perfil de toxicidad, fundamentalmente por la aparición de varios casos de síndrome de lisis tumoral, las modificaciones en las dosis utilizadas junto con el empleo de un escalado de dosis inicial parecen solventar este problema. Más recientemente, la combinación de lenalidomida con rituximab parece que podría mejorar estos

resultados. Badoux y cols. investigaron esta combinación en 59 pacientes con LLC en recaída o refractarios con una tasa de respuestas del 66% con un 12% de RC.(356) Finalmente, también se está estudiando su papel como tratamiento de mantenimiento tras un tratamiento inicial en pacientes con LLC.

2.6.4. Nuevos anticuerpos monoclonales en la LLC

La relevancia del antígeno CD20 como diana terapéutica en gran parte de los síndromes linfoproliferativos B ha originado un gran interés por hallar nuevos anticuerpos anti-CD20 con una mayor actividad y eficacia que el rituximab. En función de su mecanismo de acción, los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en dos grupos: el tipo I, que actúan principalmente a través de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), pero con poca capacidad de inducir muerte celular directa; y el tipo II, que presenta poca actividad CDC pero son muy efectivos para inducir muerte celular directa.(357, 358) La gran mayoría de anticuerpos monoclonales anti-CD20 pertenecen al tipo I, incluyendo al rituximab, ofatumumab y otros como el veltuzumab y ocrelizumab. Por el contrario el obinutuzumab (GA101) se diseñó como un anticuerpo monoclonal de tipo II con la intención de obtener una mayor capacidad de citotoxicidad directa.(359) En este sentido, estudios *in vitro* mostraron una mayor eficacia de obinutuzumab para inducir muerte directa de células de linfoma, una mayor inducción de ADCC y una mayor actividad anti-tumoral en modelos xenógrafos en comparación con anticuerpos de tipo I.(359-361) Así mismo, en estudios *ex vivo* en células leucémicas de pacientes con LLC, obinutuzumab demostró una mayor capacidad de depleción de linfocitos B en comparación con rituximab.(359) Los estudios iniciales en pacientes con linfoma no Hodgkin y LLC sugieren un perfil de seguridad similar al rituximab y unos datos de eficacia muy prometedores.(362, 363) Recientemente se han comunicado los resultados de un amplio estudio randomizado en pacientes con LLC y comorbilidades donde la combinación de obinutuzumab demostró una mayor eficacia que rituximab junto con clorambucilo en términos de tasa de respuestas y SLP.(307)

Ofatumumab es otro nuevo anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado en desarrollo en la LLC, el cual reconoce un epítipo diferente al rituximab. Estudios pre-clínicos demostraron que ofatumumab producía una mayor citotoxicidad dependiente

de complemento en comparación con el rituximab. Además, era capaz de producir citotoxicidad en células primarias de LLC resistentes a rituximab.(364, 365) A nivel ya de ensayo clínico, ofatumumab mostró ser eficaz en pacientes con LLC con factores de mal pronóstico. El tratamiento con ofatumumab de un grupo de pacientes refractarios a fludarabina y alemtuzumab, o refractarios a fludarabina y con adenopatías de gran tamaño (>5 cm) obtuvo una tasa de respuesta global del 58% y del 47%, respectivamente. Además, la respuesta se obtuvo de forma independiente al uso previo de rituximab.(366) A pesar de ello, la mediana de SLP fue inferior a 6 meses en ambos grupos.(188) El uso de ofatumumab en combinación con fludarabina y ciclofosfamida (OFC) en pacientes con LLC previamente no tratados obtuvo una tasa de respuestas globales del 77% en la rama de tratamiento con dosis de ofatumumab de 1000 mg y del 73% con la dosis de 500 mg, y una tasa de RC del 50% y 32%, respectivamente.(367) Aunque no hay datos de una comparación directa entre OFC y FCR, estos resultados no parecen mejorar los ya obtenidos con la combinación de FCR.

Finalmente, se están desarrollando nuevos anticuerpos monoclonales y SMIP (small modular immuno pharmaceutical) dirigidos contra otras dianas antigénicas de la célula de LLC además del CD20 y CD52. Entre ellos cabe destacar el dacetuzumab (SGN-40, anti-CD40),(368) milatuzumab (anti-CD74),(369) XmAb5574, MDX-1342 (anti-CD19),(370) lumiliximab (anti-CD23)(371) y TRU-016, anti-CD37.(372)

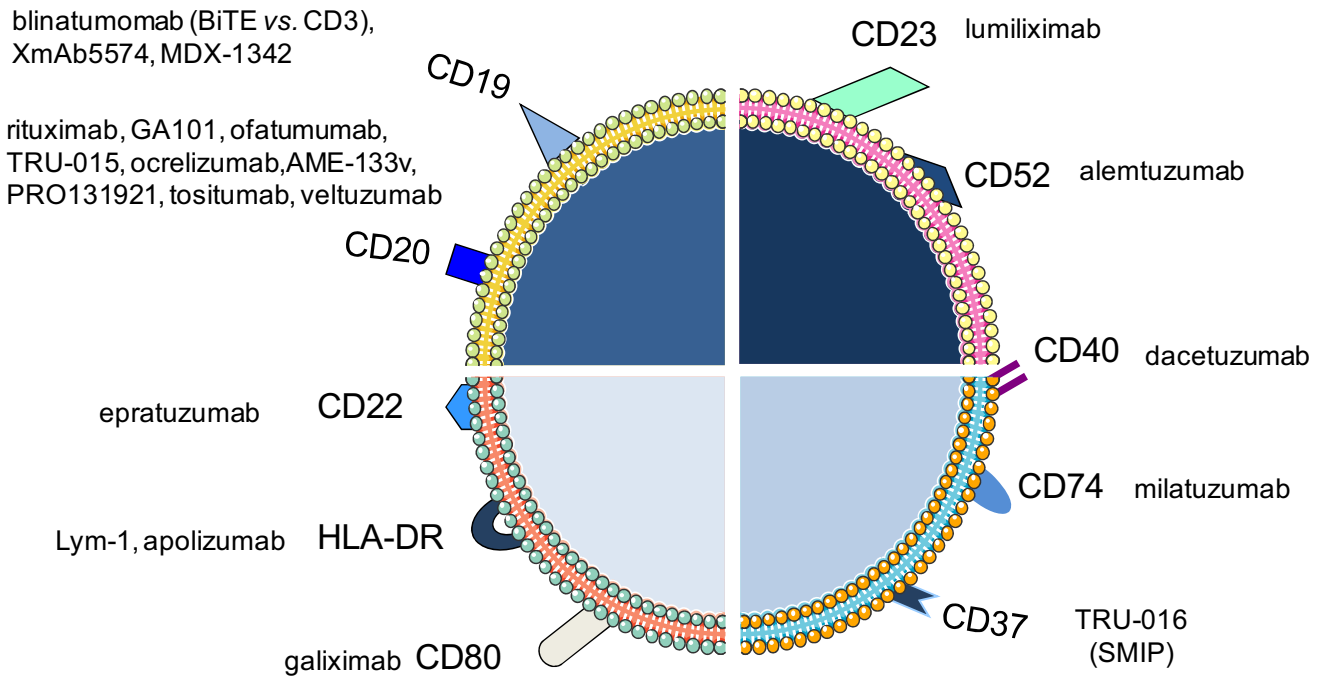


Figura 7. Antígenos diana en los linfocitos B y diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellos.

BiTE: bi-specific T-cell engager, anti CD19 y anti CD3.

2.7. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es el único tratamiento con potencial curativo en la LLC.(373) El control de la enfermedad se debe principalmente al efecto graft versus leucemia (GVL). En este sentido, a diferencia de lo observado en el trasplante autólogo, en el trasplante alogénico la incidencia de recaídas disminuye a lo largo del tiempo, incluso cuando se utilizan esquemas de acondicionamiento de intensidad reducida.(186, 373, 374) Además, el menor riesgo de recaída observado en los pacientes que desarrollan enfermedad graft versus huésped junto con un aumento de éste con el uso de depleción de células T, son otros factores que subrayan la relevancia del efecto GVL en la LLC (374-377) En este mismo sentido, la cinética de la EMR observada tras un trasplante alogénico también va en concordancia con el efecto de GVL. En este contexto se observa una mayor negativización de la EMR con la presencia de enfermedad graft versus huésped y/o modulando el tratamiento inmunosupresor.(241, 376, 378)

El trasplante alogénico mieloablativo se asoció inicialmente a una mortalidad no asociada a recaída de hasta un 44% en esta enfermedad.(379, 380) Sin embargo, el desarrollo de los regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida ha mejorado la tolerabilidad y la mortalidad asociada al trasplante, actualmente entre un 15% a un 25%, preservando el efecto injerto vs. leucemia. (186, 373, 373, 381-383) De esta manera, el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida se ha convertido en una opción de tratamiento para pacientes jóvenes con LLC con características de muy alto riesgo y una corta supervivencia con los tratamientos habitualmente utilizados en esta enfermedad: fundamentalmente aquellos pacientes con resistencia o recaída precoz tras un tratamiento basado en los análogos de las purinas, o con alteración de *TP53* que requieran tratamiento. (384) En estas situaciones el trasplante alogénico de intensidad reducida consigue mantener respuestas a largo plazo en un 30% a 60% de los pacientes, según las diferentes

series.(186, 373, 373, 381-383) Además, cabe destacar que aquellos pacientes con factores previos de mal pronóstico como la refractariedad a análogos de las purinas o delección de 17p presentan unos resultados similares a los demás pacientes.(185-187) Sin embargo, la presencia de enfermedad activa o la falta de respuesta al tratamiento al momento del trasplante siguen siendo factores que condicionan una evolución desfavorable tras él.(185, 373, 381, 383, 385)

En este sentido, los buenos resultados que están obteniendo los nuevos fármacos, principalmente los inhibidores de tirosín quinasa y de BCL2, en estos pacientes con LLC y factores de muy alto riesgo, podrían permitir que estos pacientes llegasen en una mejor situación al trasplante, o podrían ser incluso una alternativa a él. El mayor seguimiento de los pacientes tratados con estos fármacos debe permitir identificar en los próximos años cuál es la mejor estrategia terapéutica para estos pacientes.

Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

Varios estudios en la década de los 90 presentaron resultados prometedores del uso del trasplante autólogo en la LLC.(386) Posteriormente se publicaron los resultados de 2 ensayos aleatorizados que evaluaron el papel del trasplante autólogo en pacientes jóvenes previamente no tratados con LLC.(387, 388) Ambos estudios mostraron que esta estrategia terapéutica confería una mayor SLP a los pacientes. Sin embargo, este aumento en la SLP no se tradujo en un aumento en la SG de los enfermos. Además cabe resaltar que, a diferencia de lo que ocurre con el trasplante alogénico, la presencia de alteraciones genéticas como las alteraciones de *TP53* retenían su significado pronóstico adverso a pesar del trasplante. En un análisis retrospectivo el grupo alemán se compararon los resultados del ensayo CLL3, donde los pacientes recibían un trasplante autólogo como parte del tratamiento de primera

línea, con los pacientes que recibieron la rama de FCR del ensayo CLL8. El tiempo a un siguiente tratamiento y la SG de los pacientes fue similar en ambos grupos de pacientes.(389) Por lo tanto, aunque el trasplante autólogo es capaz de obtener respuestas prolongadas en los pacientes con LLC, no es un tratamiento curativo, como lo puede ser el trasplante alogénico, y no parece que ofrezca un beneficio en frente de las nuevas combinaciones de inmunoterapia.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

- La combinación de inmunoterapia consistente en rituximab, fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone (R-FCM) podría ser eficaz como tratamiento de primera línea en pacientes jóvenes con leucemia linfática crónica. El tratamiento de mantenimiento tras R-FCM con rituximab podría prolongar la duración de las respuestas obtenidas.

2. OBJETIVOS

a) Objetivo principal

Determinar la eficacia de la combinación de rituximab, fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone (R-FCM) medida a través de la tasa de respuestas, incluyendo la tasa de respuestas con enfermedad mínima residual negativa.

b) Objetivos secundarios

- Determinar la duración de la respuesta y la supervivencia libre de progresión obtenidos con la combinación de R-FCM seguido de rituximab de mantenimiento.
- Analizar las variables clínico-biológicas, incluyendo la citogenética y la expresión de ZAP-70, que influyen en la respuesta.
- Evaluar la aplicabilidad y perfil de toxicidad del tratamiento con R-FCM y rituximab de mantenimiento.

III. RESULTADOS.

1.- PRIMER TRABAJO.

1.1. RESUMEN

La combinación de inmonoquimioterapia de rituximab, fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona es un régimen altamente eficaz en el tratamiento de la leucemia linfática crónica.

La adición de anticuerpos monoclonales a los regímenes de quimioterapia ha mejorado significativamente el tratamiento de la LLC. Con esta premisa y los buenos resultados obtenidos previamente con el esquema de quimioterapia de fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona (FCM), tanto como terapia de rescate como tratamiento de primera línea,(243, 245) se exploró la adición de rituximab a FCM (R-FCM) como una nueva combinación para el tratamiento de los pacientes jóvenes con LLC.

En este artículo se presentan los resultados de un ensayo clínico multicéntrico fase II donde se evaluó el tratamiento de R-FCM seguido de un mantenimiento con rituximab en pacientes con LLC previamente no tratados. El ensayo fue revisado y aprobado por los diferentes comités éticos de todos los centros participantes. En este primer trabajo se analizaron los datos de la primera fase del estudio que consistió en el tratamiento inicial de los pacientes con R-FCM.

El esquema terapéutico consistió en rituximab 500 mg/m² (día 1) (excepto en el primer ciclo donde se administraron 375mg/m²), fludarabina 25mg/m² (días 1-3), ciclofosfamida 200mg/m² (días 1-3), y mitoxantrone 6mg/m² (día 1), cada cuatro semanas, hasta un total de seis ciclos. Todos los pacientes recibieron factor

estimulante de colonias granulocitarias pegilado el día posterior a finalizar el tratamiento y profilaxis con trimethoprim-sulfametoxazol dos veces por semana.

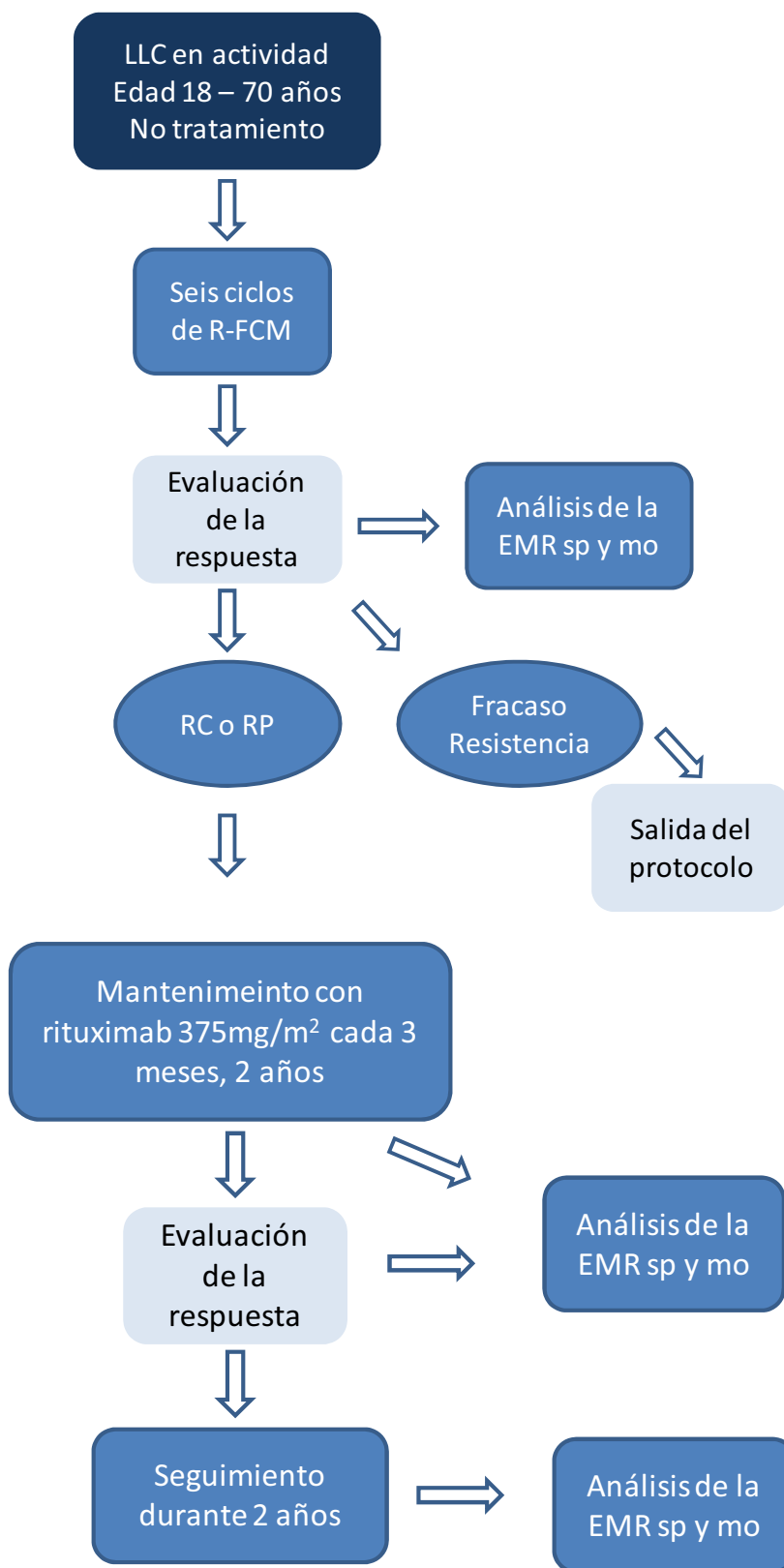


Figura 8. Algoritmo terapéutico del ensayo R-FCM.

EMR: enfermedad mínima residual; RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; sp: sangre periférica; mo: médula ósea.

Entre Noviembre de 2005 y Noviembre de 2007 se incluyeron 72 pacientes con LLC previamente no tratados y con edad igual o inferior a 70 años. Los pacientes que recibieron tres o más ciclos de tratamiento se consideraron evaluables para la respuesta, mientras que los pacientes que realizaron menos de tres ciclos a causa de la toxicidad derivada del tratamiento se catalogaron como fallo de tratamiento. La respuesta se evaluó a los tres meses de haber finalizado el tratamiento mediante los criterios del “National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia” NCI/WG (390). Además, se analizó la enfermedad mínima residual (EMR) obtenida tras el tratamiento mediante citometría de flujo de manera simultánea en sangre periférica y médula ósea. Aquellos pacientes que obtuvieron al menos una respuesta parcial (RP) tras el tratamiento inicial con R-FCM continuaron con la fase de mantenimiento del estudio. La respuesta fue evaluada en sesenta y siete pacientes, con una mediana de edad de 60 años (rango, 40 a 70 años). La tasa de respuesta global obtenida tras el tratamiento inicial con R-FCM fue del 93%, con una tasa de RC con EMR negativa, tasa de RC con EMR positiva y de RP del 46%, 36% y 11%, respectivamente. Cinco pacientes (7%) fueron considerados como fallo de tratamiento; en dos de ellos no hubo una reducción significativa de la masa tumoral, dos pacientes presentaron una neutropenia persistente que impidió la continuación del tratamiento, y un paciente murió como consecuencia de una neumonía por *Aspergillus* y una reactivación de citomegalovirus. Los factores que se correlacionaron con una menor tasa de RC fueron el estadio clínico avanzado al inicio del tratamiento, la deleción de 17p, y un valor elevado de β_2 -microglobulina. Finalmente, las variables que se asociaron con la obtención de una RC con EMR negativa fueron el tiempo de duplicación linfocitaria, y el recuento linfocitario en sangre periférica.

En general, el tratamiento con R-FCM fue bien tolerado y aunque se observó algún grado de neutropenia en un 41% de los ciclos administrados, ésta fue grave, grado 3 o 4, únicamente en una 13% de los ciclos. Los episodios de trombocitopenia o

anemia grado 3 o 4 fueron muy infrecuentes, y sólo se observaron en un 2% de los ciclos. En cuanto a la toxicidad infecciosa, se observó un evento infeccioso mayor en un 8% de los ciclos administrados. Un paciente falleció como consecuencia de una neumonía por *Aspergillus Flavus* e infección por citomegalovirus.

En conclusión, la combinación de R-FCM es un tratamiento altamente eficaz en pacientes previamente no tratados y seleccionados, jóvenes y con un estado general adecuado, con LLC. Esta combinación de inmunoterapia obtiene una alta tasa de respuesta completas (82%), consiguiendo en gran parte de ellas la negativización de la enfermedad mínima residual. Además, es un esquema de tratamiento con una tolerabilidad adecuada.

Rituximab, Fludarabine, Cyclophosphamide, and Mitoxantrone: A New, Highly Active Chemoimmunotherapy Regimen for Chronic Lymphocytic Leukemia

Francesc Bosch, Pau Abrisqueta, Neus Villamor, Maria José Terol, Eva González-Barca, Christelle Ferra, Marcos González Díaz, Eugenia Abella, Julio Delgado, Félix Carbonell, José Antonio García Marco, Lourdes Escoda, Secundino Ferrer, Encarnación Monzó, Yolanda González, Cristina Estany, Isidro Jarque, Olga Salamero, Ana Muntañola, and Emili Montserrat

From the Department of Hematology, Hospital Clinic, Institut de Investigacions Biomèdiques "August Pi i Sunyer"; Department of Hematopathology, Hospital Clinic; Hospital "Duran y Reynals," L'Hospitalet; Hospital del Mar; Hospital de Sant Pau, Barcelona; Departments of Hematology, Hospital Clinic; Hospital General Universitario; Hospital Dr Peset; Hospital "Arnao de Vilanova," Hospital "La Fe," Valencia; Hospital "Germans Trias y Pujol," Badalona; Hospital Clínico Universitario, Salamanca; Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid; Hospital Joan XXIII, Tarragona; Hospital "Josep Trueta," Girona; and Hospital Mutua de Terrassa, Terrassa, Spain.

Submitted January 16, 2009; accepted April 9, 2009; published online ahead of print at www.jco.org on August 24, 2009.

Supported in part by Grants No. 05/0213, 08/0211, and 08/0304 from the Spanish Ministry of Health; Grant No. 05/1810 from Marató de TV3; Grant No. RTICC-2006; and Grants No. EM/08 and CR/08 from the José Carreras Foundation.

Written on behalf of the Spanish Group for Chronic Lymphocytic Leukemia.

Presented in part at the 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 8-11, 2007, Atlanta, GA.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Francesc Bosch, MD, PhD, Department of Hematology, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain; e-mail: fbosch@clinic.ub.es.

© 2009 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/09/2727-4578/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2009.22.0442

A B S T R A C T

Purpose

The addition of monoclonal antibodies to chemotherapy has significantly improved treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL). Based on excellent results with the chemotherapy-only regimen fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (FCM), we built a new chemoimmunotherapy combination—rituximab plus FCM (R-FCM). We report a phase II clinical trial consisting of an initial treatment with R-FCM followed by rituximab maintenance.

Patients and Methods

Seventy-two untreated CLL patients age 70 years or younger received rituximab 500 mg/m² on day 1 (375 mg/m² the first cycle), fludarabine 25 mg/m² IV on days 1 to 3, cyclophosphamide 200 mg/m² on days 1 to 3, and mitoxantrone 6 mg/m² IV on day 1, given at 4-week intervals with up to six cycles supported with colony-stimulating factor. Patients achieving response received maintenance with rituximab 375 mg/m² every 3 months for 2 years.

Results

The overall response, minimal residual disease (MRD) –negative complete response (CR), MRD-positive CR, and partial response rates were 93%, 46%, 36%, and 11%, respectively. Severe neutropenia developed in 13% of patients. Major and minor infections were reported in 8% and 5% of cycles, respectively. Advanced clinical stage, del(17p), or increased serum β 2-microglobulin levels correlated with a lower CR rate.

Conclusion

R-FCM is highly effective in previously untreated CLL, with an 82% CR rate and a high proportion of MRD-negative CRs (46%). Treatment toxicity is acceptable. Parameters correlating with a lower response rate were advanced clinical stage, high serum β 2-microglobulin levels, and del(17p). Based on these results, R-FCM warrants further investigation in randomized clinical trials.

J Clin Oncol 27:4578-4584. © 2009 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the relentless accumulation of monoclonal CD5+ B lymphocytes in blood, bone marrow, and lymphoid tissues. The disease predominates in older individuals and its incidence increases with age. The median survival of patients with CLL is around 10 years but the individual prognosis is highly variable. Despite some advances in its therapy, CLL remains incurable with conventional treatments.¹⁻⁸

In the past few years, rituximab-based chemoimmunotherapy has emerged as the more efficacious therapy for chronic B-cell malignancies,

including CLL.⁹⁻¹¹ Despite these advances, there is no evidence yet that any of the newer and more effective treatments in terms of response rate and progression-free survival results in a longer overall survival.^{3,5,8} However, newer therapies produce a substantial proportion of minimal residual disease (MRD) –negative complete responses (CRs), a situation which translates into a longer progression-free and overall survival.^{7,8,12-16}

Based on several in vitro and in vivo studies by others¹⁷ and ourselves,^{18,19} we developed a combination chemotherapy including fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (FCM) that proved to be highly effective in patients with CLL, both previously treated and untreated.^{12,16,17}

As a next, logical development of this treatment program the effectiveness of the combination of rituximab with FCM (R-FCM) was investigated in a phase II clinical trial which includes two clearly separated treatment parts. First, patients were given R-FCM up to a maximum of six cycles. Second, after a careful evaluation of the response 3 months after concluding R-FCM, patients having achieved a response received rituximab maintenance (375 mg/m²) every 3 months for 2 years. We report here the results of the first part of our study, namely the response to R-FCM.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Between November 2005 and November 2007, 72 patients with untreated CLL were included in this study. The trial was reviewed and approved by ethical committees of all centers participating in the trial. All patients provided written informed consent before entry on this study. The diagnosis of CLL was established according to the National Cancer Institute/CLL Working Group (NCI-WG) criteria.²⁰

Evaluation prior treatment included clinical history, physical examination, WBC with differential count, liver and renal function tests, Coombs' test, serum lactate dehydrogenase, and β 2-microglobulin levels. Creatinine clearance was calculated by using the Cockcroft-Gault formula.²¹ Bone marrow infiltration was assessed by needle aspiration and biopsy. Fluorescent in situ hybridization (FISH) studies were performed by using the LSI p53/LSI ATM and LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 Multicolor Probe Sets provided by Vysis (Downers Grove, IL) using cutoff levels as previously described.²² ZAP-70 expression was analyzed in all patients by using the technique described by our group.²³ CD38 expression in CLL lymphocytes was considered increased when it was \geq 30%. Clinical and biologic parameters were assessed during a period of 1 month before the onset of the treatment.

Inclusion criteria were age 70 years or younger, active disease according to the NCI-WG criteria,²⁰ and an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 0 to 2. Patients with prior history of autoimmune phenomena or a positive Coombs' test, impaired renal or hepatic function, creatinine clearance inferior to 50 milliliter/min, past history for B or C hepatitis, severe concomitant diseases, or pregnancy were excluded from the study.

Therapy

Patients received rituximab (375 mg/m² intravenous [IV] cycle 1, and 500 mg/m² IV in subsequent cycles), fludarabine (25 mg/m² IV over 30 minutes for 3 days), cyclophosphamide (200 mg/m² IV over 1 hour for 3 days), and mitoxantrone (6 mg/m² IV over 30 minutes on day 1) as previously described.^{12,16} In patients with peripheral blood lymphocyte counts higher than 25,000/ μ L rituximab was split in half doses given on days 0 and 1. Patients received pegylated granulocyte colony-stimulating factor the day after the R-FCM and allopurinol 300 mg daily for 5 days starting on day 1. All patients received oral trimethoprim-sulfamethoxazole twice weekly up to 9 months after the end of the treatment.

Treatment cycles were repeated every 4 weeks and administered when the neutrophil count was greater than 1,500/ μ L and the platelet count superior to 100,000/ μ L. Those patients with neutropenia, thrombocytopenia, or anemia prior the onset of the R-FCM received the subsequent cycle of therapy when their neutrophil count, hemoglobin level, and platelet counts were 75% or higher than the baseline values. If 6 weeks after the previous cycle of therapy hematologic parameters did not reach the above mentioned levels, treatment was then restarted with reduced doses of FCM. However, if after this interval absolute neutrophil count was inferior to 500/ μ L or the platelet count inferior to the 75% of the baseline value treatment was discontinued.

Response Criteria

Patients who received three or more cycles of R-FCM were considered assessable for response. Patients receiving fewer than three cycles and withdrawing from the study due to undue toxicity were considered as experiencing

treatment failure. Response was assessed 3 months after the end of the treatment using NCI-WG criteria.²⁰ Patients in CR with no detectable MRD were categorized as MRD-negative CR. Bone marrow evaluation was not required for patients not attaining clinical CR. Imaging studies were not used to evaluate response to therapy.

MRD assessment was centrally analyzed in the Hematopathology Unit from the Hospital Clinic of Barcelona using multiparametric flow cytometry. Both peripheral blood and bone marrow were analyzed simultaneously at the time of response evaluation. Whole peripheral blood or bone marrow samples were incubated with quadruple combinations of antibodies in a five tube combination assay with a sensitivity of 10⁻⁴ and analyzed following the method described by Rawstron et al.²⁴

End Points and Statistical Considerations

The main end point of the first part of the trial reported here was response rate, including MRD assessment. In addition, treatment toxicity was evaluated.

The CR rate in previously untreated patients receiving FCM is 64%.¹⁶ Using an optimal two-stage design for phase II clinical trials, the estimated sample size to observe an increase of 15% in the CR rate, with an α error of .05 and a β error of 20%, was 67 patients. The Fisher's exact test or χ^2 -tests were used to analyze the association between patient characteristics and response. All statistical tests were two sided and the significance level was .05.

RESULTS

Patients' Characteristics and Response to Therapy

Sixty-seven patients (median age, 60 years; range, 40 to 70 years) were assessable for response. Four patients were excluded from the study because they did not fulfill the inclusion criteria and an additional patient declined treatment after inclusion into the study (Fig 1). The main characteristics of the patients are presented in Table 1.

Median number of R-FCM cycles administered was 6 (range, 3 to 6); 88% of patients received the entire planned therapy. The overall response rate was 93% (95% CI, 84% to 97%). CR was obtained in 82% of patients (n = 55; 95% CI, 71% to 89%). Among them, 36% achieved MRD-positive CR (n = 24; 95% CI, 25% to 48%) and 46% (n = 31; 95% CI, 35% to 58%) MRD-negative CR. Eight patients

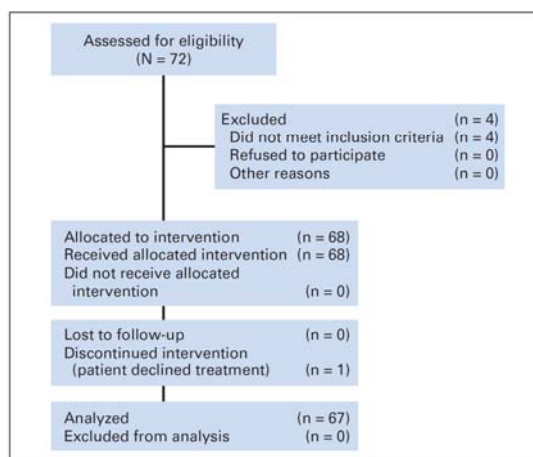


Fig 1. CONSORT diagram.

Table 1. Response Rate and Response Duration According to the Main Pretreatment Characteristics of the Patients

Variable	Distribution (%)	CR (%)	MRD-Negative CR (%)
Age, years			
Younger than 60	48	84	43
60 to 70	52	80	46
Sex			
Female	30	85	35
Male	70	81	51
Binet stage			
A	13	100	67
B	61	85*	44
C	26	65	41
Rai stage			
0	3	100	50
I-II	69	91*	50
III-IV	28	58	37
B symptoms			
No	73	80	53
Yes	27	89	28
Liver size			
Normal	45	83	46
Enlarged	55	80	47
Spleen size			
Normal	55	83	43
Enlarged	45	81	49
Lymphocyte count, μL			
< 100,000	67	84	57*
\geq 100,000	33	77	27
LDT (n = 57), months			
\geq 6	77	86	58*
\leq 6	23	69	23
Serum LDH (n = 64)			
Normal	69	84	48
Increased	31	76	40
$\beta 2$ -microglobulin (n = 58), upper limit normal			
< 2N	79	89*	48
\geq 2N	21	72	25
BM pattern (n = 62)			
Non-diffuse	55	85	52
Diffuse	45	78	41
Genetic abnormalities (n = 58)			
del(13q)	38	82	50
+12	7	100	50
del(11q)	14	87	62
del(17p)	7	25*	0
ZAP-70 expression (n = 64)			
< 20%	41	84	54
\geq 20%	59	79	39

Abbreviations: CR, complete response; MRD, minimal residual disease; LDT, lymphocyte doubling time; LDH, lactate dehydrogenase; BM, bone marrow pattern. * $P < .05$.

(11%) were considered as in PR because of persistent lymphadenopathy (two patients), incomplete bone marrow recovery (three patients) or bone marrow infiltration with lymphoid aggregates (three patients). Five patients failed (7%) to respond; in two of these patients tumor burden was not significantly reduced, two additional patients had persistent neutropenia that prevented treatment continuation, and the remaining one died due to *Aspergillus* pneumonia and cytomegalovirus reactivation.

In responding patients, a rapid tumor reduction was already observed in the first cycles of therapy. As a result, a rapid decline in blood lymphocyte count was observed with the first cycle of therapy. In addition, when analyzing the maximum clinical response not considering treatment-related cytopenias, no little further improvement was observed beyond three cycles of therapy (Fig 2).

Pretreatment variables associated with CR are listed in Table 1. Patients with advanced clinical stage, increased serum $\beta 2$ -microglobulin levels, and deletion 17p were associated with a lower CR rate. Of note, only 25% of patients having a 17p deletion attained CR. No differences in response rate were observed according to age subgroups (younger than 60 v 60 to 70 years).

In patients obtaining CR or PR according to NCI criteria, the MRD status was investigated by flow cytometry. Among 55 patients in CR, 56% of them (n = 31) achieved MRD-negative status. Moreover, in one patient considered in PR due to the presence of lymphoid aggregates in bone marrow biopsy no MRD was detected. MRD was better detected in bone marrow than in peripheral blood, since in 77% of the patients there was a virtual absence of peripheral blood B lymphocytes.

Pretreatment variables associated with MRD-negative CR achievement were lymphocyte doubling time (< 6 v \geq 6 months, 15% v 52%, respectively; $P = .026$) and peripheral blood lymphocyte count (> 100,000 v < 100,000/ μL , 27% v 57%, respectively; $P = .029$). Among responding patients, cytogenetic alterations did not correlate with MRD-negative CR achievement.

Toxicity

In general, R-FCM was well tolerated. Main toxicities are detailed in Table 2. The first infusion of rituximab was fractionated in 51% of the patients as per the protocol. Infusional reaction to rituximab was observed in 37% of the patients, mainly during the first cycle of treatment. Although some degree of neutropenia was observed in 41% of cycles, severe grade 3 to 4 neutropenia was only detected in 13% of

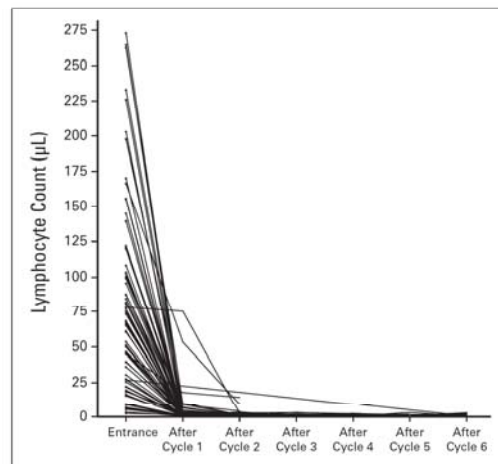


Fig 2. Blood lymphocyte counts by cycle. A rapid decline in blood lymphocyte count was observed with the first cycle of therapy.

Toxicity	%		
	Total	Grade 1-2	Grade 3-4
Hematologic			
Neutropenia	41	28	13
Thrombocytopenia	6	4	2
Anemia	17	17	—
Nonhematologic			
Infusional reaction	10	9	1
Nausea/vomiting	14	13	1
Alopecia	2	—	2
Renal	3	3	—
Gastrointestinal	3	3	—
Hepatic	6	6	—
Infection	13	8	5
Infectious episodes by site, No.			
Fever of unknown origin	31		
%	8		
Documented infections	21		
%	5		
Pneumonia	8		
Upper respiratory tract	5		
Cutaneous infection	2		
Sepsis (<i>Staphylococcus</i> spp.)	2		
Diarrhea	1		
Herpes zoster reactivation	1		
CMV reactivation	1		
Pulmonary aspergillosis	1		

NOTE. Toxicity was based on the National Cancer Institute/Chronic Lymphocytic Leukemia Working Group and WHO classification and expressed as % of the cycles administered.
Abbreviations: R-FCM, rituximab plus fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone; CMV, cytomegalovirus.

the cycles. The WBC nadir, analyzed during the first cycle, was observed 7 days after the onset of treatment. Grade 3/4 thrombocytopenia and anemia were observed in 2% of the cases. Dose reductions and delay on administration were necessary in 9% and 18% of the cycles, respectively, mainly because of hematologic toxicity.

Fever of unknown origin, recorded in 8% of the cycles, resulted more frequent after the first cycle. In contrast, documented infections were reported in 5% of the cycles and were more prevalent after the last cycle of R-FCM (Fig 3). One patient required admission due to a severe pneumonia complicated by cytomegalovirus and *Aspergillus flavus* infections that eventually were fatal, this resulting in a treatment-related mortality rate of 1.5%.

Neutropenic episodes were higher (57% v 32% of cycles, respectively; $P = .002$), and also more severe (grade 3-4 neutropenia in 22% v 8% of cycles, respectively; $P = .014$) in patients from 60 to 70 years of age ($n = 34$) than in patients younger than 60 years ($n = 33$). In addition, there was a trend for a higher number of infectious episodes in the subgroup of patients from 60 to 70 years of age ($P = .064$).

Treatment Results of R-FCM As Compared With FCM

Patients' characteristics and treatment results of our FCM clinical trial¹⁶ were retrospectively compared with those of the R-FCM study reported here (Table 3). The FCM study was designed for patients younger than 65 years, whereas R-FCM included patients younger than 70 years. The remaining inclusion criteria were identical in the

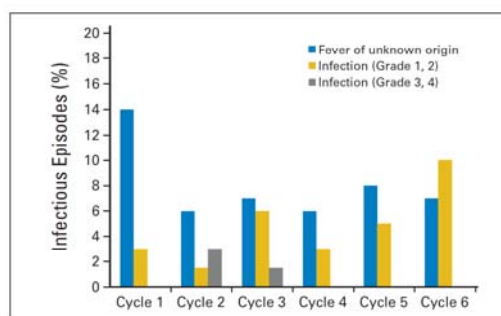


Fig 3. Percentage of infectious episodes by cycle of treatment. Blue bars represent fever of unknown origin, gold bars represent infectious episodes grades 1 to 2, and gray bars represent infections grades 3 to 4.

two treatment combinations (active CLL requiring treatment according to the NCI-WG criteria and adequate performance status). Distribution by sex, clinical stage, blood lymphocyte count, doubling time, serum $\beta 2$ -microglobulin levels, ZAP-70 expression in B-lymphocytes, and genetic abnormalities was not significantly different between the two groups of patients, except for a higher percentage of cases with trisomy 12 in the FCM cohort. Albeit the overall response rate was similar with the two regimens, the proportion of CRs, including those with negative MRD, was significantly higher with R-FCM than with FCM (46% v 26%, respectively). Also grade 3 to 4 toxicity (neutropenia, thrombocytopenia, and the number of infections) was significantly higher in patients receiving R-FCM than FCM. The R-FCM combination was also more effective and toxic than FCM when comparing patients younger than 65 years (data not shown).

DISCUSSION

This study shows that R-FCM chemoimmunotherapy is extremely active in patients with untreated CLL, with acceptable and manageable toxicity. The 93% overall response rate and 82% CR, of which 46% were MRD negative, are remarkable. Although direct comparisons of different phase II studies is inappropriate, it is of note that the CR rate found in this study is higher than those reported by the United Kingdom Leukaemia Research Fund (LRF CLL4), the German CLL Study Group, the US Intergroup with fludarabine and cyclophosphamide (FC), and pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab (39%, 24%, 23%, and 41%, respectively).^{5,8,25,26} In a large phase II study the FCR (fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab) combination designed by the M. D. Anderson Cancer Center resulted in an overall response rate of 95% and 72% CR.¹¹ Although only available in abstract format, the German CLL Study Group recently reported the results of the CLL8 clinical trial comparing FCR versus FC.²⁷ The ORR and CR rates were higher in the FCR arm (95% and 52%, respectively) than in the FC arm (88% and 27%, respectively), with a prolongation of the progression-free survival in the FCR arm. Other trials using FCR at different doses and treatment schedules have produced CR rates ranging from 61% to 79%.²⁸⁻³⁰ Comparing all these clinical trials, however, it is difficult because of the heterogeneity of patients included in the different studies; for example, whereas in our study no

Table 3. Comparison of the Main Characteristics of the Series and Treatment Results of Patients Included in Our Previous FCM Clinical Trial With Those of Patients Treated With R-FCM

Variable	%		P
	FCM	R-FCM	
No. of patients	69	67	
Age, years			
< 60	64	48	.08
≥ 60	36	52	
Sex			
Female	25	30	NS
Male	75	70	
Binet stage			
A	21	13	NS
B	67	61	
C	12	26	
Rai stage			
0	3	3	NS
I-II	74	69	
III-IV	23	28	
B symptoms			
No	67	73	NS
Yes	33	27	
Lymphocyte count, μL			
< 100,000	70	67	NS
≥ 100,000	30	33	
LDT, months			
≥ 6	60	77	.083
≤ 6	40	23	
Serum LDH (n = 65)			
Normal	77	69	NS
Increased	23	31	
$\beta 2$ -microglobulin, mg/L			
< 3	49	48	NS
≥ 3	51	52	
Genetic abnormalities			
del(13q)	34	38	NS
+12	22	7	.028
del(11q)	28	14	NS
del(17p)	11	7	NS
ZAP-70 expression (n = 39)			
< 20%	44	41	NS
≥ 20%	56	59	
Grade 3-4 toxicity			
Neutropenia	4	13	< .001
Thrombocytopenia	—	2	< .01
Infection	1	5	< .001
Response			
CR MRD negative	26	46	
CR MRD positive	38	36	.034
PR	26	11	
Failure	10	7	
CR achievement predictors	Clinical stage, spleen size, serum LDH, $\beta 2$ -microglobulin, BM, del(17p)	Clinical stage, $\beta 2$ -microglobulin, del(17p)	

Abbreviations: FCM, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone; R-FCM, rituximab plus FCM; NS, not significant; LDH, lactate dehydrogenase; LDT, lymphocyte doubling time; BM, bone marrow pattern; CR, complete response; MRD, minimal residual disease; PR, partial response.

patients above the age of 70 were included and only 20% of patients were older than 65 years, in other trials the proportion of patients older than 70 years is between 15% and 30%.^{5,11,28}

In our study the MRD-negative CR rate was 46%. MRD status is concentrating important attention in CLL therapy since MRD-negativity is associated with a longer progression-free survival and overall survival.^{7,12,16} Although the possibility of achieving MRD-negativity might be a surrogate of a less aggressive disease from the biologic standpoint, the association between MRD-negative status and a better outcome has been validated in many studies.^{7,31}

Toxicity of R-FCM, mainly hematologic and infectious, was manageable and treatment-related mortality was low. The proportion of patients with severe neutropenia was lower than that reported with FCR¹⁵ although all patients in our trial received G-CSF.

In a historical comparison of two consecutive trials conducted by our group, we found a higher CR rate with R-FCM than with FCM (64% v 58%), including a larger proportion of MRD-negative CRs (46% v 26%). Albeit this was a retrospective analysis, this comparison was performed between well-balanced subgroups of patients in terms of the main clinical and biologic variables, suggesting that the addition of rituximab highly improves the efficacy FCM. On the downside there was an increased hematologic and infectious toxicity in patients treated with R-FCM. Interestingly, in the R-FCM trial some variables indicating high tumor burden (diffuse bone marrow pattern, enlarged spleen or increased serum LDH) lost their negative predictive value for CR achievement observed in the FCM trial.

A number of other findings in our study deserve comment, particularly regarding response predictors. Of note, patients with deletion 17q responded poorly to R-FCM, this adding to the body of evidence on the ineffectiveness of fludarabine-based therapies in patients with this genetic lesion.^{5,32,33} However, no differences in response rate were observed among patients with other abnormalities (ie, deletion 13q, trisomy 12, and deletion 11q). In our trial, patients' age at inclusion did not correlate with the probability of achieving CR. This is in contrast with other trials and may be explained by the absence of patients older than 70 years.¹⁵

Besides genetic abnormalities, clinical stage, and serum $\beta 2$ -microglobulin levels correlated with an inferior response. The identification of response predictors others than del(17p) is important because the proportion of patients with such a genetic abnormality is relatively low in all series.^{25,34} In this regard, it is of note that serum $\beta 2$ -microglobulin, an easily obtainable parameter, correlated with a lower response rate both in our study and in the FCR trial recently updated by the M. D. Anderson Cancer Center Group.^{11,15,34} The search for predictors for response to the newer therapies, mainly new biologic variables, is warranted.³⁴

Our study has a number of limitations that deserve comment. First, results are derived from a phase II trial conducted in a relatively small number of patients. Second, since the study includes maintenance with rituximab, response duration and survival cannot be properly assessed yet. Nevertheless, the maintenance phase does not interfere with the major end point of this report which is response rate. The dramatic high CR rate obtained with R-FCM makes these results worth communicating because the ideal companion for rituximab in chemoimmunotherapy regimens for CLL is far from being established. Finally, this regimen was tested in CLL patients with a median age below that observed in standard CLL populations with no significant comorbidities. Our results showed higher hematologic toxicity

in the subgroup of patients older than 60 years. The efficacy and toxicity of these chemoimmunotherapies in elderly patients, particularly in those with comorbidities, is far from being established and warrants specific clinical trials.

In conclusion, R-FCM is a well-tolerated regimen that produces the highest CR rate reported to date, including MRD-negative CRs, in previously untreated patients with active CLL. Based on these results, randomized trials comparing R-FCM with other forms of chemoimmunotherapy are clearly warranted.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Although all authors completed the disclosure declaration, the following author(s) indicated a financial or other interest that is relevant to the subject matter under consideration in this article. Certain relationships marked with a "U" are those for which no compensation was received; those relationships marked with a "C" were compensated. For a detailed description of the disclosure categories, or for more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to the Author Disclosure Declaration and the Disclosures of Potential Conflicts of Interest section in Information for Contributors.

Employment or Leadership Position: None **Consultant or Advisory Role:** Francesc Bosch, Hoffmann-La Roche (C); Emili Montserrat, Hoffmann-La Roche (C), Bayer (C) **Stock Ownership:** None **Honoraria:**

Francesc Bosch, Hoffmann-La Roche; Emili Montserrat, Hoffmann-La Roche **Research Funding:** Emili Montserrat, Hoffmann-La Roche **Expert Testimony:** None **Other Remuneration:** None

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Francesc Bosch, Emili Montserrat

Administrative support: Pau Abrisqueta, Olga Salamero, Ana Muntañola

Provision of study materials or patients: Francesc Bosch, Neus Villamor, Maria José Terol, Eva González-Barca, Christelle Ferra, Marcos González Díaz, Eugenia Abella, Julio Delgado, Félix Carbonell, José Antonio García Marco, Lourdes Escoda, Secundino Ferrer, Encarnación Monzó, Yolanda González, Cristina Estany, Isidro Jarque, Emili Montserrat

Collection and assembly of data: Francesc Bosch, Pau Abrisqueta, Neus Villamor, Olga Salamero, Ana Muntañola

Data analysis and interpretation: Francesc Bosch, Olga Salamero, Ana Muntañola, Emili Montserrat

Manuscript writing: Francesc Bosch, Marcos González Díaz, Eugenia Abella, Julio Delgado, Isidro Jarque, Ana Muntañola, Emili Montserrat **Final approval of manuscript:** Francesc Bosch, Pau Abrisqueta, Neus Villamor, Maria José Terol, Eva González-Barca, Christelle Ferra, Marcos González Díaz, Eugenia Abella, Julio Delgado, Félix Carbonell, José Antonio García Marco, Lourdes Escoda, Secundino Ferrer, Yolanda González, Cristina Estany, Isidro Jarque, Olga Salamero, Ana Muntañola, Emili Montserrat

REFERENCES

- Johnson S, Smith AG, Loffler H, et al: Multi-centre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia: The French Cooperative Group on CLL. *Lancet* 347:1432-1438, 1996
- Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al: Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 92:1165-1171, 1998
- Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al: Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1750-1757, 2000
- Leporrier M, Chevret S, Gazin B, et al: Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 98:2319-2325, 2001
- 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* 370:230-239, 2007
- Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, et al: Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia: Report of a prospective, randomized, multicenter trial. *Blood* 96:2623-2629, 2000
- Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, et al: Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 25:5616-5623, 2007
- Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, et al: Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99:891, 2006
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al: CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346:235-242, 2002
- Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, et al: Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 26:4587-4594, 2008
- Tam CS, O'Brien S, Wierda W, et al: Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 112:975-980, 2008
- Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, et al: Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 119:976-984, 2002
- Moreton P, Kennedy B, Lucas G, et al: Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol* 23:2971-2979, 2005
- Byrd JC, Rai K, Peterson BL, et al: Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: An updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood* 105:49-53, 2005
- 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* 23:4079-4088, 2005
- Bosch F, Ferrer A, Villamor N, et al: Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial
- Hendry L, Bowen A, Matutes E, et al: Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia and low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 45:945-950, 2004
- Bellosillo B, Colomer D, Pons G, et al: Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B- chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 100:142-146, 1998
- Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, et al: In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:2836-2843, 1999
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al: National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87:4990-4997, 1996
- Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41, 1976
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910-1916, 2000
- 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* 348:1764-1775, 2003
- Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al: International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 21:956-964, 2007
- Flinn IW, Neuberger 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* 25:793-798, 2007
- Kay NE, Geyer SM, Call TG, et al: Combination n, cyclophosphamide, and rituximab as first-line therapy in previously

Bosch et al

untreated B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:405-411, 2007

27. Hallek M, Fingerle-Rowson G, Fink A, et al: Immunochemotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) versus fludarabine and cyclophosphamide (FC) improves response rates and progression-free survival (PFS) of previously untreated patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 112:325s, 2008 (abstr)

28. Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, et al: Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27:498-503, 2009

29. Lamanna N, Jurcic JG, Noy A, et al: Sequential therapy with fludarabine, high-dose cyclophosphamide, and rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia produces high-quality responses: Molecular remissions predict for durable complete responses. *J Clin Oncol* 27:491-497, 2009

30. Ahmadi T, Schuster SJ: Variations on the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab combination in chronic lymphocytic leukemia therapy: What have we learned? *J Clin Oncol* 27:479-480, 2009

31. Montserrat E: Treatment of chronic lymphocytic leukemia: Achieving minimal residual disease-negative status as a goal. *J Clin Oncol* 23:2884-2885, 2005

32. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al: Genetics of chronic lymphocytic leukemia: Genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 16:993-1007, 2002

33. Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, et al: Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: Justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol* 24:437-443, 2006

34. Moreno C, Montserrat E: New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 22:211-219, 2008



2.- SEGUNDO TRABAJO.

2.1. RESUMEN

Mantenimiento con rituximab tras un tratamiento de primera línea con rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, y mitoxantrone (R-FCM) en pacientes con leucemia linfática crónica.

En este segundo trabajo, se presentan los resultados de la segunda fase del estudio, la correspondiente al mantenimiento con rituximab tras el tratamiento inicial con R-FCM. A pesar de los buenos resultados obtenidos con las combinaciones de inmunoterapia en el tratamiento de la leucemia linfática crónica (LLC), los pacientes continúan recayendo y la LLC sigue siendo considerada actualmente una enfermedad incurable.(167, 259) La ausencia de una respuesta sostenida en el tiempo es debida a la persistencia de enfermedad mínima (EMR) tras el tratamiento. Por este motivo, las estrategias dirigidas a disminuir e incluso a erradicar la EMR podrían derivar en una mejora en la evolución de los pacientes con LLC. En la segunda fase del ensayo se evaluó la eficacia y tolerabilidad del tratamiento de mantenimiento con rituximab tras el tratamiento con R-FCM. Aquellos pacientes que obtuvieron una RC o RP tras el tratamiento inicial fueron elegibles para la fase de mantenimiento. El esquema terapéutico de esta fase consistió en 375mg/m² de rituximab cada tres meses durante dos años hasta un máximo de ocho dosis, en función de la respuesta y de la toxicidad observada. Los pacientes que recibieron al menos 4 ciclos de mantenimiento fueron considerados para el análisis de respuesta, mientras que aquellos en los que se tuvo que suspender el mantenimiento de forma prematura a causa de toxicidad fueron considerados como fracaso al tratamiento. La respuesta en esta segunda fase se evaluó a los tres meses de finalizar el mantenimiento según los criterios del NCI/WG.(390) Además, se analizó la EMR mediante citometría de flujo

simultáneamente en sangre periférica y médula ósea a los 3 meses de finalizar el tratamiento con R-FCM, y posteriormente cada 6 meses durante el mantenimiento, y a los 3 meses de la finalización del mismo. Finalmente, también se analizaron diferentes parámetros farmacocinéticos del rituximab como el aclaramiento, volumen de distribución y semivida.

El análisis final de los 81 pacientes reclutados en el estudio mostró un 47% de RC con EMR negativa, un 30% de RC con EMR positiva, un 13% de RP, y un 10% de fallos de tratamiento. Sesenta y siete de los 81 pacientes que entraron al estudio recibieron el tratamiento de mantenimiento con rituximab. La mediana de ciclos de mantenimiento administrados fue de 8 (rango, 2 - 8) y un 80% de los pacientes completó la totalidad del tratamiento previsto. El mantenimiento tuvo que suspenderse de forma prematura en diez pacientes por toxicidad relacionada con el tratamiento, en un paciente por el desarrollo de una segunda neoplasia, y en dos pacientes por progresión de la enfermedad. Al finalizar el mantenimiento, un 40.6% de los pacientes presentaban una RC con EMR negativa, un 40.6% una RC con EMR positiva, un 4.8% un RP, y un 14% se consideraron como fallo de tratamiento. Seis de los 29 pacientes (21%) que se hallaban en RC con EMR positiva o en RP tras R-FCM mejoraron su respuesta mediante el tratamiento de mantenimiento con rituximab. La mediana de tiempo de conversión de EMR negativa a EMR positiva fue de 43 meses. Con una mediana de seguimiento de 48.7 meses, la SLP y la SG estimada a los cuatro años fueron del 74.8% y 93.7%, respectivamente. El nivel de EMR obtenido tras el tratamiento con R-FCM fue la variable con mayor poder predictivo de la SLP de los pacientes. Tras el tratamiento inicial con R-FCM, el 76% de los pacientes presentaban una EMR negativa en sangre periférica (SP), y un 55% en médula ósea (MO). La SLP estimada a los 4 años en los pacientes con una EMR negativa en SP fue del 89.5%, significativamente superior a la de los pacientes con una EMR positiva, 27%. De la misma manera, los pacientes con una EMR negativa en MO presentaban también una

SLP a los cuatro años más prolongada que la de los enfermos con EMR positiva, 86% vs. 60%. El impacto de diferentes variables, incluyendo la respuesta clínica, el tiempo de duplicación linfocitaria [TDL], ZAP-70, b2-microglobulina y LDH séricas, alteraciones citogenéticas, y el estatus de la EMR, sobre la SLP se evaluó mediante un análisis multivariado. De ellas, sólo la EMR y el TDL mantuvieron su poder predictivo.

El tratamiento de mantenimiento tuvo que retrasarse a causa de toxicidad hematológica en 9 ciclos (2%), cuatro de ellos correspondieron al primer ciclo, y por toxicidad no hematológica en 4 ciclos (0.8%). No se realizó ninguna reducción de dosis durante el mantenimiento. Se observó algún grado de neutropenia en un 31.3% de los ciclos, aunque la neutropenia severa, grado 3 – 4, ocurrió únicamente en el 8.5% de los ciclos. Cabe destacar que el 55% de los episodios de neutropenia grado 3 – 4 se concentraron en los dos primeros ciclos de mantenimiento con rituximab. La trombocitopenia y la anemia fueron poco frecuentes durante el mantenimiento, sin observarse episodios graves. Dieciséis pacientes tuvieron un episodio infeccioso grado 3 – 4, y fallecieron dos pacientes, uno a causa de un síndrome hemofagocítico durante el tratamiento de mantenimiento, y el otro debido a una leucoencefalopatía multifocal a los tres meses de finalizar el mismo.

En conclusión, el tratamiento de mantenimiento con rituximab tras R-FCM consigue mejorar la calidad de las respuestas en un porcentaje de pacientes, y obtiene una SLP prolongada.

Regular Article

LYMPHOID NEOPLASIA

Rituximab maintenance after first-line therapy with rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) for chronic lymphocytic leukemia

Pau Abrisqueta,¹ Neus Villamor,² María José Terol,³ Eva González-Barca,⁴ Marcos González,⁵ Christelle Ferrà,⁶ Eugenia Abella,⁷ Julio Delgado,^{8,9} Jose A. García-Marco,¹⁰ Yolanda González,¹¹ Felix Carbonell,¹² Secundino Ferrer,¹³ Encarna Monzó,¹⁴ Isidro Jarque,¹⁵ Ana Muntañola,¹⁶ Mireia Constants,¹⁷ Lourdes Escoda,¹⁸ Xavier Calvo,² Sabela Bobillo,¹ José Bruno Montoro,¹⁹ Emili Montserrat,⁹ and Francesc Bosch¹

¹Department of Hematology, University Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma, Barcelona, Spain; ²Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ³Departments of Hematology of Hospital Clínic, Insituto para la Investigación, Hospital Clínic Universitario de Valencia, Valencia, Spain; ⁴Institut Català d'Oncologia, Institut de Investigació Biomèdica de Bellvitge, Barcelona, Spain; ⁵Hospital Clínic Universitario, Salamanca, Spain; ⁶Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁷Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁸Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁹Department of Hematology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; ¹⁰Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ¹¹Hospital Josep Trueta, Girona, Spain; ¹²Hospital General Universitario, Valencia, Spain; ¹³Hospital Dr Peset, Valencia, Spain; ¹⁴Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain; ¹⁵Hospital La Fe, Valencia, Spain; ¹⁶Hospital Mutua de Terrassa, Terrassa, Spain; ¹⁷Althaia, Xarxa Assistencial de Manresa, Manresa, Spain; ¹⁸Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain; and ¹⁹Department of Pharmacy, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Key Points

- Maintenance rituximab attained a prolonged PFS and improved the quality of response in patients with detectable disease after R-FCM.

The effectiveness of rituximab maintenance therapy in the treatment of chronic lymphocytic leukemia has been investigated in a phase 2 clinical trial that included an initial treatment with rituximab 500 mg/m² on day 1 (375 mg/m² the first cycle), fludarabine 25 mg/m² on days 1 to 3, cyclophosphamide 200 mg/m² on days 1 to 3, and mitoxantrone 6 mg/m² on day 1 (R-FCM), for 6 cycles, followed by a maintenance phase with rituximab 375 mg/m² every 3 months for 2 years. Sixty-seven patients having achieved complete response (CR) or partial response (PR) with R-FCM were given maintenance therapy. At the end of maintenance, 40.6% of patients were in CR with negative minimal residual disease (MRD), 40.6% were in CR MRD-positive, 4.8% remained in PR, and 14% were considered failures. Six of 29 patients (21%) who were in CR MRD-positive or in PR after R-FCM improved their response upon rituximab maintenance. The 4-year progression-free survival (PFS) and overall survival rates were 74.8% and 93.7%, respectively. MRD status after R-FCM induction was the strongest predictor of PFS. Maintenance with rituximab after R-FCM improved the quality of the response, particularly in patients MRD-positive after initial treatment, and obtained a prolonged PFS. This trial was registered at www.clinicaltrialsregister.eu as identifier #2005-001569-33. (*Blood*. 2013;122(24):3951-3959)

Introduction

Treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) with chemoimmunotherapy results in high response rates including many cases with no detectable minimal residual disease (MRD). However, all patients eventually relapse and because of this CLL remains an incurable disease.¹⁻⁶ The lack of sustained responses observed in CLL reflects the persistence of MRD after therapy. Therefore, treatment strategies aimed to eradicate relentless MRD after initial therapy might have a favorable impact on the outcome of patients with CLL.

Throughout the last decade, maintenance treatments mainly based on monoclonal antibodies have been explored in chronic B-cell malignancies, showing benefits in terms of prolongation of progression-free survival (PFS).⁷⁻⁹ In CLL, maintenance or consolidation therapies with different drugs, including interferon- α ,^{10,11} rituximab,¹²⁻¹⁸

alemtuzumab,¹⁹⁻²⁷ or more recently lenalidomide,²⁸ have been evaluated. As with other B-cell malignancies, the use of rituximab maintenance after induction treatment suggests a benefit in sustaining the response duration in patients with CLL.¹⁴

Based on data obtained from in vitro and in vivo studies,²⁹⁻³² we developed a combination chemotherapy including fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (FCM). The encouraging responses achieved with this combination in patients with CLL, both previously treated and untreated,^{29,33,34} prompted us to test its combination with rituximab. Therefore, in November 2005, the Spanish Cooperative Group on CLL (GELLC) launched a phase 2 clinical trial aimed at investigating the feasibility, response, and toxicity of a treatment strategy consisting of rituximab, fludarabine,

Submitted May 14, 2013; accepted September 19, 2013. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, October 11, 2013; DOI 10.1182/blood-2013-05-502773.

E. Montserrat and F.B. contributed equally to this study.

Presented in part at the 53rd annual meeting of the American Society of Hematology, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2013 by The American Society of Hematology

cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) as initial treatment followed by rituximab as maintenance therapy. The initial therapy with R-FCM resulted in an overall response (OR) rate of 93% and a complete response (CR) rate of 82% (46% MRD-negative CR).³⁵ The final results of the second part of the study, namely the maintenance phase with rituximab, are presented here.

Patients and methods

Study design and patients

This open-label prospective, multicenter, nonrandomized phase 2 clinical trial was reviewed and approved by ethical committees in agreement to the Declaration of Helsinki of all centers participating in the study. All patients provided informed written consent.

The trial consisted of 2 parts: an initial treatment with R-FCM followed by maintenance with rituximab. For the initial treatment phase, patients were given R-FCM (rituximab 500 mg/m² on day 1 [375 mg/m² the first cycle], fludarabine 25 mg/m² IV on days 1 to 3, cyclophosphamide 200 mg/m² on days 1 to 3, and mitoxantrone 6 mg/m² IV on day 1, given at 4-week intervals) up to a maximum of 6 cycles, as previously published.³⁵ Patients of 70 years or younger presenting active disease according to the National Cancer Institute–sponsored Working Group (NCI-WG) criteria³⁶ and with an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 0 to 2 were eligible for the study. Patients with prior history of autoimmune phenomena or a positive Coombs' test, impaired renal or hepatic function, creatinine clearance inferior of 50 mL per minute, a past history of B or C hepatitis, severe concomitant diseases, or pregnancy were excluded from the study.

The response to initial therapy was assessed 3 months after concluding R-FCM treatment. Patients who obtained a CR or a partial response (PR) were eligible for the maintenance phase of the study. Any severe induction-related event that could impair participation in the maintenance phase precluded eligibility. The main end point of the trial was OR.³⁵ Secondary end points include PFS after maintenance, MRD levels, toxicity treatment, and pharmacokinetic analysis.

Inclusion criteria in this second part of the R-FCM trial were an ECOG performance status of 0 to 2, a neutrophil count superior to 1500/μL, a platelet count superior to 75 000/μL, and CR or PR response to prior R-FCM upfront therapy. Commencing 3 months after the last R-FCM course, patients were scheduled to receive rituximab 375 mg/m² IV on day 1 and thereafter every 3 months for up to 8 courses (2 years) depending on response and toxicity.

Assessments and response criteria

Patients receiving >4 cycles of maintenance were considered for response evaluation. However, patients in whom rituximab maintenance was prematurely interrupted (≤4 cycles) due to toxicity were considered failures. The response to the maintenance phase was assessed 3 months after the end of treatment using NCI-WG criteria³⁶ and included clinical history, physical examination, white blood cell count (WBC) with differential count, liver and renal function tests, serum lactate dehydrogenase (LDH), and β₂-microglobulin and immunoglobulin levels. Bone marrow infiltration was assessed by needle aspiration and biopsy. Patients in CR with no detectable MRD were categorized as MRD-negative CR. Bone marrow biopsy was not required in cases that did not attain clinical CR. Imaging studies were not used to evaluate response to therapy. Patients were assessed by clinical examination every 12 weeks during the 2-year maintenance phase of the study.

Prospective MRD monitoring was a predefined secondary objective of the study. MRD was centrally evaluated using multiparametric flow cytometry assays in paired peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples 3 months after R-FCM induction therapy, every 6 months during rituximab maintenance, and at the final restaging 3 months after the conclusion of treatment. At completion of the maintenance treatment, MRD was assessed in PB every 3 months during the first year, every 4 months during the second and third year, and every 6 months thereafter and in BM every 6 months during the

first year, every 8 months during the second and third year, and every 12 months thereafter. MRD evaluation was performed only in CR MRD-negative patients until MRD became detectable. Whole PB or BM samples were incubated with quadruple combinations of antibodies in a 5-tube combination assay with a sensitivity of 10⁻⁴ and analyzed following the method described by Rawstron et al.³⁷ MRD levels are reported as a fraction of CLL cells of all nucleated cells.

Pharmacokinetic analysis

Blood sampling time was scheduled as follows: immediately before the rituximab infusion, and after 4, 12, 24, 48, and 72 hours, and at 7, 14, 28, and 48 days. Rituximab levels were measured with a validated enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a quantification limit >0.5 μg/mL. The pharmacokinetic parameters for rituximab were determined performing a 2-compartment open-model analysis with first-order distribution rates between compartments by using the pharmacokinetic software WinNonlin (Version 1.1; Scientific Consulting Inc.). The following pharmacokinetic parameters were considered: total body clearance (Cl), volume of the central compartment (V_c), volume of distribution at steady state (V_{ss}), elimination rate constant (T_{1/2}), elimination rate constant for the α-phase (T_{1/2α}), elimination rate constant for the β-phase (T_{1/2β}), area under the concentration-time curve (AUC), maximum serum concentration (C_{max}), minimum serum concentration (C_{min}; through serum levels), and mean residence time (MRT).

End points and statistical considerations

The main end point of the trial was OR.³⁵ Secondary end points were PFS after maintenance, MRD levels, and treatment toxicity. PFS was defined by the time from entry into the trial until CLL progression or death from any cause and was calculated in an intention-to-treat basis. Time-to-next treatment (TNT) was defined by time from the end of initial treatment until the initiation of the next therapy. Quantitative MRD results were categorized in the following groups: low (<10⁻⁴), intermediate (≥10⁻⁴ to <10⁻²), and high (≥10⁻²). Low-level MRD was considered as MRD-negative, whereas intermediate- and high-level groups were considered as MRD-positive. The Fisher exact test or the χ² tests were used to analyze the association between patient characteristics and response and to compare the frequency of adverse events. Actuarial survival curves were estimated by the method of Kaplan and Meier and compared by the log-rank test. Cox regression analysis was performed to analyze the adjusted prognostic value of MRD in a model that also included well-established prognostic factors. All statistical tests were 2-sided and the significance level was 0.05.

Results

Patients' characteristics and response to therapy

Results of the response obtained with the R-FCM initial treatment in 72 patients were previously published.³⁵ The final results obtained in 81 patients were as follows: CR MRD-negative, 47% (95% CI, 36%-58%); CR MRD-positive, 30% (95% CI, 20%-40%); PR, 13% (95% CI, 6%-20%); and 10% (95% CI, 3%-16%) failed treatment.

Between July 2006 and November 2008, 67 patients who received upfront treatment with R-FCM were given rituximab maintenance. Two patients were not considered for response evaluation due to the diagnosis of lung cancer after 1 and 2 cycles of rituximab maintenance; an additional patient declined treatment after 2 courses of rituximab (Figure 1). Overall, 64 patients (median age, 60 years; range, 35-70 years) were evaluated for response. The main characteristics of the patients are shown in Table 1. Median number of cycles of maintenance administered was 8 (range, 2-8) and 80% of patients completed the entire planned treatment. In 10 patients, maintenance was

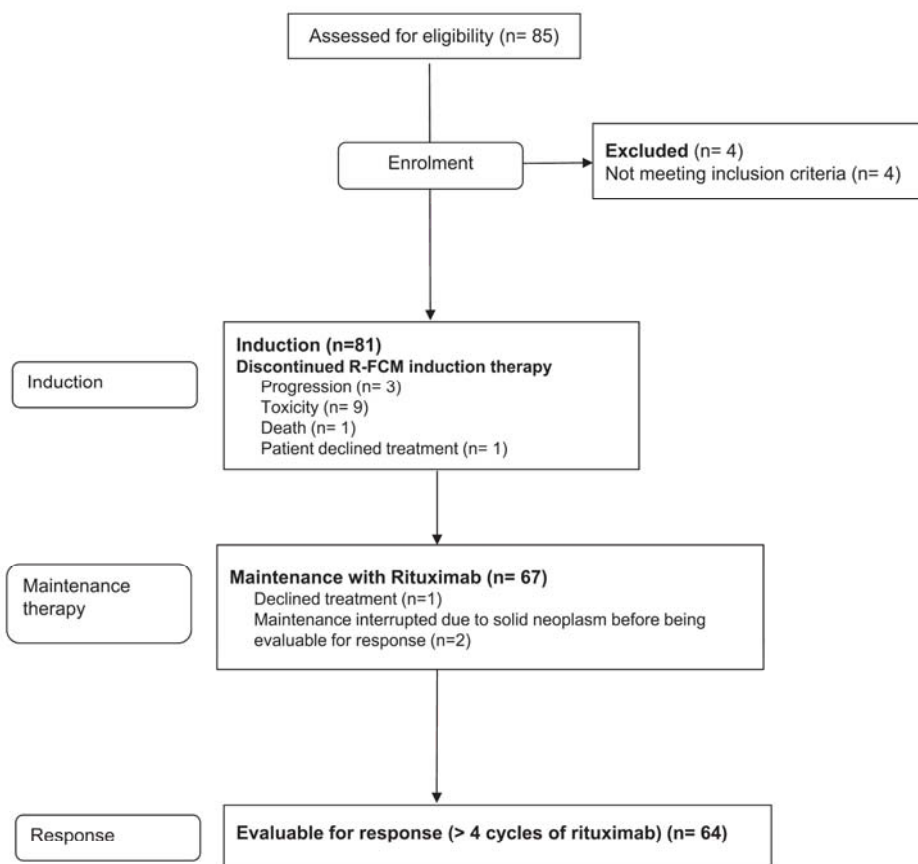


Figure 1. Consort diagram.

discontinued prematurely due to toxicity; in 1 patient, due to development of second malignancies; and in 2 patients, due to disease progression.

After rituximab maintenance, 40.6% ($n = 26$ [95% CI, 29%-53%]) of patients were in MRD-negative CR, 40.6% ($n = 26$ [95% CI, 29%-53%]) in MRD-positive CR, 4.8% ($n = 3$ [95% CI, 2%-7%]) remained stable in PR, and 14% ($n = 9$ [95% CI, 6%-22%]) failed treatment. Failures were due to disease progression (4 patients), severe neutropenia (3 patients), infections (1 patient), and death (1 patient).

Disease status was analyzed before and after rituximab maintenance (Table 2). Among 35 patients in MRD-negative CR after R-FCM, 22 patients (63%) maintained the MRD-negative status at the end of maintenance treatment, 9 patients (25.7%) switched from MRD-negative to MRD-positive, and 4 patients failed treatment, 1 due to disease progression, and 3 due to toxicity.

Median time of conversion from negative to positive MRD was 43 months.

No correlation was observed between different biological or clinical variables, such as age (<60 years vs >60 years), lymphocyte doubling time (LDT; cutoff 12 months), increased ZAP-70, increased serum β_2 -microglobulin and LDH, cytogenetic abnormalities, or Binet stage, and the achievement of a negative MRD status. However, when values of mean CD20 fluorescence intensity (MFI) obtained before the entry into the study were compared with the response achieved, patients with MRD-negative CR after rituximab maintenance had significantly higher CD20 MFI in comparison with patients with other responses (204 ± 255 vs 99 ± 78 , respectively; $P = .025$). These data suggest that CD20 expression measured by MFI could be a predictor of response to the maintenance with rituximab.

Six of 29 patients (21%) with detectable disease (CR MRD-positive or PR) improved their response category upon rituximab maintenance: 2 patients with MRD-positive CR became MRD-negative, whereas 4 patients in PR obtained a CR after maintenance, 2 of them MRD-negative (Table 2).

Table 1. Main characteristics of the patients evaluable for response (n = 64) at the entry of the trial

Variables	Distribution, n (%)
Age, y	
<60	32 (50)
60-70	32 (50)
Gender	
Female	19 (30)
Male	45 (70)
Binet stage	
A	9 (14)
B	39 (61)
C	16 (25)
Rai Stage	
0	3 (5)
I-II	43 (67)
III-IV	18 (28)
Lymphocyte count	
<100 000/ μ L	45 (70)
\geq 100 000/ μ L	19 (30)
LDT, n = 55	
>12 mo	29 (53)
\leq 12 mo	26 (47)
Serum LDH, n = 61	
Normal	45 (74)
Increased	16 (26)
β_2-microglobulin, n = 60	
Normal	20 (33)
Increased	40 (67)
Genetic abnormalities, n = 51	
del(13q)	12 (23)
+12	6 (12)
del(11q)	7 (14)
del(17p)	2 (4)
ZAP-70 expression, n = 59	
<20%	24 (41)
\geq 20%	35 (59)
Response to R-FCM induction	
CR MRD ⁻	35 (55)
CR MRD ⁺	21 (33)
PR	8 (12)

Median follow-up of the whole series (n = 81) was 48.5 months. The 4-year PFS and overall survival (OS) rates were 69.1% (95% CI, 59.3%-78.9%) and 90.5% (95% CI, 78.9%-97.2%), respectively. Median PFS was estimated to be 59.8 months and median OS was not reached (Figure 2). As per those patients who received rituximab maintenance (n = 67), the median follow-up was 48.7 months. The 4-year PFS and OS rates were 74.8% (95% CI, 63.8%-85.8%) and 93.7% (95% CI, 87.6%-99.7%), respectively. Median PFS and OS were not reached (Figure 2).

MRD status after R-FCM induction was the strongest predictor of PFS

After initial therapy with R-FCM, MRD was considered to be negative in 76% of patients (45 of 59 patients) in PB and in 55% of patients (35 of 63 patients) in BM. The 4-year PFS rate of patients with negative MRD analyzed in PB was 89.5% (95% CI, 79%-98%), whereas it was 27% (95% CI, 3%-50%) ($P < .01$) in patients who had positive MRD in PB. Likewise, patients with MRD-negative in BM had longer PFS in comparison with those with MRD-positive in BM (at 4 years, 86% [95% CI, 73%-99%] vs 60% [95% CI, 42%-78%]; $P = .027$).

PB and BM paired samples obtained after R-FCM inductions were compared for MRD levels: 12 of 57 patients (21%) with MRD-negative in PB had MRD-positive in BM, whereas all patients with negative MRD in BM also had negative MRD in PB. Patients with MRD-negative in PB but positive in BM (n = 12) presented a similar PFS than those with negative MRD in BM (4-year PFS, 86% [95% CI, 73%-98%] vs 90% [95% CI, 73%-100%], $P = .85$). Finally, 3 patients who achieved MRD-negative in PB but remained MRD-positive in BM after the initial R-FCM treatment became MRD-negative in BM upon rituximab maintenance.

The impact of different variables, including MRD levels achieved after R-FCM on PFS, was tested in a multivariate analysis. MRD status proved to be a superior predictor for PFS than clinical response (Figure 2). In addition, when different prognostic variables (LDT [cutoff 12 months], ZAP-70, serum β_2 -microglobulin and LDH, cytogenetic abnormalities, and MRD levels categorized as positive or negative in PB and BM) were analyzed as predictors for PFS, only MRD status in PB along with LDT remained significantly predictive.

According to the criteria used in other trials,³⁸ MRD levels were classified into the following categories: low, $<10^{-4}$; intermediate, $\geq 10^{-4}$ to $<10^{-2}$; and high, $\geq 10^{-2}$. When the source of MRD was BM, no significant differences in PFS were observed between patients with negative (n = 35) and intermediate (n = 20) subgroups (at 4 years, 86% [95% CI, 73%-98%] vs 74% [95% CI, 54%-93%], $P = .3$), whereas patients with high levels of MRD (n = 8) showed an inferior PFS (at 4 years, 25% [95% CI, 0%-55%], $P < .01$). In contrast, when considering MRD in PB there was no difference in PFS between the intermediate- and high-level MRD groups (at 4 years, 28% [95% CI, 0%-57%] vs 25% [95% CI, 0%-67%], $P = .75$) (Figure 2).

Toxicity of the maintenance with rituximab

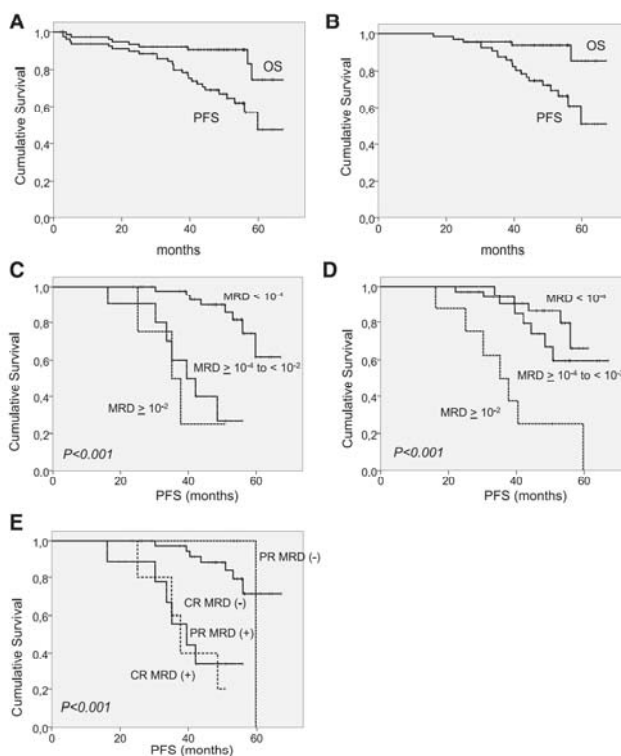
Treatment was delayed due to hematologic toxicity in 9 cycles (2%), 4 of them corresponding to the first cycle, and due to nonhematologic toxicity in 4 cycles (0.8%). No reductions in dose of rituximab were performed. Neutropenia was observed in 31.3% of cycles, although grade 3 to 4 neutropenia was detected only in 8.5% of the cycles (Table 3). Of note, 55% of grade 3 to 4 neutropenia episodes were concentrated in the first 2 cycles of rituximab maintenance (Figure 3). Thrombocytopenia or anemia were infrequent and no grade 3 to 4 toxicities were observed during maintenance with rituximab (Table 3).

Sixteen patients experienced grade 3 to 4 infectious episodes, including 9 pneumonia, 2 febrile neutropenia, 1 appendicitis, 1 myositis, 1 cutaneous infection, 1 herpes zoster, 1 sepsis, 3 upper respiratory tract infections, 1 cerebral abscess, and 1 fever of unknown origin. Varicella zoster reactivation occurred in 4 patients. Two patients died, 1 due to hemophagocytic syndrome during maintenance and the other due to multifocal leukoencephalopathy 3 months after the end of maintenance therapy. Severe infections (grade 3-4) particularly occurred at the initiation of maintenance treatment, with almost half of all episodes being observed in the first 2 courses of treatment. In

Table 2. Response rate according to the induction or maintenance treatment phase

	Response to rituximab maintenance			
	CR MRD ⁻	CR MRD ⁺	PR	Failure
Response to R-FCM, N = 64				
CR MRD ⁻ , n = 35	22	9	0	4
CR MRD ⁺ , n = 21	2	15	0	4
PR, n = 8	2	2	3	1

Figure 2. OS and PFS in the R-FCM trial. (A) OS and PFS in the whole series. (B) OS and PFS in patients entering the rituximab maintenance-study phase. (C) PFS in patients grouped by MRD levels assessed in PB after induction evaluation. (D) PFS according to MRD levels in BM after induction evaluation. (E) PFS combining the degree of response and the MRD status in PB.



addition, a second peak of incidence was observed at the end of maintenance treatment (Figure 3). Infections correlated with the development of severe neutropenia. Thus, grade 3 to 4 infectious episodes appeared in 19.5% of cycles in which grade 3 to 4 neutropenia was observed but in only 3% of cycles with neutropenia inferior to grade 3 ($P < .001$). Neutropenia of all grades was more frequent in patients with 60 to 70 years ($n = 34$) than in patients younger than 60 years ($n = 33$) (39.6% vs 28.6% of cycles, $P = .012$), although no differences were observed in the number of severe (grade 3-4) infectious events (5.6% vs 3.6% of cycles, $P = NS$) or grade 3 to 4 neutropenic episodes (10% vs 7.7% of cycles, $P = NS$) between both age groups. Finally, low-serum immunoglobulin levels of immunoglobulin G (IgG) (<6.5 mg/dL), IgA (<0.7 mg/dL), and IgM (<0.4 mg/dL) were detected in the 58.8%, 49%, and 88.2% of the patients, respectively, at the end of maintenance therapy. Three patients presented levels of IgG lower than 3 mg/dL. At the end of the maintenance therapy, serum immunoglobulin levels were lower than before treatment initiation (supplemental Table 1, available on the *Blood* Web site). No relationship was observed between infectious events and the presence of low levels of immunoglobulins. T-lymphocyte counts were assessed in PB along with the analysis of MRD. No relationship between low $CD4^+$ T lymphocyte counts ($<200/\mu\text{L}$) and severe infectious events was observed.

Six nonhematologic neoplasms were observed during the maintenance phase: 3 lung adenocarcinomas, 1 epidermoid carcinoma, 1

low-grade urothelial carcinoma, and 1 intestinal adenocarcinoma. No therapy-related myeloid neoplasms were detected.

Time-to-MRD conversion and TNT is prolonged in R-FCM plus rituximab maintenance as compared with FCM

Time-to-MRD conversion and TNT obtained in this trial was compared with that observed in a previous trial from our group using FCM.³⁴ Inclusion criteria were similar between both studies, although the FCM study included patients younger than 65 years, whereas in the R-FCM trial, the upper age limit was 70 years. Patients' characteristics were not significantly different between the 2 groups, except for a higher percentage of cases with trisomy 12 in the FCM cohort.³⁵ In both studies, MRD was analyzed by FC using a combination of monoclonal antibodies with the same sensitivity. Median time to conversion from MRD-negative to MRD-positive was significantly longer in the R-FCM plus rituximab trial than in the FCM trial, (43 months vs 16.4 months, respectively; $P = .011$) (Figure 4).

In addition, compared with the FCM series, TNT in patients attaining a MRD-positive CR (median time of 40.4 months vs non-reached, $P = .026$) or PR (median time of 6.5 months vs 51 months, $P < .001$) was significantly prolonged with R-FCM plus maintenance with rituximab. Finally, TNT was not significantly different between R-FCM and FCM in patients obtaining an MRD-negative CR (Figure 4).

Table 3. Hematologic and extrahematologic toxicity related to rituximab maintenance

Toxicity	Total, %	Grade 1-2, %	Grade 3-4, %
Hematologic			
Neutropenia	31.3	22.8	8.5
Thrombocytopenia	4.6	4.4	0.2
Anemia	1.2	1.2	0
Nonhematologic			
Fatigue	0.8	0.8	0
Gastrointestinal toxicity	2	2	0
Hepatic toxicity	2.2	2	0.2
Encephalopathy	0.2	0	0.2
Infections	13	8.4	4.6
Infectious episodes G 3-4			
Pneumonia, n = 9			
Febrile neutropenia, n = 2			
Cutaneous infection, n = 1			
Sepsis (<i>Staphylococcus</i> spp), n = 1			
Cerebral abscess, n = 1			
Herpes zoster reactivation, n = 1			
Myositis, n = 1			
Appendicitis, n = 1			
Upper respiratory tract, n = 3			
Progressive multifocal leukoencephalopathy, n = 1			
Fever of unknown origin, n = 1			
Neoplasm			
Lung adenocarcinoma, n = 3			
Epidermoid carcinoma, n = 1			
Low-grade urothelial carcinoma noninvasive, n = 1			
Intestinal adenocarcinoma, n = 1			

Toxicity was based on the NCI-WG and World Health Organization classification and expressed as a percentage of the cycles administered.

To gain insight into the impact of rituximab maintenance on MRD and clinical outcome, kinetics of MRD under rituximab were analyzed. During rituximab maintenance treatment, 72% and 47% of MRD-positive patients show stable or decreased MRD values, even below the limit of detection, in BM and PB, respectively. By contrast, in patients treated with the FCM protocol, once MRD-positive, a steady increase in MRD levels was always observed. Interestingly, once rituximab maintenance was completed in the R-FCM trial, the kinetics of MRD showed a steady increase, mostly resembling the kinetics observed in patients from FCM protocol. In Figure 4E-F, the MRD kinetics of representative patients are depicted.

Rituximab pharmacokinetics

Six patients on maintenance therapy were selected for pharmacokinetic analysis. Five patients obtained a CR and 1 a PR with R-FCM induction. The rituximab levels of all patients on maintenance therapy remained detectable because the levels of all patients on 3-monthly schedule maintenance therapy remained with a mean concentration of 6.2 $\mu\text{g/mL}$ (range, 1.0-11.1 $\mu\text{g/mL}$). The terminal elimination half-life ($T_{1/2\beta}$) of rituximab in all patients was estimated to be 24.6 days (range, 3.4-50.5 days), with an intersubject variability of 64.2%. The mean AUC value was 2675.9 $\mu\text{g} \times \text{day/L}/1.73 \text{ m}^2$ (1184.4-3577.4 $\mu\text{g} \times \text{day/L}/1.73 \text{ m}^2$) for a normalized dose of rituximab of 375 mg/m^2 , with an intersubject variability of 35.4%. V_{ss} and Cl were 6981.0 $\text{L}/1.73 \text{ m}^2$ (2960.5-10360.0 $\text{L}/1.73 \text{ m}^2$) and 285.6 $\text{mL/day}/1.73 \text{ m}^2$ (180.0-603.8 $\text{mL/day}/1.73 \text{ m}^2$), respectively. The pharmacokinetic

values obtained for each patient are detailed in supplemental Table 2. Of note, the patient in PR had low levels of rituximab in serum in comparison with the 5 patients in CR, which would suggest a possible pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship.

Discussion

This study shows that 2 years of rituximab maintenance therapy in patients responsive to first-line combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone results in a prolonged duration of response with a 4-year PFS and OS of 69.1% and 90.5% for the whole series, and 74.8% and 93.7% for patients entering the rituximab maintenance-study phase. These results compare favorably with those observed in the chemoimmunotherapy treatment arm of the German CLL Study Group CLL8 trial (3-year PFS and OS of 65% and 87%),² whereas they need longer follow-up to be compared with the MD Anderson Cancer Center FCR series.¹ The role of rituximab maintenance has been explored with or without prior chemoimmunotherapy.¹²⁻¹⁸ In line with our results, Del Poeta et al reported that patients receiving consolidation and maintenance with rituximab ($n = 28$) showed a longer PFS in comparison with a control group ($n = 18$) not receiving rituximab consolidation (87% vs 32% at 5 years, $P = .001$).¹⁴ Moreover, our results are comparable with those obtained after upfront treatment with FCR-Lite followed by rituximab maintenance administered at higher doses (5-year PFS and OS, 66.9% and 85.5%, respectively).¹⁷ Finally, the role of maintenance in CLL is currently explored using other drugs. Thus, the results of consolidation treatment with lenalidomide after upfront therapy with the pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab (PCR) combination have been recently reported, showing again a benefit of the maintenance in the treatment of patients with CLL.²⁸

The observation that the interval for conversion from MRD-negative to MRD-positive, and that the TNT was longer in this trial

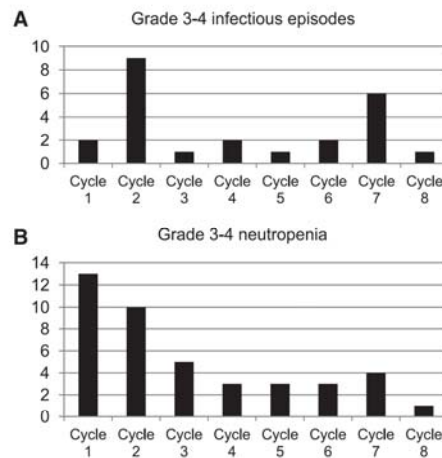
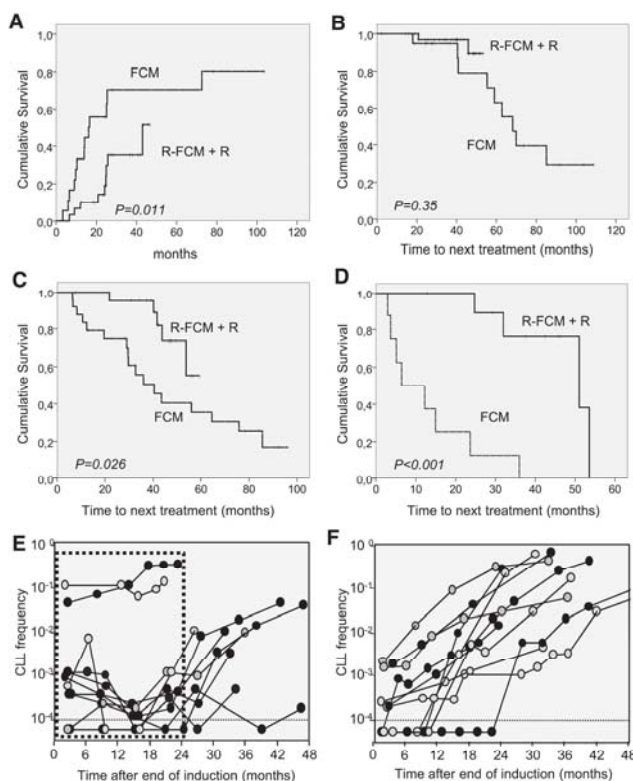


Figure 3. Infectious episodes observed in the R-FCM trial during the maintenance phase. (A) Percentage of grade 3 to 4 infectious episodes. (B) Grade 3 to 4 neutropenia episodes by cycle of treatment.

Figure 4. Comparison of the R-FCM with the previous FCM trial.³⁴ (A) Probability of conversion from MRD-negative to MRD-positive in the R-FCM + R and FCM cohorts. (B) TNT in patients who achieved a CR MRD-negative after initial treatment with R-FCM or FCM. (C) TNT in patients who achieved a CR MRD-positive after R-FCM or FCM. (D) TNT in patients who achieved a PR after R-FCM or FCM. (E) MRD kinetics of 11 representative patients of the R-FCM + R cohort. Dotted line box represents period under rituximab maintenance. (F) MRD kinetics of 11 representative patients of the FCM cohort.



compared with FCM, could be attributable to the effect of rituximab through the control of MRD levels during maintenance. However, this is a retrospective comparison, despite that data from the German CLL Study Group CLL8 trial showing that patients who attained MRD-negative with chemotherapy combinations had a comparable clinical benefit to patients who achieved MRD-negative with chemotherapeutic combinations.^{2,38} To better comprehend the impact of rituximab maintenance on MRD and clinical outcome, the kinetics of MRD under maintenance were analyzed. Rituximab maintenance was able to control MRD levels (negativized, reduced, or maintained levels of residual disease stable) in a proportion of patients. This phenomenon has been reported after allogeneic stem cell transplantation,³⁹ but is not observed after chemotherapy with FCM or autologous stem cell transplantation.⁴⁰ Once maintenance was finished, levels of MRD steadily increased, mostly resembling the kinetics observed in patients from the FCM protocol.

Finally, variables predicting response duration in other trials, as elevated serum LDH and β_2 microglobulin, and high expression of ZAP-70,^{1,34} did not show adverse impact in the R-FCM plus rituximab maintenance study. In this trial, only MRD levels and LDT predicted PFS duration, parameters that define the quality of response and the kinetics of the disease.

In this study, maintenance therapy was feasible but the hematologic and infectious toxicity were not negligible. Previous studies

administering rituximab as maintenance treatment in CLL reported inferior hematologic toxicity and a lower number of infectious events than those observed in our study.¹³⁻¹⁵ This discrepancy may be attributed to differences in intensity of initial treatment regimens used in these trials.¹³⁻¹⁵ In our study, it is difficult to discriminate which part of the observed toxicity was due to the rituximab maintenance itself or to the initial treatment with R-FCM. In this regard, long-term follow-up of FCR series^{1,41} disclosed that a substantial number of patients had persistent cytopenia after FCR treatment and a risk of 10% of serious infection was observed during the first year of remission.^{1,32} In our study, the fact that approximately half of severe neutropenia and infectious episodes were concentrated in the first 2 cycles of maintenance treatment suggests that induction therapy influences the risk of early infections during maintenance. For this reason, treatment strategies including maintenance therapy should take into account prior therapy and toxicity.

In conclusion, R-FCM followed by rituximab maintenance attained a prolonged PFS and improved the quality of response, particularly in patients with detectable disease after upfront R-FCM. Thus, this study supports the concept of the maintenance strategies, either with monoclonal antibodies or other novel therapies, in a disease where all patients eventually relapse. Further prospective, randomized clinical trials are needed to assess the precise role of maintenance strategies in prolonging response and survival in CLL.

Acknowledgments

This work was performed, in part, thanks to grants from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (08/0211 and P111/00792).

Authorship

Contribution: F.B. and E. Montserrat conceived and designed the study; P.A. provided administrative support; F.B., N.V., M.J.T., E.G.-B., C.F., M.G., E.A., J.D., F.C., J.A.G.-M., L.E., S.F., E. Monzó, Y.G., I.J., and E. Montserrat provided study materials or

patients; P.A., F.B., N.V., S.B., X.C., and A.M. collected and assembled data; F.B. and P.A. analyzed and interpreted data; J.B.M. performed pharmacokinetic analysis; F.B., P.A., N.V., J.B.M., and E. Montserrat wrote the manuscript; and P.A., N.V., M.J.T., E.G.-B., M.G., C.F., E.A., J.D., J.A.G.-M., Y.G., F.C., S.F., E. Monzó, I.J., A.M., M.C., L.E., X.C., S.B., J.B.M., E. Montserrat, and F.B. gave final approval of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: F.B. was a consultant for and received honoraria from Hoffman-La Roche and was a member of an entity's board of directors or advisory committees, J.D. received lecturing fees from Roche. The remaining authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Francesc Bosch, Department of Hematology, University Hospital Vall d'Hebron, Psg Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain; e-mail: fbosch@vhebron.net.

References

- Tam CS, O'Brien S, Wierda W, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(4):975-980.
- Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al; International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-1174.
- 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(10):1756-1765.
- Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, et al. Chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab produces extended overall survival and progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of CALGB study 9712. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1349-1355.
- 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(18):4079-4088.
- Byrd JC, Rai K, Peterson BL, et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood*. 2005;105(1):49-53.
- Salles G, Seymour JF, Offner F, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9759):42-51.
- Hochster H, Weller E, Gascoyne RD, et al. Maintenance rituximab after cyclophosphamide, vincristine, and prednisone prolongs progression-free survival in advanced indolent lymphoma: results of the randomized phase III ECOG1496 Study. *J Clin Oncol*. 2009;27(10):1607-1614.
- Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, et al; German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood*. 2006;108(13):4003-4008.
- O'Brien S, Kantarjian H, Beran M, et al. Interferon maintenance therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia in remission after fludarabine therapy. *Blood*. 1995;86(4):1298-1300.
- Zinzani PL, Bendandi M, Magagnoli M, et al. Results of a fludarabine induction and alpha-interferon maintenance protocol in pretreated patients with chronic lymphocytic leukemia and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*. 1997;59(2):82-88.
- Lamanna N, Jurcic JG, Noy A, et al. Sequential therapy with fludarabine, high-dose cyclophosphamide, and rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia produces high-quality responses: molecular remissions predict for durable complete responses. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):491-497.
- Hainsworth JD, Litchy S, Barton JH, et al; Minnie Pearl Cancer Research Network. Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol*. 2003;21(9):1746-1751.
- Del Poeta G, Del Principe MI, Buccisano F, et al. Consolidation and maintenance immunotherapy with rituximab improve clinical outcome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2008;112(1):119-128.
- Srock S, Schriever F, Neubauer A, Herold M, Huhn D. Long-term treatment with rituximab is feasible in selected patients with B-CLL: response-adjusted low-dose maintenance treatment with rituximab in patients with relapsed B-CLL, who achieved a partial or minimal response to prior rituximab therapy. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(5):905-911.
- Scaramucci L, Niscola P, Buffolino S, Bongarzone V, Cimino G, Montanaro M. Repeated rituximab maintenance courses in fludarabine-failed young patients with chronic lymphocytic leukaemia responding to FAND chemotherapy. *Hematol J*. 2004;5(2):186-187.
- Foon KA, Mehta D, Lentzsch S, et al. Long-term results of chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine, cyclophosphamide and high-dose rituximab as initial treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(13):3184-3185.
- Foon KA, Boyladsiz M, Land SR, et al. Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high-dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):498-503.
- Montillo M, Tedeschi A, Miquelisz S, et al. Alemtuzumab as consolidation after a response to fludarabine is effective in purging residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24(15):2337-2342.
- Wendtner CM, Ritgen M, Schweighofer CD, et al; German CLL Study Group (GCLLSG). Consolidation with alemtuzumab in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission—experience on safety and efficacy within a randomized multicenter phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Leukemia*. 2004;18(6):1093-1101.
- Thieblemont C, Bouafia F, Hornez E, et al. Maintenance therapy with a monthly injection of alemtuzumab prolongs response duration in patients with refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (B-CLL/SLL). *Leuk Lymphoma*. 2004;45(4):711-714.
- Lin TS, Donohue KA, Byrd JC, et al. Consolidation therapy with subcutaneous alemtuzumab after fludarabine and rituximab induction therapy for previously untreated chronic lymphocytic leukemia: final analysis of CALGB 10101. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4500-4506.
- Wierda WG, Kipps TJ, Keating MJ, et al; CLL Research Consortium. Self-administered, subcutaneous alemtuzumab to treat residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2011;117(1):116-124.
- O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, et al. Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2003;98(12):2657-2663.
- Schweighofer CD, Ritgen M, Eichhorst BF, et al. Consolidation with alemtuzumab improves progression-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in first remission: long-term follow-up of a randomized phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Br J Haematol*. 2009;144(1):95-98.
- Hainsworth JD, Vazquez ER, Spigel DR, et al. Combination therapy with fludarabine and rituximab followed by alemtuzumab in the first-line treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase 2 trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *Cancer*. 2008;112(6):1288-1295.
- Kaufman MS, Caramanica A, Janson D, et al. Alemtuzumab maintenance may safely prolong chemotherapy-free intervals in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*. 2011;28(2):532-538.

28. Shanafelt TD, Ramsay AG, Zent CS, et al. Long-term repair of T-cell synapse activity in a phase II trial of chemioimmunotherapy followed by lenalidomide consolidation in previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2013; 121(20):4137-4141.
29. Hendry L, Bowen A, Matutes E, Swansbury J, Catovsky D. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia and low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45(5):945-950.
30. Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E, Gil J. In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(8): 2636-2643.
31. Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Gil J. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 1998;100(1): 142-146.
32. Robak T, Blonski JZ, Gora-Tybor J, et al; Polish Leukemia Group (PALG CLL2). Cladribine alone and in combination with cyclophosphamide or cyclophosphamide plus mitoxantrone in the treatment of progressive chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, multicenter, randomized trial of the Polish Adult Leukemia Group (PALG CLL2). *Blood*. 2006;108(2): 473-479.
33. Bosch F, Ferrer A, López-Guillermo A, et al; GELCAB (Grup per l'Estudi dels Limfomes a Catalunya i Balears). Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002; 119(4):976-984.
34. Bosch F, Ferrer A, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1):155-161.
35. Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, et al. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemioimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009;27(27): 4578-4584.
36. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87(12):4990-4997.
37. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007;21(5): 956-964.
38. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):980-988.
39. Ritgen M, Böttcher S, Stilgenbauer S, et al; German CLL Study Group. Quantitative MRD monitoring identifies distinct GVL response patterns after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: results from the GCLLSG CLL3X trial. *Leukemia*. 2008;22(7): 1377-1386.
40. Esteve J, Villamor N, Colomer D, et al. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: different outcome after autologous and allogeneic transplantation and correlation with minimal residual disease status. *Leukemia*. 2001;15(3): 445-451.
41. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, et al. Extended follow up of the CLL8 protocol, a randomized phase-III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG) comparing fludarabine and cyclophosphamide (FC) to FC plus rituximab (FCR) for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL): results on survival, progression-free survival, delayed neutropenias and secondary malignancies confirm superiority of the FCR regimen. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2012;120(21): Abstract 435.

IV. DISCUSIÓN

Tratamiento de primera línea con rituximab en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone y mantenimiento con rituximab en pacientes con leucemia linfática crónica.

- La combinación de inmunoterapia de rituximab con fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone obtiene una alta tasa de respuestas en pacientes con LLC previamente no tratados, incluyendo un alto número de respuestas completas con enfermedad residual negativa.

En el primer trabajo se presentan los resultados del tratamiento en primera línea de pacientes jóvenes con LLC con la combinación de R-FCM. Los resultados del estudio muestran que esta combinación de inmunoterapia es altamente activa en pacientes con LLC previamente no tratados, con una toxicidad manejable. Es importante destacar tanto la alta tasa de respuestas conseguidas con esta combinación, con la que se obtuvo una tasa de RG del 93%, como también la calidad de las respuestas obtenidas, con una tasa de RC del 82%, de las cuales un 46% fueron RC con EMR negativa. A pesar de las limitaciones que conlleva la comparación de diferentes estudios entre ellos, debe resaltarse que la tasa de RC obtenida fue claramente superior a la reportada con fludarabina en combinación con ciclofosfamida (FC) tanto por el grupo inglés (United Kingdom Leukemia Research Fund, LRF CLL4), como por el grupo alemán (German CLL Study Group), y el intergrupo de los Estados Unidos (US Intergroup Trial E2997), con tasas de RC del 39%, 24% y 23%, respectivamente, (81, 166, 277). En un ensayo fase II diseñado por el grupo de M. D. Anderson Cancer Center con la introducción ya de una combinación de

inmunoquimioterapia, rituximab junto con FC (FCR), se obtuvo una tasa de RG del 95% y RC del 72%.(259) Posteriormente, el grupo alemán reportó una tasa de RG del 90% y de RC del 44% en un ensayo fase III randomizado de FCR frente a FC, en el brazo de inmunoquimioterapia.(167) Otros ensayos que utilizaron la combinación de fármacos de FCR en diferentes dosis y esquemas de tratamiento obtuvieron tasas de RC entre un 61% hasta un 79% de los pacientes.(242, 391) Finalmente, la tasa de RC obtenida con otras combinaciones de inmunoquimioterapia, como rituximab junto con bendamustina o pentostatina y ciclofosfamida, fueron del 23,1% y del 41%, respectivamente.(303, 392) A pesar de que los datos de respuesta de nuestro estudio resultan favorables en relación a los de los diferentes estudios previamente citados, la comparación de estos ensayos es difícil debido a la heterogeneidad de los pacientes incluidos en los diferentes estudios. En este sentido en nuestro ensayo no se incluyó ningún paciente con edad mayor a 70 años y sólo el 20% de los pacientes tenía una edad por encima de los 65 años. En otros ensayos la proporción de pacientes con edad superior a los 70 años se encontraba entre un 15% a un 30%.(81, 259, 391)

La tasa de RC con EMR negativa alcanzada con R-FCM fue del 46%. Los niveles de EMR obtenidos tras el tratamiento están suscitando cada vez un mayor interés en la LLC. Varios estudios han correlacionado la negativización de la EMR con una mayor SLP e incluso con una mayor SG.(182, 239-246). Recientemente, el grupo alemán corroboró el valor predictivo de la cuantificación de la EMR en una serie amplia de enfermos dentro del estudio prospectivo CLL8.(244) Además, demostraron que el valor predictivo de la EMR obtenida tras el tratamiento es independiente de otros factores pronósticos, así como de la terapia previa empleada, FCR o FC.(244) Aunque todavía no esté claro si el estatus de la EMR está reflejando una enfermedad biológicamente menos agresiva y que deba perseguirse su negativización como un objetivo del tratamiento, sí debe tenerse en cuenta su impacto pronóstico en la

duración de la respuesta de los pacientes tratados con regímenes de inmunoterapia.

Finalmente, otro punto a tener en cuenta es la rapidez con la que se obtuvo la respuesta al tratamiento. El tratamiento con R-FCM consiguió una reducción tumoral muy importante en los primeros ciclos. De hecho, cuando se analizó la máxima respuesta clínica obtenida, sin tener en cuenta las citopenias relacionadas con el tratamiento, prácticamente no se observó ninguna mejoría a partir de los 3 ciclos de tratamiento. En futuros estudios deberá evaluarse si en determinados subgrupos de pacientes, por ejemplo aquellos con características de buen pronóstico y buena respuesta inicial, es posible la reducción del número de ciclos de tratamiento sin que esto repercuta negativamente en la duración de la respuesta.

El perfil de toxicidad de la combinación de R-FCM fue tolerable.

La toxicidad del tratamiento fue manejable y la mortalidad relacionada con el mismo fue baja. Los eventos adversos que se observaron de forma más frecuente fueron de tipo hematológico e infeccioso. El porcentaje de pacientes que presentaron una neutropenia grave fue inferior a la reportada con FCR,(167, 232) aunque cabe mencionar que en el presente estudio todos los pacientes recibieron profilaxis con factores estimulantes de las colonias granulocitarias.

En comparación con el ensayo clínico con fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone (FCM) en pacientes con LLC previamente no tratados, R-FCM obtiene una mayor tasa de respuestas completas.

En una comparación histórica con el ensayo previo del grupo con FCM,(243) R-FCM obtuvo una mayor tasa de RC, 82% vs. 64%, y una mayor proporción de RC con EMR negativa, 46% vs. 26%. Aunque se trate de una comparación retrospectiva, los dos ensayos presentaban pacientes de características similares y las principales variables biológicas y clínicas estaban balanceadas entre ambos estudios. Estos resultados sugieren que la adición de rituximab mejora la eficacia de FCM. Aunque ambas combinaciones obtuvieron una tasa de respuestas globales muy alta, 90% con FCM vs. 93% con R-FCM, el porcentaje de RC y sobre todo de RC con negativización de la EMR fueron superiores en el presente estudio.

Por otro lado, también hay que resaltar que la toxicidad hematológica e infecciosa fue mayor en los pacientes que recibieron R-FCM en comparación con FCM. De forma interesante, algunas variables que fueron predictoras de una menor probabilidad de conseguir una RC con FCM, como el patrón de infiltración difusa en la biopsia de médula ósea, la presencia de esplenomegalia o el aumento en los valores séricos de LDH, perdieron su impacto pronóstico negativo con el tratamiento de R-FCM.

La delección de 17p y los niveles séricos de β_2 -microglobulina como variables predictoras de respuesta a la combinación de R-FCM.

De entre las diferentes variables analizadas como predictoras de la respuesta al tratamiento cabe destacar la delección de 17p. La respuesta al tratamiento en los pacientes con esta alteración genética fue claramente insatisfactoria, lo cual vuelve a demostrar la ineficacia de las combinaciones basadas en fludarabina como tratamiento de este subgrupo de pacientes.(81, 167, 175) Por el contrario, las demás alteraciones genéticas como la delección de 13q, la trisomía 12 o la delección de 11q, no tuvieron ningún impacto en la posibilidad de alcanzar una RC. A diferencia de lo observado en otros estudios,(232) la edad al inicio del tratamiento no se correlacionó con la

probabilidad de conseguir una RC. Una posible explicación de ello en nuestro ensayo sería la ausencia de pacientes mayores de 70 años. Más allá de la delección de 17p, que cabe recordar que es una alteración con una baja frecuencia en los pacientes previamente no tratados con LLC, otras variables que se correlacionaron con la obtención de una inferior respuesta fueron el estadio clínico al inicio del tratamiento y los niveles séricos de β_2 -microglobulina. La β_2 -microglobulina sérica es una variable de fácil obtención y que ya demostró ser un parámetro robusto que se correlacionaba con la respuesta en el estudio previo del grupo de M. D. Anderson Cancer Center con FCR.(232)

Limitaciones del estudio.

En el presente trabajo deben destacarse algunos factores que pueden condicionar las conclusiones del estudio. En primer lugar, los resultados obtenidos derivan de un ensayo clínico fase II con un relativo reducido número de pacientes. En segundo lugar, hay que destacar que la mediana de edad de nuestro estudio es claramente inferior a la observada en la población general con LLC. Hay que tener en cuenta que la toxicidad hematológica que se observó en el subgrupo de pacientes mayores de 60 años fue superior en comparación con los pacientes más jóvenes. Además, los pacientes que participaron en el estudio no presentaban comorbilidades significativas. Los datos disponibles sobre la eficacia y toxicidad de los regímenes de inmunoquimioterapia como R-FCM en pacientes mayores con LLC, en particular en aquellos pacientes con comorbilidades asociadas, son muy escasos actualmente. Para esta población de enfermos, por otro lado, mayoritarios en la práctica clínica habitual, se están ensayando combinaciones de inmunoquimioterapia con un perfil de toxicidad más favorable, y nuevos fármacos no quimioterápicos, con unos resultados muy prometedores. (248, 307) Finalmente, en el presente estudio, no se pudo analizar el

impacto de las nuevas alteraciones moleculares, como las mutaciones en *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, o *BIRC3*, como variables predictoras de respuesta a R-FCM.

En conclusión, R-FCM es un régimen con una toxicidad tolerable que obtiene una muy alta tasa de respuestas, incluyendo RC con EMR negativa, en pacientes con LLC previamente no tratados. Los regímenes de inmunoterapia están aportando las mayores tasas de respuestas reportadas en la LLC. Tanto R-FCM como FCR son combinaciones de tratamiento muy activas en los pacientes con esta enfermedad y con un perfil de toxicidad aceptable al menos en los pacientes jóvenes sin comorbilidades importantes asociadas. Sin embargo, pueden no ser tolerables en una parte importante de la población de pacientes con LLC, donde otras combinaciones menos intensivas, como clorambucilo junto con rituximab u obinutuzumab, o rituximab y bendamustina, podrían ser más adecuadas.(303, 307) Finalmente, los buenos resultados obtenidos con los nuevos fármacos en la LLC, principalmente los inhibidores de tirosín quinasa capaces de bloquear las señales derivadas del receptor de células B, los inhibidores de señales antiapoptóticas como bcl2, y los nuevos anticuerpos monoclonales, podrían cambiar el paradigma de tratamiento de esta enfermedad.(261-263, 265, 325) Los estudios con estas moléculas tanto en combinación con los esquemas de quimioterapia anteriores, como en combinación entre ellas, o en monoterapia, deberán aportar mayor luz sobre cuál debe ser la mejor estrategia terapéutica en los pacientes con LLC.

- El tratamiento de mantenimiento con rituximab obtiene una SLP prolongada y consigue mejorar la calidad de las respuestas en pacientes con enfermedad detectable tras R-FCM.

Una de las estrategias que ha obtenido un mayor éxito en el tratamiento de los síndromes linfoproliferativos ha sido el uso de esquemas de mantenimiento tras el tratamiento inicial, principalmente con anticuerpos monoclonales.(321-323) En este sentido, en la LLC se han explorado diferentes terapias de mantenimiento o consolidación, incluyendo interferon- α ,(309, 393) alemtuzumab,(310, 311, 317, 318, 394-398) rituximab,(242, 312, 313, 324, 391, 399, 400) y más recientemente lenalidomida.(314) De forma análoga a lo observado en otros síndromes linfoproliferativos B, el uso de rituximab como tratamiento de mantenimiento en la LLC parece que podría mejorar la duración de la respuesta de los pacientes.(313)

En el segundo trabajo se muestran los resultados obtenidos con el tratamiento de mantenimiento con rituximab tras R-FCM. El estudio mostró que el mantenimiento con rituximab durante dos años obtenía una duración de la respuesta prolongada, con una SLP y SG a los cuatro años del 74.8% y 93.7%, respectivamente. Estos resultados se comparan de forma favorable con los obtenidos en la rama de inmunoterapia del ensayo del grupo alemán CLL8,(167) con una SLP y SG a los tres años del 65% y del 87%, respectivamente, mientras que todavía es necesario un mayor seguimiento para poderlos comparar con la serie de FCR del MD Anderson Cancer Center.(261)

El papel de rituximab como tratamiento de mantenimiento ya había sido explorado en estudios previos en la LLC.(242, 312, 313, 324, 391, 399, 400) Del Poeta y cols. en consonancia con nuestros resultados, reportaron una SLP estimada a los cinco años del 87% en un grupo reducido de pacientes que habían sido tratados con rituximab en consolidación y mantenimiento.(313) Asimismo, nuestros resultados son comparables con los conseguidos con un tratamiento inicial con FCR-Lite seguido por

un mantenimiento con rituximab a dosis más altas (SLP y SG estimada a los cinco años del 66.9% y 85.5%, respectivamente).(324, 391)

Finalmente, más allá de los anticuerpos monoclonales, actualmente se están explorando nuevos fármacos como tratamiento de mantenimiento en la LLC. En este sentido, los datos preliminares del uso de lenalidomida como tratamiento de consolidación tras pentostatina, ciclofosfamida y rituximab (PCR) han obtenido unos resultados muy prometedores.(314)

Efecto del rituximab como tratamiento de mantenimiento.

Con la finalidad de analizar en mayor profundidad el impacto del tratamiento de mantenimiento con rituximab, se comparó el tiempo hasta la conversión de la EMR y el tiempo hasta el siguiente tratamiento, obtenidos en este ensayo y en el estudio previo del grupo con FCM, ensayo que no incluía una estrategia de mantenimiento posterior. El tratamiento de R-FCM seguido de mantenimiento con rituximab consiguió un intervalo de tiempo hasta la conversión de la EMR negativa a positiva significativamente mayor que el obtenido en el estudio previo con FCM, 43 meses vs. 16.4 meses. Además, el tiempo hasta el siguiente tratamiento en los pacientes en RC con EMR-positiva o en RP tras el tratamiento inicial fue también más prolongado en la cohorte de pacientes tratados con R-FCM más rituximab. Aunque se trate de una comparación histórica, la mejoría obtenida con el presente estudio parece en gran parte derivada de la adición del mantenimiento con rituximab. En este sentido, a pesar de que ambos estudios difieren en el tratamiento inicial, FCM vs. R-FCM, los datos del estudio alemán CLL8 mostraron que los pacientes que conseguían una EMR negativa con el brazo de quimioterapia sola, FC, tuvieron un beneficio clínico similar a aquellos que la alcanzaban con la combinación de inmunquimioterapia, FCR.(167, 244)

Además, cabe destacar, que en ambos estudios la EMR se analizó por citometría de flujo con una sensibilidad similar.

Asimismo, para obtener un mayor conocimiento del verdadero impacto del mantenimiento con rituximab en la EMR y en la evolución clínica de los enfermos, se analizó también la cinética de la EMR durante el mantenimiento. En una proporción de enfermos, rituximab fue capaz de controlar los niveles de la EMR, negativizarla, reducirla, o mantenerla en unos niveles estables. Este hecho se había observado tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, pero no tras la combinación de quimioterapia con FCM ni con el trasplante autólogo.(401) Cabe resaltar que al finalizar el tratamiento de mantenimiento, los niveles de EMR aumentaron con una cinética similar a la observada tras FCM. Finalmente, variables asociadas en estudios previos a una menor duración de la respuesta, como valores séricos elevados de LDH o β_2 microglobulina, o una expresión alta de ZAP-70,(243, 259) no mantenían un impacto negativo con R-FCM junto con rituximab de mantenimiento. En este ensayo, únicamente los niveles de EMR y el tiempo de duplicación linfocitaria fueron predictores de la SLP de los enfermos. Es interesante destacar que son parámetros que definen por un lado la calidad de la respuesta alcanzada, y por otro, la cinética de la enfermedad.

El tratamiento de mantenimiento con rituximab fue factible pero no exento de toxicidad hematológica e infecciosa.

Los estudios previos que habían utilizado un tratamiento de mantenimiento con rituximab en la LLC habían reportado una toxicidad hematológica inferior, y un menor número de episodios infecciosos en comparación con nuestro estudio.(312, 313, 399) Esta discrepancia puede estar en relación con la intensidad de los diferentes regímenes de tratamiento inicial utilizados en estos ensayos.(312, 313, 399) En

nuestro estudio es difícil discriminar qué parte de la toxicidad observada durante el mantenimiento deriva realmente del tratamiento de mantenimiento en sí, o es consecuencia del tratamiento inicial con R-FCM. En este sentido, el seguimiento a largo plazo de los pacientes tratados con FCR, mostró que un número substancial de los pacientes presentaban citopenias persistentes, y que hasta un 10% de los enfermos presentaban infecciones graves durante el primer año de la remisión.(259)(402) En nuestro estudio, el hecho de que cerca de la mitad de los episodios de neutropenia grave y de los episodios infecciosos se concentrasen en los dos primeros ciclos del mantenimiento apunta claramente a que el tratamiento inicial con R-FCM condiciona parte de la toxicidad observada durante el tratamiento de mantenimiento. De todo ello se deriva que la toxicidad asociada al tratamiento inicial debe tenerse en cuenta en el diseño de las estrategias terapéuticas que incluyan un mantenimiento en el tratamiento de los pacientes con LLC.

En conclusión, el esquema de tratamiento de R-FCM seguido de un mantenimiento con rituximab consigue una SLP prolongada y mejora la calidad de las respuestas obtenidas, particularmente en aquellos pacientes con persistencia de enfermedad detectable tras R-FCM. Este estudio sostiene el concepto de las estrategias de mantenimiento en una enfermedad donde prácticamente todos los pacientes recaerán. Sin embargo, estos resultados deben confirmarse en estudios posteriores randomizados donde podrá determinarse de forma más precisa el beneficio del rituximab como mantenimiento en la LLC. Además, la aparición de nuevos fármacos como los inhibidores de tirosín quinasa y los inhibidores de BCL2, poco tóxicos y con unos datos de eficacia muy alentadores incluso en los pacientes con características biológicas tradicionalmente de alto riesgo, deben ofrecer nuevas opciones en el diseño de estudios con estrategias de mantenimiento en la LLC.

V. CONCLUSIONES

1.- La combinación de inmunoterapia basada en rituximab junto con fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone obtiene una alta tasa de respuestas, la mayoría de ellas respuestas completas, e incluyendo en un porcentaje importante de ellas la negativización de la enfermedad mínima residual.

2.- La toxicidad observada con la combinación fue aceptable.

3.- Las variables previas al tratamiento que tuvieron un impacto pronóstico negativo para la obtención de una respuesta completa fueron la presencia de una deleción de 17p, los niveles séricos elevados de la β 2-microglobulina y el estadio clínico avanzado.

4.- El tratamiento de mantenimiento con rituximab tras R-FCM consigue una SLP prolongada y mejora la calidad de las respuestas en un porcentaje de pacientes, particularmente en aquellos con persistencia de enfermedad detectable tras R-FCM.

5.- El tratamiento de mantenimiento con rituximab fue factible pero no exento de toxicidad hematológica e infecciosa.

6.- Los niveles de EMR obtenidos tras el tratamiento inicial con R-FCM fue la variable con mayor poder predictivo de la SLP de los pacientes.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, et al.: Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 139:809-819, 2007
2. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al.: Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107:265-276, 2006
3. Watson L, Wyld P, Catovsky D: Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *Eur J Haematol* 81:253-258, 2008
4. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. (eds). (2011) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). National Cancer Institute, Bethesda, MD. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09. Based on November 2011 SEER data submission, posted on the SEER web site, April 2012.
5. Rozman C, Montserrat E: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 333:1052-1057, 1995
6. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352:804-815, 2005
7. Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, et al.: Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood* 114:2044-2050, 2009
8. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al.: Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 100:635-639, 2002
9. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al.: Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 130:325-332, 2005
10. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al.: Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 102:1515-1525, 1998
11. Capello D, Fais F, Vivenza D, et al.: Identification of three subgroups of B cell chronic lymphocytic leukemia based upon mutations of BCL-6 and IgV genes. *Leukemia* 14:811-815, 2000
12. Pasqualucci L, Neri A, Baldini L, et al.: BCL-6 mutations are associated with immunoglobulin variable heavy chain mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 60:5644-5648, 2000
13. 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* 194:1625-1638, 2001

14. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al.: Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 194:1639-1647, 2001
15. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, et al.: B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 99:4087-4093, 2002
16. Schroeder HW, Jr., Dighiero G: The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 15:288-294, 1994
17. 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* 94:1840-1847, 1999
18. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al.: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1848-1854, 1999
19. Herve M, Xu K, Ng YS, et al.: Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 115:1636-1643, 2005
20. Zupo S, Isnardi L, Megna M, et al.: CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 88:1365-1374, 1996
21. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, et al.: Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101:1087-1093, 2003
22. Weill JC, Weller S, Reynaud CA: Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27:267-285, 2009
23. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H: Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197:179-191, 2004
24. Martin F, Kearney JF: Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2:323-335, 2002
25. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, et al.: B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23:7-18, 2005
26. Stall AM, Farinas MC, Tarlinton DM, et al.: Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7312-7316, 1988
27. Chung JB, Silverman M, Monroe JG: Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol* 24:343-349, 2003
28. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, et al.: Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105:4390-4398, 2005

29. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, et al.: Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol* 127:14-25, 2008
30. Carsetti R, Kohler G, Lamers MC: Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* 181:2129-2140, 1995
31. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, et al.: Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 209:2183-2198, 2012
32. Ha YJ, Mun YC, Seong CM, et al.: Characterization of phenotypically distinct B-cell subsets and receptor-stimulated mitogen-activated protein kinase activation in human cord blood B cells. *J Leukoc Biol* 84:1557-1564, 2008
33. 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* 20:246-259, 2011
34. Nieto WG, Almeida J, Romero A, et al.: Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 114:33-37, 2009
35. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, et al.: Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 100:2289-2290, 2002
36. Landgren O, Albitar M, Ma W, et al.: B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 360:659-667, 2009
37. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al.: Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 359:575-583, 2008
38. Marti G, Abbasi F, Raveche E, et al.: Overview of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 139:701-708, 2007
39. Odegard VH, Schatz DG: Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 6:573-583, 2006
40. Krober A, Seiler T, Benner A, et al.: V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1410-1416, 2002
41. 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* 348:1764-1775, 2003
42. Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, et al.: Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood* 89:4153-4160, 1997
43. Damle RN, Bhatiwala 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* 103:375-382, 2004

44. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al.: Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 92:1242-1245, 2007
45. Guarini A, Chiaretti S, Tavoraro S, et al.: BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 112:782-792, 2008
46. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al.: Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:4609-4614, 2002
47. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al.: Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 111:1524-1533, 2008
48. 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* 101:4952-4957, 2003
49. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al.: Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 113:1008-1016, 2004
50. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al.: Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 200:519-525, 2004
51. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, et al.: Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 104:2879-2885, 2004
52. Widhopf GF, Rassenti LZ, Toy TL, et al.: Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood* 104:2499-2504, 2004
53. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al.: Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 109:259-270, 2007
54. Chu CC, Catera R, Zhang L, et al.: Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood* 115:3907-3915, 2010
55. Catera R, Silverman GJ, Hatzi K, et al.: Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol Med* 14:665-674, 2008

56. Lanemo MA, Hellqvist E, Sidorova E, et al.: A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* 111:3838-3848, 2008
57. Seiler T, Woelfle M, Yancopoulos S, et al.: Characterization of structurally defined epitopes recognized by monoclonal antibodies produced by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 114:3615-3624, 2009
58. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al.: Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 105:1678-1685, 2005
59. Potter KN, Orchard J, Critchley E, et al.: Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood* 101:3082-3084, 2003
60. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, et al.: Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood* 111:5101-5108, 2008
61. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al.: Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99:2262-2264, 2002
62. Duhren-von MM, Ubelhart R, Schneider D, et al.: Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 489:309-312, 2012
63. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, et al.: Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412:341-346, 2001
64. Dohner H, Stilgenbauer S, Dohner K, et al.: Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med (Berl)* 77:266-281, 1999
65. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al.: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910-1916, 2000
66. Zenz T, Krober 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* 112:3322-3329, 2008
67. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al.: The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 15:995-1004, 2009
68. Austen B, Powell JE, Alvi A, et al.: Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 106:3175-3182, 2005

69. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al.: Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 114:5307-5314, 2009
70. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, et al.: The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 23:117-124, 2009
71. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, et al.: Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:748-753, 1999
72. Stankovic T, Weber P, Stewart G, et al.: Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 353:26-29, 1999
73. Guarini A, Marinelli M, Tavolaro S, et al.: ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica* 97:47-55, 2012
74. Liu Y, Corcoran M, Rasool O, et al.: Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 15:2463-2473, 1997
75. 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* 97:2098-2104, 2001
76. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al.: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524-15529, 2002
77. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al.: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858, 2001
78. Ouillette P, Erba H, Kujawski L, et al.: Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res* 68:1012-1021, 2008
79. 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* 102:13944-13949, 2005
80. 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* 17:28-40, 2010
81. 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* 370:230-239, 2007
82. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, et al.: Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with

- chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 25:799-804, 2007
83. Buhl AM, Jurlander J, Jorgensen FS, et al.: Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107:2904-2911, 2006
 84. Buhl AM, Novotny GW, Josefsson P, et al.: The CLLU1 expression level is a stable and inherent feature of the chronic lymphocytic leukemia clone. *Leukemia* 23:1182-1186, 2009
 85. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, et al.: 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89:2516-2522, 1997
 86. Bredemeyer AL, Sharma GG, Huang CY, et al.: ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination. *Nature* 442:466-470, 2006
 87. Kalla C, Scheuermann MO, Kube I, et al.: Analysis of 11q22-q23 deletion target genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B. *Eur J Cancer* 43:1328-1335, 2007
 88. Kienle DL, Korz C, Hosch B, et al.: Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol* 23:3780-3792, 2005
 89. 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* 25:5448-5457, 2007
 90. Dohner 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* 85:1580-1589, 1995
 91. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al.: Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475:101-105, 2011
 92. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al.: Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 208:1389-1401, 2011
 93. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al.: SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 365:2497-2506, 2011
 94. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, et al.: POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 45:526-530, 2013
 95. Lobry C, Oh P, Aifantis I: Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med* 208:1931-1935, 2011

96. Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, et al.: Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol* 28:343-365, 2010
97. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, et al.: NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* 151:404-406, 2010
98. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al.: Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119:521-529, 2012
99. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, et al.: NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 27:1100-1106, 2013
100. 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* 44:47-52, 2012
101. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al.: NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 119:329-331, 2012
102. Del Giudice, I, Rossi D, Chiaretti S, et al.: NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*, 2011
103. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al.: NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 119:329-331, 2012
104. Lopez C, Delgado J, Costa D, et al.: Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 51:881-889, 2012
105. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R: The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701-718, 2009
106. 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* 118:6904-6908, 2011
107. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, et al.: Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 9:1371-1378, 2008
108. Lau R, Niu MY, Pratt MA: cIAP2 represses IKKalpha/beta-mediated activation of MDM2 to prevent p53 degradation. *Cell Cycle* 11:4009-4019, 2012
109. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al.: Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119:2854-2862, 2012

110. Fazi C, Scarfo L, Pecciarini L, et al.: General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood* 118:6618-6625, 2011
111. Rossi D, Sozzi E, Puma A, et al.: The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol* 146:64-75, 2009
112. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al.: Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152:714-726, 2013
113. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al.: Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300:455, 2003
114. Rush LJ, Raval A, Funchain P, et al.: Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res* 64:2424-2433, 2004
115. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, et al.: Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 129:879-890, 2007
116. Billot K, Soeur J, Chereau F, et al.: Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. *Blood* 117:1917-1927, 2011
117. Corcoran M, Parker A, Orchard J, et al.: ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 90:1078-1088, 2005
118. Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, et al.: TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23:3877-3885, 2005
119. Stratthdee G, Sim A, Parker A, et al.: Promoter hypermethylation silences expression of the HoxA4 gene and correlates with IgVh mutational status in CLL. *Leukemia* 20:1326-1329, 2006
120. Chen SS, Raval A, Johnson AJ, et al.: Epigenetic changes during disease progression in a murine model of human chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13433-13438, 2009
121. Irving L, Mainou-Fowler T, Parker A, et al.: Methylation markers identify high risk patients in IGHV mutated chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 6:300-306, 2011
122. Kanduri M, Cahill N, Goransson H, et al.: Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115:296-305, 2010
123. Kulis M, Heath S, Bibikova M, et al.: Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 44:1236-1242, 2012

124. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, et al.: Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 91:2387-2396, 1998
125. Caligaris-Cappio F, Ghia P: Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol* 26:4497-4503, 2008
126. Smit LA, Hallaert DY, Spijker R, et al.: Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity. *Blood* 109:1660-1668, 2007
127. Ghia P, Strota G, Granziero L, et al.: Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 32:1403-1413, 2002
128. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, et al.: High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 113:3050-3058, 2009
129. Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al.: Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97:2777-2783, 2001
130. Tromp JM, Tonino SH, Elias JA, et al.: Dichotomy in NF-kappaB signaling and chemoresistance in immunoglobulin variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering. *Oncogene* 29:5071-5082, 2010
131. Burger JA, Tsukada N, Burger M, et al.: Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96:2655-2663, 2000
132. Kern C, Cornuel JF, Billard C, et al.: Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 103:679-688, 2004
133. Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, et al.: Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 100:2973-2979, 2002
134. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, et al.: Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99:1030-1037, 2002
135. Damle RN, Temburni S, Calissano C, et al.: CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* 110:3352-3359, 2007
136. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, et al.: CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 105:3042-3050, 2005
137. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, et al.: Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an

- immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 95:999-1006, 2000
138. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, et al.: B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118:4313-4320, 2011
 139. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC: The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 120:1175-1184, 2012
 140. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, et al.: B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol* 41:599-613, 2004
 141. Wiestner A: Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 120:4684-4691, 2012
 142. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, et al.: The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 117:563-574, 2011
 143. Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, et al.: Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 98:3050-3057, 2001
 144. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, et al.: The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 111:846-855, 2008
 145. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al.: Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 23:686-697, 2009
 146. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, et al.: B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 114:1029-1037, 2009
 147. Paterson A, Mockridge CI, Adams JE, et al.: Mechanisms and clinical significance of BIM phosphorylation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119:1726-1736, 2012
 148. Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, et al.: The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 120:356-365, 2012
 149. Buchner M, Baer C, Prinz G, et al.: Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115:4497-4506, 2010
 150. Hoellenriegel J, Coffey GP, Sinha U, et al.: Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia* 26:1576-1583, 2012
 151. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, et al.: The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118:3603-3612, 2011

152. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, et al.: Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 117:6287-6296, 2011
153. Müller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Campo E, Harris NL, Stein H. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al.(eds): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
154. 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* 111:5446-5456, 2008
155. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al.: Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 108:378-382, 1997
156. Ginaldi L, De MM, Matutes E, et al.: Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. *Leuk Res* 22:185-191, 1998
157. Gine E, Martinez A, Villamor N, et al.: Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 95:1526-1533, 2010
158. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, et al.: Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 64:642-648, 1984
159. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46:219-234, 1975
160. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al.: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198-206, 1981
161. Rai KR, Montserrat E: Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 24:252-256, 1987
162. Cordone I, Masi S, Mauro FR, et al.: p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 91:4342-4349, 1998
163. Lin K, Sherrington PD, Dennis M, et al.: Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1404-1409, 2002

164. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al.: Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 16:993-1007, 2002
165. Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, et al.: Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ* 10:477-484, 2003
166. 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* 107:885-891, 2006
167. 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* 376:1164-1174, 2010
168. Harris SL, Levine AJ: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24:2899-2908, 2005
169. 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* 21:2442-2451, 2007
170. Krober A, Bloehdorn J, Hafner S, et al.: Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 24:969-975, 2006
171. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al.: Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 24:4634-4641, 2006
172. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al.: Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 100:1177-1184, 2002
173. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al.: TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 28:4473-4479, 2010
174. 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* 29:2223-2229, 2011
175. Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, et al.: Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol* 24:437-443, 2006
176. 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* 30:4524-4532, 2012

177. Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, et al.: p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood* 98:814-822, 2001
178. Gryshchenko I, Hofbauer S, Stoecher M, et al.: MDM2 SNP309 is associated with poor outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 26:2252-2257, 2008
179. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al.: Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* 103:3278-3281, 2004
180. Stilgenbauer S, Dohner H: Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med* 347:452-453, 2002
181. Osuji NC, Del G, I, Matutes E, et al.: The efficacy of alemtuzumab for refractory chronic lymphocytic leukemia in relation to cytogenetic abnormalities of p53. *Haematologica* 90:1435-1436, 2005
182. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, et al.: Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 25:5616-5623, 2007
183. Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, et al.: Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 27:3994-4001, 2009
184. 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* 30:1647-1655, 2012
185. Dreger P, Dohner H, Ritgen M, et al.: Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood* 116:2438-2447, 2010
186. Schetelig J, Thiede C, Bornhauser M, et al.: Evidence of a graft-versus-leukemia effect in chronic lymphocytic leukemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: the Cooperative German Transplant Study Group. *J Clin Oncol* 21:2747-2753, 2003
187. Schetelig J, van BA, Brand R, et al.: Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion: a retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation analysis. *J Clin Oncol* 26:5094-5100, 2008

188. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, et al.: Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 28:1749-1755, 2010
189. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, et al.: Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 31:88-94, 2013
190. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al.: Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 369:32-42, 2013
191. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al.: ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19:202-208, 2013
192. Zenz T, Habe S, Denzel T, et al.: Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 114:2589-2597, 2009
193. Mansouri L, Cahill N, Gunnarsson R, et al.: NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 27:512-514, 2013
194. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, et al.: The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 121:468-475, 2013
195. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al.: Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121:1403-1412, 2013
196. Lin KI, Tam CS, Keating MJ, et al.: Relevance of the immunoglobulin VH somatic mutation status in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) or related chemoimmunotherapy regimens. *Blood* 113:3168-3171, 2009
197. Thorselius M, Krober A, Murray F, et al.: Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* 107:2889-2894, 2006
198. Chan AC, van Oers NS, Tran A, et al.: Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol* 152:4758-4766, 1994
199. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, et al.: ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71:649-662, 1992
200. Chu DH, Morita CT, Weiss A: The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* 165:167-180, 1998
201. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al.: ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 363:105-111, 2004

202. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al.: ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 351:893-901, 2004
203. Del Principe MI, Del PG, Buccisano F, et al.: Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 108:853-861, 2006
204. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al.: ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101:4944-4951, 2003
205. Nedellec S, Renaudineau Y, Bordron A, et al.: B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol* 174:3749-3756, 2005
206. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, et al.: Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 105:4820-4827, 2005
207. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, et al.: ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 107:3584-3592, 2006
208. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, et al.: ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes towards CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*, 2011
209. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al.: CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 110:4012-4021, 2007
210. Ferrero E, Malavasi F: Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol* 159:3858-3865, 1997
211. Deaglio S, Aydin S, Vaisitti T, et al.: CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends Mol Med* 14:210-218, 2008
212. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al.: CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98:181-186, 2001
213. Ghia P, Guida G, Stella S, et al.: The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 101:1262-1269, 2003
214. 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* 99:1023-1029, 2002

215. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, et al.: Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* 95:2455-2457, 2000
216. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al.: Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98:2633-2639, 2001
217. Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, et al.: Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 115:854-861, 2001
218. Ibrahim S, Jilani I, O'Brien S, et al.: Clinical relevance of the expression of the CD31 ligand for CD38 in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 97:1914-1919, 2003
219. Jaksic O, Paro MM, Kardum S, I, et al.: CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow. *Blood* 103:1968-1969, 2004
220. Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al.: CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 111:5173-5181, 2008
221. de La Fuente MT, Casanova B, Garcia-Gila M, et al.: Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia* 13:266-274, 1999
222. Spessotto P, Cervi M, Mucignat MT, et al.: beta 1 Integrin-dependent cell adhesion to EMILIN-1 is mediated by the gC1q domain. *J Biol Chem* 278:6160-6167, 2003
223. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, et al.: CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 69:4001-4009, 2009
224. 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* 111:865-873, 2008
225. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, et al.: CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol* 140:537-546, 2008
226. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, et al.: CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 93:1575-1579, 2008
227. Eksioglu-Demiralp E, Alpdogan O, Aktan M, et al.: Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia* 10:1331-1339, 1996
228. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al.: Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early,

- nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93:1732-1737, 1999
229. Reinisch W, Willheim M, Hilgarth M, et al.: Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 12:2146-2152, 1994
 230. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, et al.: Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 88:4259-4264, 1996
 231. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al.: Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:4679-4685, 2007
 232. 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* 23:4079-4088, 2005
 233. Wierda W, O'Brien S, Wen S, et al.: Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23:4070-4078, 2005
 234. Kallander CF, Simonsson B, Gronowitz JS, et al.: Serum deoxythymidine kinase correlates with peripheral lymphocyte thymidine uptake in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 38:331-337, 1987
 235. Knauf WU, Ehlers B, Mohr B, et al.: Prognostic impact of the serum levels of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 89:4241-4242, 1997
 236. Montserrat E, Sanchez-Bisoso J, Vinolas N, et al.: Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 62:567-575, 1986
 237. Molica S, Alberti A: Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 60:2712-2716, 1987
 238. Dhodapkar M, Tefferi A, Su J, et al.: Prognostic features and survival in young adults with early/intermediate chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a single institution study. *Leukemia* 7:1232-1235, 1993
 239. Moreton P, Kennedy B, Lucas G, et al.: Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol* 23:2971-2979, 2005
 240. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, et al.: Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 98:29-35, 2001
 241. Moreno C, Villamor N, Colomer D, et al.: Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107:4563-4569, 2006

242. Lamanna N, Jurcic JG, Noy A, et al.: Sequential therapy with fludarabine, high-dose cyclophosphamide, and rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia produces high-quality responses: molecular remissions predict for durable complete responses. *J Clin Oncol* 27:491-497, 2009
243. Bosch F, Ferrer A, Villamor N, et al.: Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res* 14:155-161, 2008
244. Bottcher S, Ritgen M, Fischer K, et al.: Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol* 30:980-988, 2012
245. Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, et al.: Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 119:976-984, 2002
246. Montserrat E: Treatment of chronic lymphocytic leukemia: achieving minimal residual disease-negative status as a goal. *J Clin Oncol* 23:2884-2885, 2005
247. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al.: Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 369:32-42, 2013
248. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, et al.: Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol* 15:48-58, 2014
249. Kipps TJ, Carson DA: Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood* 81:2475-2487, 1993
250. Brecher M, Banks PM: Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome. Report of eight cases. *Am J Clin Pathol* 93:333-339, 1990
251. Rossi D, Cerri M, Capello D, et al.: Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 142:202-215, 2008
252. Han T, Ezdinli EZ, Shimaoka K, et al.: Chlorambucil vs. combined chlorambucil-corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 31:502-508, 1973
253. Knospe WH, Loeb V, Jr., Huguley CM, Jr.: Proceedings: Bi-weekly chlorambucil treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 33:555-562, 1974
254. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al.: Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1750-1757, 2000
255. Lepage M, Chevret S, Cazin B, et al.: Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 98:2319-2325, 2001

256. Johnson S, Smith AG, Loffler H, et al.: Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet* 347:1432-1438, 1996
257. Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, et al.: Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, randomized, multicenter trial. *Blood* 96:2723-2729, 2000
258. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, et al.: Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood* 105:49-53, 2005
259. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, et al.: Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 112:975-980, 2008
260. 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* 28:1756-1765, 2010
261. Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, et al.: Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 24:5343-5349, 2006
262. Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ, et al.: Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111:5291-5297, 2008
263. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al.: Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 369:32-42, 2013
264. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, et al.: Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 116:2078-2088, 2010
265. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al.: ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19:202-208, 2013
266. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al.: Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 338:1506-1514, 1998
267. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al.: International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 21:956-964, 2007
268. Rawstron AC, Bottcher S, Letestu R, et al.: Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international

- harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia* 27:142-149, 2013
269. Begleiter A, Mowat M, Israels LG, et al.: Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leuk Lymphoma* 23:187-201, 1996
270. A randomized clinical trial of chlorambucil versus COP in stage B chronic lymphocytic leukemia. The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 75:1422-1425, 1990
271. Effects of chlorambucil and therapeutic decision in initial forms of chronic lymphocytic leukemia (stage A): results of a randomized clinical trial on 612 patients. The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 75:1414-1421, 1990
272. Brugiatelli M, Jaksic B, Planinc-Peraica A, et al.: Treatment of chronic lymphocytic leukemia in early and stable phase of the disease: long-term results of a randomized trial. *Eur J Haematol* 55:158-163, 1995
273. Shustik C, Mick R, Silver R, et al.: Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol* 6:7-12, 1988
274. Montserrat E, Alcalá A, Parody R, et al.: Treatment of chronic lymphocytic leukemia in advanced stages. A randomized trial comparing chlorambucil plus prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone. *Cancer* 56:2369-2375, 1985
275. Raphael B, Andersen JW, Silber R, et al.: Comparison of chlorambucil and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone as initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of an Eastern Cooperative Oncology Group randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 9:770-776, 1991
276. Jaksic B, Brugiatelli M, Krc I, et al.: High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen in the treatment of patients with advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international multicenter randomized trial. International Society for Chemo-Immunotherapy, Vienna. *Cancer* 79:2107-2114, 1997
277. 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* 25:793-798, 2007
278. Robak T, Blonski JZ, Gora-Tybor J, et al.: Cladribine alone and in combination with cyclophosphamide or cyclophosphamide plus mitoxantrone in the treatment of progressive chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, multicenter, randomized trial of the Polish Adult Leukemia Group (PALG CLL2). *Blood* 108:473-479, 2006
279. Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, et al.: In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:2836-2843, 1999

280. Bellosillo B, Colomer D, Pons G, et al.: Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 100:142-146, 1998
281. Hendry L, Bowen A, Matutes E, et al.: Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia and low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 45:945-950, 2004
282. 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* 114:3382-3391, 2009
283. Thurmes P, Call T, Slager S, et al.: Comorbid conditions and survival in unselected, newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 49:49-56, 2008
284. Extermann M: Measuring comorbidity in older cancer patients. *Eur J Cancer* 36:453-471, 2000
285. Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, et al.: Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematol* 114:800-809, 2001
286. McLaughlin P, White CA, Grillo-Lopez AJ, et al.: Clinical status and optimal use of rituximab for B-cell lymphomas. *Oncology (Williston Park)* 12:1763-1769, 1998
287. Huhn D, von SC, Wilhelm M, et al.: Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98:1326-1331, 2001
288. Nguyen DT, Amess JA, Doughty H, et al.: IDEC-C2B8 anti-CD20 (rituximab) immunotherapy in patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma and lymphoproliferative disorders: evaluation of response on 48 patients. *Eur J Haematol* 62:76-82, 1999
289. Winkler U, Jensen M, Manzke O, et al.: Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 94:2217-2224, 1999
290. Ladetto M, Bergui L, Ricca I, et al.: Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody induces marked but transient reductions of peripheral blood lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia patients. *Med Oncol* 17:203-210, 2000
291. Itala M, Geisler CH, Kimby E, et al.: Standard-dose anti-CD20 antibody rituximab has efficacy in chronic lymphocytic leukaemia: results from a Nordic multicentre study. *Eur J Haematol* 69:129-134, 2002
292. Manshouri T, Do KA, Wang X, et al.: Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 101:2507-2513, 2003
293. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, et al.: CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic

- leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 98:3383-3389, 2001
294. Beers SA, French RR, Chan HT, et al.: Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 115:5191-5201, 2010
295. O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, et al.: Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19:2165-2170, 2001
296. Byrd JC, Murphy T, Howard RS, et al.: Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J Clin Oncol* 19:2153-2164, 2001
297. Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA, et al.: Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood* 101:6-14, 2003
298. Schulz H, Klein SK, Rehwald U, et al.: Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:3115-3120, 2002
299. 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* 28:1756-1765, 2010
300. Leoni LM, Bailey B, Reifert J, et al.: Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents. *Clin Cancer Res* 14:309-317, 2008
301. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, et al.: Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27:4378-4384, 2009
302. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al.: Bendamustine Combined With Rituximab in Patients With Relapsed and/or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multicenter Phase II Trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*, 2011
303. 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* 30:3209-3216, 2012
304. Eichhorst B, Fink AM, Busch R, et al.: Chemoimmunotherapy With Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Versus Bendamustine and Rituximab (BR) In Previously Untreated and Physically Fit Patients (pts) With Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results Of a Planned Interim Analysis Of The CLL10

Trial, An International, Randomized Study Of The German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood* 2013 122:526. abstract.

305. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA, et al. Rituximab plus chlorambucil in patients with CD20-positive B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL): final response analysis of an open-label Phase II study. *Blood* 2010;116:697. abstract.
306. Foa R, Giudice ID, 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
307. Goede V, Fischer K, Busch R, et al.: Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med*, 2014
308. O'Brien S, Kantarjian H, Beran M, et al.: Interferon maintenance therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia in remission after fludarabine therapy. *Blood* 86:1298-1300, 1995
309. Zinzani PL, Bendandi M, Magagnoli M, et al.: Results of a fludarabine induction and alpha-interferon maintenance protocol in pretreated patients with chronic lymphocytic leukemia and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 59:82-88, 1997
310. Wendtner CM, Ritgen M, Schweighofer CD, et al.: Consolidation with alemtuzumab in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission--experience on safety and efficacy within a randomized multicenter phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Leukemia* 18:1093-1101, 2004
311. Thieblemont C, Bouafia F, Hornez E, et al.: Maintenance therapy with a monthly injection of alemtuzumab prolongs response duration in patients with refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (B-CLL/SLL). *Leuk Lymphoma* 45:711-714, 2004
312. Hainsworth JD, Litchy S, Barton JH, et al.: Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol* 21:1746-1751, 2003
313. Del Poeta G, Del Principe MI, Buccisano F, et al.: Consolidation and maintenance immunotherapy with rituximab improve clinical outcome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 112:119-128, 2008
314. Shanafelt TD, Ramsay AG, Zent CS, et al.: Long-term repair of T-cell synapse activity in a phase II trial of chemoimmunotherapy followed by lenalidomide consolidation in previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 121:4137-4141, 2013
315. Rowan W, Tite J, Topley P, et al.: Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) mediates growth inhibition in human B- and T-lymphoma cell lines, and subsequent emergence of CD52-deficient cells. *Immunology* 95:427-436, 1998

316. Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al.: Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 99:3554-3561, 2002
317. Montillo M, Tedeschi A, Miqueleiz S, et al.: Alemtuzumab as consolidation after a response to fludarabine is effective in purging residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 24:2337-2342, 2006
318. Schweighofer CD, Ritgen M, Eichhorst BF, et al.: Consolidation with alemtuzumab improves progression-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in first remission: long-term follow-up of a randomized phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Br J Haematol* 144:95-98, 2009
319. O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, et al.: Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 98:2657-2663, 2003
320. Montillo M, Schinkoethe T, Elter T: Eradication of minimal residual disease with alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients: the need for a standard method of detection and the potential impact of bone marrow clearance on disease outcome. *Cancer Invest* 23:488-496, 2005
321. Salles G, Seymour JF, Offner F, et al.: Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 377:42-51, 2011
322. Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, et al.: Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood* 108:4003-4008, 2006
323. Hochster H, Weller E, Gascoyne RD, et al.: Maintenance rituximab after cyclophosphamide, vincristine, and prednisone prolongs progression-free survival in advanced indolent lymphoma: results of the randomized phase III ECOG1496 Study. *J Clin Oncol* 27:1607-1614, 2009
324. Foon KA, Mehta D, Lentzsch S, et al.: Long-term results of chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine, cyclophosphamide and high-dose rituximab as initial treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119:3184-3185, 2012
325. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al.: Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 2014
326. Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, et al.: Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* 100:3741-3748, 2002

327. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, et al.: Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 116:2078-2088, 2010
328. Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, et al.: Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 98:3050-3057, 2001
329. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, et al.: Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 117:6287-6296, 2011
330. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al.: The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13075-13080, 2010
331. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, et al.: The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 119:1182-1189, 2012
332. Vogt PK, Kang S, Elsliger MA, et al.: Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends Biochem Sci* 32:342-349, 2007
333. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, et al.: The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 114:3367-3375, 2009
334. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, et al.: CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 117:591-594, 2011
335. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, et al.: The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2011
336. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al.: Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 2014
337. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, et al.: R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 319:998-1008, 2006
338. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al.: Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115:2578-2585, 2010
339. Spurgeon SE, Coffey G, Fletcher LB, et al.: The selective SYK inhibitor P505-15 (PRT062607) inhibits B cell signaling and function in vitro and in vivo and augments the activity of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *J Pharmacol Exp Ther* 344:378-387, 2013

340. O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, et al.: Phase I study of obatoclox mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113:299-305, 2009
341. O'Brien SM, Cunningham CC, Golenkov AK, et al.: Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23:7697-7702, 2005
342. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, et al.: Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* 30:488-496, 2012
343. Lapalombella R, Andritsos L, Liu Q, et al.: Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway. *Blood* 115:2619-2629, 2010
344. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al.: Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 118:2427-2437, 2008
345. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al.: Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia* 24:22-32, 2010
346. Aue G, Njuguna N, Tian X, et al.: Lenalidomide-induced upregulation of CD80 on tumor cells correlates with T-cell activation, the rapid onset of a cytokine release syndrome and leukemic cell clearance in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 94:1266-1273, 2009
347. Giannopoulos K, Dmoszynska A, Kowal M, et al.: Thalidomide exerts distinct molecular antileukemic effects and combined thalidomide/fludarabine therapy is clinically effective in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 23:1771-1778, 2009
348. Idler I, Giannopoulos K, Zenz T, et al.: Lenalidomide treatment of chronic lymphocytic leukaemia patients reduces regulatory T cells and induces Th17 T helper cells. *Br J Haematol* 148:948-950, 2010
349. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, et al.: Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 163:380-386, 1999
350. LeBlanc R, Hideshima T, Catley LP, et al.: Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood* 103:1787-1790, 2004
351. Schafer PH, Gandhi AK, Loveland MA, et al.: Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 305:1222-1232, 2003

352. Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, et al.: Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest* 115:1797-1805, 2005
353. Gorgun G, Ramsay AG, Holderried TA, et al.: E(mu)-TCL1 mice represent a model for immunotherapeutic reversal of chronic lymphocytic leukemia-induced T-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6250-6255, 2009
354. Andritsos LA, Johnson AJ, Lozanski G, et al.: Higher doses of lenalidomide are associated with unacceptable toxicity including life-threatening tumor flare in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 26:2519-2525, 2008
355. Chen CI, Bergsagel PL, Paul H, et al.: Single-agent lenalidomide in the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 29:1175-1181, 2011
356. Badoux XC, Keating MJ, Wen S, et al.: Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 31:584-591, 2013
357. Cragg MS, Glennie MJ: Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103:2738-2743, 2004
358. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, et al.: Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44:3823-3837, 2007
359. Mossner E, Brunker P, Moser S, et al.: Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115:4393-4402, 2010
360. Patz M, Isaeva P, Forcob N, et al.: Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 152:295-306, 2011
361. Dalle S, Reslan L, Besseyre de HT, et al.: Preclinical studies on the mechanism of action and the anti-lymphoma activity of the novel anti-CD20 antibody GA101. *Mol Cancer Ther* 10:178-185, 2011
362. Salles G, Morschhauser F, Lamy T, et al.: Phase 1 study results of the type II glycoengineered humanized anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab (GA101) in B-cell lymphoma patients. *Blood* 119:5126-5132, 2012
363. Sehn LH, Assouline SE, Stewart DA, et al.: A phase 1 study of obinutuzumab induction followed by 2 years of maintenance in patients with relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood* 119:5118-5125, 2012
364. Teeling JL, French RR, Cragg MS, et al.: Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 104:1793-1800, 2004
365. Pawluczko AW, Beurskens FJ, Beum PV, et al.: Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells

- opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *J Immunol* 183:749-758, 2009
366. Wierda WG, Padmanabhan S, Chan GW, et al.: Ofatumumab is active in patients with fludarabine-refractory CLL irrespective of prior rituximab: results from the phase II international study. *Blood*, 2011
 367. Wierda WG, Kipps TJ, Durig J, et al.: Chemoimmunotherapy with O-FC in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 117:6450-6458, 2011
 368. Furman RR, Forero-Torres A, Shustov A, et al.: A phase I study of dacetuzumab (SGN-40, a humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 51:228-235, 2010
 369. Hertlein E, Triantafillou G, Sass EJ, et al.: Milatuzumab immunoliposomes induce cell death in CLL by promoting accumulation of CD74 on the surface of B cells. *Blood* 116:2554-2558, 2010
 370. Awan FT, Lapalombella R, Trotta R, et al.: CD19 targeting of chronic lymphocytic leukemia with a novel Fc-domain-engineered monoclonal antibody. *Blood* 115:1204-1213, 2010
 371. Byrd JC, Kipps TJ, Flinn IW, et al.: Phase 1/2 study of lumiliximab combined with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115:489-495, 2010
 372. Heider KH, Kiefer K, Zenz T, et al.: A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADCC and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies. *Blood* 118:4159-4168, 2011
 373. Sorror ML, Storer BE, Sandmaier BM, et al.: Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 26:4912-4920, 2008
 374. Dreger P, Brand R, Milligan D, et al.: Reduced-intensity conditioning lowers treatment-related mortality of allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a population-matched analysis. *Leukemia* 19:1029-1033, 2005
 375. Toze CL, Galal A, Barnett MJ, et al.: Myeloablative allografting for chronic lymphocytic leukemia: evidence for a potent graft-versus-leukemia effect associated with graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 36:825-830, 2005
 376. Farina L, Carniti C, Doderio A, et al.: Qualitative and quantitative polymerase chain reaction monitoring of minimal residual disease in relapsed chronic lymphocytic leukemia: early assessment can predict long-term outcome after reduced intensity allogeneic transplantation. *Haematologica* 94:654-662, 2009

377. Gribben JG, Zahrieh D, Stephans K, et al.: Autologous and allogeneic stem cell transplantations for poor-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106:4389-4396, 2005
378. Ritgen M, Bottcher S, Stilgenbauer S, et al.: Quantitative MRD monitoring identifies distinct GVL response patterns after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: results from the GCLLSG CLL3X trial. *Leukemia* 22:1377-1386, 2008
379. Michallet M, Archimbaud E, Bandini G, et al.: HLA-identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with chronic lymphocytic leukemia. European Group for Blood and Marrow Transplantation and the International Bone Marrow Transplant Registry. *Ann Intern Med* 124:311-315, 1996
380. Pavletic SZ, Khouri IF, Haagenson M, et al.: Unrelated donor marrow transplantation for B-cell chronic lymphocytic leukemia after using myeloablative conditioning: results from the Center for International Blood and Marrow Transplant research. *J Clin Oncol* 23:5788-5794, 2005
381. Brown JR, Kim HT, Li S, et al.: Predictors of improved progression-free survival after nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for advanced chronic lymphocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:1056-1064, 2006
382. Delgado J, Thomson K, Russell N, et al.: Results of alemtuzumab-based reduced-intensity allogeneic transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a British Society of Blood and Marrow Transplantation Study. *Blood* 107:1724-1730, 2006
383. Khouri IF, Saliba RM, Admirand J, et al.: Graft-versus-leukaemia effect after non-myeloablative haematopoietic transplantation can overcome the unfavourable expression of ZAP-70 in refractory chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 137:355-363, 2007
384. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al.: Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 21:12-17, 2007
385. Dreger P, Ritgen M, Bottcher S, et al.: The prognostic impact of minimal residual disease assessment after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: is achievement of molecular remission worthwhile? *Leukemia* 19:1135-1138, 2005
386. Milligan DW, Fernandes S, Dasgupta R, et al.: Results of the MRC pilot study show autografting for younger patients with chronic lymphocytic leukemia is safe and achieves a high percentage of molecular responses. *Blood* 105:397-404, 2005
387. Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, et al.: Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood* 117:6109-6119, 2011

388. Michallet M, Dreger P, Sutton L, et al.: Autologous hematopoietic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: results of European intergroup randomized trial comparing autografting versus observation. *Blood* 117:1516-1521, 2011
389. Dreger P, Dohner H, McClanahan F, et al.: Early autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of the German CLL Study Group CLL3 trial. *Blood* 119:4851-4859, 2012
390. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al.: National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87:4990-4997, 1996
391. Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, et al.: Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27:498-503, 2009
392. Kay NE, Geyer SM, Call TG, et al.: Combination chemoimmunotherapy with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab shows significant clinical activity with low accompanying toxicity in previously untreated B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:405-411, 2007
393. O'Brien S, Kantarjian H, Beran M, et al.: Interferon maintenance therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia in remission after fludarabine therapy. *Blood* 86:1298-1300, 1995
394. Lin TS, Donohue KA, Byrd JC, et al.: Consolidation therapy with subcutaneous alemtuzumab after fludarabine and rituximab induction therapy for previously untreated chronic lymphocytic leukemia: final analysis of CALGB 10101. *J Clin Oncol* 28:4500-4506, 2010
395. Wierda WG, Kipps TJ, Keating MJ, et al.: Self-administered, subcutaneous alemtuzumab to treat residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 117:116-124, 2011
396. O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, et al.: Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 98:2657-2663, 2003
397. Hainsworth JD, Vazquez ER, Spigel DR, et al.: Combination therapy with fludarabine and rituximab followed by alemtuzumab in the first-line treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase 2 trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *Cancer* 112:1288-1295, 2008
398. Kaufman MS, Caramanica A, Janson D, et al.: Alemtuzumab maintenance may safely prolong chemotherapy-free intervals in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol* 28:532-538, 2011
399. Srock S, Schriever F, Neubauer A, et al.: Long-term treatment with rituximab is feasible in selected patients with B-CLL: response-adjusted low-dose maintenance treatment with rituximab in patients with relapsed B-CLL, who achieved a partial or minimal response to prior rituximab therapy. *Leuk Lymphoma* 48:905-911, 2007

400. Scaramucci L, Niscola P, Buffolino S, et al.: Repeated rituximab maintenance courses in fludarabine-failed young patients with chronic lymphocytic leukaemia responding to FAND chemotherapy. *Hematol J* 5:186-187, 2004
401. Esteve J, Villamor N, Colomer D, et al.: Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: different outcome after autologous and allogeneic transplantation and correlation with minimal residual disease status. *Leukemia* 15:445-451, 2001
402. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, et al. Extended follow up of the CLL8 protocol, a randomized phase-III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG) comparing fludarabine and cyclophosphamide (FC) to FC plus rituximab (FCR) for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL): results on survival, progression-free survival, delayed neutropenias and secondary malignancies confirm superiority of the FCR regimen. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts). 2012;120(21):Abstract 435.