

Rozzano, 28/10/2025

DNA Tumorale Circolante come Biomarker Predittivo di Risposta e Resistenza alla terapia con anticorpi bispecifici CD20/CD3 nel Linfoma Diffuso a Grandi Cellule B Recidivato/Refrattario

Dott. Flavio Pistolese

Negli ultimi anni, il trattamento del linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) recidivato/refrattario (R/R) è stato rivoluzionato dall'introduzione di terapie immunologiche innovative, tra cui gli anticorpi bispecifici anti-CD20xCD3, come Glofitamab. Nonostante le elevate percentuali di risposta iniziale, oltre la metà dei pazienti sviluppa resistenza primaria o secondaria al trattamento. L'identificazione precoce di marcatori molecolari predittivi di risposta rappresenta quindi un obiettivo clinico cruciale.

Il progetto è volto a caratterizzare l'eterogeneità genetica e molecolare dei pazienti trattati con Glofitamab, utilizzando il DNA tumorale circolante (ctDNA) come principale fonte di informazione genomica. L'analisi del ctDNA consente di ottenere una "biopsia liquida" non invasiva, capace di riflettere in modo dinamico l'evoluzione clonale del tumore e di fornire biomarcatori precoci di risposta o resistenza all'immunoterapia.

L'attività progettuale si articola in quattro principali obiettivi:

1. **Caratterizzare il profilo mutazionale del DLBCL r/r** mediante genotipizzazione del ctDNA per definire l'eterogeneità genetica e le alterazioni più ricorrenti.
2. **Monitorare la malattia residua minima (MRD)** attraverso la quantificazione del ctDNA in campioni seriali per valutare la clearance molecolare precoce e la sua correlazione con gli esiti clinici.
3. **Identificare mutazioni predittive di risposta o resistenza a Glofitamab**, con particolare attenzione a geni ad alto impatto biologico (TP53, KMT2D, CCND3, BCL7A, ZFP36L1).
4. **Studiare i meccanismi di perdita di risposta e resistenza acquisita**, integrando le informazioni genomiche longitudinali con i dati clinico-radiologici (PET/CT).

Metodologia

Il lavoro sperimentale ha seguito un disegno retrospettivo e prospettico multicentrico, integrando la raccolta di campioni biologici, l'analisi molecolare e l'elaborazione bioinformatica dei dati.

1. Raccolta campioni e processazione

Sono stati inclusi pazienti adulti (≥ 18 anni) con diagnosi di DLBCL, HGBCL o tDLBCL trattati con Glofitamab. Il sangue periferico è stato raccolto in provette Streck per l'isolamento del plasma e delle cellule mononucleate.

Il plasma è stato separato mediante doppia centrifugazione (1600 g e 16000 g) e conservato a -80 °C in aliquote da 1,5–2 mL. Il DNA germinale è stato estratto dai granulociti, mentre il cfDNA è stato isolato dal plasma con il kit Maxwell® RSC LV cfDNA (Promega). La qualità e la frammentazione del DNA sono state valutate tramite Agilent TapeStation 4200.

2. Sequenziamento e analisi genomica

Il ctDNA è stato analizzato con la tecnologia CAPP-Seq (Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing), un approccio di sequenziamento mirato ad alta sensibilità.

Le librerie sono state preparate con KAPA HyperPrep/HyperPlus e arricchite con sonde KAPA HyperCap Target Enrichment, mirate a 155 geni frequentemente mutati nei linfomi B.

Il sequenziamento è stato eseguito su piattaforma Illumina NextSeq 550 con una profondità target $> 2000\times$.

Le varianti somatiche sono state identificate con VarScan2, mentre le alterazioni di numero di copia (CNV) sono state analizzate con CNVkit e GISTIC 2.0; le fusioni e traslocazioni con FACTERA.

3. Analisi statistica e correlazione clinica

Le correlazioni tra variabili genetiche, livelli di ctDNA e risposta clinica (Best Overall Response, PFS, OS) sono state valutate mediante test di Fisher, Mann-Whitney e modelli di Cox multivariati. Le curve di sopravvivenza sono state stimate con il metodo di Kaplan-Meier.

4. Monitoraggio dinamico della MRD

La quantificazione del ctDNA è stata effettuata in campioni longitudinali raccolti al baseline e dopo i cicli 2, 5, 8 e a fine trattamento.

Risultati

L'attività ha consentito di completare la caratterizzazione genomica e dinamica del ctDNA in una coorte di 70 pazienti affetti da DLBCL recidivato/refrattario, trattati con anticorpo bispecifico anti-CD20xCD3 (Glofitamab) tra il 2018 e il 2025 presso IRCCS Humanitas Research Hospital e AOUI Verona.

Tutti i pazienti avevano ricevuto una terapia standard di induzione e almeno una linea successiva prima dell'arruolamento. L'età mediana era di 63 anni, e oltre il 70% presentava malattia in stadio avanzato (Ann Arbor \geq III).

1. Analisi mutazionale basale

Il ctDNA è stato rilevato nel 89% dei pazienti, con una concentrazione mediana pari a 288 hGE/mL (range 27–14803). Il valore basale di ctDNA è risultato significativamente correlato con IPI elevato e presenza di malattia bulky, indicando un'associazione diretta tra carico tumorale e quantità di DNA tumorale circolante.

L'analisi mutazionale condotta su 48 pazienti che hanno raggiunto la dose target di trattamento ha permesso di identificare 492 varianti somatiche (non sinonimiche e splicing), distribuite su 155 geni target.

I geni più frequentemente mutati sono risultati:

- TP53 (46%),
- KMT2D (38%),
- IGLL5 (33%),
- PIM1 (25%),
- BCL2 (23%),
- CREBBP (23%),
- HIST1H1E (23%).

Le analisi di numero di copia hanno inoltre evidenziato amplificazioni di 8q24 (MYC) e 9p24.1 (PDL1/PDL2), e delezioni di 6q21 (PRDM1) e 6q23.3 (TNFAIP3), suggerendo il coinvolgimento di pathway legati all'immuno-evasione e alla regolazione del signaling NF- κ B.

2. Monitoraggio della MRD tramite ctDNA

L'analisi longitudinale del ctDNA è stata condotta in 43 pazienti con campioni disponibili in più timepoint.

Dopo due cicli di terapia, il 58% dei pazienti ha raggiunto la negativizzazione del ctDNA (MRD-), parametro fortemente predittivo di risposta completa a fine trattamento (EOT) e di migliore sopravvivenza libera da progressione.

In confronto, la PET/CT precoce (al ciclo 3) ha mostrato una capacità predittiva inferiore (AUC 79,6 vs 87,5 per ctDNA).

Nei pazienti TP53-mutati, la scomparsa precoce della mutazione nel ctDNA è risultata associata alla risposta completa e alla sopravvivenza a lungo termine.

La ricomparsa o l'aumento del ctDNA durante il trattamento ha anticipato la progressione clinica in quattro pazienti, confermando la capacità del biomarcatore di intercettare precocemente eventi di recidiva molecolare.

Conclusioni

L'analisi mutazionale del DNA tumorale circolante (ctDNA) ha permesso di definire con maggiore precisione il panorama genetico dei pazienti con DLBCL recidivato/refrattario trattati con Glofitamab, evidenziando la presenza ricorrente di mutazioni in geni chiave come TP53, KMT2D, IGLL5 e BCL2, implicati nei processi di resistenza e progressione di malattia.

Parallelamente, il monitoraggio dinamico della malattia residua minima (MRD) ha dimostrato che la negativizzazione precoce del ctDNA (MRD-) si associa in modo significativo a una sopravvivenza libera da progressione più lunga e a una maggior probabilità di risposta completa, rafforzando la validità del ctDNA come indicatore prognostico precoce rispetto all'imaging convenzionale.

I risultati finora conseguiti pongono solide basi per le analisi successive previste dal progetto, finalizzate a identificare in modo sistematico le mutazioni predittive di risposta o resistenza al trattamento con Glofitamab e a studiare i meccanismi di perdita di risposta e di resistenza acquisita, integrando i dati genomici con le informazioni cliniche e trascrittomiche.

Tali indagini avranno importanti implicazioni traslazionali, orientate allo sviluppo di modelli predittivi capaci di supportare la personalizzazione dell'immunoterapia nel linfoma diffuso a grandi cellule B.



Prof. Carmelo Carlo-Stella
Professore di Ematologia
Humanitas University
Capo Sezione Neoplasie Linfoidi
Humanitas Cancer Center
IRCCS Humanitas Research Hospital
Milano