



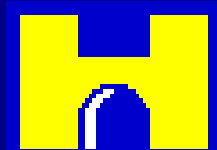
**EMATOLOGIA DI LABORATORIO:**  
**percorsi diagnostici e obiettivi clinici**

***Diagnostica di laboratorio nella  
leucemia mieloide cronica nell'era  
degli inibitori delle tirosino-kinasi***

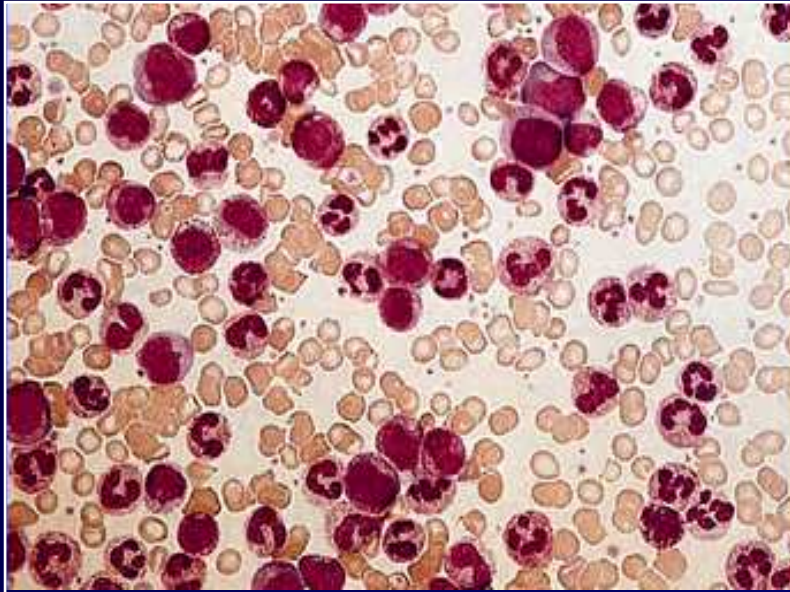
**Ester Pungolino**

**Divisione di Ematologia e Centro Trapianto di Midollo Osseo  
Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano**

Milano 11 e 12 Novembre 2010




# Parlando di Leucemia Mieloide Cronica ...

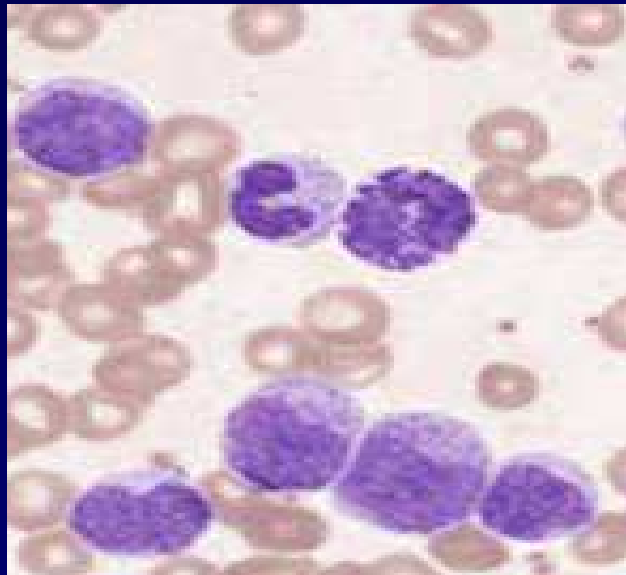
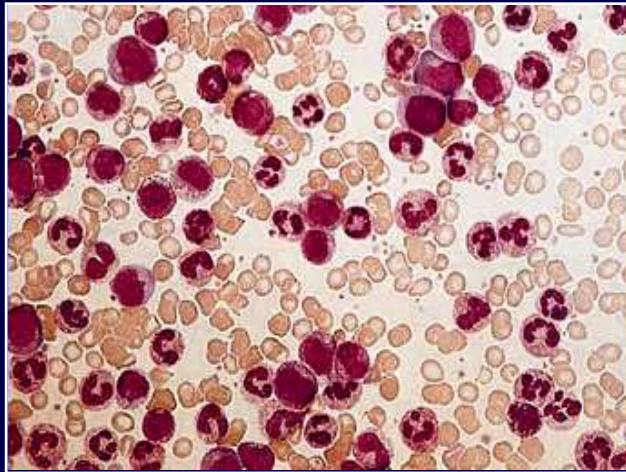


## Storia naturale della LMC: le 3 fasi

Fase cronica	Fase avanzata	
	Accelerata	Fase blastica
Soprav. media  4-6 anni	Soprav. media  sino a 1 anno	Soprav. media  3-6 mesi

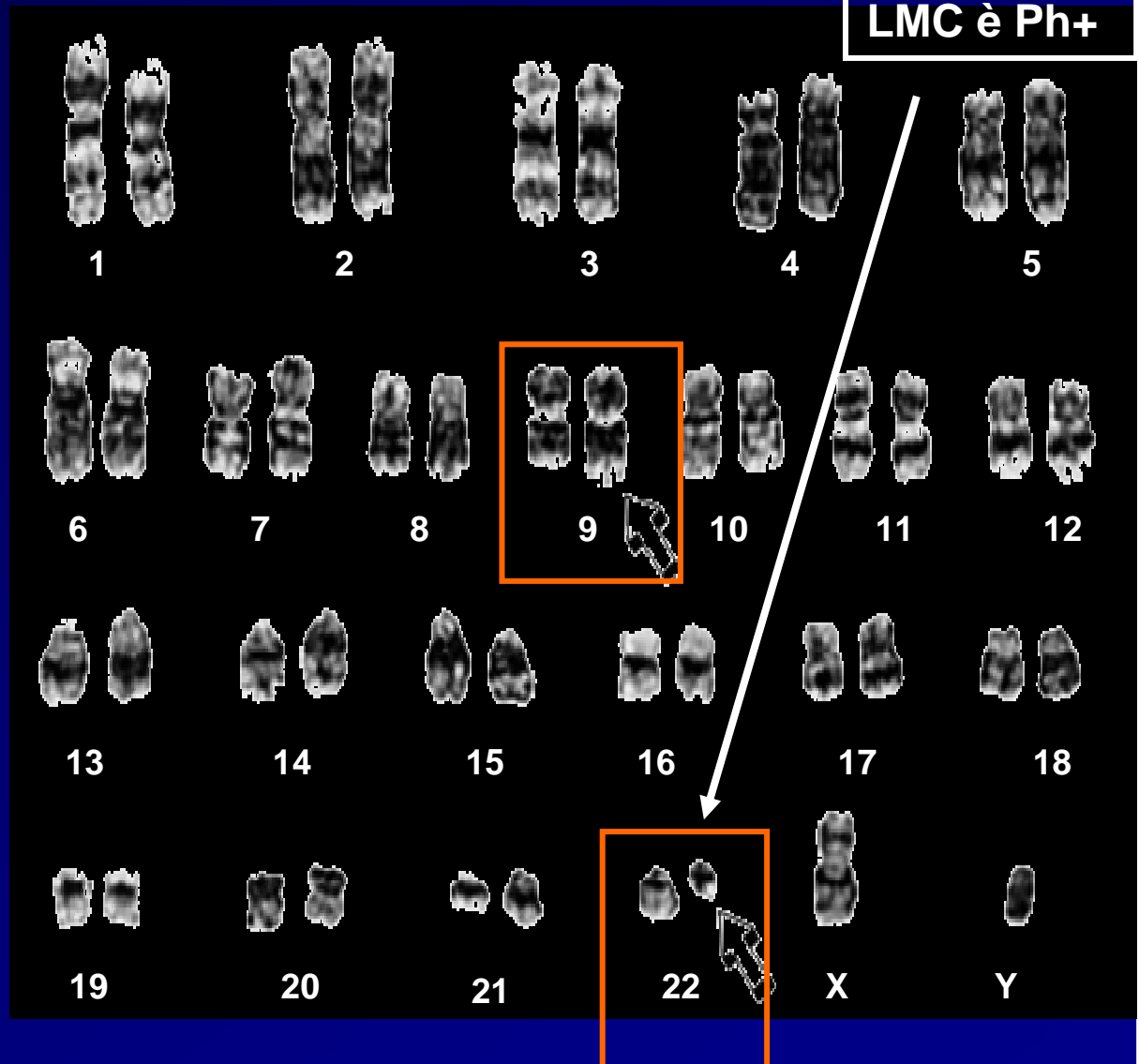


# Parlando di Leucemia Mieloide Cronica ...



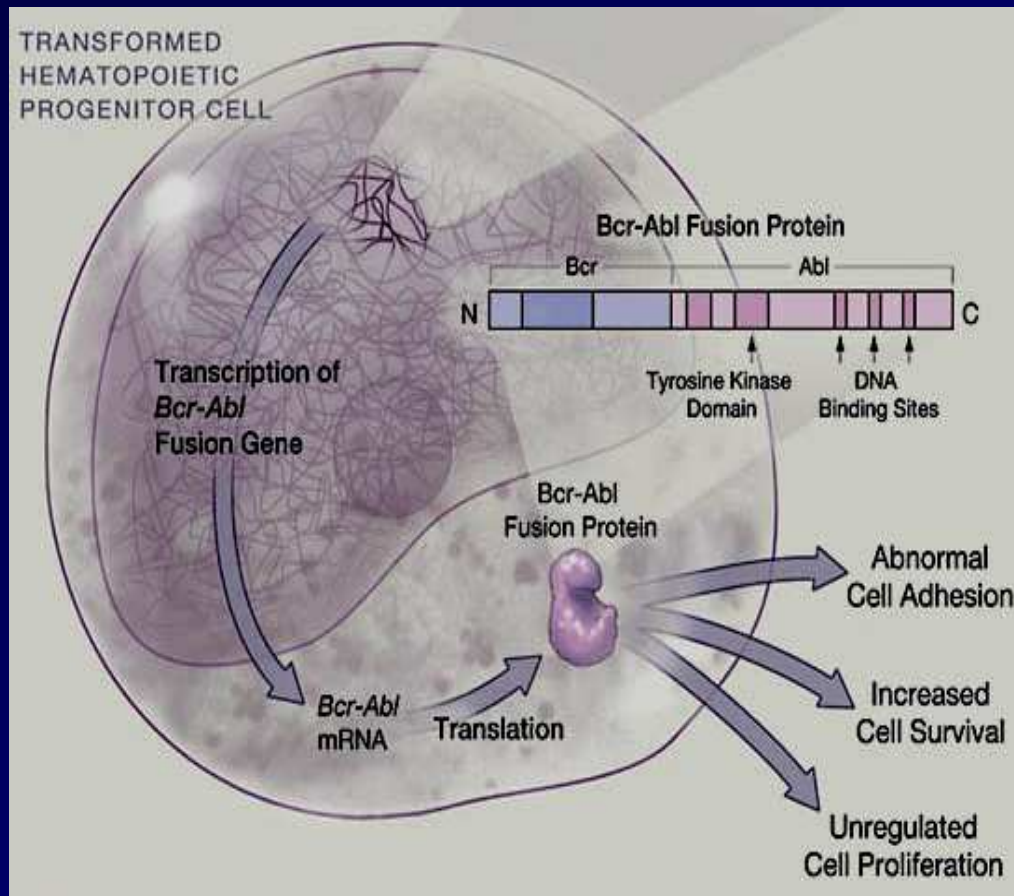
## Cromosoma Ph

95% delle  
LMC è Ph+



# Parlando di Leucemia Mieloide Cronica ...

## Il gene di fusione **BCR-ABL**



**PCR**

> 90% LMC Ph-  
è BCR-ABL+

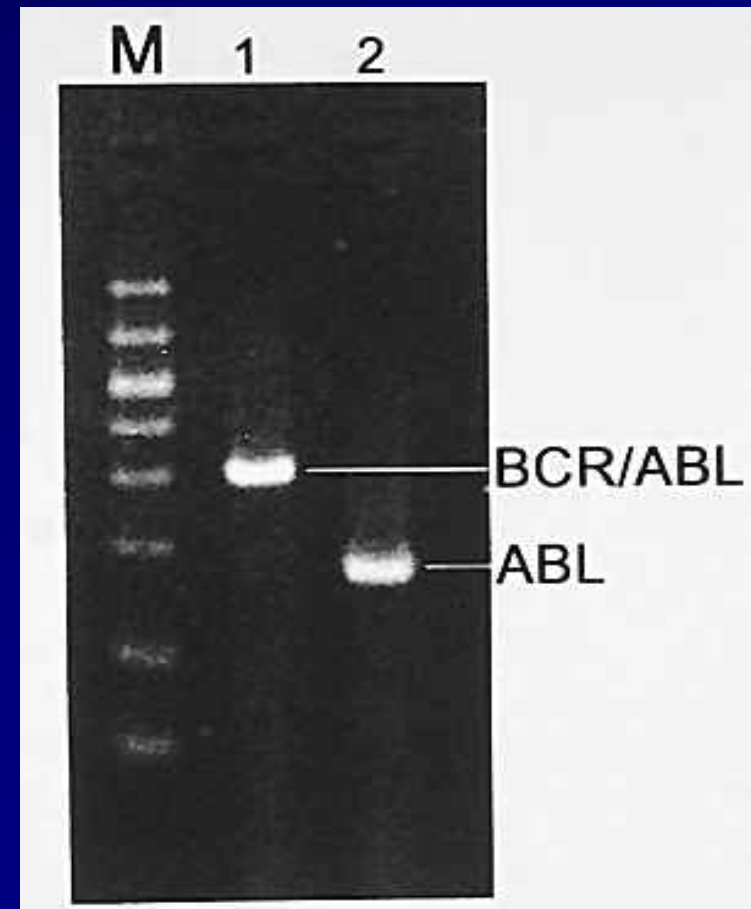
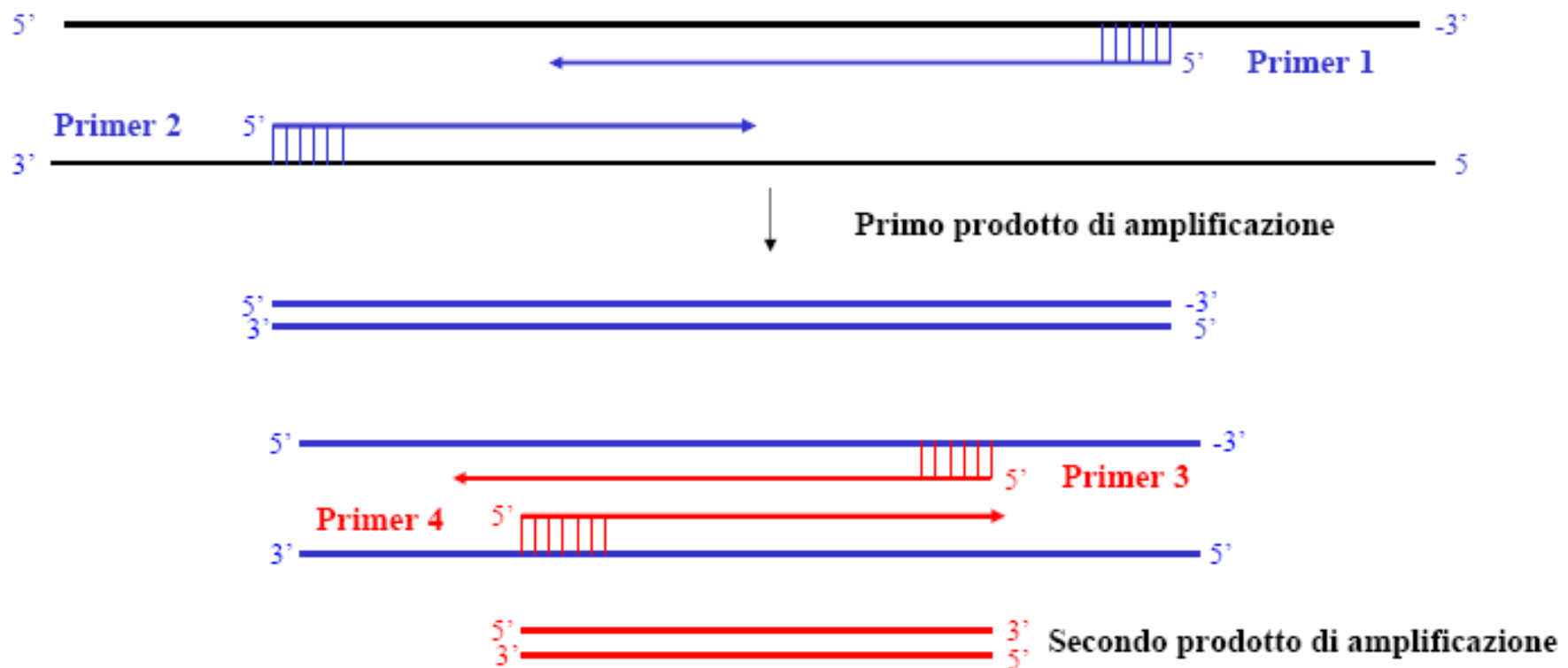


Image from:  
Kalidas M, Kantarjian H, Talpaz M.

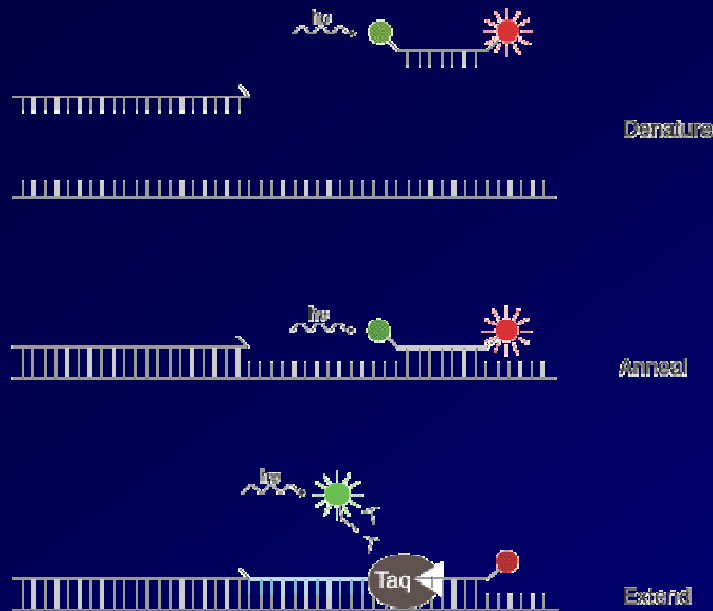
*JAMA*. 2001;286(8):895-898

## Nested PCR

La nested PCR è una variante della tecnica di PCR che consiste nello utilizzo di due coppie di primers, una esterna che genera un normale prodotto di PCR ed una coppia con primers all'interno del prodotto amplificato: Se il prodotto di amplificazione fosse aspecifico la seconda PCR non andrebbe a buon fine.



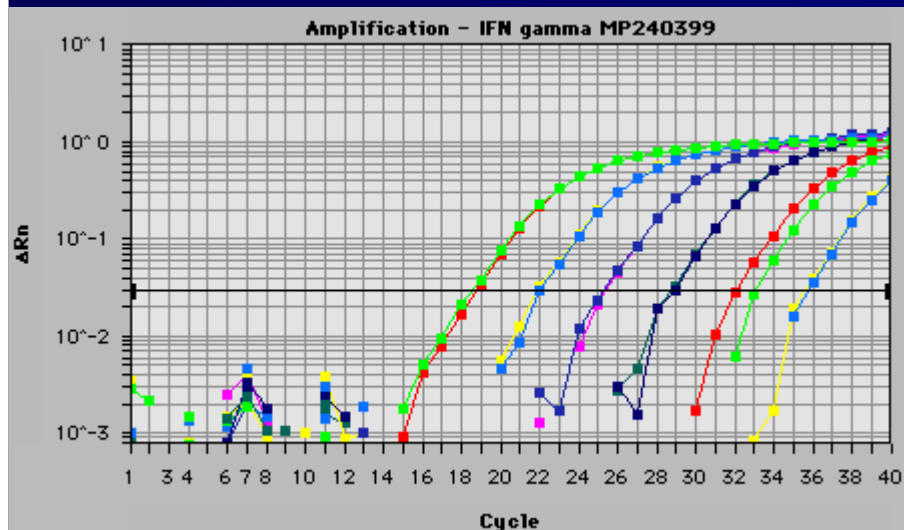
# RT- PCR o RQ- PCR (Real Time o Quantitative PCR)



Permette non solo la determinazione della presenza ma soprattutto la determinazione quantitativa dei prodotti generati da ciascun ciclo di PCR.

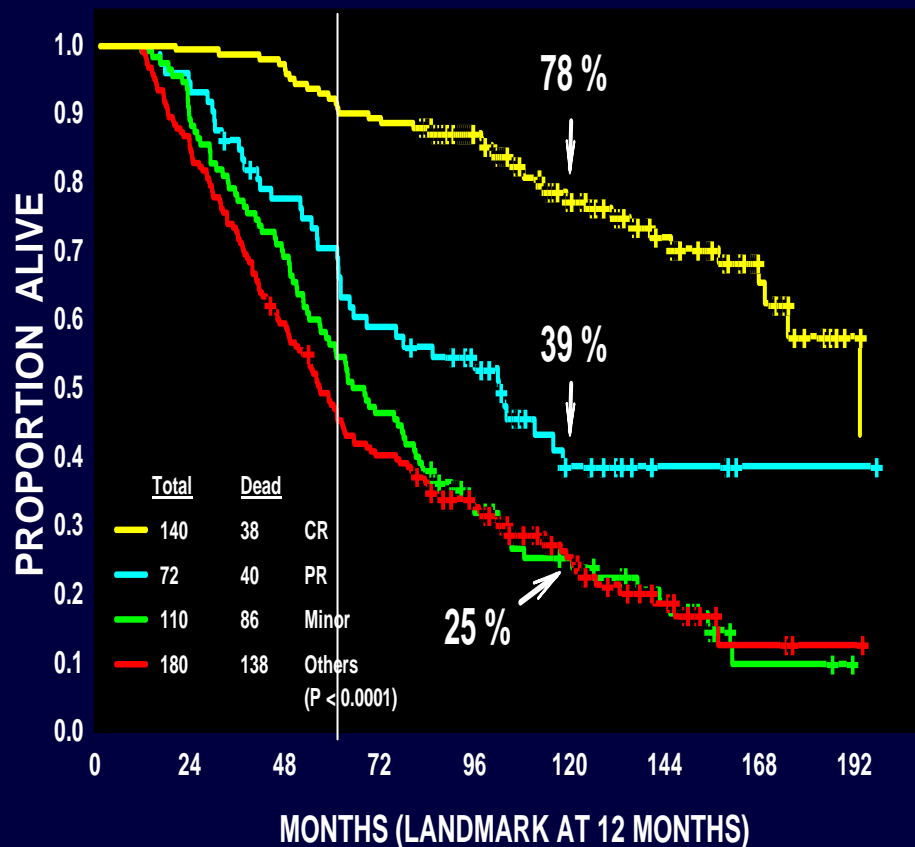
Sfrutta l'attività nucleasica 5'-3' della DNA polimerasi Taq per identificare e quantificare i prodotti specifici di PCR mentre la reazione procede.

Durante l'amplificazione viene degradata la sonda interna fluorogena specifica per la sequenza bersaglio e questo porta all'emissione di un segnale fluorescente, che si accumula durante la reazione.



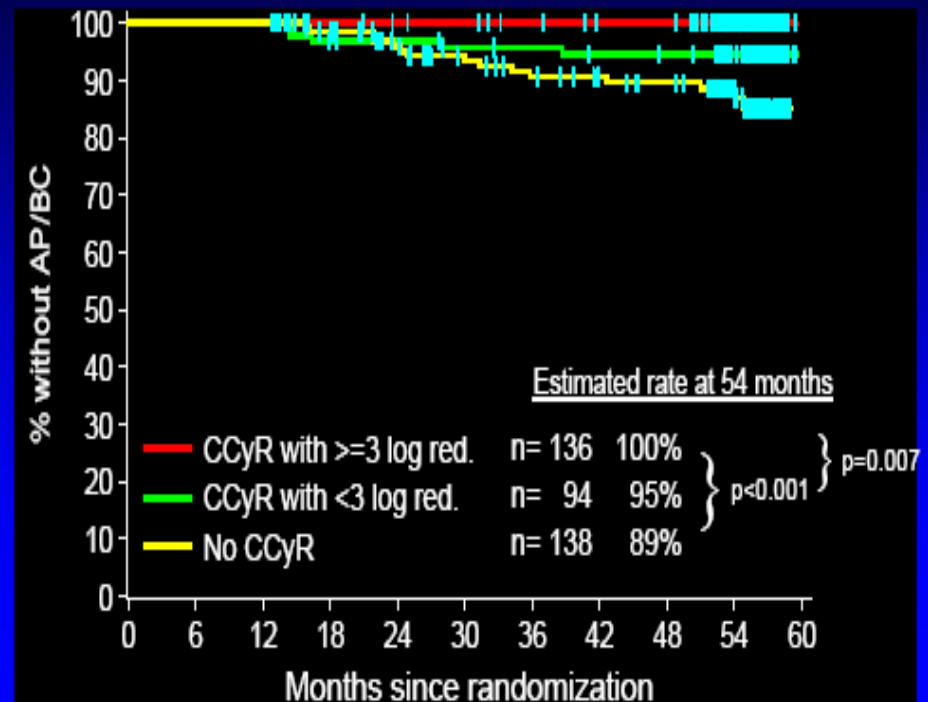
# Parlando di Leucemia Mieloide Cronica ...

## IFN $\alpha$ in CML Survival by CG Response



## Studio Iris (2007) (Imatinib)

### Survival Without AP/BC by Molecular Response at 12 months on First-line Imatinib

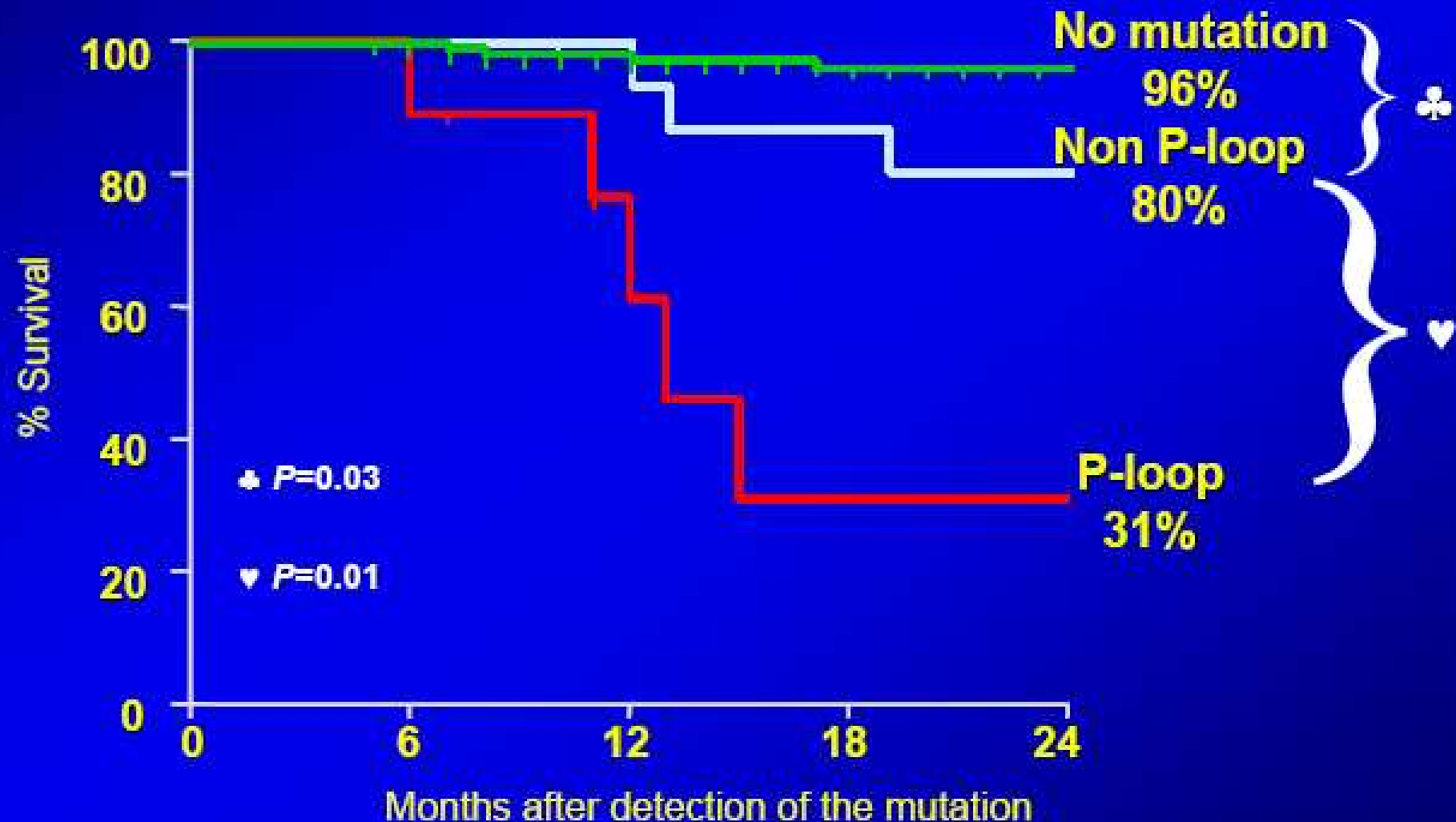


# Resistance Mechanisms

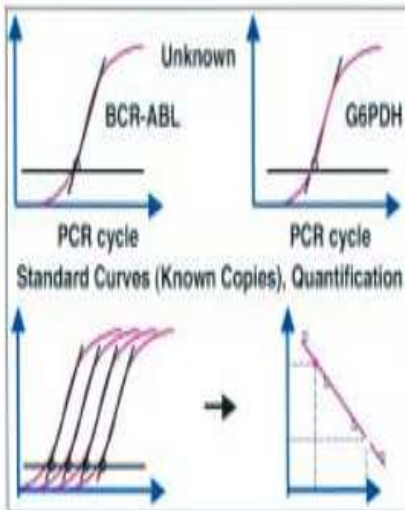
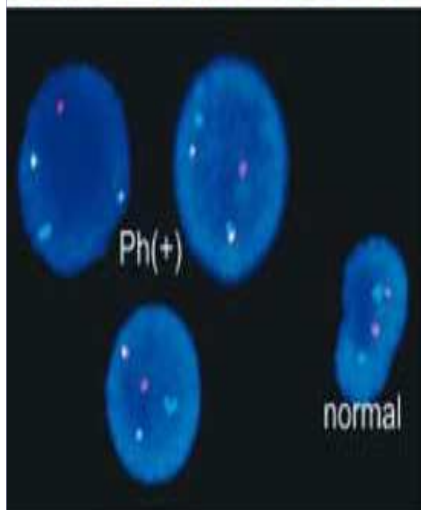
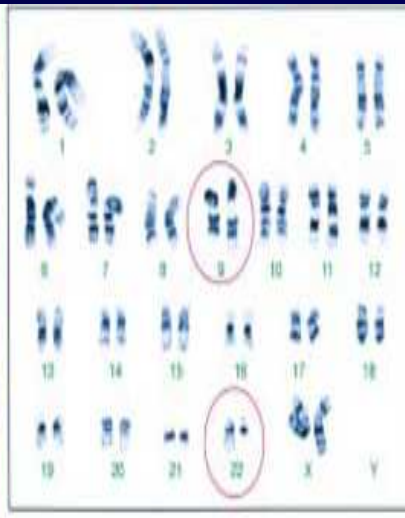
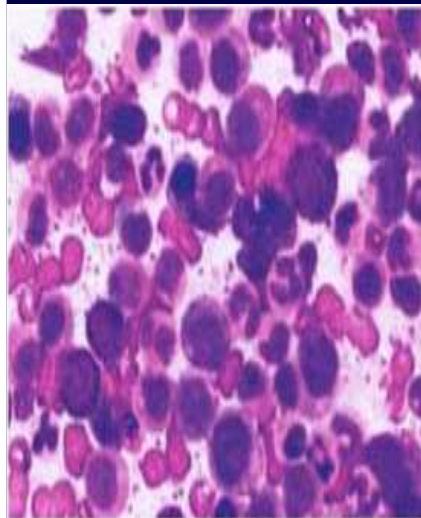
- Mutations in kinase domain (50-75% of relapse)
- Amplification of Bcr/Abl (10-20% of relapse)
- Mutations or activation of other genes (LYN)
- ABCB1, ABCG2, Oct-1, or other drug pumps



# Survival at 24 Months of Imatinib in 188 Chronic Phase Patients



# Parlando di Leucemia Mieloide Cronica ... Monitoraggio



Risposta ematologica	Risposta citogenetica	Risposta molecolare
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Emocromo</li> <li>• Striscio di sangue periferico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cariotipo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reazione quantitativa in tempo reale (RQ-PCR)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ibridizzazione <i>in situ</i> fluorescente (FISH)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reazione a catena della polimerasi a trascrittasi inversa (RT-PCR)</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Analisi mutazionale del gene BCR-ABL</i></li> </ul>

# Parlando di Leucemia Mieloide Cronica ...

## Monitoraggio

- Gli studi clinici ci hanno insegnato che è importante
  - la **qualità** della risposta ottenuta
  - il **tempo** per ottenere la risposta  
(impatto su PFS e Sopravvivenza)
- Esperti internazionali hanno definito il timing del monitoraggio, il peso della risposta e le indicazioni sulla gestione del paziente

# Raccomandazioni dell'ELN

dal 2006 al 2009

(1)

- Sono stati **rivisti** gli abstracts dei maggiori congressi e le pubblicazioni, sino al febbraio 2009
- Il **monitoraggio** si basa sulla valutazione delle risposte ematologica, citogenetica, molecolare
- Le **valutazioni prognostiche** e le raccomandazioni relative al **trattamento** si sono basate su dati disponibili di OS, EFS, PFS
- Le raccomandazioni sul **trattamento** considerano 3 TKIs
  - 1 linea: imatinib
  - 2 linea: nilotinib e dasatinib

# Nuove Raccomandazioni ELN

## Definizioni di risposta 2009 (2)

**FALLIMENTO** Il Pz deve passare ad altro trattamento, quando disponibile ed indicato.

**SUB-OTTIMALE** Il Pz potrebbe avere beneficio a lungo termine mantenendo il trattamento in atto ma le probabilità di un andamento ottimale sono ridotte. I Pz potrebbero essere avviati ad un diverso trattamento ma la condizione di risposta sub-ottimale è comunque transitoria.

**WARNING** Il Pz richiede un più stretto ed attento monitoraggio.

**OTTIMALE** Sulla base delle attuali conoscenze ed attese, questa condizione predice un' **aspettativa di vita normale**

Rosso indica le variazioni rispetto alle raccomandazioni 2006

Baccarani et al. JCO 2009

# Nuove Raccomandazioni ELN

## Definizione di risposta – 2009

(3)

	<b>RISPOSTA OTTIMALE</b>	<b>RISPOSTA SUBOTTIMALE</b>	<b>FALLIMENTO</b>	<b>WARNINGS (ALLERTA)</b>
<b>BASALE</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>	- Alto rischio - CCA/Ph+
<b>3 mesi</b>	- <b>CHR e almeno CyR Minore (Ph+ ≤ 65%)</b>	- <b>Non CyR (Ph+ &gt; 95%)</b>	- <b>Meno di CHR</b>	<b>NA</b>
<b>6 mesi</b>	- <b>Almeno PCyR (Ph+ ≤ 35%)</b>	- <b>Meno di PCyR (Ph+ &gt; 35%)</b>	- <b>Non CgR (Ph+ &gt; 95%)</b>	<b>NA</b>
<b>12 mesi</b>	- <b>CCyR</b>	- <b>PCyR (Ph+ 1-35%)</b>	- <b>Meno di PCyR (Ph+ &gt; 35%)</b>	- <b>Meno di MMoIR</b>
<b>18 mesi</b>	- <b>MMoIR</b>	- <b>Meno di MMoIR</b>	- <b>Meno di CCyR</b>	<b>NA</b>
<b>Sempre</b>	- <b>MMoIR stabile o in miglioramento</b>	- <b>Perdita di MMoIR - Mutazioni*</b>	- <b>Perdita di CHR - Perdita di CCgR - Mutazioni** - <b>CCA/Ph+</b></b>	- <b>Ogni incremento dei livelli di trascritto - CCA/Ph-</b>

In rosso le variazioni rispetto alle raccomandazioni del 2006

\*Poco sensibili ad imatinib; \*\* Insensibili ad imatinib

Baccarani et al. JCO 2009

# Nuove Raccomandazioni ELN

## Definizione di risposta - 2009

	<b>RISPOSTA OTTIMALE</b>	RISPOSTA SUBOTTIMALE	FALLIMENTO	WARNINGS (ALLERTA)
BASALE	NA	NA	NA	- Alto rischio - CCA/Ph+
3 mesi	- CHR e almeno - CyR Minore (Ph+ ≤ 65%)	- Non CyR (Ph+ > 95%)	- Meno di CHR	NA
6 mesi	- Almeno PCyR (Ph+ > 35%)	- Meno di PCyR (Ph+ > 35%)		NA
12 mesi	- CCyR (Ph+ 1-35%)	- Meno di CCyR (Ph+ 1-35%)		- Meno di MMoIR
18 mesi	- MMoIR	- Meno di MMoIR		NA
Sempre	- MMoIR o in miglioramento	- Perdita di MMoIR - Mutazioni		- Ogni incremento dei livelli di trascritto - CCA/Ph-
			- CCA/Ph+	

**Risposta citogenetica**

- Cariotipo

**Risposta ematologica**

- Emocromo
- Striscio di sangue periferico

In rosso le variazioni rispetto alle raccomandazioni del 2006

\*Poco sensibili ad imatinib; \*\* Insensibili ad imatinib

Baccarani et al. JCO 2009

# Nuove Raccomandazioni ELN

## Definizione di risposta - 2009

	<b>RISPOSTA OTTIMALE</b>	RISPOSTA SUBOTTIMALE	FALLIMENTO	WARNINGS (ALLERTA)
<b>BASALE</b>	NA	NA	NA	- Alto rischio - CCA/Ph+
3 mesi	- CHR e almeno - CyR Minore (Ph+ ≤ 65%)	- Non CyR (Ph+ > 95%)	- Meno di CHR	NA
6 mesi	- <b>Almeno PCyR</b> (Ph+ ≤ 35%)	- Meno di PCyR (Ph+ > 35%)	- Non CgR (Ph+ > 95%)	NA
12 mesi	- <b>CCyR</b>	- PCyR (Ph+ 1-35%)	- Meno di PCyR (Ph+ > 35%)	- Meno di MMoIR
18 mesi	- MMoIR	- Meno di MMoIR	- Meno di CCyR	NA
Sempre	- MMoIR stabile o in miglioramento	- Perdita di CHR - Mutazioni**	- Perdita di CHR - Perdita di CCgR - Mutazioni** - CCA/Ph+	MMoIR scritto

**Risposta citogenetica**

- Cariotipo

**Risposta Molecolare**

- Reazione quantitativa in tempo reale (RQ-PCR)

In rosso le variazioni rispetto alle raccomandazioni ELN 2006

\*Poco sensibili ad imatinib; \*\* Insensibili ad imatinib

Baccarani et al. JCO 2009



# Nuove Raccomandazioni ELN

## Definizione di risposta - 2009

	RISPOSTA OTTIMALE	RISPOSTA SUBOTTIMALE	FALLIMENTO	WARNINGS (ALLERTA)
BASALE	<b>Risposta molecolare</b>	NA	NA	- Alto rischio - CCA/Ph+
3 mesi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reazione quantitativa in tempo reale (RQ-PCR)</li> </ul>	- Non CyR (Ph+ > 95%)	<b>Risposta citogenetica</b>	NA
6 mesi		- Meno di PCyR (Ph+ > 95%)	<b>Cariotipo</b>	NA
12 mesi	- CCyR	- BCR-ABL/ABL < 0.1% (I.S.)	Meno di PCyR (Ph+ > 35%)	- Meno di MMoIR
18 mesi	- <b>MMoIR</b>	- Meno di MMoIR	- Meno di CCyR	NA
Sempre	- MMoIR stabile o in miglioramento	- Perdita di MMoIR - Mutazioni*	- Perdita di CHR - Perdita di CCgR - Mutazioni** - CCA/Ph+	- Ogni incremento dei livelli di trascritto - CCA/Ph-

In rosso le variazioni rispetto alle raccomandazioni del 2006

\*Poco sensibili ad imatinib; \*\* Insensibili ad imatinib

Baccarani et al. JCO 2009

# Nuove Raccomandazioni ELN

## Definizione di risposta - 2009

	<b>RISPOSTA OTTIMALE</b>	RISPOSTA SUBOTTIMALE	FALLIMENTO	WARNINGS (ALLERTA)
<b>BASALE</b>	NA	NA	NA	- Alto rischio - CCA/Ph+
3 mesi	- CHR e almeno - CyR Minore (Ph+ ≤ 65%)	- Non CyR (Ph+ > 95%)	- Non CyR (Ph+ > 95%)	
6 mesi	- Almeno PCyR (Ph+ ≤ 35%)	- Meno di PCyR (Ph+ > 35%)	- Meno di PCyR (Ph+ > 35%)	
12 mesi	- CCyR	- PCyR (Ph+ 1-35%)	- Meno di PCyR (Ph+ > 35%)	- M
18 mesi	- MMoIR	- Meno di MMoIR	- Meno di CCyR	NA
<b>Sempre</b>	- <b>MMoIR stabile o in miglioramento</b>	- Perdita di MMoIR - Mutazioni*	- Perdita di CHR - Perdita di CCyR - Mutazioni** - <b>CCA/Ph+</b>	- Ogni incremento dei livelli di trascritto - CCA/Ph-

**Risposta citogenetica**

- **Cariotipo**

**Ricerca mutazioni di ABL**

- **Sequenziamento**

In rosso le variazioni rispetto alle raccomandazioni del 2006

\*Poco sensibili ad imatinib; \*\* Insensibili ad imatinib

Baccarani et al. JCO 2009

# Nuove Raccomandazioni ELN

## Trattamento LMC in fase cronica

1 <sup>a</sup> Linea Tutti i pazienti	<ul style="list-style-type: none"><li>• Imatinib 400 mg al dì</li></ul>
2 <sup>a</sup> Linea Intolleranti ad imatinib	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dasatinib o Nilotinib</li></ul>
2 <sup>a</sup> Linea Risposta sub-ottimale ad imatinib	<ul style="list-style-type: none"><li>• Possono continuare con imatinib, dose invariata o incrementata</li><li>• possono essere elegibili per dasatinib or nilotinib</li></ul>
2 <sup>a</sup> Linea Fallimento in imatinib	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dasatinib o Nilotinib</li><li>• <b>In caso di progressione a fase accelerata o blastica o se comparsa di mutazione T315I: alloHSCT</b></li></ul>
3 <sup>a</sup> Linea Risposta sub-ottimale a dasatinib o nilotinib	<ul style="list-style-type: none"><li>• Continuano nilotinib o dasatinib</li><li>• <b>considerare alloHSCT se warning</b> (precedente resistenza ematologica ad imatinib, mutazioni) <b>o rischio trapiantologico: score <math>\leq 2</math></b></li></ul>
3 <sup>a</sup> Linea Fallimento in dasatinib o nilotinib	<ul style="list-style-type: none"><li>• AlloHSCT</li></ul>

# Goals nel trattamento della LMC

## in fase cronica

- **Risposta ematologica completa (CHR), risposta citogenetica completa (CCyR), risposta molecolare maggiore (MMoIR)**
- **Normale aspettativa di vita e normale qualità di vita**
- **Possibilità di procreazione sicura**
- **Sospensione del trattamento (?)**