



INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO-TERAPEUTICO DELLA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

Gruppo di Studio "Sindromi Mieloproliferative Ph+ e Ph- 2019"

Coordinatrici: Rege Cambrin Giovanna, Pregno Patrizia

Componenti Gruppo di Studio che hanno approvato il documento:

Pregno Patrizia, Rege Cambrin Giovanna, Aguzzi Chiara, Ardizzone Fabio, Beggiato Eloise, Beltrami Germana, Benevolo Giulia, Bergamaschi Micaela, Biale Lucia, Bruno Benedetto, Busca Alessandro, Cametti Giovanni, Campana Silvia, Castelli Andrea, Cerrano Marco, Cilloni Daniela, Corsetti Maria Teresa, Crisà Elena, Cuttica Alessandra, Dragani Matteo Emidio, Fava Carmen, Festuccia Moreno Benedetto, Ferrero Dario, Fizzotti Marco, Foli Cristina, Francia Di Celle Paola, Gai Valentina, Godio Laura, Gottardi Enrico, Manzin Paola, Marchetti Monia, Mattei Daniele, Nicolosi Maura, Pagliaro Maria, Patriarca Andrea, Pich Achille, Rapezzi Davide, Riera Ludovica, Soglio Giuseppe, Sciancalepore Patrizia, Serra Anna, Vaccarino Antonella

INTRODUZIONE

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è un disordine clonale della cellula staminale. La classificazione della WHO del 2008, (Vardiman et al. Blood 2009) rivista nel 2014, la colloca all'interno delle neoplasie mieloproliferative BCR-ABL1 positive.

E' una malattia neoplastica relativamente rara con un'incidenza di circa 1-2 casi/100.000 abitanti/anno. L'età mediana è di circa 55 anni, circa il 30% dei pazienti si presenta con >60 anni, ma esistono casi ad insorgenza giovanile.

La patogenesi della malattia è da ricondurre ad un'anomalia clonale della cellula staminale che si manifesta con un'eccessiva proliferazione dei precursori mieloidi nel midollo osseo, dovuta ad un'acquisita anomalia cromosomica, il cromosoma Philadelphia (Ph'), presente nel 95% dei casi di LMC.

Il cromosoma Ph' è il risultato della traslocazione bilanciata tra il gene Abelson (ABL1) dal cromosoma 9 ad una regione del cromosoma 22 definita breakpoint cluster region (BCR).

Pertanto, il risultato della traslocazione t(9;22) (q34;q11.2) è la proteina di fusione BCR-ABL1 con un'attività tirosin-chinasica, ereditata da ABL1, costitutiva, quindi non più regolata.

Si conoscono due forme differenti della proteina a seconda del suo peso molecolare, p210 (b3a2, b2a2) e p190 (e1a2). Il BCR-ABL1 è una tirosin-chinasi citoplasmatica che determina un'alterazione della proliferazione, dell'apoptosi e dell'adesione cellulare delle cellule neoplastiche. Il clone leucemico si sostituisce gradualmente alle cellule sane coinvolte.

Nei casi di LMC in cui non si osserva il cromosoma di Philadelphia, circa il 5% del totale, è possibile dimostrare con tecniche di biologia molecolare la presenza del gene di fusione BCR-ABL1.

La presenza della di tale alterazione molecolare differenzia la LMC dalle Malattie mieloproliferative Ph negative. Esistono rari casi di leucemia neutrofilica e LMC Ph' negativa.

Table 1. World Health Organization classification of myeloid malignancies

| |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Acute myeloid leukemia (AML) and related precursor neoplasms^a 2. Myeloproliferative neoplasms (MPN) <ol style="list-style-type: none"> 2.1. Chronic myelogenous leukemia, <i>BCR-ABL1</i> positive (CML) 2.2. Polycythemia vera (PV) 2.3. Primary myelofibrosis (PMF) 2.4. Essential thrombocythemia (ET) 2.5. Chronic neutrophilic leukemia (CNL) 2.6. Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified (CEL-NOS) 2.7. Mastocytosis 2.8. Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable (MPN-U) 3. Myelodysplastic syndromes (MDS) <ol style="list-style-type: none"> 3.1. Refractory cytopenia^b with unilineage dysplasia (RCUD) <ol style="list-style-type: none"> 3.1.1. Refractory anemia (ring sideroblasts < 15% of erythroid precursors) 3.1.2. Refractory neutropenia 3.1.3. Refractory thrombocytopenia 3.2. Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS; dysplasia limited to erythroid lineage and ring sideroblasts \geq 15% of bone marrow erythroid precursors) 3.3. Refractory cytopenia with multi-lineage dysplasia (RCMD; ring sideroblast count does not matter) 3.4. Refractory anemia with excess blasts (RAEB) <ol style="list-style-type: none"> 3.4.1. RAEB-1 (2–4% circulating or 5–9% marrow blasts) 3.4.2. RAEB-2 (5–19% circulating or 10–19% marrow blasts or Auer rods present) 3.5. MDS associated with isolated del(5q) 3.6. MDS, unclassifiable (MDS-U) 4. MDS/MPN overlap <ol style="list-style-type: none"> 4.1. Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) 4.2. Atypical chronic myeloid leukemia, <i>BCR-ABL1</i> negative (aCML) 4.3. Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) 4.4. MDS/MPN, unclassifiable (MDS/MPN-U) <ol style="list-style-type: none"> 4.4.1. Provisional entity: Refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T) 5. Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i> or <i>FGFR1</i>^c <ol style="list-style-type: none"> 5.1. Myeloid and lymphoid neoplasms with <i>PDGFRA</i> rearrangement 5.2. Myeloid neoplasms with <i>PDGFRB</i> rearrangement 5.3. Myeloid and lymphoid neoplasms with <i>FGFR1</i> abnormalities |
|--|

Il quadro clinico della LMC è costituito prevalentemente da splenomegalia, leucocitosi, e piastrinosi, a volte anche di notevole entità, con o senza anemia, cui si associa un corollario di sintomi aspecifici quali astenia, tensione addominale, senso di ripienezza precoce, artralgie, mialgie ed in alcuni casi calo ponderale.

Se non trattata, è caratterizzata da un **decorso clinico ad esito infausto** nell'arco di pochi anni. Nella fase iniziale della malattia, detta **fase cronica**, le cellule leucemiche tendono a crescere di numero con aumento del numero dei globuli bianchi nel sangue periferico a diverso grado maturativo e del volume della milza, ma conservano la capacità di maturare e di produrre cellule del sangue mature.

Durante questa fase il controllo della malattia è abbastanza agevole.

Dopo un periodo di tempo variabile, anche di qualche anno, fa seguito una seconda fase, detta **fase accelerata**, in genere della durata di mesi o pochi anni, in cui la malattia diventa più aggressiva e che, se non curata, inevitabilmente evolve nella **fase blastica**, in cui le cellule neoplastiche perdono la capacità di maturare e la malattia assume le caratteristiche di una leucemia acuta.

Table 1. List of the criteria for the definition of AP and BP, as recommended by ELN^{4,5} and by the World Health Organization⁶

| Accelerated phase | Definition |
|--------------------|---|
| ELN criteria | Blasts in blood or marrow 15-29%, or blasts plus promyelocytes in blood or marrow >30%, with blasts <30% Basophils in blood $\geq 20\%$ Persistent thrombocytopenia ($< 100 \times 10^9/L$) unrelated to therapy Clonal chromosome abnormalities in Ph+ cells (CCA/Ph+), major route, on treatment |
| WHO criteria | Blasts in blood or marrow 10-19% Basophils in blood $\geq 20\%$ Persistent thrombocytopenia ($< 100 \times 10^9/L$) unrelated to therapy CCA/Ph+ on treatment Thrombocytosis ($> 1000 \times 10^9/L$) unresponsive to therapy Increasing spleen size and increasing white blood cell count unresponsive to therapy |
| Blast phase | |
| ELN criteria | Blasts in blood or marrow $\geq 30\%$ Extramedullary blast proliferation, apart from spleen |
| WHO criteria | Blasts in blood or marrow $\geq 20\%$ Extramedullary blast proliferation, apart from spleen Large foci or clusters of blasts in the bone marrow biopsy |

The ELN criteria are those that were used in all main studies of TKI. The use of TKI may require a change of the boundaries between CP, AP, and BP and modify to some extent the classic subdivision of CML in 3 phases, but the data are not yet sufficient for a revision.

CCA/Ph+, clonal chromosome abnormalities in Ph+ cells.

La **diagnosi** di LMC viene effettuata nell'85% dei casi durante fase cronica della malattia, molto più raramente nelle fasi accelerata e blastica.

L'**emocromo** mostra quasi sempre un aumento anche notevole del numero dei globuli bianchi a diverso grado di maturazione e a volte, un aumento del numero delle piastrine o una lieve anemia. In caso di sospetto diagnostico, è necessario l'esame microscopico dello striscio di sangue periferico ed un prelievo di aspirato midollare.

La diagnosi deve essere confermata dalla presenza del caratteristico cromosoma di Ph' all'analisi del **cariotipo** e/o dalla dimostrazione della presenza del gene di fusione BCR-ABL1 tramite tecniche di **biologia molecolare**.

La malattia può essere stratificata in tre classi di rischio (basso, intermedio ed alto) ad evolvere nelle fasi più avanzate di malattia, studiate da Sokal et al. (Sokal et al. Blood 1994) valutando alla diagnosi: età, splenomegalia, n° di piastrine e percentuale di blasti nel sangue periferico (4).

Le ELN 2013 pubblicate da Baccarani et al. (Baccarani et al, European LeukemiaNet, Blood 2013) hanno definito bene le risposte ematologica, citogenetica e molecolare e soprattutto i criteri di risposta ottimale, "warning" e "failure" e i tempi per ottenere ciascuna di esse.

Il trattamento della LMC ha subito nel corso del tempo notevoli cambiamenti, iniziando dalla somministrazione di Idrossiurea (HU) e Busulfano (BU), passando all'Interferon (INF), per giungere alla fine degli anni 90' agli inibitori di tyrosin-chinasi (TKIs), il cui capostipite, l'Imatinib (IMA), ne ha rivoluzionato la storia come primo esempio di "target therapy".

Successivamente sono stati studiati ed immessi nel commercio TKIs di II generazione Nilotinib (NIL), Dasatinib (DAS), Bosutinib (BOS) e di III generazione Ponatinib (PON). Ad oggi i TKIs rappresentano la terapia standard della LMC in fase cronica di malattia, perché consentono di ottenere ottimi risultati in termini di risposta ematologica, citogenetica e molecolare.

Criteri e requisiti minimi

La **diagnosi** di LMC richiede la valutazione dei seguenti fattori: morfologia, caratteristiche molecolari, citogenetiche, informazioni cliniche e di laboratorio secondo le ELN 2013 e WHO 2016. Da ciò consegue che la diagnosi e la gestione del paziente devono essere eseguite da centri con particolare expertise.

Requisiti richiesti:

- Competenze per eseguire l'analisi morfologica dell'aspirato midollare e Servizio di Anatomia Patologica di riferimento in grado di eseguire l'analisi della Biopsia osteomidollare con esperienza nella diagnostica dei disordini mieloproliferativi.
- Servizio di citogenetica di riferimento in grado di eseguire le indagini per la ricerca del cromosoma Ph' secondo le ELN 2013. In Piemonte e Valle d'Aosta: Alessandria, Cuneo, Torino, Orbassano, Novara; in Liguria Policlinico San Martino.
- Servizio di biologia molecolare di riferimento per la ricerca ed il monitoraggio del riarrangiamento BCR-ABL1 secondo i criteri LabNet. I laboratori attualmente accreditati Labnet sono: in Piemonte e Valle d'Aosta A.O.U Città della Salute e della Scienza di Torino, Osp San Luigi di Orbassano, Ospedale Maggiore della carità di Novara e in Liguria Policlinico San Martino di Genova.
- Servizio di biologia molecolare di riferimento per la ricerca delle mutazioni del gene BCR-ABL1 (rete LabNet).

PERCORSO DIAGNOSTICO PER PAZIENTI CON SOSPETTA LMC

ESAMI DI I LIVELLO

- **VISITA:**
 - Anamnesi patologica remota e prossima, familiare (soprattutto riguardo patologie cardiovascolari), abitudini di vita (fumo, alcool, attività fisica)
 - Esame obiettivo con valutazione epatosplenica comprensivo della valutazione dei polsi periferici e della pressione arteriosa
 - Calcolo BMI
- **EMATOCHIMICI INDISPENSABILI:**
 - Emocromo con formula (eseguita al microscopio)
 - Funzionalità renale ed epatica

- Acido urico
- Glicemia a digiuno
- LDH

➤ **RICERCA RIARRANGIAMENTO BCR-ABL1 SU SANGUE PERIFERICO:**

- Fish e/o Ricerca qualitativa (opzionale l'analisi quantitativa) del trascritto BCR-ABL1, secondo le indicazioni riportate sulle R.I.L. del network CML LabNet.

ESAMI DI II LIVELLO

➤ **EMATOCHIMICI :**

- VES, PCR,
- Quadro proteico elettroforetico,
- Pannello virologico comprensivo di HBsAg, anti HBsAb, anti HBcAb, HBV DNA (solo in chi è anti HBc Ab pos), HCV, HIV
- PT, aPTT, Fibrinogeno, ATIII, D-Dimero
- Test di gravidanza se applicabile

➤ **DIAGNOSI MORFOLOGICA, CITOGENETICA E DI BIOLOGIA MOLECOLARE SU ASPIRATO MIDOLLARE:**

- Aspirato midollare con analisi morfologica ed indagini di citogenetica convenzionale o FISH in assenza di metafasi e biologia molecolare qualitativa (opzionale l'analisi quantitativa) secondo le indicazioni riportate sulle R.I.L. del network CML LabNet.
- Biopsia osteomidollare (non obbligatoria, consigliata se trombocitosi e/o segni di displasia).
- Analisi mutazionale in pazienti alla diagnosi solo in fase accelerata o in crisi blastica.

➤ **ESAMI RADIOLOGICI:**

- Rx torace standard in 2p
- Ecografia addome superiore ed inferiore
- ECG ed Ecocardiografia

INQUADRAMENTO CLINICO PRETERAPIA

Accertamenti opzionali sulla base del quadro clinico alla diagnosi e delle comorbidità:

- Ormoni tiroidei,
- Hb glicata
- Assetto lipidico completo (trigliceridi, colesterolo totale, HDL e LDL)
- Spirometria
- Valutazione cardiologica specialistica
- Esecuzione doppler TSA e arterioso AAII
- Screening trombofilico in caso di anamnesi positiva in età giovani
- Ulteriori accertamenti aggiuntivi e valutazione interdisciplinare in presenza di comorbidità a seconda dell'organo coinvolto (rene, fegato, polmone, sistema endocrino)

PERCORSO TERAPEUTICO PER PAZIENTI AFFETTI DA LMC

I pazienti con LMC, alla diagnosi, vengono classificati in tre categorie di rischio: alto, intermedio e basso rischio, secondo i rischi SOKAL, HASFORD EUTOS e ELTS (Sokal JE et al. Blood 1984; Hasford J et al. J Nat Canc Inst.1998; Hasford J et al. Blood 2011; Pfirrmann M et al. Leukemia. 2016). Il rischio Sokal ed Hasford valutano il rischio di evoluzione di malattia, il rischio Eutos prende maggiormente in considerazione la probabilità di ottenere una CCyR a 18 mesi, mentre il rischio ELTS calcola la probabilità di decesso a causa della LMC. In tutti gli scores vengono prese in considerazione variabili differenti. Nella pratica clinica, attualmente, il rischio Sokal è il più utilizzato; tuttavia lo score ELTS è maggiormente predittivo pertanto si suggerisce anche la valutazione secondo tale score.

La storia della Leucemia Mieloide Cronica è drammaticamente cambiata grazie all'introduzione intorno agli anni 90 degli Inibitori della Tirosin Kinasi, farmaci in grado di bloccare l'attivazione costitutiva del BCR-ABL1. Le raccomandazioni dell'European Leukemia Net ELN2013 pubblicate nel 2013 da Baccarani et al. definiscono quali siano i criteri di risposta alla terapia e i tempi per raggiungerla. Definiscono inoltre come utilizzare i TKIs nelle varie linee di terapia.

Rischio Sokal, Eutos, Hasford, ELTS

| SCORE | VARIABILI e CALCOLO | CLASSE DI RISCHIO |
|----------------|--|-----------------------------|
| Sokal | $[0.0116x (\text{età} - 43.4)] +$ | Basso <0.8 |
| | $0.0345 x (\text{milza} - 7.51) +$ | Intermedio $0.8-1.2$ |
| | $0.188 x [(n^\circ \text{piastrine} + 700)^2 - 0.563] +$ | Alto >1.2 |
| | $0.0887 x \text{blasti} - 2.10)$ | |
| Eutos | Milza x 4+ basofili x 7 | Basso ≤ 87 |
| | | Alto >87 |
| Hasford | 0.666 se età ≥ 50 altrimenti 0 + | Basso < 780 |
| | $0.042 x \text{milza (cm dal margine costale) +}$ | Intermedio $780-1480$ |
| | 1.0956 se $n^\circ \text{plts} > 1500.000$ altrimenti 0+ | Alto rischio > 1480 |
| | $0.0584 x \text{blasti(\% in SVP)+}$ | |
| | $0.20399 \text{ se basofili} > 3\% (\text{ SVP }) \text{ altrimenti } 0+$ eosinofili (SVP) x 100 | |
| ELTS | $0.0025 x (\text{età}/10)^3$ | Basso ≤ 1.5680 |
| | $+ 0.0615 x \text{milza (cm dal margine costale)}$ | Intermedio $1.5680- 2.2185$ |
| | $+ 0.1052 x x \text{blasti(\% in SVP)}$ | alto >2.2185 |
| | $+ 0.4104 x (n^\circ \text{piastrine} /1000)^{-0.5}$ | |

- SVP: sangue venoso periferico
- Sokal JE et al. Blood 1984; Hasford J et al. J Nat Canc Inst.1998;Hasford J et al. Blood 2011; Pffirmann M et al. Leukemia. 2016

TERAPIA

LMC in fase cronica

La terapia della LMC si basa attualmente sull'uso dei farmaci inibitori delle tirosin-chinasi (TKI) di prima (Imatinib), seconda (Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib) e terza generazione (Ponatinib).

La presenza di comorbidità, attentamente valutate, suggerisce cautela nell'utilizzo di:

- IMATINIB in caso di insufficienza renale o scompenso cardiaco non controllato
- NILOTINIB in caso di Patologie ischemiche cardiovascolari rilevanti e diabete mellito scarsamente controllato
- DASATINIB in caso di Patologie respiratorie rilevanti, ipertensione polmonare e sanguinamenti gastroenterici
- BOSUTINIB in caso di insufficienza renale
- PONATINIB in caso di Patologie cardiovascolari.

Le dosi dei farmaci possono essere modulate sulla base dell'efficacia e della tolleranza e/o tossicità. Relativamente alla gestione delle tossicità in corso di terapia si rimanda alle linee guida NCCN, ELN e alle schede tecniche dei singoli farmaci.

TERAPIA DI I° LINEA

- a) IMATINIB o NILOTINIB o DASATINIB
- b) IDROSSIUREA da utilizzare come pretrattamento nei pazienti iperleucocitosici prima dell'inizio del TKI ed in casi selezionati in cui sia comunque controindicato l'utilizzo di tutti i TKI.

TERAPIA DI II° LINEA

Prima di cambiare terapia in caso di FALLIMENTO occorre prendere in considerazione:

- l'aderenza al trattamento da parte del paziente
- ricerca delle mutazioni. Se positiva, il tipo di mutazione può indirizzare la scelta del farmaco: vi sono specifiche tabelle da consultare.

Particolare attenzione va posta nei pazienti con criteri di risposta “warning” secondo le ELN 2013, che richiedono uno stretto monitoraggio.

In caso di intolleranza cambio di terapia se:

1. Tossicità di gradi III-IV CTCE extraematologica con evidenza di danno permanente
2. Tossicità di gradi III-IV CTCE extraematologica senza danno permanente: provare a sospendere il farmaco, si potrà riprendere poi il farmaco se la tossicità sarà tornata di grado 1, ripartendo da dosaggio ridotto, aumentando gradualmente al posologia sulla base della risposta
3. Tossicità di grado I-II CTCE se prolungata nel tempo e sulla base della risposta al trattamento e del tipo di intolleranza che condizioni la QoL.

In generale: qualsiasi altro TKIs approvato per la I° linea ma non precedentemente utilizzato.

Per ulteriori dettagli fare riferimento alle schede tecniche dei singoli farmaci.

- a) Fallimento dopo IMATINIB: in base a età/ comorbilità/mutazioni → NILOTINIB O DASATINIB o PONATINIB o BOSUTINIB; Valutazione TRAPIANTO
- b) Fallimento dopo NILOTINIB: In base a età/comorbilità/mutazioni → DASATINIB o PONATINIB o BOSUTINIB; Valutazione TRAPIANTO
- c) Fallimento dopo DASATINIB: in base a età/ comorbilità/mutazioni → NILOTINIB o PONATINIB o BOSUTINIB; Valutazione TRAPIANTO
- d) Il cambio a PONATINIB è mandatorio in caso di positività per la mutazione T315I.

TERAPIA DI III° LINEA

Da utilizzare a causa di fallimento o intolleranza alla II° linea:

- INIBITORI NON UTILIZZATI IN PRECEDENZA E VALUTAZIONE TRAPIANTO ALLOGENICO IN PAZIENTI ELEGGIBILI.

PONATINIB : IN QUALSIASI LINEA IN BASE ALLA PRESENZA DELLA MUTAZIONE T315.

TRAPIANTO ALLOGENICO

LMC IN FASE ACCELERATA

- IMATINIB o NILOTINIB o DASATINIB o BOSUTINIB o PONATINIB

LMC in fase blastica

- IMATINIB o DASATINIB o BOSUTINIB o PONATINIB

Alla diagnosi: l'obiettivo è quello di ottenere il ritorno in fase cronica se possibile con un inibitore di II generazione o Ponatinib in presenza di mutazione T315I e se candidabile avviare il paziente a trapianto allogenico.

Come progressione dopo terapia con TKI:

TKI non precedentemente utilizzati e se candidabile avviare il paziente a trapianto allogenico.

Il ruolo della chemioterapia è incerto e può essere utilizzata in casi selezionati.

Indicazioni al trapianto nella LMC

Negli anni è cambiato l'approccio trapiantologico al trattamento della leucemia mieloide cronica.

Occorre prendere in considerazione:

1) l'esecuzione di una tipizzazione HLA nel paziente e nei fratelli può trovare indicazione nei pazienti giovani ad alto rischio affetti da LMC in fase cronica alla diagnosi e/o con anomalie citogenetiche clonali aggiuntive. Trova senz'altro indicazione nel caso di fallimento a > due linee di terapia con TKIs.

La ricerca di un donatore familiare o volontario può essere presa in considerazione in caso di fallimento in prima linea di inibitori di seconda generazione.

In caso di LMC in fase accelerata o blastica o in caso di mutazioni T315I è fortemente consigliata la ricerca di un donatore HLA familiare o volontario.

2) l'indicazione al trapianto allogenico è da prendere in considerazione quando sussistano donatori compatibili nei casi di LMC in fase cronica con mutazione T315I o che abbiano fallito già più di due inibitori.

Nei pazienti in fase accelerata alla diagnosi il trapianto allogenico è indicato nei pazienti che non ottengano una risposta ottimale col miglior inibitore disponibile.

Nei pazienti in fase accelerata già trattati col miglior inibitore e nei pazienti in fase blastica indipendentemente dalla linea di terapia il trapianto trova indicazione se il paziente è candidabile .

RISPOSTE AL TRATTAMENTO

Dopo la diagnosi e quindi all'inizio del trattamento è indispensabile valutare la risposta alla terapia quale predittore di evoluzione e di sopravvivenza a lungo termine. Ogni valutazione verrà eseguita alla diagnosi e con timing differenti durante il corso del trattamento (ELN 2013).

| TIPO DI RISPOSTA | PARAMETRI | TIMING |
|---|--|--|
| Ematologica | PLTS < 450.000 Gb < 10.000 Eosinofili < 5% No di forme immature No splenomegalia | Alla diagnosi, ogni 7-10 giorni fino a raggiungimento e conferma della CHR, mensilmente per i primi 3 mesi, poi ogni 3 mesi |
| Citogenetica | CCyR: Ph 0% PCyR: Ph 1-35% mCyR: Ph 36-65% minCyR: Ph 66- 95% No CyR: Ph > 95% | Alla diagnosi, a 3 mesi, poi ogni 3 mesi fino a raggiungimento della CCyR . Da ripetere in caso di fallimento, tossicità ematologica prolungata. |
| Biologia molecolare RT-Q-PCR | CMol : Bcr/Abl non detectabile in RT-Q-PCR MR2: ≤ 1 MMol: MR3: ≤ 0.1 MR4: ≤ 0.01 MR4,5: ≤ 0.0032 MR5 : ≤ 0.001 | Ogni 3 mesi fino a MMolR , poi ogni 3-6 mesi |
| Analisi mutazionale | | In caso di warning, di fallimento, prima del cambio di terapia. |

In base ai risultati ottenuti, in termini di risposta ematologica, citogenetica e molecolare, dopo terapia di I° linea, con qualsiasi TKI, il paziente verrà classificato secondo tre categorie di risposte (ELN 2013).

| | OTTIMALE | WARNING | FALLIMENTO |
|-----------------------------|--------------------------------|---|---|
| Diagnosi | NA | Alto rischio o CCA/Ph*, major route | NA |
| 3 mesi | BCR/ABL ≤ 10% e/o Ph+ ≤ 35% | BCR/ABL > 10% e/o PH + 36-95% | No CHR o Ph + > 95% o Nuove mutazioni |
| 6 mesi | BCR/ABL < 1% e/o Ph+ < 0% | BCR/ABL 1-10% e/o PH + 1-35% | BCR/ABL > 10% e/o PH+ > 65% e/o nuove mutazioni |
| 12 mesi | BCR/ABL < 0.1% | BCR/ABL > 0.1-1% | BCR/ABL > 10% e/o PH+ > 35% e/o nuove mutazioni |
| In qualunque momento | BCR/ABL ≤ 0.1% | CCA/Ph- (-7 o 7q-) | Perdita della CHR Perdita CCyR Perdita confermata di MMR -Mutazioni -CCA/Ph+ |

CHR: risposta ematologica completa

CCA: anomalie citogenetiche aggiuntive

CCyR: risposta citogenetica completa

MMR: risposta molecolare maggiore

In caso di fallimento alla terapia di I° linea con Imatinib, il paziente verrà avviato a terapia di II° linea e valutato secondo i criteri di risposta alla II° linea.

| | OTTIMALE | WARNING | FALLIMENTO |
|-----------------------------|-----------------------------|--|---|
| Diagnosi | NA | No CHR o meno della CHR con Imatinib o meno della CyR al TKI di I° linea o alto rischio | NA |
| 3 mesi | BCR/ABL ≤ 10% e/o Ph+ < 65% | BCR/ABL > 10% e/o PH + 65-95% | No CHR o Ph + > 95% o nuove mutazioni |
| 6 mesi | BCR/ABL ≤ 10% e/o Ph+ < 35% | PH + 35-65% | BCR/ABL > 10% e/o PH+ > 65% e/o nuove mutazioni |
| 12 mesi | BCR/ABL < 1% e/o Ph + 0 | BCR/ABL 1-10% e/o PH + 1 -35% | BCR/ABL > 10% e/o PH+ > 35% e/o nuove mutazioni |
| In qualunque momento | BCR/ABL ≤ 0.1 | CCA/Ph-(-7 o 7q-) o BCR/ABL > 0.1% | Perdita della CHR o perdita CCyR o PCyR; Nuove mutazioni; Perdita confermata di MMR: CCA/Ph+ |

CHR: risposta ematologica completa

CCA: anomalie citogenetiche aggiuntive

CCyR: risposta citogenetica completa

PCyR: risposta citogenetica parziale

MMR: risposta molecolare maggiore

FOLLOW_UP

| TIME POINT | ESAME | MATERIALE BIOLOGICO |
|----------------------|--|--|
| Diagnosi | <p>-Biologia molecolare qualitativa + cariotipo*.</p> <p>Consigliata: BOM</p> <p>Opzionali: biologia molecolare quantitativa, FISH</p> <p>-Biologia molecolare qualitativa.</p> <p>Opzionale: biologia molecolare quantitativa</p> | <p>-Aspirato midollare</p> <p>-Sangue venoso periferico</p> |
| 3/6/12 Mesi | <p>-Biologia molecolare</p> <p>Quantitativa</p> <p>Opzionale: biologia molecolare qualitativa</p> <p>- cariotipo*,</p> <p>Opzionale: Biologia molecolare quantitativa</p> | <p>-Sangue venoso</p> <p>Periferico</p> <p>-Aspirato midollare</p> |
| Oltre 12 Mesi | <p>-Biologia molecolare</p> <p>Quantitativa ogni tre-sei mesi al raggiungimento di MR3 (MMR)</p> | <p>-Sangue venoso</p> <p>Periferico</p> |

*: in caso di analisi citogenetica convenzionale insufficiente (<20 mitosi) utilizzare FISH su aspirato midollare o su sangue periferico.

INDAGINE CITOGENETICA/FISH

L'esame del cariotipo convenzionale con valutazione di almeno 20 mitosi viene effettuato a partire dalla diagnosi e fortemente raccomandato a tre mesi e ogni 3 mesi fino a conferma della risposta citogenetica completa (assenza del Cromosoma Ph' su almeno 20 mitosi valutate).

FISH da eseguire solo in questi casi:

- in tutti i *timepoints* in cui non si ottengono, in citogenetica classica su aspirato midollare, almeno 20 mitosi; da eseguirsi su sangue periferico se non disponibile aspirato midollare
- in presenza di "Philadelphia Criptici" (assenza della traslocazione t9;22 in citogenetica classica)
- se alla diagnosi sono presenti marcatori aggiuntivi (es: +8, 20q-, -Y...) FISH del marcatore specifico nei *timepoints* successivi alla diagnosi in assenza di mitosi.

INDAGINI in BIOLOGIA MOLECOLARE nei trascritti rari

Nei pazienti che alla diagnosi presentano un tipo di breakpoint raro di BCR-ABL1 (es: b2a3, b3a3, e1a3, e19a2, e19a3, BCR ex6-ABLex2, BCRe8-ABLex2, ecc..) eseguire analisi qualitativa in NESTED PCR in tutti i *timepoints*.

ANALISI MUTAZIONALE

Alla diagnosi indicata solo in pazienti in fase accelerata (FA) o in Crisi Blastica (CB).

E' suggerita in caso di mancato ottenimento della risposta ottimale ai diversi *timepoints* od in caso di perdita confermata della risposta ottenuta.

Non è indicata l'esecuzione di tale analisi in caso di fluttuazione del trascritto e/o in caso di intolleranza o tossicità.

Vi sono specifiche tabelle da consultare, periodicamente aggiornate in letteratura, che possono orientare la scelta terapeutica.

BIBLIOGRAFIA:

1. Vardiman et al. The 2008 revision World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009.
2. Sokal JE et al. Blood 1984.
3. Hasford J et al. J Nat Canc Inst.1998.
4. Hasford J et al. Blood 2011.
5. Pfirmann M et al, Leukemia 2015.
6. Baccarani et al. European LeukemiaNet, Blood 2013.
7. NCCN guidelines, 2019.
8. WHO Arber Blood 2017.
9. Soverini S et al; Blood vol 118 n5, 4 Aug 2011.
10. Zabriskie et al, Cancer Cell 2014.

D

| | | Imatinib | Nilotinib | Dasatinib | Ponatinib | Rebastinib | Bosutinib | |
|------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Single Mutants | Native | Green | Green | Green | Green | Green | Green | |
| | M244V | Green | Green | Green | Green | Green | Green | |
| | G250E | Red | Yellow | Green | Light Green | Orange | Yellow | |
| | Q252H | Green | Green | Green | Green | Light Green | Green | |
| | Y253H | Red | Red | Green | Green | Orange | Green | |
| | E255V | Red | Red | Green | Yellow | Red | Light Green | |
| | V299L | Yellow | Green | Light Green | Green | Green | Red | |
| | F311I | Red | Green | Green | Green | Light Green | Green | |
| | T315I | Red | Red | Red | Green | Light Green | Red | |
| | I315M | Red | Red | Red | Red | Red | Red | |
| | F317L | Orange | Green | Green | Green | Yellow | Light Green | |
| | M351T | Light Green | Green | Green | Green | Green | Green | |
| | F359V | Red | Yellow | Green | Green | Yellow | Green | |
| | H396R | Red | Green | Green | Green | Yellow | Green | |
| Compound Mutants | T315I-Inclusive | M244V/T315I | Red | Red | Red | Green | Light Green | Red |
| | | G250E/T315I | Red | Red | Red | Red | Red | Red |
| | | Q252H/T315I | Red | Red | Red | Orange | Orange | Red |
| | | Y253H/T315I | Red | Red | Red | Red | Red | Red |
| | | E255V/T315I | Red | Red | Red | Red | Red | Red |
| | | F311I/T315I | Red | Red | Red | Red | Yellow | Red |
| | | T315I/M351T | Red | Red | Red | Orange | Orange | Red |
| | | T315I/F359V | Red | Red | Red | Orange | Red | Red |
| | | T315I/H396R | Red | Red | Red | Orange | Orange | Red |
| | | T315I/E453K | Red | Red | Red | Orange | Yellow | Red |
| | | Non-T315I | G250E/V299L | Red | Orange | Yellow | Green | Light Green |
| | Y253H/E255V | | Red | Red | Green | Red | Red | Yellow |
| | Y253H/F317L | | Red | Red | Green | Green | Red | Light Green |
| | E255V/V299L | | Red | Red | Orange | Light Green | Yellow | Red |
| | V299L/F317L | | Red | Light Green | Red | Green | Light Green | Red |
| | V299L/M351T | | Orange | Green | Light Green | Green | Green | Red |
| | V299L/F359V | | Orange | Orange | Light Green | Green | Light Green | Red |
| | F317L/F359V | | Red | Red | Light Green | Yellow | Red | Yellow |
| | parental | Red | Red | Red | Red | Red | Red | |

Tabella Mutazioni BCR-ABL1 (Zabriskie et al)