

Resistenza a imatinib: opzioni diagnostiche e terapeutiche

Marianna De Muro¹, Odoardo Maria Olimpieri¹, Rosa Greco¹, Lidia Altomare¹

Abstract

We report a case of a 42-year-old woman with t(9;22) positive chronic myeloid leukemia (CML) who developed a sub-optimal response to therapy with imatinib mesylate due to M351T mutation and low plasma level of imatinib. Dose increase of imatinib resulted in toxicity. She obtained a complete molecular response to therapy with nilotinib, without adverse events.

Keywords: imatinib resistance, blood level test, nilotinib
Imatinib resistance: diagnostic and therapeutic choices
CMI 2010; 4(Suppl. 2): 21-25

CASO CLINICO

Una donna di 42 anni giungeva alla nostra osservazione per comparsa di febbre, astenia e malessere generale. La donna riferiva, inoltre, difficoltà digestive post-prandiali.

L'esame obiettivo mostrava splenomegalia (18 cm).

La donna veniva, quindi, sottoposta a esami ematochimici di approfondimento: l'emocromo mostrava leucocitosi con 123.000 globuli bianchi/mm³; nello striscio di sangue venoso periferico erano presenti cellule immature.

Nel sospetto di una patologia mieloproliferativa, la paziente veniva sottoposta ad aspirato del midollo osseo; l'esame morfologico del midollo mostrava iperplasia granuloblastica senza elementi indifferenziati, mentre l'analisi citogenetica convenzionale non rilevava alterazioni (cariotipo 46 XX).

L'esame di citogenetica FISH su nuclei in interfase dimostrava la presenza di una traslocazione classica t(9;22) con delezione 9q.

L'esame molecolare del sangue midollare mostrava un trascritto b2a2 e l'esame quantitativo (RQ-PCR) evidenziava una ratio BCR-ABL/ABL del 48%.

Gli elementi permettevano di porre diagnosi di leucemia mieloide cronica (LMC), in fase cronica.

Data la gravità del caso e il forte sospetto di patologia mieloproliferativa, prima di ottenere le risposte della citogenetica e della biologia molecolare, era stata intrapresa terapia citoriduttiva con idrossiurea. Ottenuta la conferma diagnostica di LMC, nel mese successivo la terapia fu modificata sostituendo il chemioterapico con imatinib a dosaggio standard (400 mg/die). Nelle prime settimane di terapia non fu rilevato alcun effetto collaterale e alla terza settimana la paziente aveva ottenuto una **risposta ematologica completa**.

Al 3° mese di terapia l'esame citogenetico mostrava una risposta parziale (Ph+ 25%).

Perché descriviamo questo caso?

I pazienti affetti da LMC possono manifestare resistenza durante la terapia, ma tale evento non preclude il raggiungimento di una remissione della patologia, se vengono utilizzati i giusti strumenti diagnostici e terapeutici

¹ Area di Ematologia, Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, Roma

Disclosure

Supplemento realizzato con il contributo di Novartis S.p.A.

Corresponding author

Marianna De Muro
M.DeMuro@unicampus.it

Al 6° mese di terapia la paziente aveva ottenuto una risposta citogenetica completa (RCC, Ph+ 0%).

Al 12° mese di terapia persisteva la RCC. L'analisi molecolare quantitativa mostrava una ratio BCR-ABL/ABL pari a 1,2%.

Al 18° mese di terapia l'analisi molecolare quantitativa evidenziava una ratio in ascesa (2,4%), RCC persistente.

Considerando l'incremento della ratio quantitativa, la paziente è stata sottoposta a dosaggio del livello plasmatico di imatinib (BLT) e a screening mutazionale, mediante tecnica *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC).

Il BLT, eseguito 2 volte consecutivamente, evidenziava una concentrazione plasmatica di imatinib pari a 850 ng/ml e 940 ng/ml, valori inferiori rispetto alla soglia ritenuta efficace (1.002 ng/ml).

Lo screening mutazionale evidenziava la mutazione M351T del dominio catalitico di BCR-ABL.

La presenza di un dosaggio plasmatico del farmaco inferiore rispetto a quello reputato efficace e la presenza di una mutazione che rendeva la paziente potenzialmente responsiva a imatinib a dosaggio maggiore rispetto a quello standard suggerivano di incrementare il farmaco al dosaggio di 600 mg/die.

Dopo tre mesi di terapia l'esame molecolare evidenziava nuovamente una ratio di 2,5%.

A 6 mesi dall'aumento del dosaggio la ratio era pari al 3%, con persistenza della mutazione evidenziata precedentemente.

La paziente iniziò inoltre a manifestare effetti collaterali legati a imatinib, quali ritenzione idrica e crampi muscolari, sintomi mai presentati prima.

In considerazione della resistenza alla terapia effettuata, degli effetti collaterali e della mutazione M351T, si decideva di interrompere definitivamente imatinib e iniziare nilotinib, inibitore delle tirosin chinasi di seconda generazione, al dosaggio standard di 400 mg/bid.

A 3 mesi dall'assunzione la ratio era pari a 0,1%, raggiungendo una risposta molecolare maggiore secondo l'*International Scale*.

Dopo 6 mesi l'analisi molecolare quantitativa evidenziava una ratio pari a 0,01%. La ritenzione idrica sviluppata con imatinib non venne più riscontrata, mentre solo nelle prime settimane di assunzione la paziente riferì cefalea.

Domande da porsi

- Come gestire la "risposta sub-ottimale"?
- Qual è l'utilità dello studio mutazionale e del BLT?
- Come interpretare i risultati delle analisi?
- Come scegliere il farmaco di seconda linea?

Discussione

La leucemia mieloide cronica (LMC) è una patologia ematologica derivata dalla trasformazione neoplastica della cellula staminale pluripotente. È caratterizzata dalla presenza della traslocazione t(9;22) (cromosoma Philadelphia) nel clone neoplastico. Il cromosoma Philadelphia è il risultato della fusione fra il gene BCR (*Breakpoint Cluster Region*) situato sul cromosoma 22, e il gene ABL (*Abelson Leukemia virus*), situato sul cromosoma 9; ne deriva l'oncogene di fusione BCR-ABL.

La proteina codificata dall'oncogene, BCR-ABL, è una tirosin chinasi citoplasmatica costitutivamente attivata, attualmente considerata la principale causa della LMC.

La LMC è caratterizzata da tre fasi [1]:

- **fase cronica:** leucocitosi neutrofila ($12-1.000 \times 10^9/l$), con neutrofilii presenti nelle varie fasi maturative. Possono essere presenti basofilia assoluta e/o eosinofilia; in alcuni casi è presente monocitosi assoluta. La quota di blasti nel sangue venoso periferico non supera il 2%. La conta piastrine è variabile: da valori normali a valori elevati ($1.000 \times 10^9/l$), la trombocitopenia è meno frequente. Nel midollo osseo è presente un'iperplasia granuloblastica, con una quota di blasti minore al 10%. È spesso presente splenomegalia;
- **fase accelerata,** con presenza di uno dei seguenti parametri:
 1. persistenza/incremento dei globuli bianchi $>10 \times 10^9/l$ e/o persistenza/incremento della splenomegalia;
 2. persistenza della piastrinosi ($> 1.000 \times 10^9/l$), non controllata dalla terapia;
 3. persistenza della piastrinopenia non correlata alla terapia ($< 100 \times 10^9/l$);
 4. evoluzione clonale citogenetica rispetto al cariotipo della diagnosi;

5. basofili \geq al 20% nel sangue venoso periferico;

6. 10-19% di mieloblasti nel sangue venoso periferico o nel midollo osseo;

• **fase blastica:**

1. blasti \geq 20% di cellule nel sangue venoso periferico o delle cellule nucleate nel midollo osseo;

2. proliferazione di blasti in sede extramidollare.

Attualmente la terapia di scelta per la fase cronica è rappresentata da imatinib mesilato, al dosaggio standard di 400 mg/die. Imatinib è un inibitore della tirosin chinasi [2].

Durante la terapia i pazienti devono essere sottoposti a controlli ematologici, citogenetici e molecolari per la valutazione della risposta alla terapia stessa.

La nostra paziente è stata sottoposta ai controlli previsti, mostrando una rapida risposta sia ematologica sia citogenetica, ma la presenza del trascritto valutato mediante biologia molecolare quantitativa positiva al 12° mese di trattamento permetteva di classificarla come un paziente *warning*, ovvero un paziente che non ha avuto una buona risposta al trattamento e che necessita di un monitoraggio stretto [4]. La ripetizione al 18° mese di terapia dell'analisi molecolare quantitativa evidenziava una ratio in ascesa (2,4%), nonostante la risposta citogenetica completa: per tale motivo la paziente presentava una risposta sub-ottimale alla terapia. La **risposta sub-ottimale** significa che il paziente può ancora trarre beneficio da imatinib nonostante l'outcome a lungo termine non sia ottimale. Recentemente Marin e collaboratori hanno stratificato i pazienti affetti da LMC dell'Hammersmith Hospital in base ai criteri ELN (*European LeukemiaNet*), evidenziando una sovrapposizione nelle definizioni di fallimento e risposta sub-ottimale [5].

Tipo di risposta	Definizione
Ematologica completa (CHR)	<ul style="list-style-type: none"> Globuli bianchi $< 10 \times 10^9/l$ Basofili $< 5\%$ Assenza di mielociti, mieloblasti, promielociti Piastrine $< 450 \times 10^9/l$ Milza non palpabile
Citogenetica	<ul style="list-style-type: none"> <i>Completa (CCgR)</i> assenza del cromosoma Philadelphia <i>Parziale (PCgR)</i> Philadelphia + compreso fra 1-35% <i>Minore (mCgR)</i> Philadelphia + compreso fra 36-65% <i>Minima (minCgR)</i> Philadelphia + compreso fra 66-95% <i>Nessuna (no CgR)</i> Philadelphia + $> 95\%$
Molecolare	<ul style="list-style-type: none"> <i>Completa (CMolR)</i> trascritto BCR-ABL mRNA non rintracciabile con RT-Q-PCR e/o nested PCR in due campioni consecutivi di sangue di adeguata qualità (sensibilità $> 10^4$) <i>Maggiore (MMolR)</i> Ratio BCR-ABL su ABL $\leq 0,1\%$ della <i>International Scale</i>

L'incidenza di risposta sub-ottimale in corso di terapia con imatinib, secondo gli studi ELN del 2006, è pari a circa il 20% [4].

I pazienti con risposta sub-ottimale possono giovare di trattamento con imatinib a dosaggio maggiore se non hanno sviluppato resistenza al farmaco. Il dosaggio plasmatico di imatinib, valutato con il BLT, al di sotto della soglia ritenuta terapeutica, può supportare ulteriormente la decisione di incrementare il dosaggio del farmaco.

Il problema dell'insorgenza delle **mutazioni nel dominio chinasi di BCR-ABL**, ovvero nel sito di legame di imatinib con la proteina, rappresenta una questione aperta.

L'incidenza di resistenza a imatinib dovuta a mutazioni riportata in letteratura è pari a circa il 40-50% nella fase cronica di malattia. In letteratura sono ormai note più di 90-100 mutazioni ed è conosciuto l'IC50 di ciascuna mutazione: alcune rispondono a un incremento di dosaggio del farmaco, altre ai nuovi farmaci inibitori delle chinasi; la mutazione T315I conferisce resistenza a tutti i farmaci attualmente disponibili.

Tabella I

Definizione di risposta ematologica, citogenetica e molecolare [3]

RT-Q-PCR = *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*

Risposta	Descrizione del monitoraggio
Ematologica	Alla diagnosi e ogni 15 giorni fino al raggiungimento della risposta ematologica completa (CHR); successivamente ogni 3 mesi o quando richiesto
Citogenetica	Alla diagnosi, a 3 e a 6 mesi. Successivamente ogni 6 mesi fino al raggiungimento e conferma della risposta citogenetica completa (CCgR). Successivamente ogni 12 mesi, se non può essere eseguito il controllo molecolare regolare; sempre nel sospetto di fallimento terapeutico (resistenza primaria o secondaria), e per la comparsa di anemia, leucopenia, piastrinopenia inspiegata
Molecolare con RT-Q-PCR	Ogni 3 mesi fino al raggiungimento e conferma della risposta molecolare maggiore (MMolR). Successivamente almeno ogni 6 mesi
Molecolare con analisi mutazionale	Nel caso di risposta sub-ottimale o fallimento. Sempre prima di iniziare terapia con un altro inibitore

Tabella II

Timing del monitoraggio della risposta alla terapia con imatinib in corso di LMC [3]

RT-Q-PCR = *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*

Nel caso della mutazione M351T, l'IC50 è pari a 820 ng/ml, valore che ci ha consentito di ottimizzare la dose; inoltre questa mutazione rende il soggetto suscettibile a terapia con nilotinib (inibitore della tirosin chinasi di seconda generazione) [6].

Il **BLT** è uno strumento valido nei casi di pazienti resistenti con mutazioni sensibili a imatinib o senza alcuna mutazione in cui il sottodosaggio del farmaco è causa della resistenza. Il BLT può essere utile quindi per valutare:

- l'assorbimento del farmaco;
- l'aderenza alla terapia;
- il possibile sviluppo di interazioni farmacologiche che riducono/aumentano l'assorbimento di imatinib.

Trova inoltre impiego nella diagnosi di eventi avversi gravi legati al sovradosaggio di imatinib [7-9].

Nel nostro caso la mutazione M351T [6], e il basso livello plasmatico hanno giustificato l'incremento del dosaggio del farmaco. Il nostro tentativo, tuttavia, è stato vano per assenza di risposta molecolare e insorgenza di effetti collaterali.

La resistenza alla terapia e l'intolleranza a imatinib a dosaggi maggiori di 400 mg/die (comparsa di effetti collaterali) imponevano una nuova decisione terapeutica.

La mutazione sviluppata dalla paziente rendeva possibile la somministrazione di nilotinib, un inibitore della tirosin chinasi che si è dimostrato 30-50 volte più potente di imatinib, con alta selettività e affinità per BCR-ABL, maneggevole e ben tollerato [10,11].

La somministrazione di questo nuovo farmaco ha consentito il raggiungimento della risposta molecolare completa in tempi brevi.

Risposte alle domande emerse nel corso del caso clinico

- **La "risposta sub-ottimale"** necessita di una attenta valutazione in quanto il paziente non ha raggiunto il target terapeutico, quindi potrebbe, potenzialmente, evolvere perdendo la risposta ottenuta. Bisogna quindi decidere, utilizzando gli strumenti diagnostici a disposizione, l'atteggiamento terapeutico più corretto da adottare
- **Lo studio mutazionale e il BLT** rappresentano i due strumenti attualmente disponibili per valutare sia la causa dell'assenza/perdita della risposta alla terapia, sia il tipo di approccio terapeutico da adottare
- **L'analisi mutazionale** ci fornisce:
 - indicazioni rispetto alla presenza o meno di una mutazione
 - il tipo di mutazione
 - l'eventuale sensibilità della mutazione a imatinib, giustificando un eventuale incremento del farmaco
 - la sensibilità della mutazione ad altri tipi di inibitori della tirosin chinasi di seconda generazione, indicando, quindi, il farmaco da adottare
- **Il BLT** consente di valutare se il dosaggio plasmatico di imatinib risulta entro il range terapeutico, permettendo di diagnosticare sia sottodosaggi che rendono inefficace la terapia (in caso, per esempio, di scarsa aderenza alla terapia o interazione tra farmaci), sia sovradosaggi che causano reazioni avverse
- **Il farmaco di seconda linea** nel paziente resistente a imatinib deve essere scelto in base alla capacità di bypassare la resistenza indotta dalla mutazione che ha reso inefficace imatinib [6]

BIBLIOGRAFIA

1. Swerdlow SH, Ciampo E, Lee H, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissue. Geneva: WHO, 2008; 4th edition
2. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1054-61

3. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6041-51
4. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108: 1809-20
5. Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, Khorashad JS, de Lavallade H, Reid AG et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood* 2008; 112: 4437-44
6. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110: 2242-9
7. Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard MA et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Blood* 2007; 109: 3496-9
8. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008; 111: 4022-8
9. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7374-9
10. Jabbour E, Hochhaus A, Cortes J, La Rosée P, Kantarjian HM. Choosing the best treatment strategy for chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib: weighing the efficacy and safety of individual drugs with BCR-ABL mutations and patient history. *Leukemia* 2010; 24: 6-12
11. Breccia M, Alimena G. Nilotinib therapy in chronic myelogenous leukemia: the strength of high selectivity on BCR-ABL. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 530-6