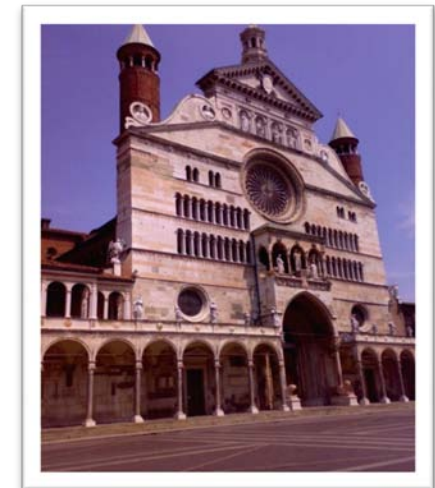


Studio dei cloni EPN (Emoglobinuria Parossistica Notturna) in patologie ematologiche associate ad anemie: possibili implicazioni terapeutiche

LANZA FRANCESCO

**UOC EMATOLOGIA /
Lab Specialistico di
Citometria e Cellule
Staminali**

CREMONA



CLASSIFICATION OF HAEMOLYTIC ANAEMIAS

	<i>Intracorpuscolar causes</i>	<i>Extracorpuscolar causes</i>
Hereditary	• Haemoglobinopaties • Enzimopathies • Membranopathies • Other	Familial HUS (due to defective C reg protein)
Acquired	Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (PNH)	• Malaria • Auto-immune • Drug-induced • Micro-angiopathic • Other

E.P.N.

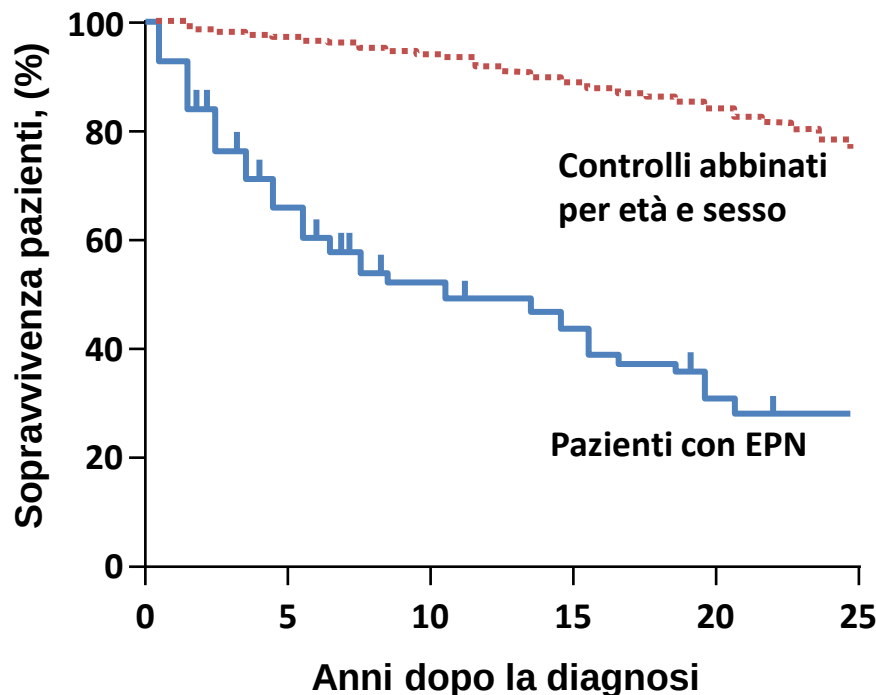
**Malattia clonale di natura acquisita
delle cellule staminali emopoietiche
che provoca:**

- 1. Anemia dovuta ad emolisi
intravascolare cronica e acuta;**
- 2. Diatesi tromboembolica;**
- 3. Leuco-piastriopenia**
- 4. Distonia della muscolatura liscia**

L'EPN è una patologia progressiva e potenzialmente letale con morbidità e mortalità talora precoce

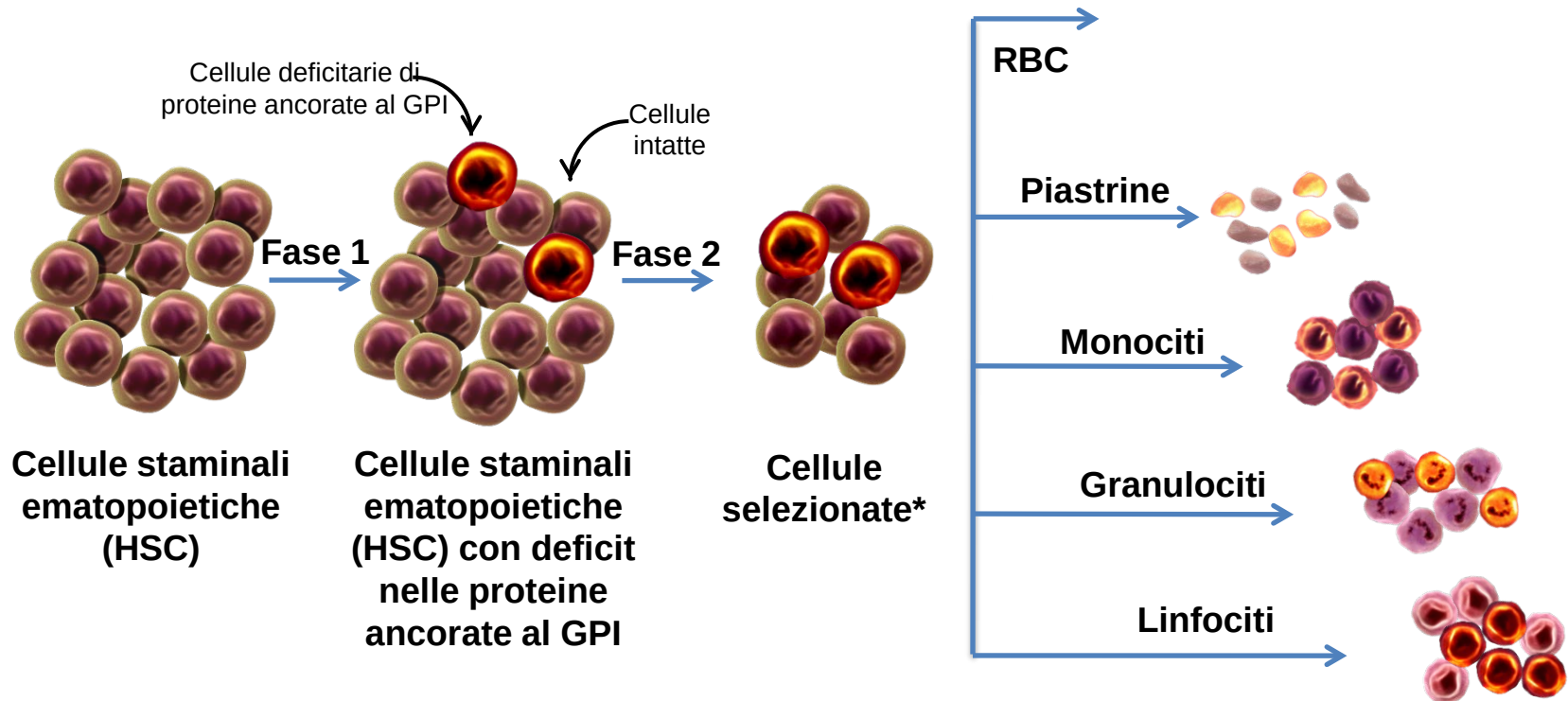
- **Prevalenza: 15,9/milione¹**
- Età mediana alla diagnosi: **poco oltre i trent'anni^{2,3}**
- **Patologia progressiva:** caratterizzata da **emolisi cronica**, complemento-mediata²⁻⁴
- Il 35% dei pazienti con EPN muore entro 5 anni dalla diagnosi, nonostante le migliori terapie di supporto⁴

**Sopravvivenza attuariale
dal momento della diagnosi
in 80 pazienti con EPN⁴**



1. Hill A, et al. *Blood*. 2006;108(11):290a.
2. Nishimura JI et al. *Medicine*. 2004;83:193-207.
3. Socié G, et al. *Lancet*. 1996;348(9027):573-577.
4. Hillmen P, et al. *N Engl J Med*. 1995;333(19):1253-1258.

Le cellule emopoietiche presentano un deficit nelle proteine ancorate al GPI



Mutazione somatica
nel *PIG-A*

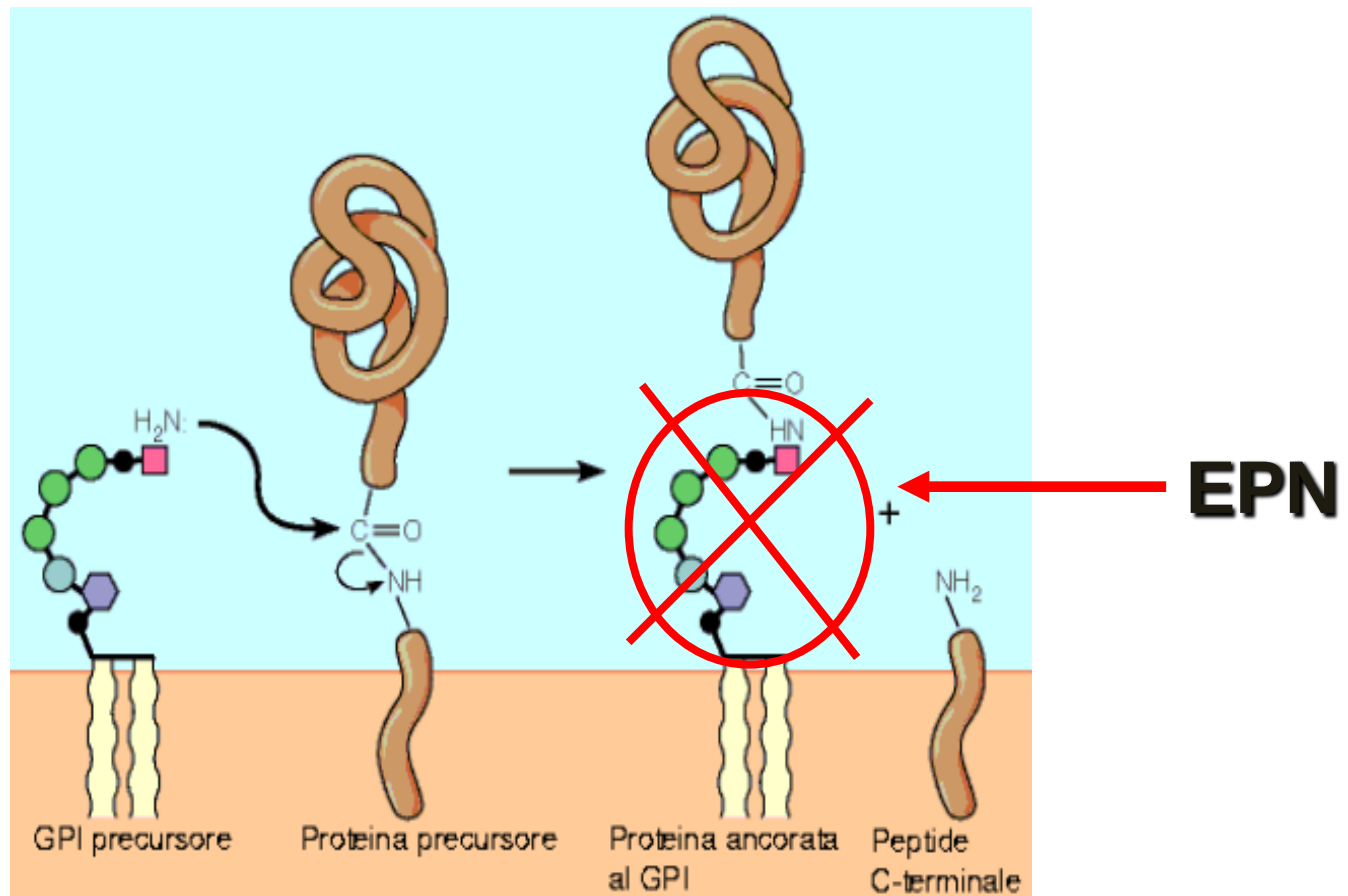
Attacco autoimmune

Espansione clonale
tramite
immuno-selezione

Espansione benigna simil-tumorale

*Cloni che si presume abbiano un vantaggio di crescita conferito, in aggiunta alla mutazione del gene *PIG-A*, con conseguente deficit nelle proteine ancorate al GPI.
Inoue N, et al. *Int J Hematol.* 2003;77(2):107-112.

Glicosil-Fosfatidil-Inositolo (GPI)



glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI) svolge un ruolo importante nell'ancoraggio di proteine che non possono entrare nella membrana lipidica per la mancanza di un segmento idrofobo sufficientemente esteso.



ISTITUTI OSPITALIERI DI CREMONA
Azienda Ospedaliera

Conclusioni: Lo studio citometrico dell'espressione di molecole GPI-linked ha confermato la presenza di un clone EPN (granulociti 97.5%, monociti 96.8%, eritrociti 13.3%). Questo risultato e' compatibile con Emoglobinuria Parossistica Notturna. Le differenze di dimensioni del clone tra globuli bianchi e globuli rossi possono essere dovute a emolisi e/o trasfusioni.

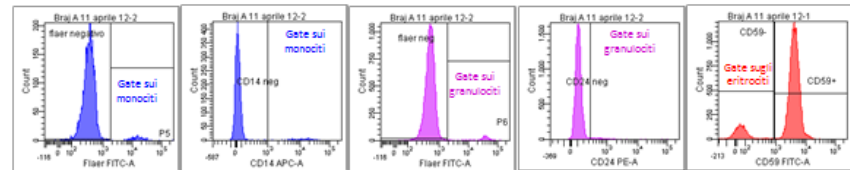
REFERTAZIONE CASO I

COGNOME, NOME E DATA DI NASCITA: BA

PRELIEVO DEL

MATERIALE RICEVUTO: ☒ Sangue periferico

PROVENIENZA: ☐ Reparto ☒ Ambulatorio ☐ Day hospital ☐ Esterno



CONTA CELLULARE: 0.8×10^3 WBC/ μ L

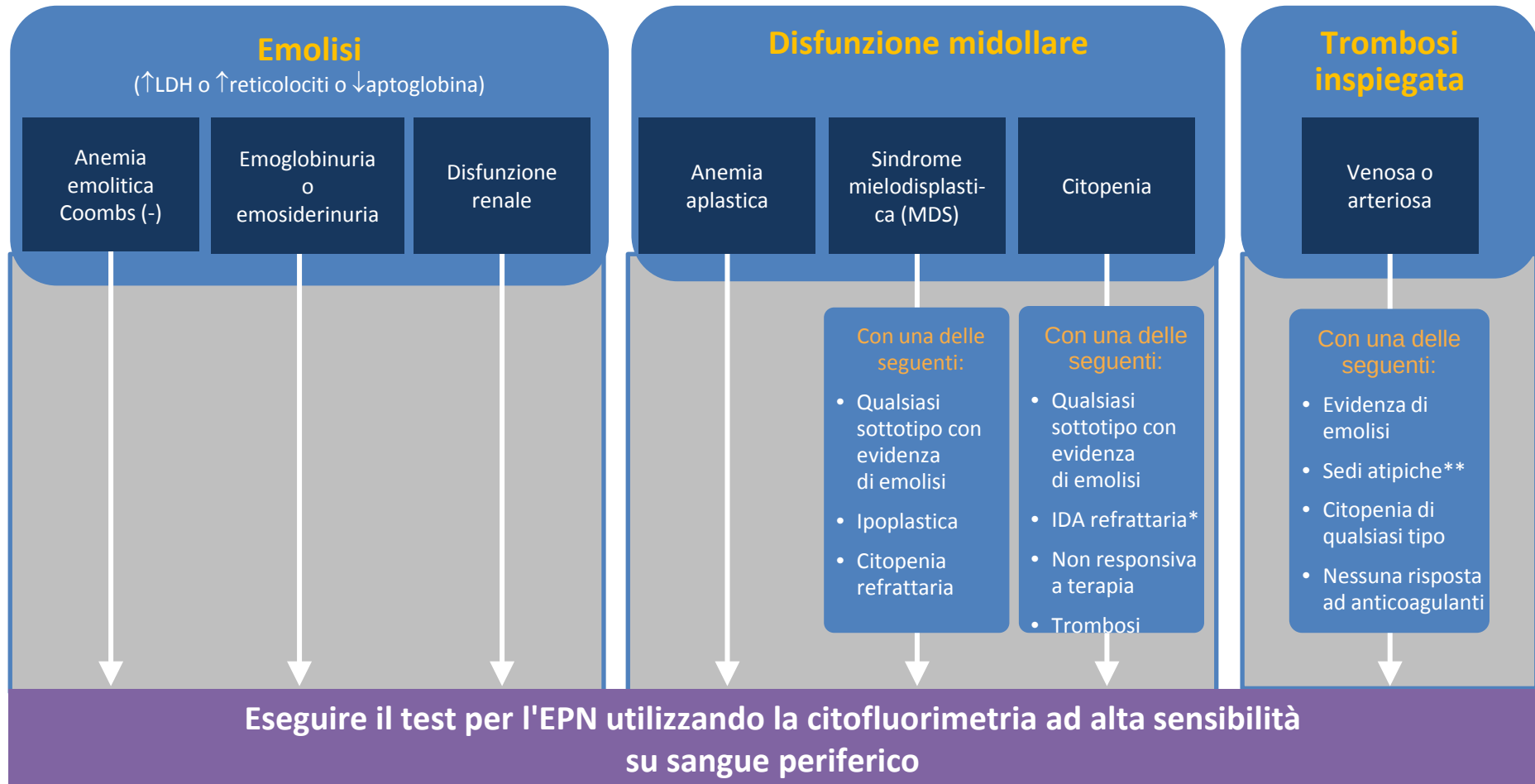
In base alle notizie ricevute (anemia aplastica, emoglobinuria parossistica notturna da confermare) sono stati indagati con metodica a 6 colori i seguenti marcatori cellulari: CD45, CD14, CD33, CD16, CD24, CD59, Flaer.

Risultati:

Popolazione	Eventi nel gate	Sensibilita'	Marcatori di Gating	Marcatore GPI-linked	% tipo I (normale)	% tipo II (parzialmente difettivo)	% tipo III (negativo)
Eritrociti	30000	0.1%		CD59	86.7		13.3
Granulociti	30000	0.1%	CD45, CD33	FLAER	2.5		97.5
				CD24	1.6		98.4
Monociti	4600	0.6%	CD45, CD33	FLAER	3.2		96.8
				CD14	3		97

Conclusioni: Lo studio citometrico dell'espressione di molecole GPI-linked ha confermato la presenza di un clone EPN (granulociti 97.5%, monociti 96.8%, eritrociti 13.3%). Questo risultato e' compatibile con Emoglobinuria Parossistica Notturna. Le differenze di dimensioni del clone tra globuli bianchi e globuli rossi possono essere dovute a emolisi e/o trasfusioni.

Una diagnosi precoce è fondamentale per migliorare la gestione clinica e la prognosi del paziente



*IDA: Iron deficiency anemia, anemia sideropenica

**Vene epatiche (Sindrome di Budd-Chiari), vene intra-addominali (portale, splenica, splancnica), vene dei seni cerebrali, vene dermiche.

Rother RP, et al. JAMA. 2005;293:1653-1662. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, et al, eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone; 2005:419-427. Borowitz MJ, et al; for Clinical Cytometry Society. Cytometry Part B. 2010;78B:211-230. Parker C, et al; for International PNH Interest Group. Blood. 2005;106:3699-3709. Parker CJ. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008:93-103. Dolezel Z, et al. Pediatr Nephrol. 2004;19:1177-1179. Rachidi S, Musallam KM. Eur J Intern Med. 2010;21:260-267. Hillmen P, et al. Am J Hematol. 2010;85:553-559. Ballarín J, et al. Nephrol Dial Transplant. 2011;26:3408-3411. Sharma VR. Clin Adv Hematol Oncol. 2013;11:1-11. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice

Relazione tra EPN e disturbi da insufficienza midollare (BMF)

- Anche se l'EPN e l'insufficienza midollare (BMF) sono strettamente connesse tra loro, le due patologie si distinguono sulla base del quadro clinico predominante^{1,2}

EPN	Continua distruzione dei globuli rossi (emolisi)²
BMF	Ridotta produzione di RBC, WBC, e piastrine (pancitopenia)³

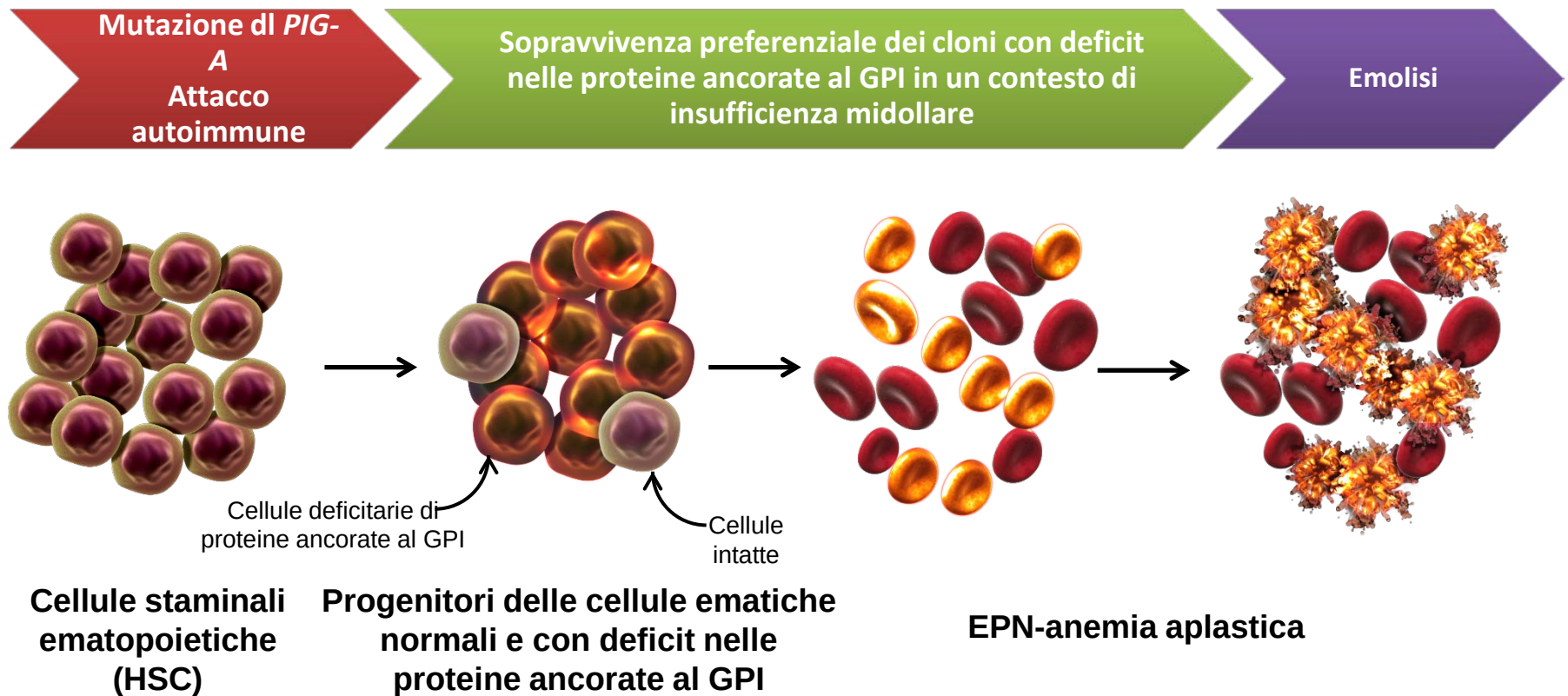
- Ogni condizione può progredire in maniera indipendente e richiedere una gestione clinica e un approccio terapeutico differenti^{2,4}
- Le citopenie causate da EPN e da BMF si presentano spesso simultaneamente, ma sono il risultato di disturbi ematici differenti⁵

BMF, insufficienza midollare; RBC, globuli rossi; WBC, globuli bianchi.

1. Brodsky RA. *Blood*. 2009;113(26):6522-6527. 2. Luzzatto L, et al. *Br J Haematol*. 2011;153(6):709-720. 3. Weinzierl EP, et al. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(1):9-29. 4. Sugimori C, et al. *Br J Haematol*. 2009;147(1):102-112. 5. Young NS, et al. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2000:18-38.

Un contesto di disfunzione midollare può promuovere l'espansione di un clone con deficit nelle proteine ancorate al GPI in pazienti con AA¹⁻³

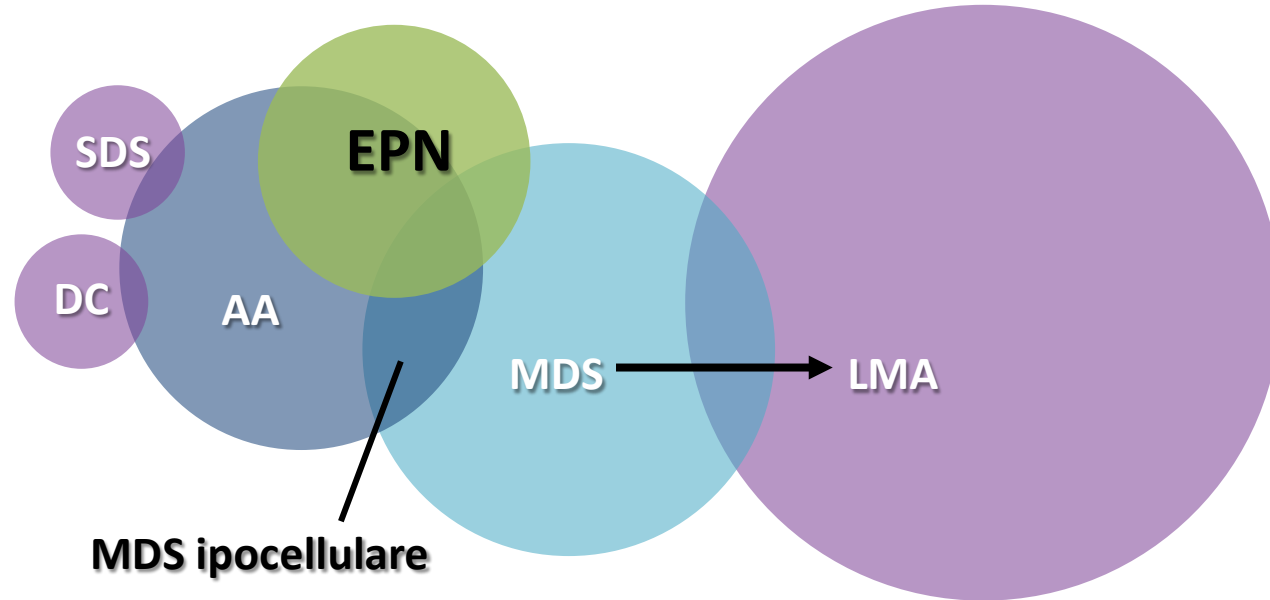
Le cellule staminali con deficit nelle proteine ancorate al GPI hanno un vantaggio competitivo in un contesto di disfunzione midollare²



1. Brodsky RA, Jones RJ. *The Lancet*. 2005;365(9471):1647-1656.
2. Kinoshita T, Inoue N. *Int. J. Hematol*. 2002;75(2):117-122.
3. Tiu R et al. *Leucemia*. 2007;21:1648-1657.

EPN e altre sindromi da insufficienza midollare (BMF)

I sintomi dell'EPN possono presentarsi sovrapposti a quelli di sindromi da BMF, e il quadro clinico predominante può evolvere nel tempo^{1,2}



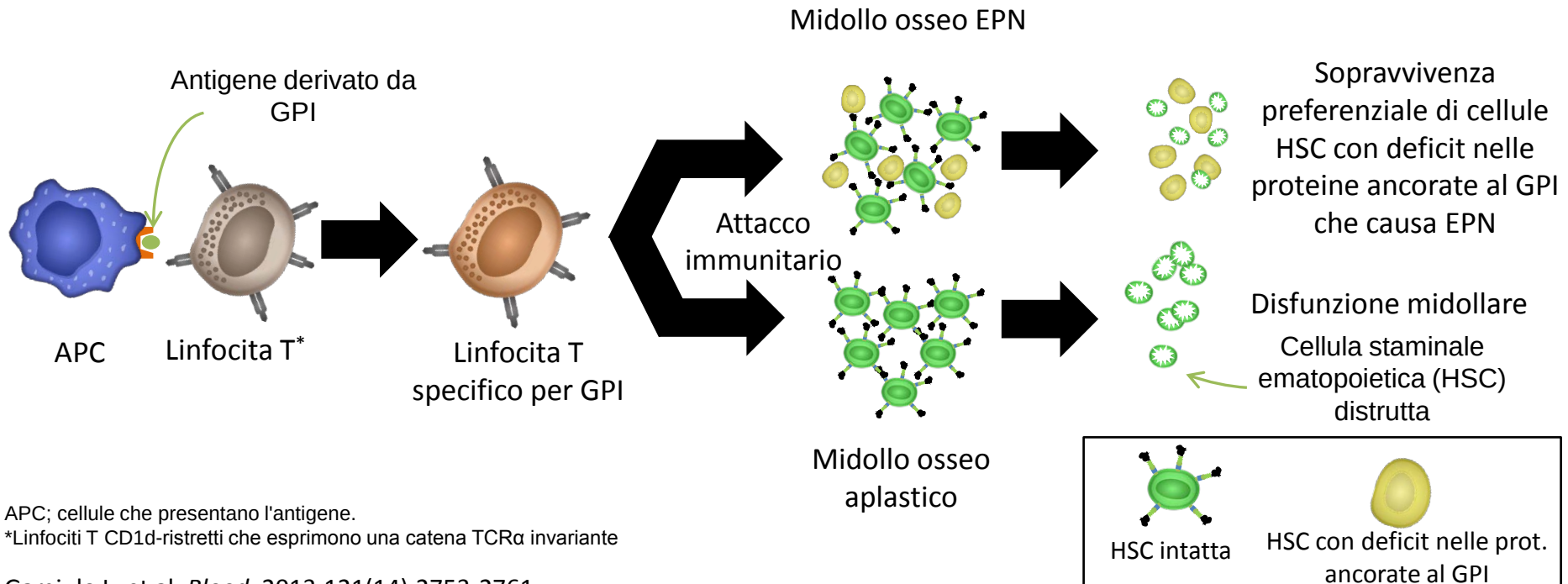
LMA, leucemia mieloide acuta; AA, anemia aplastica; DC, discheratosi congenita; MDS, sindrome mielodisplastica; SDS, sindrome di Shwachman-Diamond.

1. Young NS, et al. *Blood*. 2006;108(8):2509-2519.
2. Weinzierl EP, et al. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(1):9-29.

L'ancora GPI può essere il target dell'attacco immunitario in pazienti con EPN

- Cellule con deficit nelle proteine ancorate al GPI possono avere una sopravvivenza preferenziale a causa di un processo autoimmune mediato dai linfociti T, che ha come target le cellule staminali ematopoietiche GPI positive, ma non quelle GPI negative¹
- In pazienti con EPN è stato osservato un numero elevato di linfociti T reattivi verso il GPI^{*1}

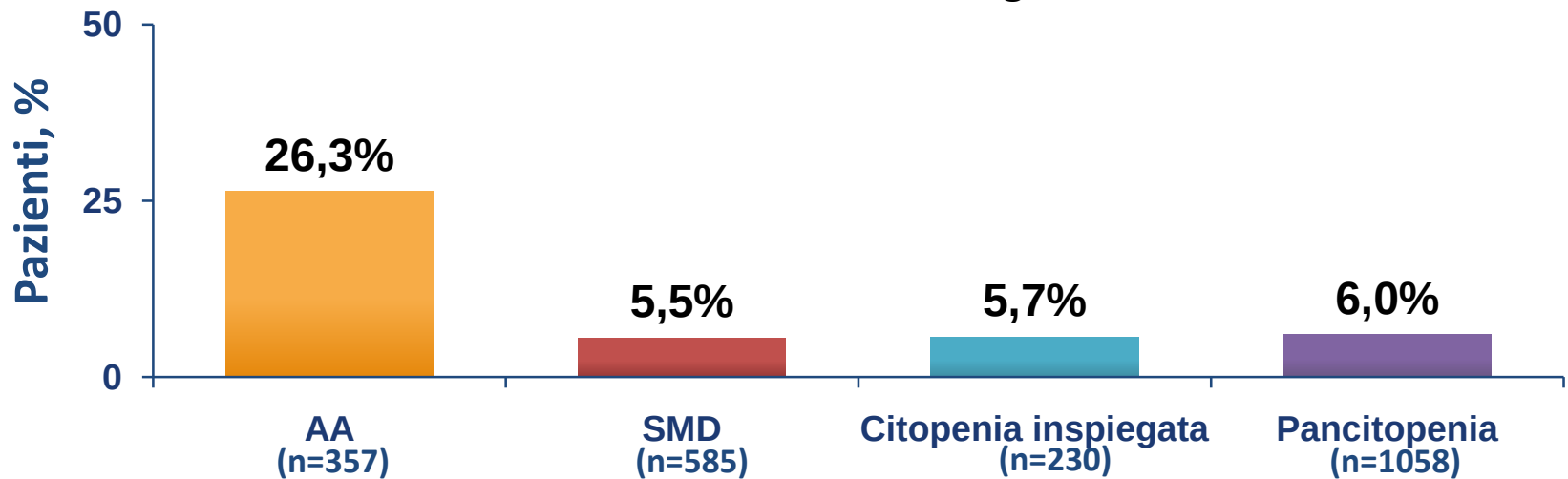
Potenziale meccanismo dell'attacco immunitario nell'EPN



In pazienti affetti da insufficienza midollare (BMF) sono individuate cellule con deficit nelle proteine ancorate al GPI

- I pazienti con AA, sindrome mielodisplastica (MDS), o altri disturbi da BMF hanno spesso cloni con deficit nelle proteine ancorate al GPI individuabili^{1,2}

Percentuale di pazienti con cellule con deficit nelle proteine ancorate al GPI > 0,01% alla diagnosi³



Codice diagnostico ICD-9*

BMF, BoneMarrow Failure

ICD (International Classification of Diseases), Classificazione internazionale delle malattie.

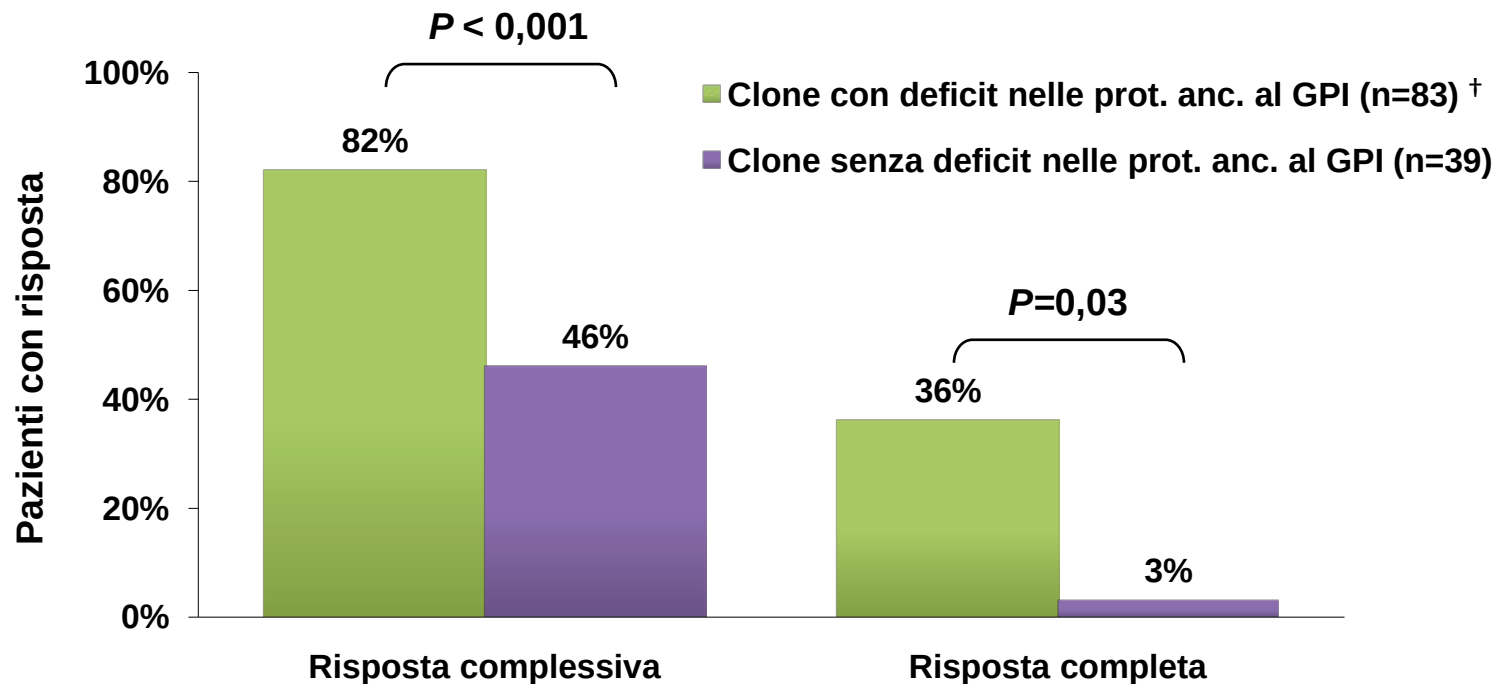
* I pazienti potrebbero avere avuto più di 1 codice ICD-9 associato.

1. Sugimori C, et al. *Br. J. Haematol.* 2009;147(1):102-112.
2. Raza A, et al. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2014;86(3):175-182.
3. Movalia MK, et al. *Blood.* 2011;118(21):1033.

I cloni con deficit nelle proteine ancorate al GPI potrebbero rappresentare un fattore predittivo di risposta alla terapia immunosoppressiva (IST)

- La presenza di cloni con deficit nelle proteine ancorate al GPI è stato l'unico significativo fattore predittivo della risposta alla IST in 122 pazienti con AA ($P < 0,01$) in un'analisi multivariata

Risposta* alla IST in pazienti con cloni con deficit nelle proteine ancorate al GPI



IST, terapia immunosoppressiva.

*Risposta completa (CR): emoglobina normale per l'età, conta dei neutrofili maggiore di $1,5 \times 10^9/L$, e conta piastrinica maggiore di $150 \times 10^9/L$; Risposta parziale (PR), indipendenza da trasfusioni e criteri per la classificazione come malattia grave in pazienti con AA grave non più soddisfatti. Risposta complessiva = CR + PR.

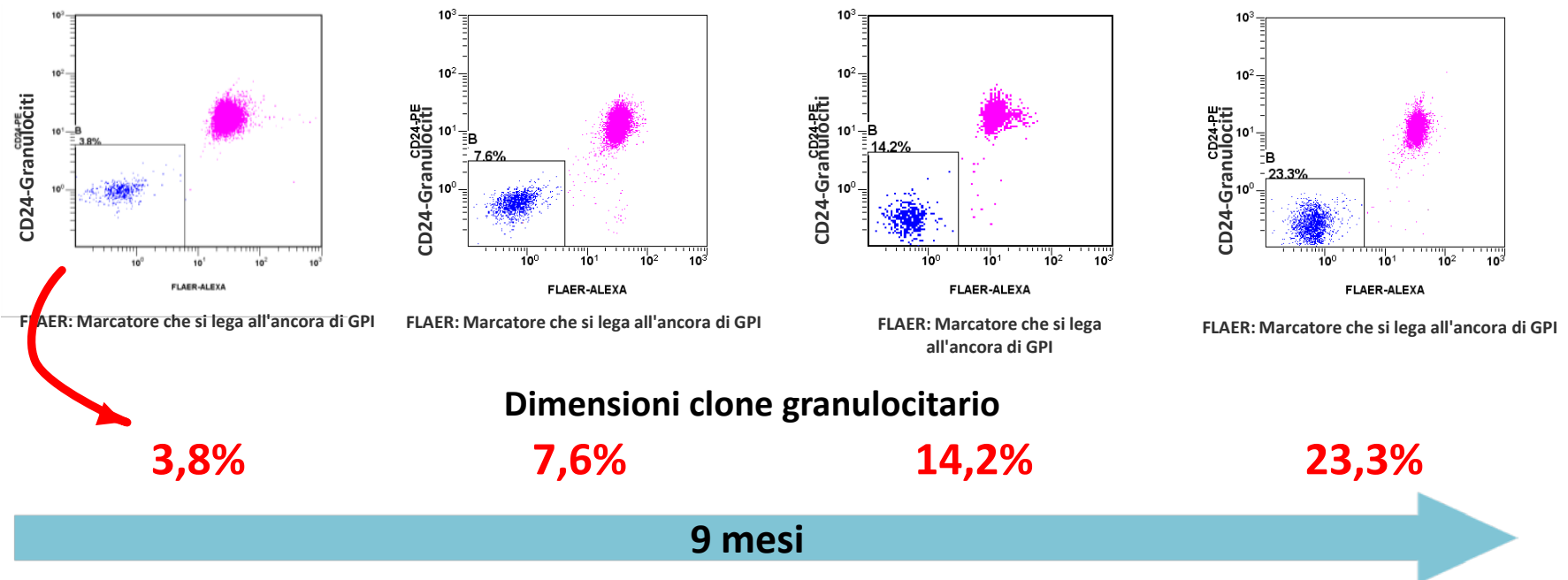
†Presenza di cloni con deficit nelle proteine ancorate al GPI definita tale quando $> 0,1\%$

Sugimori C, et al. *Blood*. 2006;107(4):1308-1314.

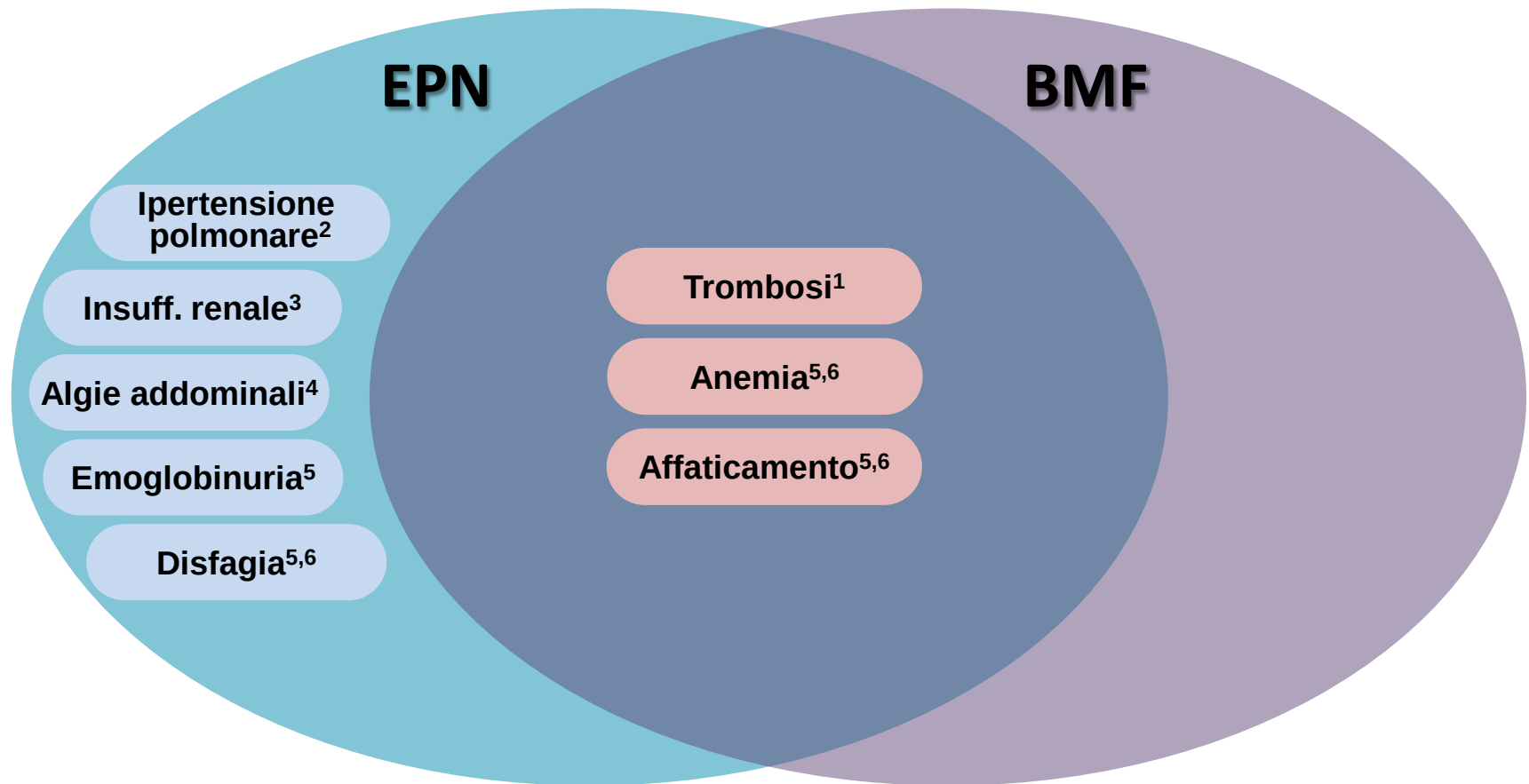
I cloni con deficit nelle proteine ancorate al GPI possono espandersi rapidamente o più raramente estinguersi

- I cloni con deficit nelle proteine ancorate al GPI potrebbero espandersi rapidamente nel corso del tempo in pazienti con AA¹⁻³

Espansione di cloni con deficit nelle proteine ancorate al GPI⁴



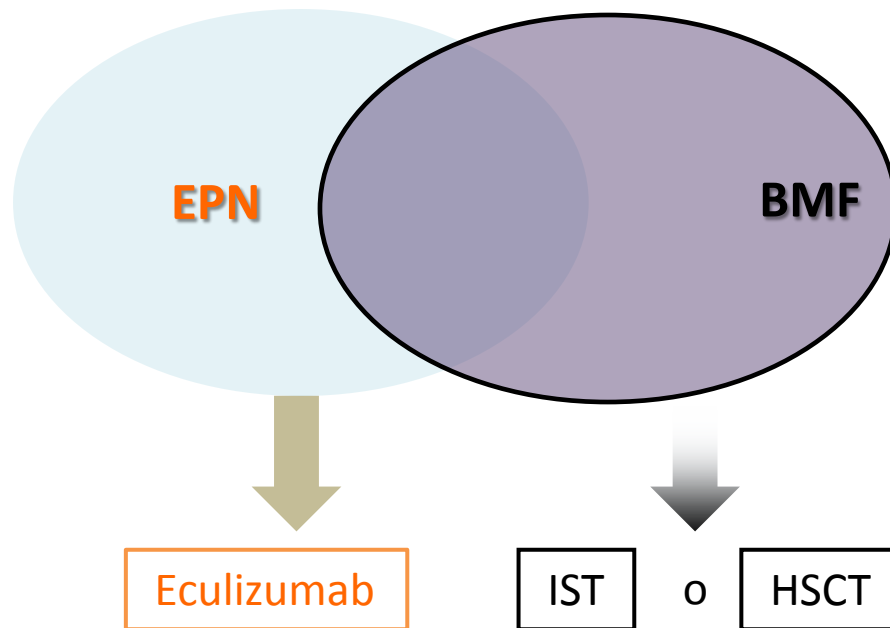
Pazienti con EPN e insufficienza midollare (BMF) possono presentare quadri clinici simili o evolvere nel tempo in patologie simili o dissimili



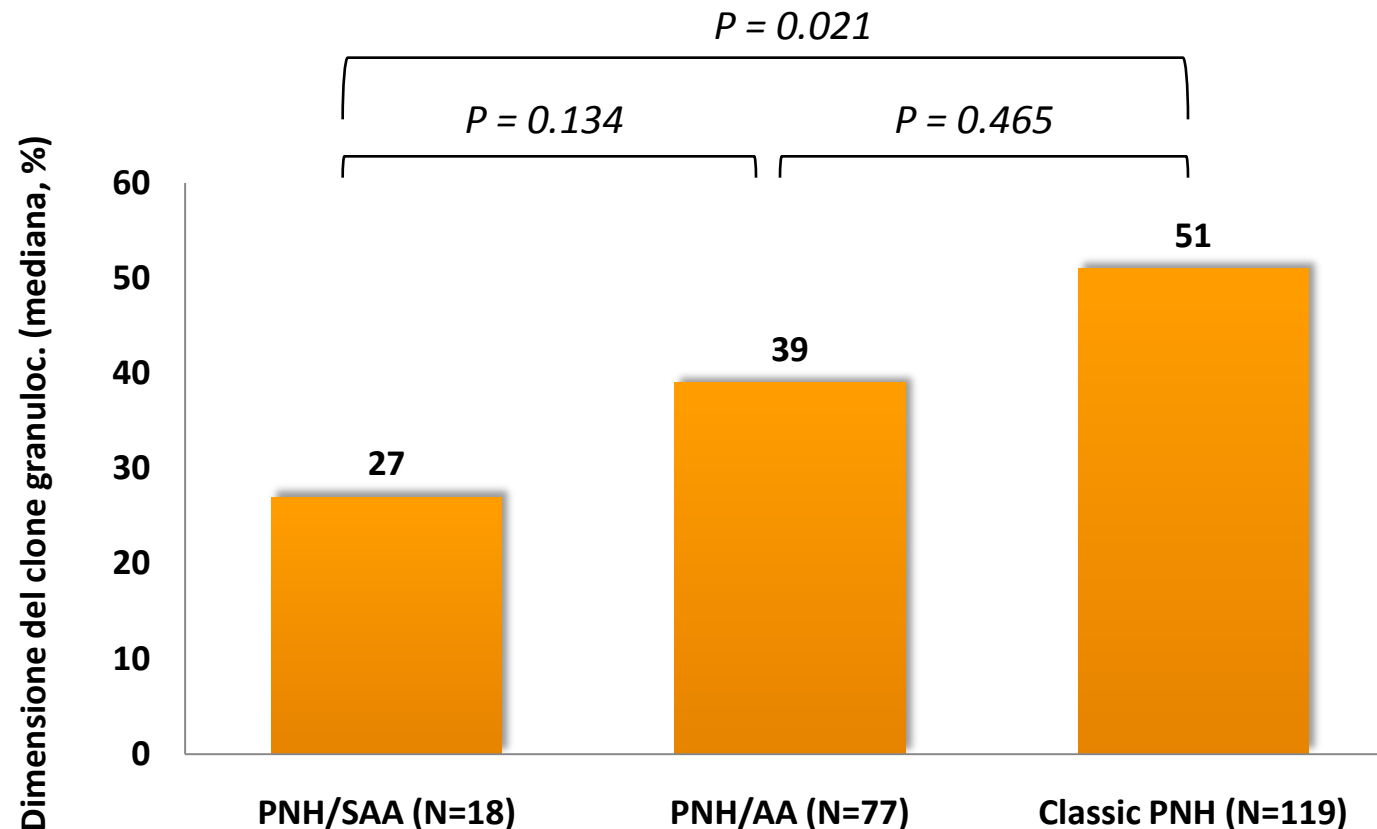
Gestione di pazienti con EPN e insufficienza midollare senza emolisi

- In pazienti con emolisi minima, gli interventi devono focalizzarsi sulla disfunzione midollare sottostante¹

Algoritmo di trattamento²⁻⁴



Pazienti con PNH ed AA: dimensione del clone

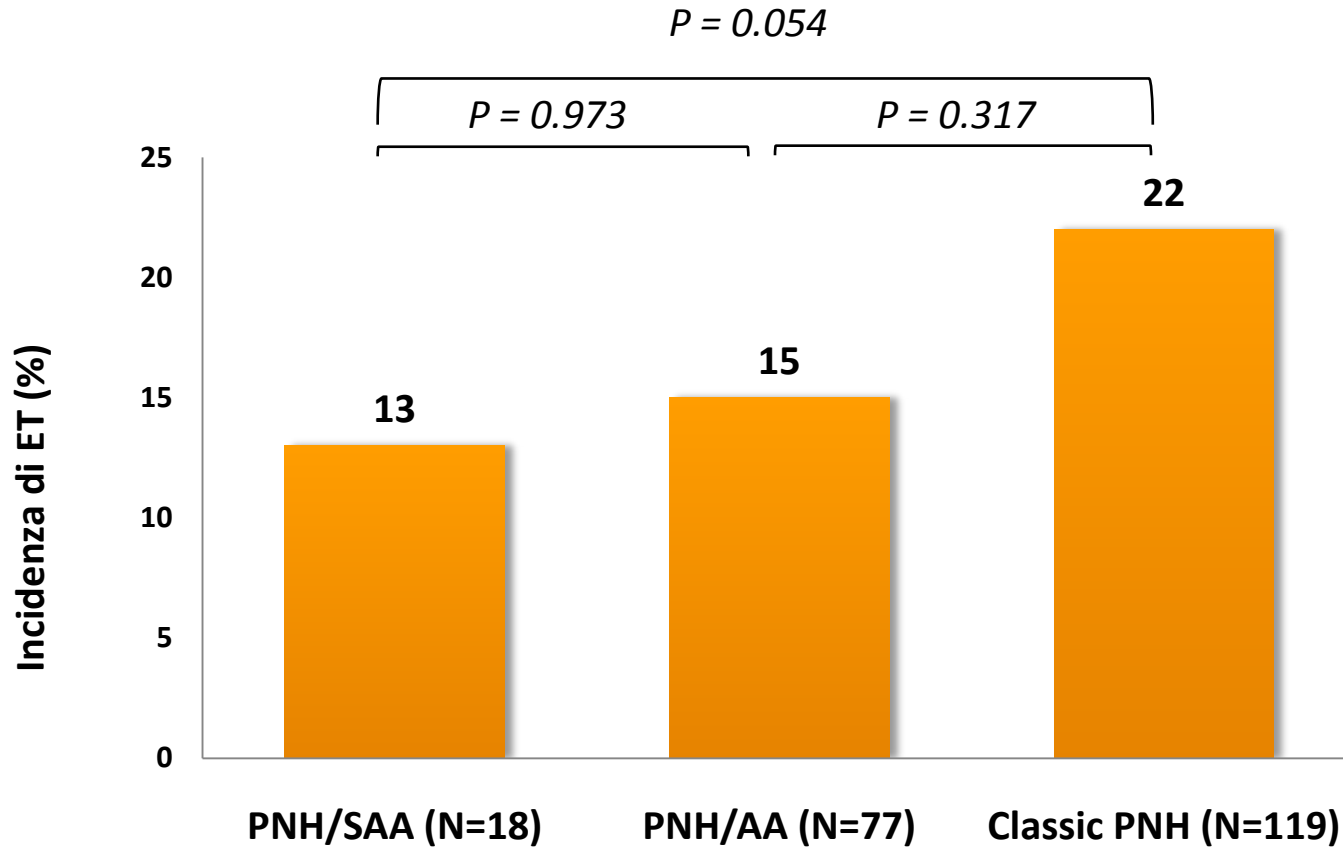


- I pazienti con PNH classica presentano dimensione del clone simile ai pazienti con PNH/AA, mentre è stata osservata una differenza significativa rispetto al sottogruppo con PNH/SAA

PNH/SAA: evidenza alla diagnosi di almeno 2 dei seguenti parametri: Hb ≤ 8 g/dL, ANC $< 0.5 \times 10^9/L$, PLTs $< 20 \times 10^9/L$.

PNH/AA: evidenza alla diagnosi di almeno 2 dei seguenti parametri: Hb ≤ 10 g/dL, ANC $0.5 - 1.5 \times 10^9/L$, PLTs $20 - 100 \times 10^9/L$.

L'incidenza di ET è simile nei sottogruppi di pazienti con PNH con o senza AA



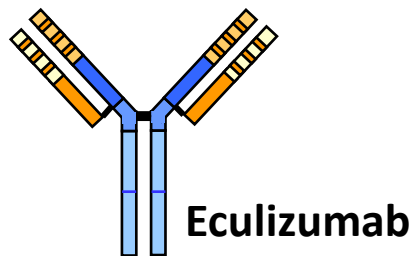
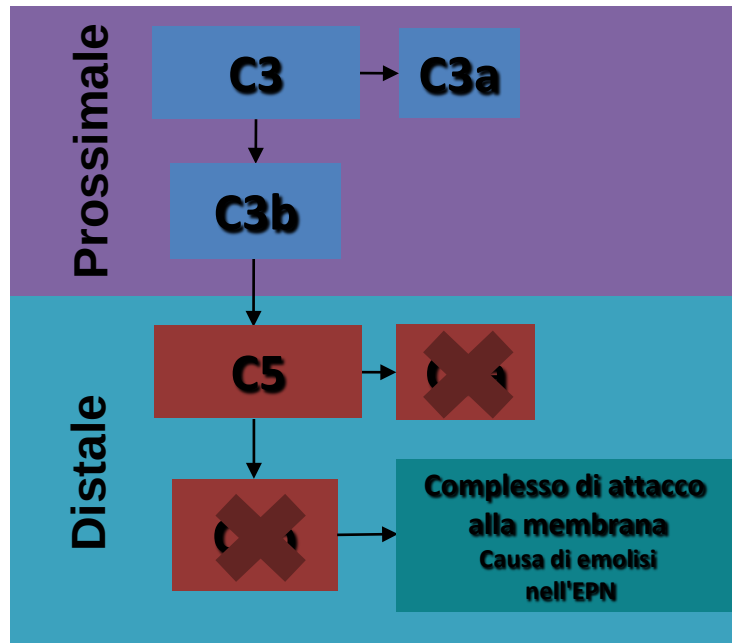
- Non è stata osservata alcuna differenza significativa nell'incidenza di TE tra i pazienti con PNH classica ed i sottogruppi PNH/SAA e PNH/AA

PNH/SAA: evidenza alla diagnosi di almeno 2 dei seguenti parametri: Hb ≤ 8 g/dL, ANC $< 0.5 \times 10^9/L$, PLTs $< 20 \times 10^9/L$.

PNH/AA: evidenza alla diagnosi di almeno 2 dei seguenti parametri: Hb ≤ 10 g/dL, ANC $0.5 - 1.5 \times 10^9/L$, PLTs $20 - 100 \times 10^9/L$.

Eculizumab blocca l'attivazione del complemento distale, impedendo l'emolisi cronica

Cascata del complemento^{1,2}



- **Eculizumab si lega con elevata affinità al C5²**
- Complemento distale - Formazione di C5a e C5b-9 bloccata²
- Le funzioni prossimali del complemento restano intatte²
 - Anafilotossina debole
 - Rimozione degli immunocomplessi
 - Opsonizzazione microbica
- Indicato per³
 - Emoglobinuria Parossistica Notturna (EPN)
 - Le prove del beneficio clinico sono dimostrate in pazienti con emolisi e uno o più sintomi clinici indicativi di una elevata attività della malattia, indipendentemente dalla storia precedente di trasfusioni
 - Sindrome emolitica uremica atipica (SEUa)

1. Walport MJ. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1058-1066.
2. Rother RP, et al. *Nat Biotechnol*. 2007;25(11):1256-1264.
3. Sintesi delle caratteristiche del prodotto Soliris (Eculizumab). Alexion Europe SAS; 2015.



STUDIO CITOFUORIMETRICO DEI CLONI GPI-CARENTI (CON FENOTIPO EPN) IN CORSO DI ANEMIA APLASTICA

CREMONA- HSR

Obiettivi dello studio

- *Obiettivo primario*
 - **Determinare la prevalenza di cloni con fenotipo EPN** in pazienti con diagnosi nota o nuova di anemia aplastica afferenti ai Centri della Rete Ematologica Lombarda partecipanti allo studio
- *Obiettivi secondari*
 - **Determinare le linee cellulari coinvolte** nell'espressione del clone EPN.
 - Valutare **la dimensione dei cloni in termini di conta cellulare assoluta.**

Disegno dello studio

- Studio spontaneo, multicentrico, retrospettivo e prospettico in una popolazione di pazienti con diagnosi nota o nuova di anemia aplastica afferenti ai Centri della Rete Ematologica Lombarda partecipanti allo studio

Criteri di inclusione

- Età ≥ 18 anni;
- Consenso informato scritto;
- Diagnosi di anemia aplastica nuova o nei 3 anni precedenti l'inizio dello studio. L'anemia aplastica è definita come²²:
 - Anemia aplastica severa (SAA), caratterizzata da cellularità midollare $< 25\%$ ed almeno una delle seguenti conte su sangue periferico: neutrofili $< 0.5 \times 10^9/L$, piastrine $< 20 \times 10^9/L$, anemia con reticolociti corretti $< 1\%$;
 - Anemia aplastica molto severa (vSAA), caratterizzata da cellularità midollare $< 25\%$ ed almeno una delle seguenti conte su sangue periferico: neutrofili $< 0.2 \times 10^9/L$, piastrine $< 20 \times 10^9/L$, anemia con reticolociti corretti $< 1\%$;
- Anemia aplastica non severa (nSAA), caratterizzata da ipoplasia midollare con pancitopenia non sufficientemente severa da raggiungere i criteri sopracitati

Questionario conoscitivo REL (1)

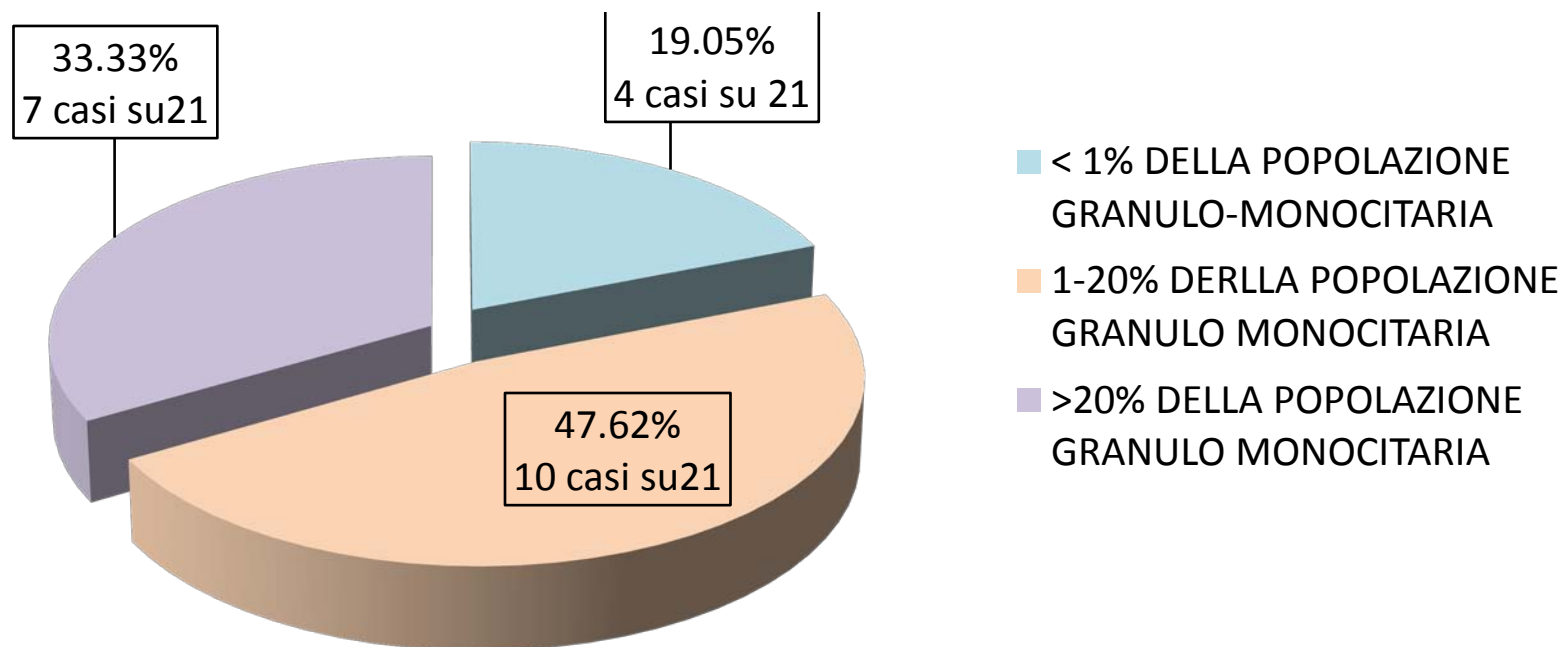
1. Nel Suo centro vengono ricercati in citometria a flusso i cloni EPN (GPI –carenti) nei pazienti con aplasia-ipoplasia midollare?
2. Dal 2005 ad oggi avete osservato dei casi di aplasia midollare in cui è stato dimostrato un clone EPN ?
3. Se avete risposto Sì, in quanti casi?
4. Nei casi in cui avete identificato cellule EPN, qual'era il valore percentuale del clone EPN (GPI carente)?
 - Clone EPN > 20% della popolazione granulocitaria-monocitaria
 - Clone EPN 1- 20% della popolazione granulocitaria-monocitaria
 - Clone EPN < 1% della popolazione granulocitaria-monocitaria

Questionario conoscitivo REL (2)

5. Per i cloni piccoli ($< 1\%$) determinate la sensibilità del metodo mediante LOD?
6. Quali marcatori immunologici avete utilizzato per l'analisi dei cloni EPN nelle diverse popolazioni ematiche:
 - a) Granulociti : FLAER , CD24, CD16, CD66b, CD157;
 - b) Monociti: FLAER , CD14, CD157
 - c) Eritrociti: CD59 , CD55
7. Quali marcatori immunologici utilizzate per effettuare il gating:
 - a) Granulociti : CD33, CD45, FSC, SSC
 - b) b) Monociti: CD33, CD45, FSC, SSC
 - c) c) Eritrociti: FSC, SSC, CD45
8. Siete interessati a partecipare ad uno studio osservazionale retrospettivo-prospettico per lo studio dei cloni EPN in corso di aplasia-ipoplasia midollare ?

APLASIA MIDOLLARE - STUDIO REL

% DEI CLONI EPN DELLA POPOLAZIONE GRANULO-MONOCITARIA (20¹ Casi)



6 CENTRI REL

Progetto REL-TRE

(Brando) :

**Progetto della Rete Ematologica
Lombarda per lo Screening con Test
Rapido dell'EPN**

Progetto REL-TRE

- Costituito da 2 fasi:
 1. Validazione di un metodo rapido per la diagnosi di EPN
 2. Utilizzo del test rapido per lo screening di pazienti ad alto rischio

Validazione della metodica rapida

- Pannello anticorpale a tre marcatori:
 - CD45 PerCP Cy5.5
 - CD15APC
 - FLAER-Alexa 488
- Strumentazione Becton Dickinson

Metodica rapida

- Strumentazione Becton Dickinson, pannello anticorpale a tre marcatori:
 - CD45 PerCP Cy5.5
 - CD15APC
 - FLAER-Alexa 488
- Strumentazione Beckman Coulter, pannello anticorpale a tre marcatori:
 - CD45 Pe Cy7
 - CD15 PeCy5
 - FLAER-Alexa 488

OBIETTIVO DELLO STUDIO

- Valutazione della frequenza di cloni con fenotipo da emoglobinuria parossistica notturna in soggetti ad alto rischio.

DISEGNO DELLO STUDIO

- Studio multicentrico, prospettico, con il coinvolgimento dei laboratori di citometria lombardi.
- Ogni responsabile del laboratorio dovrà indicare un medico di riferimento per l'identificazione dei pazienti, nell'ambito di quelli afferenti al reparto, che presentano i requisiti clinici per l'inclusione nel progetto.

Criteri di inclusione

- Anemia emolitica Coombs negativa definita da:
 - LDH $\geq 1,5 \times \text{ULN}$;
 - E/O aumento dei reticolociti;
 - E/O diminuzione dell'aptoglobina.
- E/O citopenia refrattaria uni- o bi- o tri-lineare, caratterizzata da:
 - Emoglobina $< 10 \text{ g/dL}$ negli uomini e $< 9 \text{ g/dL}$ nelle donne;
 - Piastrine $< 100.000/\mu\text{L}$
 - Leucociti $< 3000/\mu\text{L}$
- E/O mielodisplasia a basso grado, definita secondo la classificazione WHO.
- E/O Trombosi inusuali in pazienti di età < 50 anni, definite come:
- In siti inusuali (vene epatiche, vena porta, vena splenica, altre vene splanchniche, vene dei seni cerebrali, vene dermiche);
- E/O con citopenia inspiegata concomitante;
- E/O recidivanti malgrado la terapia anticoagulante.

Criteri di esclusione:

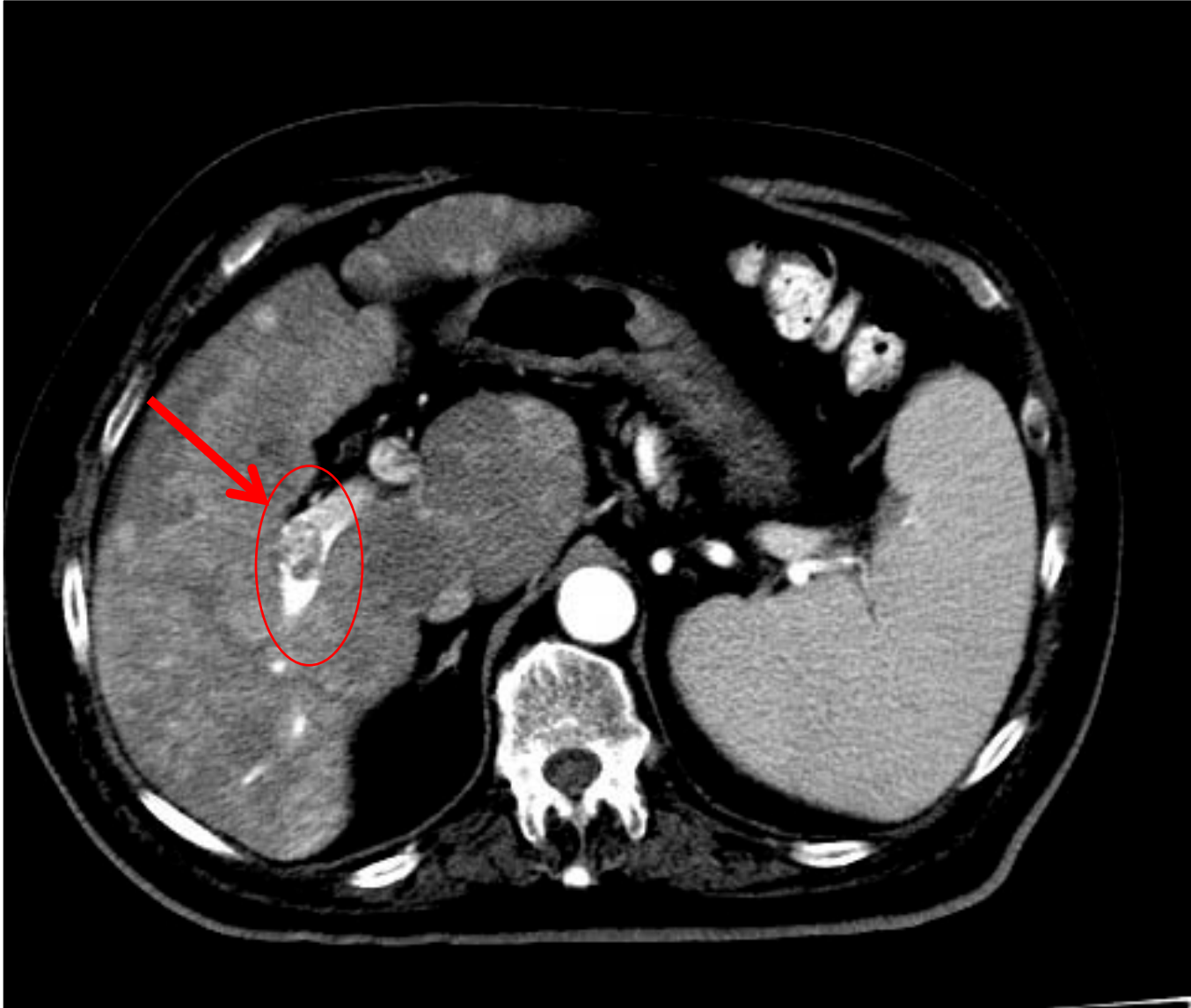
Test di Coombs positivo;
Presenza di sferociti, schistociti, cellule falciformi nello striscio periferico.

*Percorso Diagnostico, Terapeutico e
Assistenziale (PDTA) relativo a:
EMOGLOBINURIA PAROSSISTICA
NOTTURNA*

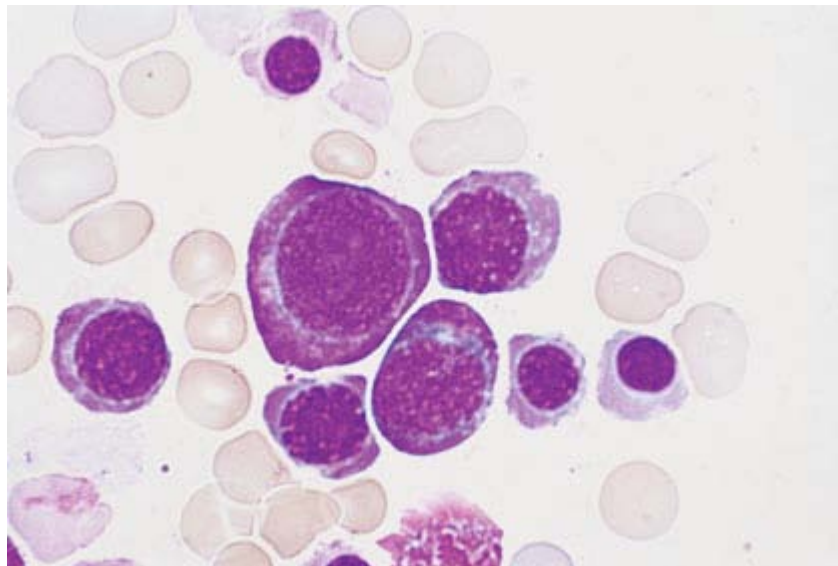
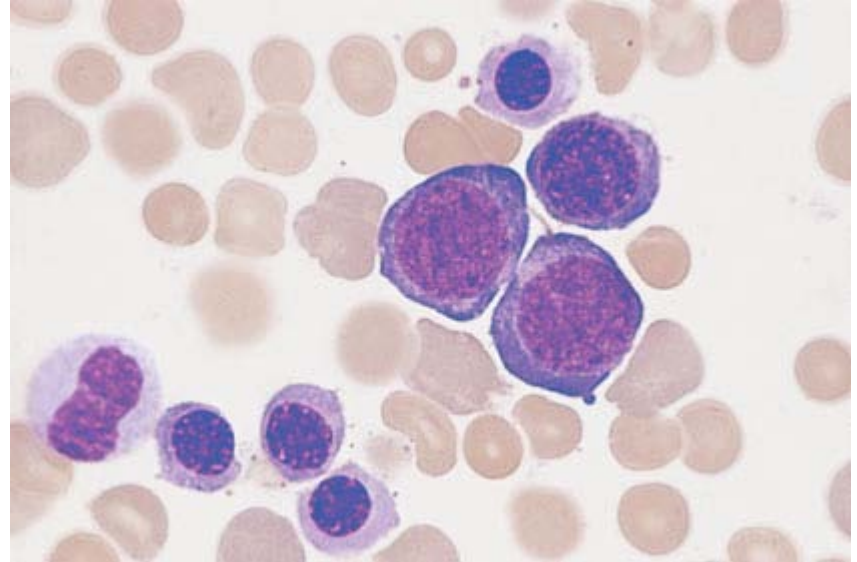
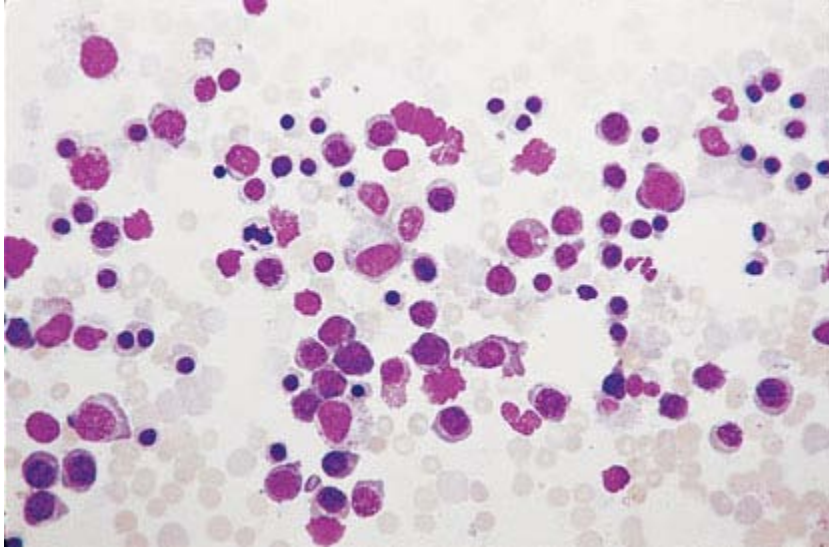
Codice esenzione RD0020



**TC addome in fase arteriosa:
trombosi ramo portale destro**



Aspirato midollare: iperplasia eritroide



Trombosi in sede atipica: iter diagnostico



Trombosi eredo-familiari

ATIII

Proteina C

Proteina S

PCA-R e FV Leiden

Protombina mutata

Iperomocisteinemia

Più rare:

↑ lipoproteina (a)

Ridotta fibrinolisi

(↑ di PAI-1 o ↓ di tPA)



Stati trombofilici acquisiti

Diabete mellito

Sindrome da APA

Neoplasie (pancreas, stomaco, polmone)

Sindrome nefrosica

MPD

EPN-Aplasia

Protesi valvolari

Morbo di Crohn

Sindrome di Behcet

Trombocitopenia da eparina

Valutazione della diatesi trombofilica (PC, PS, ATIII, HHcy, APS, FV Leiden e mutazione G20210A protrombina): **negativa**

Ricerca su midollo di **JAK2**, (c-mpl): **negativa**
Analisi del cariotipo su midollo: **46XX**

Valutazione immunofenotipica del sangue periferico per ricerca clone PNH

TAILORED THERAPY- from Eculizumab ev to new Ecu formulation or alternative drugs (Immunosuppressive,etc)

- Treatment with Eculizumab resulted in a **92% reduction in thrombotic events**
- 82% of patients being treated with Eculizumab achieved **transfusion independence** at 36 months
- Treatment with Eculizumab resulted in clinically meaningful improvements in **quality of life**, including reduced fatigue and pain
- Patients being treated with Eculizumab reported significant improvement in evidence of **pulmonary hypertension** and dyspnea