

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO in Embriologia Medica, Patologia ed Ematologia
Sperimentale. Ciclo XXIV.**

DIPARTIMENTO DI BIO-MEDICINA CLINICA E MOLECOLARE

**Approcci Terapeutici Innovativi per il Trattamento
di Cellule di Leucemia Mieloide Cronica Resistenti
ad Imatinib Mesilato**

STEFANIA STELLA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Alfredo Ferro

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Livia Manzella

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

1. Introduzione

- 1.1 Leucemia mieloide cronica
- 1.2 Decorso clinico della Leucemia Mieloide Cronica
- 1.3 Ruolo di BCR-ABL nella patogenesi della LMC
 - 1.3.1 Il gene e la proteina BCR
 - 1.3.2 Il gene e la proteina ABL
 - 1.3.3 Il gene e la proteina BCR-ABL
 - 1.3.4 Vie di trasduzione attivate da BCR-ABL
- 1.4 Terapia farmacologica della LMC
 - 1.4.1 Imatinib Mesilato
 - 1.4.2 Inibitori tirosino-chinasici di seconda generazione
- 1.5 Meccanismi di Resistenza ad Imatinib Mesilato

2. Scopo

3. Materiali e metodi

- 3.1 Estrazione delle cellule primarie
- 3.2 Estrazione dell'RNA
- 3.3 Analisi del trascritto mediante PCR Real-time
- 3.4 Analisi statistica

4. Risultati

- 4.1 Pazienti e Trattamento

- 4.2 Criteri European Leukemia Net
- 4.3 Risposta Ematologica, Citogenetica e Molecolare dei Pazienti SCREEN alla terapia con Imatinib
- 4.4 Sopravvivenza Globale, Sopravvivenza Libera da Progressione, Sopravvivenza Libera da Fallimento e Sopravvivenza Libera da Eventi
- 4.5 Importanza della Risposta Citogenetica Completa e della Risposta Molecolare Maggiore per EFS
- 4.6 Probabilità di ottenere una Risposta Citogenetica Completa o una Risposta Ottimale in base al trascritto BCR-ABL^{IS} dopo 3 e 6 mesi di terapia
- 4.7 Probabilità di ottenere una Risposta Citogenetica Completa, una Sopravvivenza libera da Fallimento, una Sopravvivenza libera da eventi o una Risposta Ottimale in base al trascritto trascritto BCR-ABL^{IS} alla diagnosi

5. Discussione

6. Bibliografia

1. INTRODUZIONE

1.1 LA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

La leucemia mieloide cronica (LMC), descritta per la prima volta da Bennett, Craigie e Virchow nel 1845, è una patologia mieloproliferativa derivata dalla trasformazione neoplastica della cellula staminale emopoietica ed è caratterizzata da una iperplasia della linea granulocitaria.

La LMC è stata la prima malattia associata ad una specifica anomalia del cariotipo, il cromosoma Philadelphia (Ph), descritto nel 1960 da Peter Nowell e David Hungerford [1].

Nel 1973 Janet Rowley dimostrò che il cromosoma di Philadelphia derivava dalla traslocazione reciproca tra il braccio lungo del cromosoma 9 e il braccio lungo del cromosoma 22 $t(9;22)(q34;q11)$. Questa traslocazione genera un cromosoma 22 di dimensioni ridotte, denominato cromosoma di Philadelphia, dal nome della città in cui lavoravano Nowell e Hungerford. A livello molecolare, la traslocazione $t(9;22)(q34;q11)$ giustappone la porzione 5' del gene *BCR* con la

porzione 3' del gene *ABL*, producendo un gene chimerico chiamato *BCR-ABL* (Figura 1) [1].

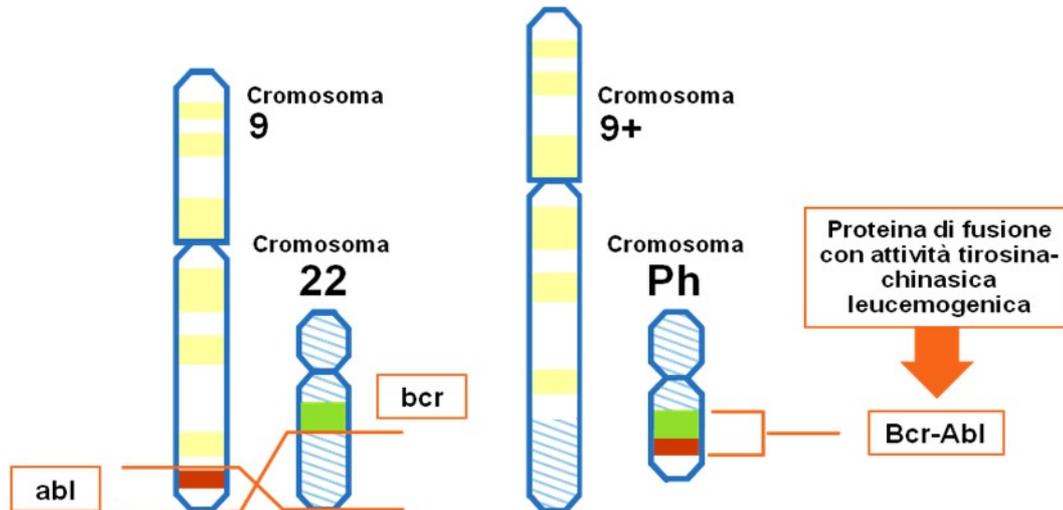


Figura 1. Traslocazione t(9;22).

Una traslocazione reciproca tra il cromosoma 9 ed il cromosoma 22 genera un cromosoma 22 di dimensioni inferiori alla norma, denominato cromosoma di Philadelphia (Ph). L'oncogene chimerico *BCR-ABL* è il prodotto molecolare di questa traslocazione.

La LMC ha un'incidenza di 1 caso per 100.000 persone/anno e rappresenta il 15% delle leucemie della popolazione adulta. L'incidenza della malattia è bassa in soggetti di età inferiore ai 40 anni, mentre aumenta rapidamente al superamento di tale soglia, con un'età media alla diagnosi compresa fra i 45 e i 55 anni.

La LMC è caratterizzata da un aumento del numero dei globuli bianchi nel sangue periferico, nel midollo, nella milza e

in altri organi periferici. Nel sangue possono inoltre comparire cellule immature della serie mieloide note come blasti (Figura 2).

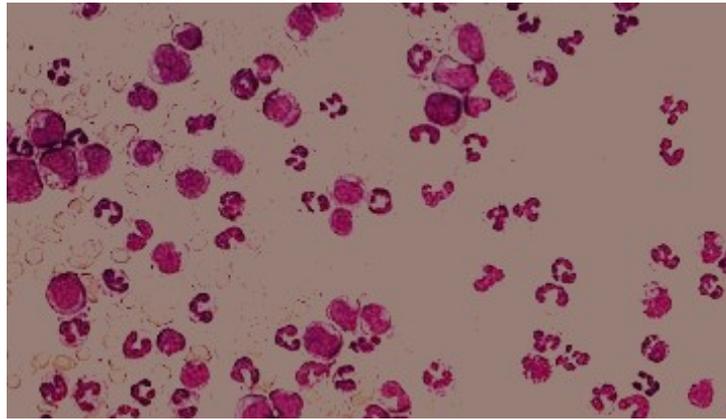


Figura 2. Blasti nel sangue periferico di paziente affetto da LMC.

1.2 DECORSO CLINICO DELLA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

Nella LMC si distinguono tre fasi:

- la *fase cronica*;
- la *fase accelerata*;
- la *fase acuta o crisi blastica*.

La **fase cronica** nella quale viene solitamente diagnosticata la malattia, è caratterizzata da un'espansione massiccia della linea granulocitaria. Questa fase dura in media da tre a sei anni. I disturbi associati alla fase cronica possono essere molto lievi o completamente assenti (febbricola, astenia, dolori addominali), ed il paziente può condurre spesso una vita normale [2, 3-5].

L'acquisizione di ulteriori alterazioni genetiche o epigenetiche causa la progressione della LMC dalla fase cronica ad una breve **fase accelerata** in cui si osserva un aumento dei blasti nel sangue periferico e midollare fino ad una soglia massima del 30%.

In assenza di terapie adeguate, la fase accelerata evolve ineluttabilmente nella **fase acuta o crisi blastica** (CB)

caratterizzata da un blocco del differenziamento dei progenitori ematopoietici e dalla presenza nel sangue periferico e nel midollo di più del 30% di blasti. La sopravvivenza mediana dei pazienti in CB è purtroppo estremamente bassa [6].

1.3 RUOLO DI BCR-ABL NELLA PATOGENESI DELLA LMC

La LMC origina nel midollo osseo dalla trasformazione neoplastica di una singola cellula staminale ematopoietica (Figura 3) [1, 7].

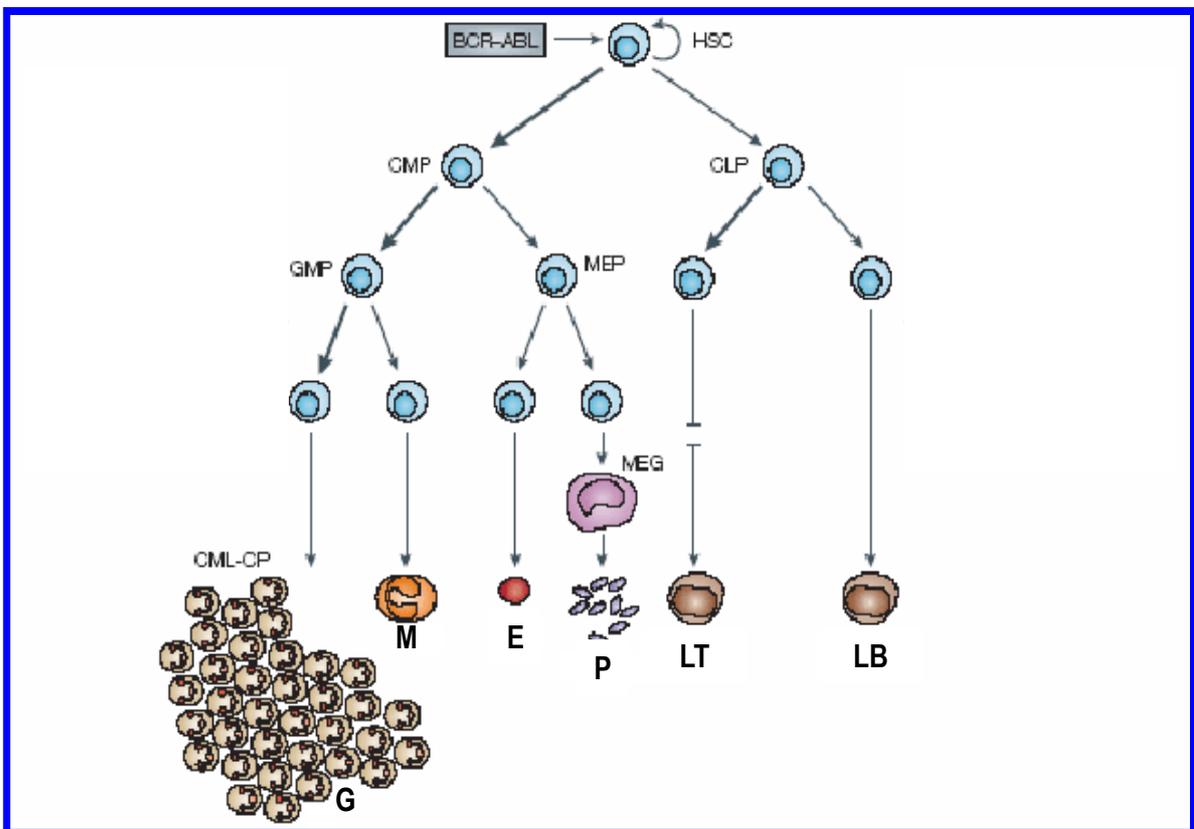


Figura 3. Rappresentazione schematica del differenziamento ematopoietico. La cellula staminale ematopoietica BCR-ABL-positiva genera progenitori mieloidi che, in seguito ad ulteriori alterazioni genetiche, promuovono la progressione della malattia.

HSC: cellula staminale ematopoietica

CMPs: cellule progenitrici mieloidi

CLPs: cellule progenitrici linfoidi

GMPs: progenitori dei granulociti/macrofagi

MEP: progenitori dei megacitociti /eritrociti

CML: clone leucemico

G: granulociti

M: macrofagi

E: eritrociti

P: piastrine

LT: linfociti T

LB: linfociti B

1.3.1 IL GENE E LA PROTEINA BCR

Il gene *BCR* si estende su un segmento di DNA di 130 kb ed è costituito da 23 esoni (Figura 4).

Questo gene codifica per la proteina BCR con peso molecolare di 160 kDalton.

All'estremità ammino-terminale BCR presenta un dominio di oligomerizzazione (compreso tra gli amminoacidi 1-68). Questo dominio è responsabile dell'oligomerizzazione della proteina BCR fisiologica ed è necessario per l'attivazione costitutiva dell'attività tirosino-chinasica di ABL nell'oncoproteina chimerica BCR-ABL [8].

Il centro della molecola contiene un dominio GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) che catalizza il distacco di una molecola di GDP (e la sua sostituzione con una molecola di GTP) dal sito catalitico delle proteine della superfamiglia delle GTPasi [9].

All'estremità carbossi-terminale della proteina è invece presente un dominio GAP (GTPase Activating Protein) che idrolizza il GTP in GDP, inattivando le proteine della superfamiglia delle GTPasi.

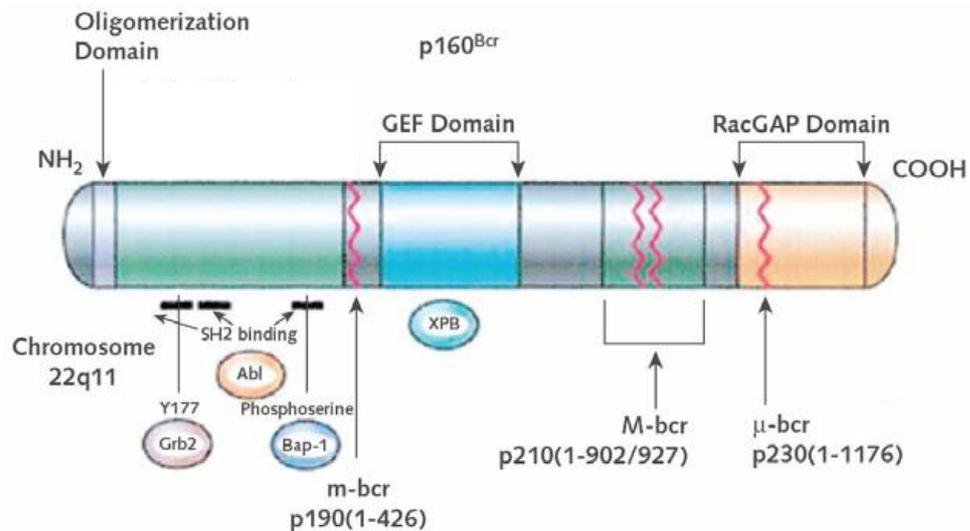


Figura 4. Organizzazione strutturale della proteina BCR

1.3.2 IL GENE E LA PROTEINA ABL

Il gene *ABL* è l'omologo umano dell'oncogene virale *v-ABL* presente nel Virus della Leucemia Murina di Abelson (A-MuLV) (Figura 5) [9].

Il gene *ABL* si estende su un segmento di DNA di 230 kb e presenta 12 esoni. La sua trascrizione, attraverso un meccanismo di splicing alternativo, può generare diversi RNA messaggeri a seconda che venga incluso nel trascritto maturo l'esone 1a o l'esone 1b. In entrambi i casi, il prodotto risultante è una proteina di 145 kDalton che codifica per una tirosin-chinasi non recettoriale localizzata sia nel citoplasma (dove

lega l'actina del citoscheletro) che nel nucleo (dove lega il DNA) [10].

All'estremità ammino-terminale la proteina ABL contiene due domini di omologia a SRC (SH). Il dominio SH3 consente l'interazione con altre proteine dotate di sequenze ricche in prolina; il successivo dominio SH2 media invece l'interazione con residui di tirosina fosforilati. Il dominio catalitico (tirosino-chinasico) è collocato a valle del SH2.

La porzione centrale della proteina contiene regioni ricche in prolina capaci di legare i domini SH3 di altre proteine. A questo livello sono anche stati identificati tre Segnali di Localizzazione Nucleare (NLS) responsabili dell'importo di ABL all'interno del nucleo.

Nella porzione carbossi-terminale ABL presenta un dominio di legame con l'actina (sia globulare che filamentosa) ed un Segnale di Esporto Nucleare (NES) che consente l'esporto della proteina dal nucleo al citoplasma [11].

La proteina ABL è coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, nella risposta agli stress genotossici, nell'adesione cellulare e nell'apoptosi è [9].

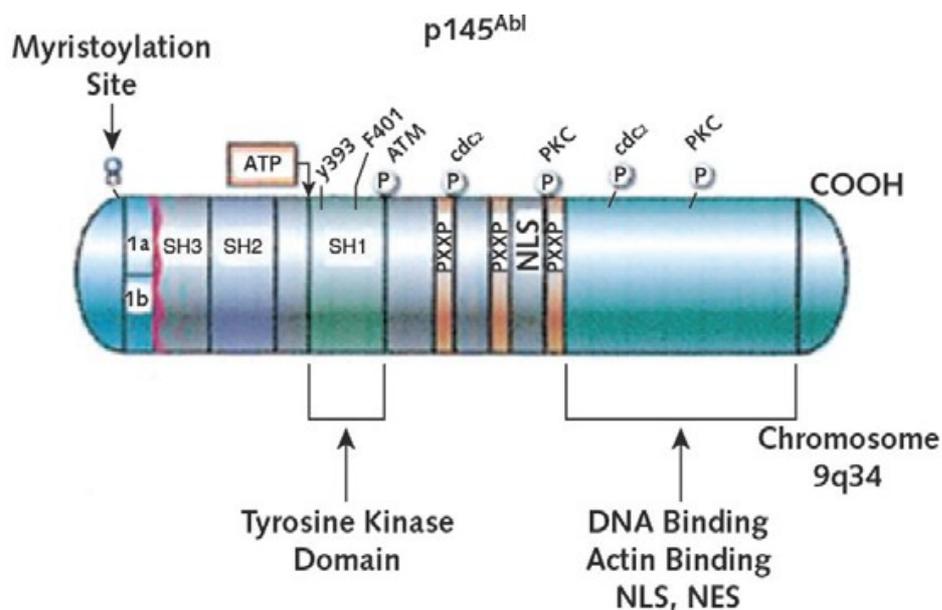


Figura 5. Organizzazione strutturale della proteina ABL

1.3.3 IL GENE E LA PROTEINA BCR-ABL

La LMC è caratterizzata dall'espressione dell'oncogene chimerico *BCR-ABL* formato dall'impropria fusione della sequenza 5' di *BCR* con buona parte della sequenza di *ABL*.

Il punto di rottura del gene *BCR* è quasi sempre localizzato tra gli esoni 13 e 14 (denominati anche esoni b2-b3), ed identifica una regione definita *Major Breakpoint Cluster Region* (*M-BCR*): [8,12].

ABL solitamente presenta 3 siti di rottura localizzati in una zona di circa 300 kb a monte dell'esone 1b, a valle dell'esone

1a o - più frequentemente - tra questi due esoni. Gli esoni 2-11 di *ABL* sono quindi sempre inclusi nel prodotto della traslocazione.

In relazione all'esone del gene *BCR* coinvolto nella traslocazione, si possono ottenere due forme alternative di gene chimerico:

- e13-a2 (o b2a2) (giunzione tra l'esone 13 di *BCR* e l'esone 2 di *ABL*)
- e14-a2 (o b3a2) (giunzione tra l'esone 14 di *BCR* e l'esone 2 di *ABL*) (Figura 6) [8, 9,12].

Entrambi codificano per un'oncoproteina del peso di circa 210 kDalton (nota come p210^{BCR-ABL}), responsabile del 90% dei casi di LMC [12].

Il gene *BCR* può anche presentare una rottura alternativa in corrispondenza del primo esone (e1). Questa regione nota come *minor Breakpoint Cluster Region* (m-*BCR*) [14,15] si fonde con gli esoni 2-11 di *ABL* creando la giunzione e1-a2. Il prodotto di tale giunzione è una proteina di 190 kDalton (p190^{BCR-ABL}) responsabile del 15% dei casi di Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) e di infrequenti casi di LMC.

Un'ulteriore rottura del gene *BCR* può verificarsi [15] tra gli esoni 19 e 20, generando una regione nota come *micro Breakpoint Cluster Region* (μ -*BCR*) che coniugandosi con gli esoni 2-11 di *ABL* genera la giunzione e19-a2. Tale giunzione codifica per un'ulteriore isoforma dell'oncoproteina BCR-ABL dal peso di 230 kDalton. p230^{BCR-ABL} è spesso associata alla LMC a granulociti neutrofili (LMC-N) [15].

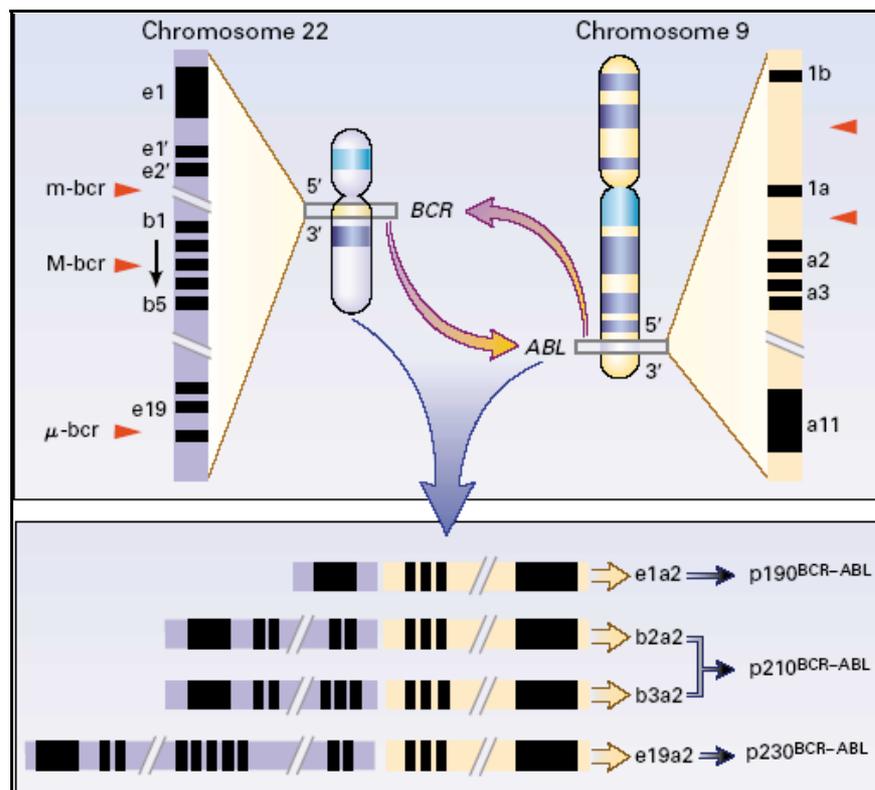


Figura 6. Organizzazione di BCR ed ABL ed isoforme del gene di fusione.

Le frecce indicano l'estensione delle tre regioni del gene *BCR* ed i punti di rottura all'interno di *ABL* (pannello superiore). Nel pannello inferiore sono riportate le quattro possibili isoforme del gene BCR-ABL.

Il potenziale leucemogeno di p210^{BCR-ABL} deriva dall'attivazione costitutiva dell'attività tirosin-chinasica di ABL nell'oncoproteina chimerica [12, 16].

1.3.4 VIE DI TRASDUZIONE ATTIVATE DA BCR-ABL

L'espressione dell'oncoproteina BCR-ABL stimola la crescita cellulare e favorisce la trasformazione delle linee cellulari ematopoietiche [16-19]. Tramite la sua attività tirosin-chinasica costitutiva BCR-ABL attiva numerose vie di traduzione del segnale (Figura 7) che, nella popolazione leucemica, inducono:

- un incremento della frazione proliferante;
- una riduzione dell'apoptosi;
- una aumentata motilità e sopravvivenza anche in assenza delle fisiologiche interazioni con la matrice extracellulare [20 - 21].

Le vie di trasduzione del segnale regolate dall'attività catalitica di BCR-ABL coinvolgono molteplici proteine tra cui RAS, STAT, MAPK, MEK, MYC, PI3K ed Akt [22-24].

Molte di queste interazioni sono mediate dalla fosforilazione di tirosine e richiedono il legame di BCR-ABL a proteine adattatrici quali GRB-2, DOK, CRKL e SHC.

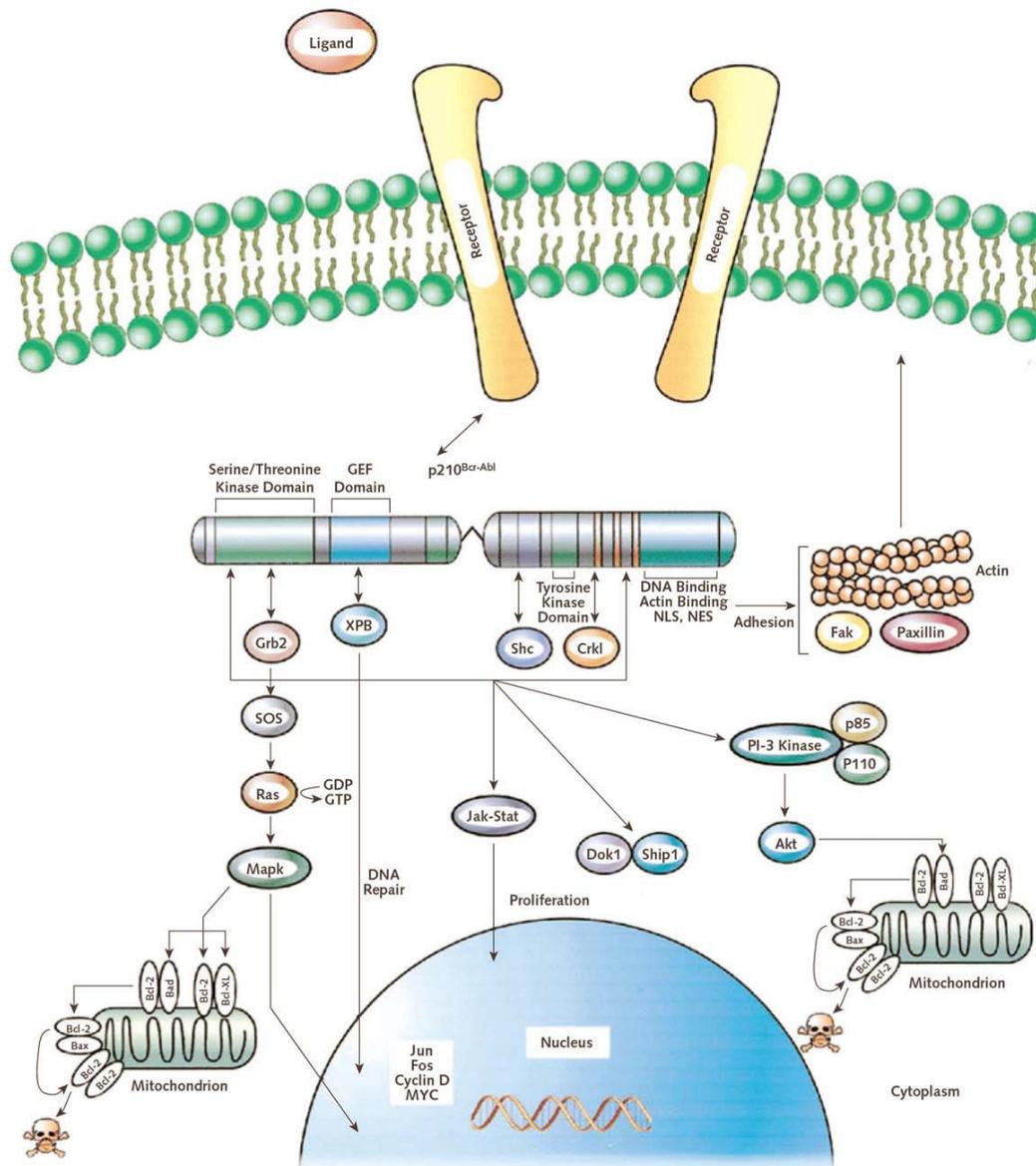


Figura 7. Rappresentazione schematica delle vie di trasduzione del segnale attivate da BCR-ABL.

1.4 TERAPIA FARMACOLOGICA DELLA LMC

Il primo composto sintetico utilizzato per la terapia farmacologica della LMC è stato il *Busulfano*, un agente alchilante che causava un miglioramento sintomatico della patologia, senza incrementarne la sopravvivenza [25].

Tuttavia l'eccessiva tossicità del Busulfano ha portato all'identificazione dell'Idrossiurea (HU), un'inibitore della ribonucleotide-riduttasi che, pur mostrando una ridotta tossicità, non si è mostrato capace di indurre una remissione citogenetica (riduzione percentuale delle cellule Philadelphia-positive) della malattia [26].

Per tale ragione ai pazienti affetti da LMC è stato successivamente proposto il trapianto di cellule staminali allogeniche che, a tutt'oggi, rappresenta l'unica possibilità di guarigione per i malati. Tuttavia, questa terapia trova scarsa applicazione sia per l'incapacità dei soggetti in età avanzata di sopportare i gravi effetti collaterali del trattamento, che per la difficoltà di trovare un donatore compatibile [27].

Negli anni '80, con l'introduzione dell'*interferone-alfa* nella terapia della LMC, si sono osservati i primi casi di remissione citogenetica completa con un significativo incremento della sopravvivenza globale nei pazienti che rispondevano a questo farmaco.

L'interferone è stato successivamente associato alla *citosina arabinoside* (ARA-C) e tale associazione farmacologica ha rappresentato la terapia di prima linea della LMC fino alla sintesi di un inibitore semi-specifico del dominio catalitico di ABL, l'Imatinib Mesilato (IM) [25-27].

L'IM è stato registrato nel 2001 per il trattamento della LMC per la sua capacità di indurre risposte ematologiche, citogenetiche e molecolari nella maggior parte dei pazienti trattati, con un significativo miglioramento sia della sopravvivenza globale che di quella libera da progressione.

Purtroppo circa il 25-30% dei pazienti in trattamento con IM sviluppa resistenza o intolleranza al farmaco. Per questa ragione sono state disegnate ulteriori molecole che offrono una valida alternativa per il trattamento terapeutico di questo gruppo di pazienti. Oggi si parla pertanto di inibitori tirosino-chinasici di

seconda generazione riferendosi a due composti denominati Dasatinib e Nilotinib [28-33].

1.4.1 IMATINIB MESILATO

L'Imatinib Mesilato ($C_{29}H_{31}N_7O \cdot CH_4SO_3$, PM 589,7), nome commerciale Glivec/Gleevec, è un derivato fenil-amino-pirimidinico (Figura 8).

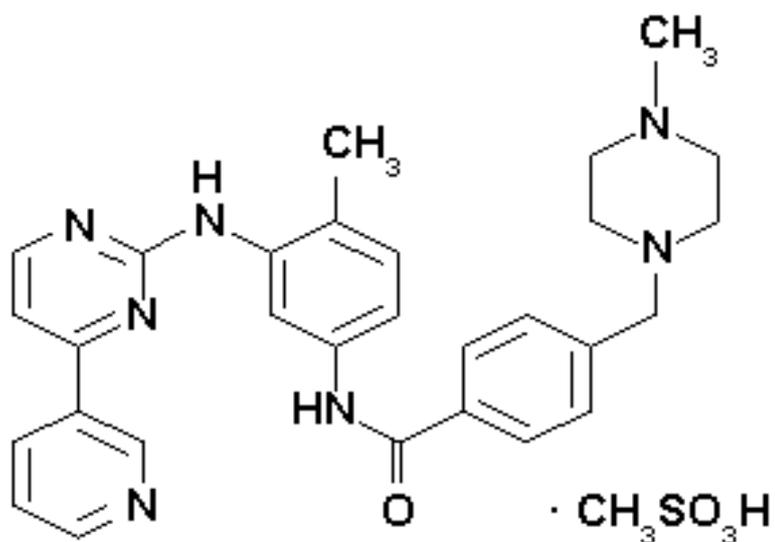


Figura 8. Struttura dell'Imatinib Mesilato.

IM rappresenta a tutt'oggi il farmaco d'elezione per il trattamento di pazienti con nuova diagnosi di LMC.

Oltre a BCR-ABL, IM riconosce quattro ulteriori tirosin-chinasi: ABL, c-KIT, PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) ed ARG (ABL-related gene) [34-36].

L'IM si lega al dominio TK di BCR-ABL attraverso un meccanismo *chiave-serratura* che si basa sulla complementarità della regione catalitica della proteina rispetto al farmaco, con la formazione di ponti idrogeno tra atomi del farmaco e residui di proteina. Questi ponti idrogeno sono importanti per stabilizzare il farmaco nella sua tasca di legame [37].

Come tutte le chinasi, BCR-ABL oscilla tra una conformazione inattiva (cataliticamente silente) ed una conformazione attiva (cataliticamente funzionante). Il passaggio tra le due conformazioni avviene per lo spostamento di un'ansa (definita *ansa di attivazione*) che dalla posizione chiusa nella conformazione inattiva, passa ad un posizione aperta nella conformazione attiva. IM si lega alla conformazione inattiva dell'enzima inibendo in modo allosterico il legame dell'ATP e bloccando così la fosforilazione dei substrati a valle e dunque la trasduzione del segnale dipendente da BCR-ABL [37] (Figura 9).

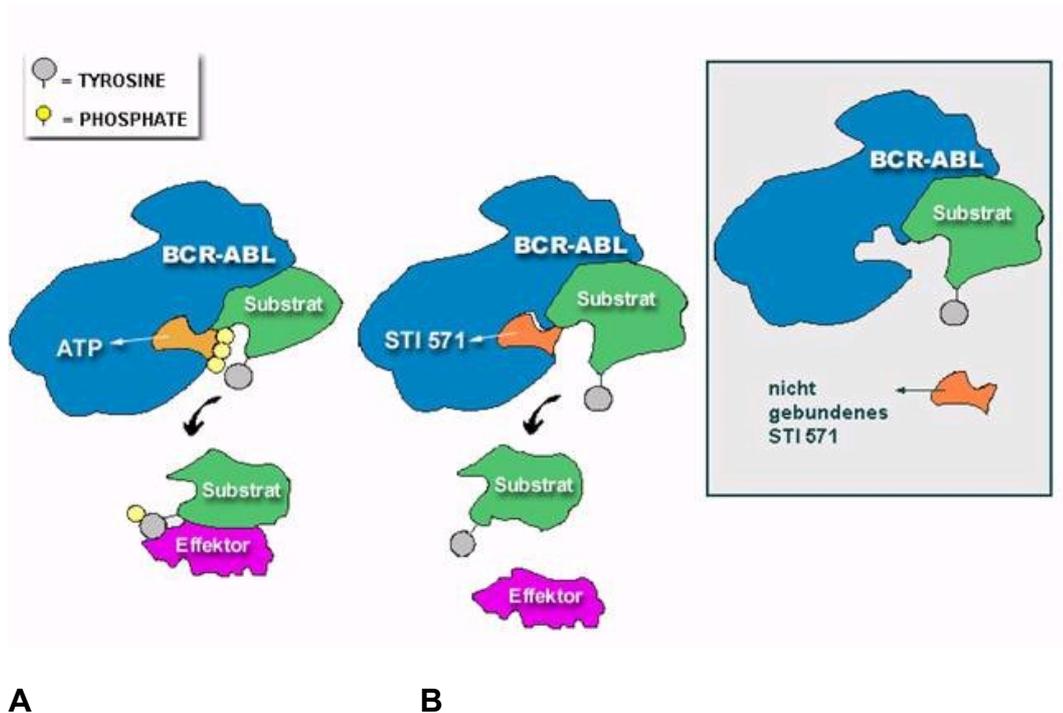


Figura 9. Meccanismo d'azione dell'Imatinib Mesilato.
(A) Dopo aver legato l'ATP, BCR-ABL è in grado di trasferire una molecola di fosfato ai residui di tirosina di diversi substrati, promuovendo l'attivazione di molteplici segnali intracellulari.
(B) Quando l'IM occupa il sito catalitico, blocca l'accesso per l'ATP, sopprimendo la fosforilazione delle molecole effettrici.

IM differisce in modo evidente dalle terapie tradizionali per quanto riguarda gli effetti tossici: l'effetto più comune è l'edema, talvolta associato a mialgia, aralgia, diarrea e rash cutaneo che si riscontrano nel 10% dei pazienti. Alcuni pazienti possono anche presentare edema periorbitale e ritenzione di liquidi.

1.4.2 INIBITORI TIROSINO-CHINASICI DI SECONDA GENERAZIONE

Dasatinib e Nilotinib sono farmaci appositamente disegnati per offrire un'alternativa terapeutica ai pazienti affetti da LMC che manifestano resistenza o intolleranza all'IM.

Il Dasatinib è un derivato carbossamidico ed è stato progettato in modo da essere un inibitore più potente dell'IM (Figura 10) [28-29, 33].

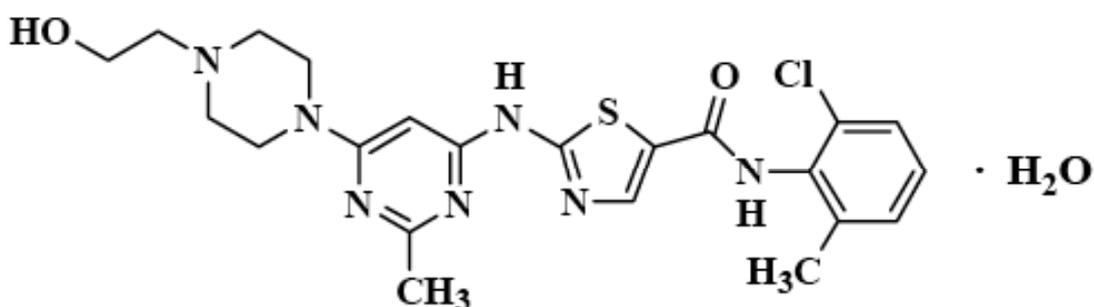


Figura 10. Struttura del Dasatinib.

Dasatinib ha una biodisponibilità orale che varia dal 14 al 34% probabilmente dovuta ad un incompleto assorbimento ed un elevato primo passaggio epatico.

Oltre alla mielosoppressione, la ritenzione di liquidi a livello pleurico sembra essere il principale effetto tossico del Dasatinib [28-29].

Il Nilotinib è stato disegnato sostituendo nella struttura dell'IM il gruppo N-metil piperazina con un gruppo trifluorometil-imidazolo fenilico (Figura 11). Anche questo composto è più potente dell'IM.

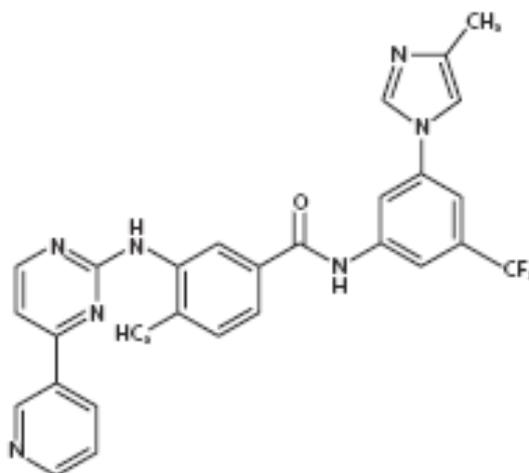


Figura 11. Struttura del Nilotinib.

Come l'IM anche il Nilotinib è un'inibitore semi-specifico dell'attività catalitica di BCR-ABL che induce apoptosi nelle cellule leucemiche [38-39].

L'assorbimento orale del Nilotinib non è molto rapido (la biodisponibilità media è del 30%) e la concentrazione

plasmatica aumenta con l'aumentare della dose, tendendo però alla saturazione. L'assorbimento orale è inoltre influenzato dall'assunzione di cibo: per tale ragione il farmaco deve essere assunto un'ora prima o due ore dopo i pasti, cercando di evitare alimenti ad alto contenuto di grassi.

Gli effetti tossici riscontrati più frequentemente comprendono la mielosoppressione, il rash cutaneo, la fatica e l'incremento dei valori di lipasi ed amilasi [32].

1.5 MECCANISMI DI RESISTENZA AD IMATINIB MESILATO

Nonostante gli eccellenti risultati ottenuti con l'IM, all'incirca il 25% dei pazienti affetti da LMC manifesta resistenza al farmaco [40-45]. La mancata risposta alla terapia può essere dovuta a:

1. **resistenza primaria:** si manifesta in pazienti che dopo 3 mesi di terapia non hanno raggiunto la risposta ematologica completa, o che dopo 12 mesi di terapia presentano più del 35% di cellule contenenti il cromosoma Philadelphia, o che dopo 18 mesi di IM non hanno ottenuto una risposta citogenetica completa (assenza di cellule positive per il cromosoma di Philadelphia);
2. **resistenza secondaria:** si manifesta in pazienti che perdono la risposta ematologica o citogenetica completa o progrediscono in Fase accelerata o Crisi Blastica.

Si distinguono due meccanismi principali di resistenza ad IM:

- **Meccanismi di RESISTENZA BCR-ABL-DIPENDENTE**
- **Meccanismi di RESISTENZA BCR-ABL-INDIPENDENTE.**

La **resistenza BCR-ABL dipendente** può essere dovuta a:

- mutazioni puntiformi nel dominio tirosino-chinasico di BCR-ABL che preservano l'attività catalitica dell'oncoproteina ma ne impediscono l'interazione con il farmaco [40, 46];
- amplificazione genica o cromosomica di BCR-ABL che aumentano il numero di molecole di BCR-ABL all'interno di ciascuna cellula leucemica. In queste circostanze, la concentrazione intracellulare di IM non riesce a sopprimere l'attività catalitica dell'incrementato numero di molecole di BCR-ABL.

La **resistenza BCR-ABL indipendente** può essere dovuta all'iper-espressione di tirosino-chinasi come Lyn, Src e Hck che non sono inibite da IM e stimolano la proliferazione cellulare.

2. SCOPO

Lo scopo di questo studio è stato di individuare uno o più parametri molecolari associati ad una risposta insoddisfacente all'Imatinib Mesilato nei 192 pazienti con Leucemia Mieloide Cronica arruolati nello studio osservazionale SCREEN. L'identificazione di tale/i parametro/i consentirebbe di indirizzare precocemente questi pazienti verso un approccio terapeutico alternativo.

Obiettivi secondari dello studio sono state le correlazioni tra molteplici parametri molecolari (varianti di trascritto, quantità di trascritto per BCR-ABL alla diagnosi e dopo 3 o 6 mesi di trattamento con Imatinib) e la risposta alla terapia in termini di sopravvivenza globale, sopravvivenza libera da progressione, sopravvivenza libera da eventi, sopravvivenza libera da fallimento.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ESTRAZIONE DELLE CELLULE PRIMARIE

Le cellule primarie sono state estratte dal sangue del paziente mediante una lisi eritrocitaria del sangue midollare e del sangue periferico. La lisi consiste nel risospendere il sangue midollare o periferico con una soluzione di lisi (1,55 mol/L NH_4Cl , 0,1 mol/L KHCO_3 e 0,5 mol/L EDTA), omogeneizzare, lasciare in ghiaccio per 10 minuti e centrifugare a 1800 rpm, 25 °C per 7 minuti. Buttare il surnatante e ripetere questa fase per altre due volte.

Le cellule, poi, sono state lavate con una soluzione di PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma), centrifugate e, dopo aver buttato il surnatante, sono state risospese in una soluzione di GTC (4 M Guanidine Thiocyanate, 5 mM EDTA(0.5M), 25mM Tris-citrate (1.0 M) e 0,5% Sarcosyl (30%), previamente attivato con beta-mercaptoetanololo e omogenizzate mediante una siringa con un ago 22G.

La soluzione di GTC consente di lisare le membrane cellulari, di preservare gli acidi nucleici degradando gli enzimi DNasi e RNasi, responsabili della degradazione dei rispettivi acidi

nucleici e, inoltre, permette di preservare gli acidi nucleici per molto tempo.

Il lisato cellulare del campione è stato conservato in un freezer a -20°C.

3.2 ESTRAZIONE DELL' RNA

L'RNA totale è stato estratto dai lisati cellulari, conservati a -20°C, mediante QIAGEN Rneasy Mini Kit (QIAGEN).

L'estrazione dell'RNA avviene in diverse fasi:

- Aggiunta di Etanolo: al lisato cellulare del campione si aggiunge un ugual volume etanolo al 70% per agevolare il legame dell'RNA alla membrana semipermeabile delle colonnine del kit;
- Legame dell'RNA: si trasferisce la soluzione del lisato con l'etanolo nelle colonnine del kit, dotate di una membrana semipermeabile in grado di trattenere gli acidi nucleici, e si centrifuga a 13000 rpm per 15 secondi per eliminare tutto il resto.
- Lavaggi: si eseguono tre lavaggi il primo con il Buffer RW1 e gli altri due con il Buffer RPE; dopo ogni

lavaggio si esegue una centrifugata a 13000 rpm per 15 secondi.

- Eluizione dell'RNA: si eluisce l'RNA con 30 μ L di H₂O bidistillata RNasi-Free mediante centrifugata a 14000 rpm per 2 minuti, si dosa con uno spettrofotometro, si incuba per 5 minuti a 65°C e si mette in un freezer a -20°C.

3.3 ANALISI DEL TRASCritto MEDIANTE PCR REAL-TIME

La PCR Real-Time è in grado di misurare in tempo reale la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico.

Il cDNA sintetizzato dall'RNA viene addizionato alla reazione di PCR contenente i componenti standard della PCR ed in più una sonda che si appaia al filamento di DNA compreso tra i due primers. La sonda contiene un "*reporter*" fluorescente all'estremità 5' e un "*quencher*" all'estremità 3'.

Durante la reazione, la progressione della polimerasi lungo il filamento di DNA provoca la rottura della sonda e, conseguentemente, il rilascio del reporter da parte del quencher. In seguito a questa separazione nella reazione si produce una fluorescenza che viene misurata dalla macchina. L'accumulo dei prodotti di PCR è direttamente proporzionale all'aumento in fluorescenza del reporter e dunque la fluorescenza aumenta in ogni ciclo proporzionalmente alla velocità di degradazione della sonda.

Durante la reazione ai campioni viene attribuito un numero di copie ricavato in riferimento al numero di copie della curva standard.

La curva standard viene allestita utilizzando varie diluizioni di plasmidi codificanti per il gene d'interesse o con cDNA derivato da una linea cellulare positiva per BCR-ABL.

Oltre alla curva standard vengono inseriti anche dei controlli positivi e un controllo negativo (di solito cDNA derivato da linee cellulari immortalizzate che esprimono o sono prive del gene d'interesse). Viene inoltre aggiunto come ulteriore controllo il DNA genomico, che contenendo nella propria sequenza sia gli introni che gli esoni permette di sottrarre al

risultato ottenuto il fondo dovuto a possibili contaminazioni da DNA gnomico.

Per valutare la risposta molecolare si eseguono due analisi quantitative: la prima viene eseguita per valutare il trascritto di BCR-ABL e la seconda per determinare il trascritto del gene controllo beta- glucuronidasi (GUS) o Abelson (ABL).

Per esprimere i risultati, il numero di copie di BCR-ABL viene espresso come rapporto rispetto al numero di copie del gene di controllo (GUS/ABL), in alternativa, come riduzione logaritmica rispetto a un valore soglia prefissato [59].

3.4 ANALISI STATISTICA

Le probabilità di Sopravvivenza globale (Overall Survival o OS), di Sopravvivenza libera da Progressione (Progression-Free Survival o PFS) di Sopravvivenza libera da Fallimento (Failure-Free Survival o FFS) e di sopravvivenza libera da eventi (Event Free-Survival o EFS) sono state calcolate utilizzando il metodo di Kaplan-Meier. PFS è stata definita come la sopravvivenza senza evidenze di fase accelerata o di crisi blastica mentre la FFS è stata definita come la probabilità di sopravvivenza senza evidenze di fallimento del farmaco in

accordo con i criteri European Leucemia Net 2009.

La probabilità delle risposte ematologiche, citogenetiche e molecolari sono state calcolate usando la procedura dell'indidenza cumulativa, in cui le risposte mantenute sono gli eventi di interesse. Per identificare fattori prognostici per la risposta citogenetica e la risposta molecolare sono state eseguite analisi multivariate utilizzando il log-rank test. Per identificare fattori prognostici per la risposta ottimale sono state eseguite analisi univariate utilizzando il Fisher exact test.

Il significato dei livelli di trascritto BCR-ABL^{IS} alla diagnosi per il raggiungimento di una risposta citogenetica completa, una sopravvivenza libera da fallimento, una sopravvivenza libera da evento e una risposta ottimale è stata valutato usando il Wilcoxon rank sum test. Nelle analisi landmark, i pazienti con parametro di stratificazione (CCyR a 12 mesi o MMR a 18 mesi) sono stati assegnati al maggior gruppo sfavorevole (no CCyR o no MMR) per riflettere una collocazione "intention-to-treat".

La differenza tra le medie dei due gruppi individuali dei pazienti è stata valutata mediante il test t di Student per i dati non appaiati con il 95% di intervallo di confidenza. La differenza statistica tra le prevalenze è stata effettuata mediante il test del χ^2 . Sono stati considerati significativi dati con $p < 0.05$, $p < 0.01$ e

$p < 0.001$. Le analisi statistiche sono state eseguite con R software (R Development Core Team, 2011).

4. RISULTATI

4.1 PAZIENTI E TRATTAMENTO

Lo studio SCREEN, Sicily CML Regional Enterprise, è uno studio osservazionale condotto su un campione di 192 pazienti affetti da Leucemia Mieloide Cronica arruolati dalle principali Divisioni di Ematologia della Regione Sicilia al fine di valutare la loro risposta ematologica, citogenetica e molecolare al trattamento con IM.

I pazienti, tutti con LMC in fase cronica, sono stati arruolati tra gennaio 2005 e dicembre 2010 ed hanno ricevuto 400 mg al giorno di IM come terapia di prima linea.

Ogni Divisione di Ematologia è stata responsabile della diagnosi, del trattamento e del follow-up dei pazienti inclusi nello studio, mentre tutte le analisi molecolari sono state centralizzate nel Laboratorio di Oncologia ed Ematologia Sperimentale del Dipartimento di Bio-Medicina Clinica e Molecolare - Sezione di Ematologia, Oncologia, Patologia Generale e Clinica e Bioinformatica - dell'Università di Catania.

Le principali caratteristiche anagrafiche, ematologiche e biologiche della popolazione reclutata sono riassunte nella Tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti arruolati nello studio SCREEN (N=192).

Caratteristiche	N°	%
Età (anni)		
Mediana	54	
Intervallo	24-90	
Sesso		
Maschio	85	44.3
Femmine	107	55.7
Rischio Sokal		
Basso	92	47.9
Intermedio	72	37.5
Alto	28	14.6
Periodo intercorso dalla diagnosi (settimane)		
Mediana	3	
Intervallo	0-48	
Anomalie cromosomiche aggiuntive oltre al Cromosoma Philadelphia		
	14	7.3
Splenomegalia		
Dimensioni milza \geq 10 cm sotto il margine costale sinistro	28	14.6
Leucociti ($\times 10^9/L$)		
Mediana	63.3	
Intervallo	3.5-718	
Conta Piastrinica ($\times 10^9/L$)		
Mediana	335	
Intervallo	67-1690	
Emoglobina (g/L)		
Mediana	12.2	
Intervallo	7.5-17	
Tipo di Transcritto		
e13a2 (b2a2)	73	38.0
e14a2 (b3a2)	103	53.7
e13a2 ed e14a2	16	8.3

Il follow-up mediano dei soggetti arruolati nello studio è di 37 mesi (intervallo 12 - 72).

Nessun paziente è stato perso al follow-up. Quarantatre pazienti (22.39%) hanno interrotto il trattamento con IM dopo una mediana di 12 mesi (intervallo 3 - 54) a causa di intolleranza (n=6), risposta subottimale (n=4), mancata risposta al farmaco (n=29) o per decesso imputabile alla malattia (n=4). Dopo l'interruzione del farmaco, 1 paziente è stato sottoposto a trapianto allogenico di midollo mentre i restanti 38 hanno assunto un inibitore tirosino-chinasico di seconda generazione.

Ventitre pazienti (11.97%) hanno aumentato la dose di IM passando da 400 mg/die a 600 o 800 mg/die. La tossicità ad IM osservata è analoga a quella precedentemente descritta in letteratura [47-49].

4.2 CRITERI EUROPEAN LEUKEMIA NET

Dal 2001 l'IM rappresenta il farmaco d'elezione per il trattamento di pazienti con nuova diagnosi di LMC. Per

monitorare le risposte dei pazienti alla terapia un pannello di esperti internazionali riuniti sotto l'egida dello European Leukemia Net (ELN) ha individuato molteplici criteri ematologici, citogenetici e molecolari.

Questi criteri, pubblicati per la prima volta nel 2006 [49] e successivamente aggiornati nel 2009 [50], sono riassunti nella Tabella 2.

Tabella 2. Linee Guida ELN (2009) per la Valutazione della Risposta ad IM di pazienti affetti da LMC.

TEMPO	RISPOSTA OTTIMALE	RISPOSTA SUBOTTIMALE	RISPOSTA FALLIMENTARE
Dopo 3 mesi di IM	CHR	No CyR	<CHR
Dopo 6 mesi di IM	PCyR ($\leq 35\%$ Ph+)	<PCyR ($> 35\%$ Ph+)	<mCyR ($> 95\%$ Ph+)
Dopo 12 mesi di IM	CCyR	PCyR ($\leq 35\%$ Ph+)	<PCyR ($> 35\%$ Ph+)
Dopo 18 mesi di IM	MMR	<MMR	<CCyR
In ogni momento	Stabilità o miglioramento della MMR	Perdita MMR; Mutazioni**	Perdita CHR, Perdita CCyR; Mutazioni [°] , ACA in cellule Ph+*

CHR: Risposta Ematologia Completa; CCyR: Risposta Citogenetica Completa; PCyR: Risposta Citogenetica Parziale; mCyR: Risposta Citogenetica Minore; MMR: Risposta Molecolare Maggiore; ACA: Alterazioni Cromosomiche Aggiuntive; *Confermata in almeno 2 test citogenetici consecutivi e associata con la perdita di CHR o di CCyR; **Bassi livelli di insensibilità ad IM; [°]Alti livelli di insensibilità ad IM.

Le raccomandazioni ELN postulano che un paziente in terapia con IM debba ottenere, in tempi diversi, una Risposta Ematologica, Citogenetica e Molecolare.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'analisi dei livelli del trascritto ibrido *BCR-ABL* mediante **PCR REAL-TIME** (RQ-PCR) riflette la diminuzione della massa leucemica indotta dalla terapia con IM ed è il metodo più accurato per il monitoraggio dei pazienti con LMC [49]. L'analisi RQ-PCR permette di valutare il grado di risposta molecolare di ogni paziente e di identificare precocemente la resistenza all'IM.

Al fine di rendere equiparabili i dati quantitativi generati da laboratori diversi, è stato recentemente approvato l'impiego di una Scala di Standardizzazione Internazionale (International Standardized Scale o IS) in cui il trascritto di ogni paziente viene rapportato ad un valore convenzionalmente stimato pari al 100%. Questo valore deriva dalla mediana del trascritto di 30 pazienti misurato in tre centri internazionali di riferimento.

In base al valore IS del trascritto di *BCR-ABL*, la risposta molecolare può essere di due tipi:

- ✓ **Risposta Molecolare Maggiore (MMR):** quando il rapporto tra il trascritto di *BCR-ABL* e quello di *ABL* è minore dello 0.1%;
- ✓ **Risposta Molecolare Completa (CMR):** quando il trascritto di *BCR-ABL* è assente.

Benchè non ci sia una correlazione assoluta tra uno specifico valore di trascritto e la risposta ematologica o citogenetica, generalizzando è possibile stimare che ad una riduzione di 1 logaritmo, rispetto al 100% basale, corrisponde una CHR. La riduzione di 2 logaritmi è spesso associata ad una CCyR mentre il decremento di 3 logaritmi è indicativo di una MMR. Infine, una riduzione dei livelli di *BCR-ABL* superiore ai 4.5 logaritmi viene convenzionalmente indicata come una CMR (Figura 12). L'analisi molecolare del trascritto per *BCR-ABL* viene eseguita sul sangue periferico alla diagnosi e ripetuta dopo ogni tre mesi per tutta la durata della terapia.

INTERNATIONAL STANDARDIZED SCALE

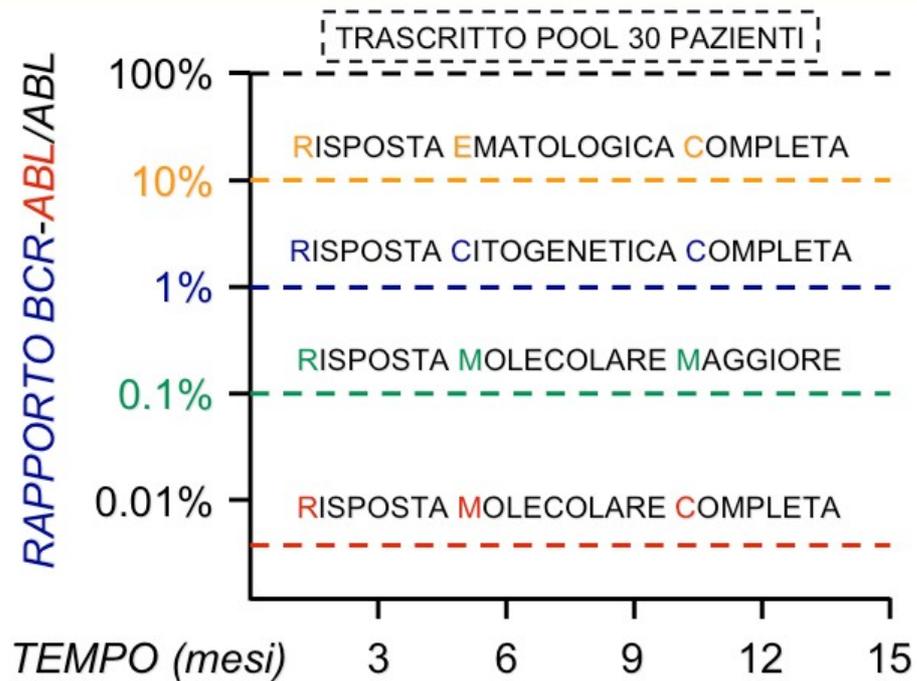


Figura 12. International Standardized Scale (IS).

Scala di Standardizzazione Internazionale in cui il trascritto di ogni paziente viene rapportato ad un valore convenzionalmente stimato pari al 100% e derivato dalla mediana del trascritto di 30 pazienti misurata in tre centri internazionali di riferimento.

4.3 RISPOSTA EMATOLOGICA, CITOGENETICA E MOLECOLARE DEI PAZIENTI SCREEN ALLA TERAPIA CON IM

In base ai criteri ELN 2009, tutti i 192 pazienti arruolati nello studio SCREEN hanno raggiunto una Risposta Ematologica Completa (CHR). Centosessantadue pazienti (84.37%) hanno ottenuto una Risposta Citogenetica Completa (CCyR) (mediana 6 mesi, intervallo 6 - 24 mesi), 116 (60.41%) hanno raggiunto una Risposta Molecolare Maggiore (MMR) (mediana 12 mesi; intervallo 3 - 57 mesi) e 33 (17.18%) hanno conseguito una Risposta Molecolare Completa (CMR) (mediana 34.5 mesi; intervallo 6 - 57 mesi).

Durante il follow-up 4 pazienti (2.08%) hanno perso la loro CHR, 8 (4.93%) la CCyR, 28 (24.13%) una MMR e 22 (66.66%) hanno perso la CMR.

L'analisi statistica dell'incidenza cumulativa calcolata dopo 12 mesi di trattamento con IM mostra che il 97.91% dei pazienti ha raggiunto una CHR, il 73.5% ha ottenuto una CCyR, il 21.8% ha conseguito una MMR e l'1.1% ha raggiunto una CMR (Figura 13). Una stima a 60 mesi prevede una frequenza del

97.91% per la CHR, del 89.5% per la CCyR, del 64.7% per la MMR e del 12.2% per la CMR.

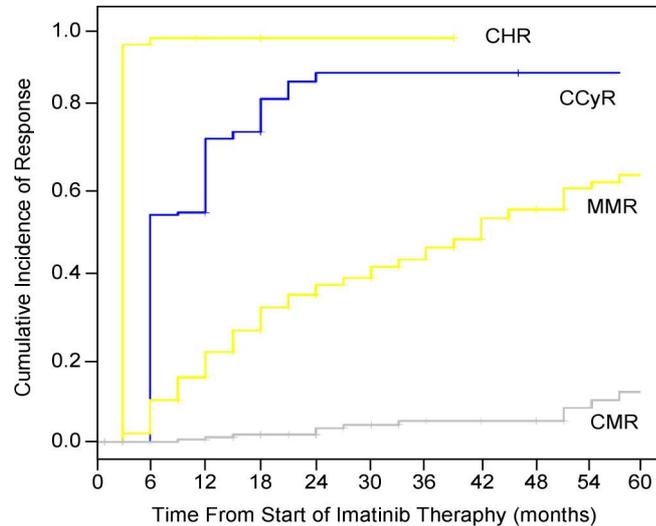


Figura 13. Incidenza Cumulativa della risposta al trattamento con IM.

Dopo 12 mesi, il 97.91% dei pazienti ha raggiunto una CHR, il 73.5% ha ottenuto una CCyR, il 21.8% ha conseguito una MMR e l'1.1% ha ottenuto una CMR. L'incidenza stimata a 60 mesi per ogni parametro è: 97.91% per la CHR, 89.5% per la CCyR, 64.7% per la MMR e 12.2% per la CMR. Le linee verticali indicano i pazienti censurati.

4.4 SOPRAVVIVENZA GLOBALE, SOPRAVVIVENZA LIBERA DA PROGRESSIONE, SOPRAVVIVENZA LIBERA DA FALLIMENTO E SOPRAVVIVENZA LIBERA DA EVENTI

Per valutare l'efficacia del trattamento con IM abbiamo effettuato un'analisi statistica in cui sono state calcolate la Sopravvivenza globale (Overall Survival o OS), la Sopravvivenza libera da Progressione (Progression-Free Survival o PFS) e la Sopravvivenza libera da Fallimento (Failure-Free Survival o FFS). La stima a 5 anni, utilizzando l'analisi "Intention To Treat", mostra che la probabilità di OS è del 93.3%, quella di PFS è del 97.6% mentre la FFS è stata del 72% (Figura 14A).

In studi precedenti sono state utilizzate definizioni diverse della Sopravvivenza libera da eventi (Event-Free Survival o EFS) [48, 5].

Al fine di paragonare i dati ottenuti dai pazienti dello SCREEN con quelli riportati negli altri studi, abbiamo condotto

un'analisi statistica in cui è stata calcolata la stima di EFS a 5 anni usando una delle due definizioni riportate di seguito:

- la definizione più conservativa usata dallo Studio Internazionale Randomizzato Interferone versus Imatinib conosciuto come "IRIS" in cui vengono considerati **eventi** la morte per ogni causa, la progressione dalla fase cronica, la perdita di CHR, la perdita di MCyR o un incremento della conta dei globuli bianchi;
- la definizione più ampia, derivata da uno studio condotto dalla Divisione di Ematologia dell'Hammersmith Hospital di Londra, in cui oltre alle condizioni precedenti si definiscono **eventi** il mancato conseguimento di una MCyR senza aver perso la CHR e l'intolleranza all'IM.

Prevedibilmente, se la definizione di EFS impiegata è quella dello studio IRIS la popolazione libera da eventi è superiore 80.5% (95% CI, da 70.9% a 91.3%) rispetto a quella individuata dalla definizione più ampia dell'Hammersmith Hospital 69.5% (95% CI, da 60.3 a 80.1%) (Figura 14B).

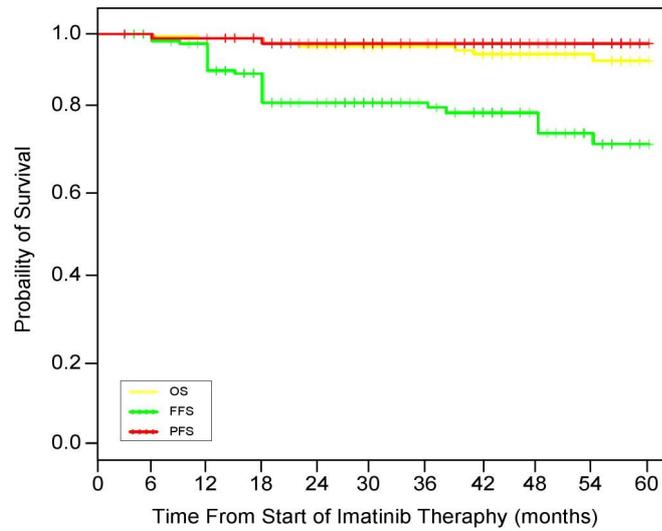
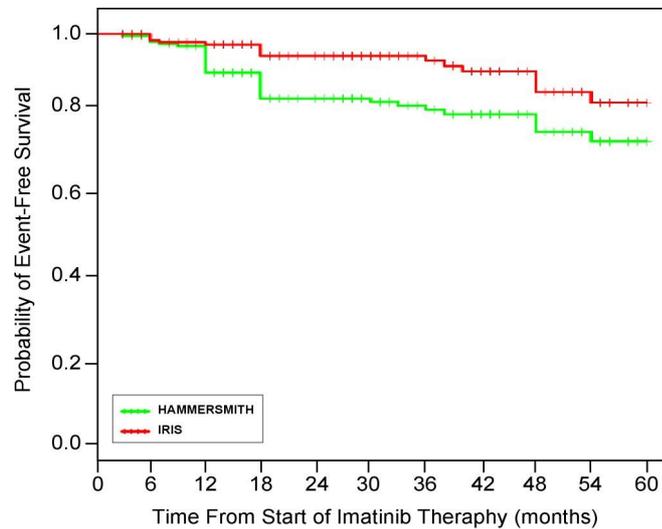
A**B**

Figura 14. Analisi “Intention-to-Treat” per il calcolo (A) della OS, della PFS e della FFS, o (B) della EFS.

A 5 anni, le probabilità di OS, PFS ed FFS sono rispettivamente il 93.3%, il 97.6% ed il 72%. La probabilità di EFS è dell' 80.5% (definizione studio IRIS) o del 69.5% (definizione studio Hammersmith). Le linee verticali indicano i pazienti censurati.

4.5 IMPORTANZA DELLA RISPOSTA CITOGENETICA COMPLETA E DELLA RISPOSTA MOLECOLARE MAGGIORE PER EFS

I criteri ELN prevedono che i soggetti in risposta ottimale ottengano una Risposta Citogenetica Completa entro 12 mesi dall'inizio del trattamento e una Risposta Molecolare Maggiore entro 18 mesi di terapia.

Per valutare l'importanza di ottenere una CCyR e una MMR entro questi termini, abbiamo condotto diverse analisi statistiche in cui è stata calcolata la EFS nella popolazione dello studio SCREEN suddivisa in base alla risposta citogenetica raggiunta dopo 12 mesi dall'inizio dell'IM (Figura 15A) o in base alla risposta molecolare ottenuta dopo 18 mesi di trattamento (Figura 15B).

Seguendo la definizione di EFS impiegata nello studio IRIS, i pazienti presi in considerazione dopo 12 mesi di IM sono stati 187. Dopo un anno di terapia, 121 su 187 pazienti (nessun evento, \geq 12 mesi di follow-up) hanno ottenuto e mantenuto una CCyR. Questi pazienti hanno una maggiore probabilità di EFS

rispetto ai 66 pazienti che non hanno raggiunto una CCyR (96.8% vs 66.3%: $p=1.59e^{-5}$; Figura 15A pannello di sinistra). Abbiamo ripetuto l'analisi calcolando l'EFS in base ai criteri dello studio Hammersmith ed i soggetti considerati sono stati 182. Abbiamo notato che 120 su 182 pazienti hanno mantenuto una CCyR e hanno mostrato una probabilità di EFS del 94.7% contro il 44.8% in quelli con metafasi Ph-positive ($p=1.56e^{-12}$; Figura 15A pannello di destra).

Anche il conseguimento di una MMR dopo 18 mesi di IM aumenta, in maniera significativa, la probabilità di evitare un evento. Questo risultato si ripete indipendentemente dalla definizione di EFS. Infatti, utilizzando la definizione di EFS dello studio IRIS, 39 di 146 pazienti (nessun evento, ≥ 18 mesi di follow-up) hanno ottenuto una MMR dopo 18 mesi di terapia. Questi individui presentano un'alta probabilità di EFS se paragonati ai 107 soggetti con trascritto BCR-ABL^{IS} $>0.1\%$ (100% vs 83.5%: $p=0.044$; Figura 15B pannello di sinistra). L'uso della definizione di EFS dello studio Hammersmith ha cambiato questi numeri in 100% contro 75.4% a favore dei 39 pazienti che si trovano in MMR ($p=0.004$; Figura 15B pannello di destra).

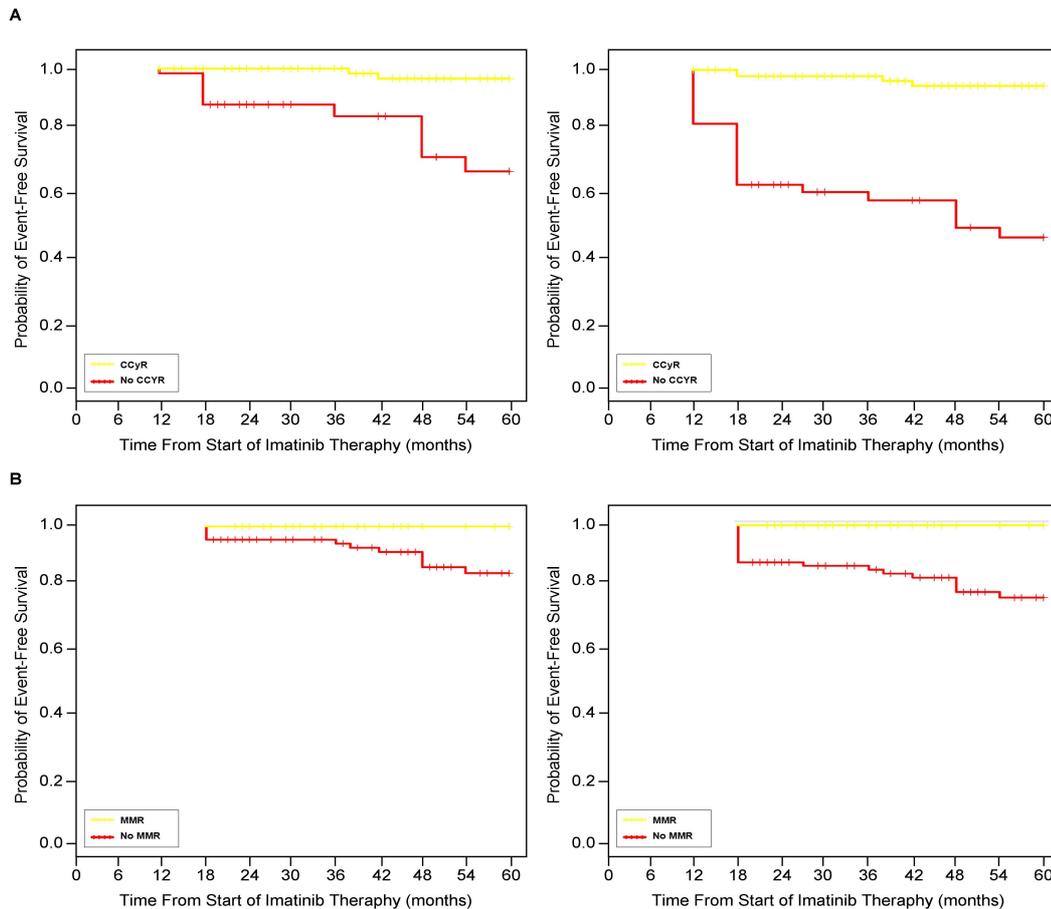


Figura 15. Analisi “Landmark” di EFS in base a (A) CCyR dopo 12 mesi di IM o (B) MMR ottenuta dopo 18 mesi di terapia.

Secondo la definizione di EFS dello studio IRIS, dopo 12 mesi di IM 121 (64.7%) su 187 pz hanno raggiunto una CCyR. Dopo 5 anni, i pazienti con CCyR hanno una maggiore probabilità di EFS rispetto a quelli che non raggiungono questa risposta (pannello in alto a sinistra; 96.8% vs 66.3%: $p=1.59e^{-5}$). Con la definizione di EFS dello studio Hammersmith, dopo un anno di terapia 120 (65.93%) su 182 hanno raggiunto una CCyR. La probabilità di evitare un evento dopo 60 mesi di terapia è di nuovo superiore per i pazienti che hanno ottenuto una CCyR (pannello in alto a destra; 94.7% vs 44.8%: $p=1.56e^{-12}$).

Dopo 18 mesi di IM, secondo la definizione dello studio IRIS, 39 (26.17%) su 146 hanno raggiunto una MMR. Anche in questo caso, i pazienti con una MMR hanno una migliore probabilità di EFS (pannello in basso a sinistra; 100% vs 83.5%: $p=0.044$). Secondo la definizione dello studio Hammersmith, dopo 60 mesi di trattamento i soggetti con una MMR hanno una più elevata probabilità di EFS (pannello in basso a destra; 100% vs 75.4%: $p=0.004$). Le linee verticali indicano i pazienti censurati.

4.6 PROBABILITA' DI OTTENERE UNA RISPOSTA CITOGENETICA COMPLETA O UNA RISPOSTA OTTIMALE IN BASE AL TRASCritto BCR- ABL^{IS} DOPO 3 E 6 MESI DI TERAPIA

Poichè una CCyR dopo 12 mesi di IM è strettamente correlata con alte incidenze di PFS ed EFS, l'identificazione precoce di pazienti che hanno poca probabilità di ottenere una CCyR potrebbe individuare soggetti che dovrebbero essere considerati per terapie alternative. Abbiamo quindi esaminato 129 pazienti per i quali disponevamo di cellule derivate da sangue periferico dopo 3 e 6 mesi di IM. I 6 individui intolleranti al farmaco sono stati esclusi da quest'analisi.

I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi in base ai loro livelli di trascritto BCR-ABL^{IS} dopo 6 mesi di terapia. Il 96.13% dei soggetti che raggiungono livelli di BCR-ABL^{IS} <1% ottengono una CCyR entro 1 anno di terapia. Solo il 49.61% dei pazienti con livelli di BCR-ABL^{IS} tra 1% e 10% e il 18.2% di individui con BCR-ABL^{IS} >10% ottiene una CCyR entro 12 mesi. Quindi, pazienti con trascritto BCR-ABL^{IS} <1% dopo 6 mesi di IM presentano una maggiore probabilità di ottenere una CCyR

entro 1 anno dall'inizio della terapia rispetto agli altri pazienti ($p=3.91e^{-14}$; Figura 16A). Il significato di questo risultato è stato confermato da una analisi differente in cui abbiamo raggruppato gli stessi pazienti in due gruppi in base alla risposta ad IM. I soggetti sono stati classificati come pazienti in risposta ottimale (RO) oppure come pazienti in risposta subottimale o resistenti al farmaco (S/R). Ancora una volta trascritti BCR-ABL^{IS} <1 dopo sei mesi di terapia sono associati ad un'alta probabilità di ottenere una risposta ottimale rispetto ai pazienti con livelli di BCR-ABL^{IS} tra 1% e 10% o >10% ($p=2.63e^{-16}$; Figura 16B).

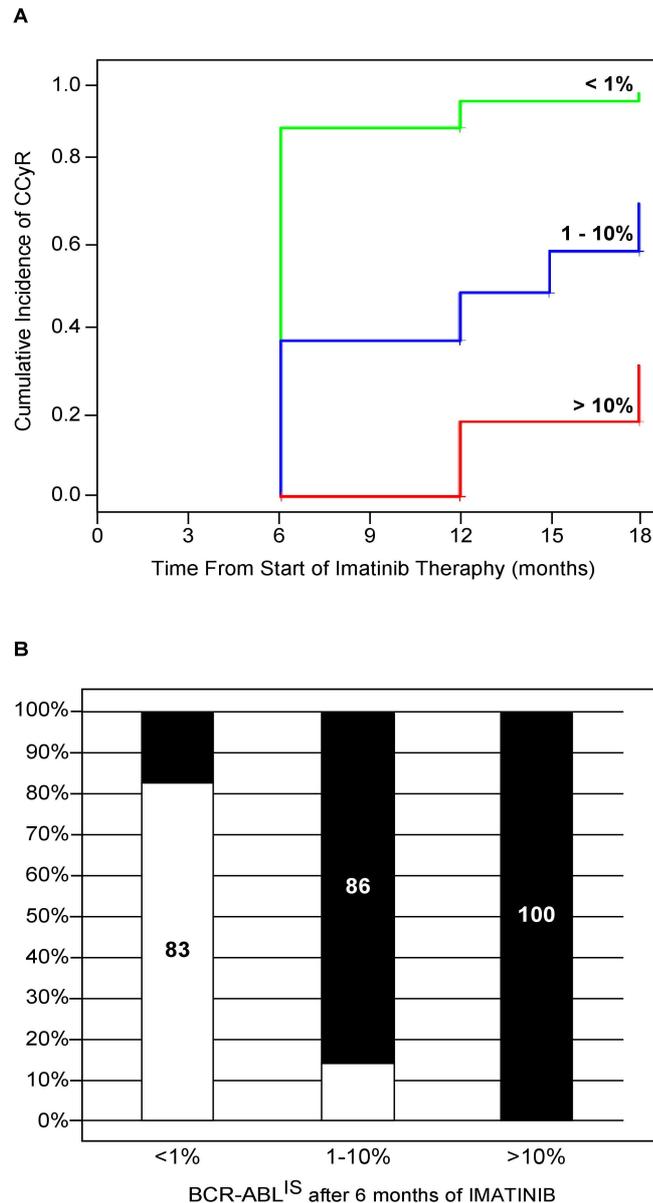


Figura 16. (A) Incidenza cumulativa di CCyR e (B) conseguimento della risposta ottimale in base al trascritto BCR-ABL^{IS} dopo 6 mesi di IM.

I pazienti sono stati divisi in tre gruppi in base ai loro livelli di BCR-ABL^{IS} (<1%, 1%-10% e >10%) dopo 6 mesi di terapia e in ogni gruppo abbiamo calcolato l'incidenza di CCyR. Dopo 12 e 18 mesi di IM, l'incidenza di CCyR è stata 96.13% e 99% per i pazienti con BCR-ABL^{IS} <1%, 49.61% e 71.2% per i pazienti con BCR-ABL^{IS} 1%-10%, e 18.2% e 31.8% per gli individui con BCR-ABL^{IS} >10%. I pazienti con livelli di trascritto tra 1-10% e >10%, hanno una minore probabilità di ottenere un CCyR rispetto a quelli con trascritto >1%: $p=3.91e^{-14}$. I tre gruppi sopra indicati sono stati anche stratificati in base ai criteri ELN 2009 in pazienti in risposta

ottimale (colonne bianche) e individui in risposta subottimale o resistenti (colonne nere). I soggetti con trascritto BCR-ABL^{IS} 1%-10% o >10% hanno una maggiore probabilità di essere classificati nel gruppo subottimale/resistente rispetto agli individui con trascritto BCR-ABL^{IS} <1%: $p=2.63e^{-16}$.

Abbiamo successivamente ripetuto quest'analisi utilizzando i livelli di trascritto BCR-ABL^{IS} dopo 3 mesi di IM. L'analisi ha rilevato che soggetti con BCR-ABL^{IS} <1% o compreso tra 1% e 10% hanno una maggiore probabilità di acquisire e mantenere una CCyR dopo 12 mesi di trattamento (94.87% per BCR-ABL^{IS} <1% e 81.3% per BCR-ABL^{IS} 1%-10%) rispetto a quelli che mostrano livelli di BCR-ABL^{IS} >10% ($p=0.004$; Figura 17A). Bassi livelli di trascritto BCR-ABL^{IS} dopo 3 mesi di IM sono anche associati ad un'aumentata probabilità di raggiungere una risposta ottimale. Infatti, nel nostro studio il 74% dei pazienti con trascritto BCR-ABL^{IS} <1% ed il 64% dei malati con livelli di BCR-ABL^{IS} 1%-10% ha conseguito una risposta ottimale rispetto al solo 29% nei pazienti con trascritto BCR-ABL^{IS} >10% ($p=0.0009$; Figura 17B).

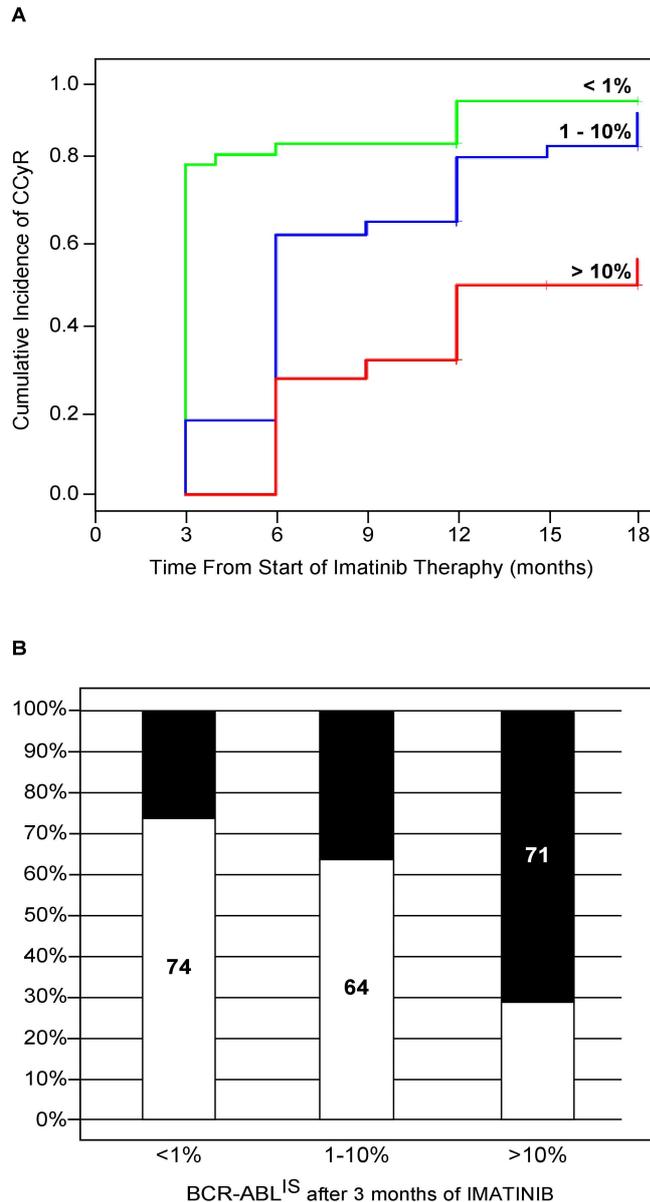


Figura 17. (A) Incidenza cumulativa della CCyR e (B) conseguimento della risposta ottimale in base al trascritto BCR-ABL^{IS} dopo 3 mesi di IM.

I pazienti sono stati divisi in tre gruppi come descritto nella figura precedente. Dopo 12 e 18 mesi di terapia, l'incidenza di CCyR è stata 94.87% per i pazienti con BCR-ABL^{IS} <1%, 81.3% e 92% per i soggetti con trascritto BCR-ABL^{IS} tra 1% e 10%, 50.5% e 56.7% per gli individui con livelli di BCR-ABL^{IS} >10%. I pazienti con trascritto >10% hanno una minore probabilità di ottenere una CCyR rispetto a quelli con trascritto <1% e tra 1%-10%: p=0.004. I tre gruppi sono stati stratificati anche per la loro risposta in base ai criteri ELN 2009. Gli individui in risposta ottimale sono indicati dalle colonne bianche mentre i soggetti in risposta subottimale o resistenti sono rappresentati dalle colonne nere. I pazienti

con livelli BCR-ABL^{IS} <1% o tra 1% e 10% hanno una probabilità significativamente maggiore di ottenere una risposta ottimale: p=0.0009.

4.7 PROBABILITA' DI OTTENERE UNA RISPOSTA CITOGENETICA COMPLETA, UNA SOPRAVVIVENZA LIBERA DA FALLIMENTO, UNA SOPRAVVIVENZA LIBERA DA EVENTI O UNA RISPOSTA OTTIMALE IN BASE AL TRASCritto BCR-ABL^{IS} ALLA DIAGNOSI

Considerato che alti livelli di BCR-ABL^{IS} dopo 3 o 6 mesi di IM sono associati ad una minore probabilità di ottenere una CCyR e una risposta ottimale, abbiamo voluto investigare se alti livelli di BCR-ABL^{IS} alla diagnosi potessero essere correlati con una risposta inadeguata ad IM.

Abbiamo quindi misurato i trascritti BCR-ABL^{IS} alla diagnosi, escludendo i soggetti intolleranti al farmaco. Inizialmente abbiamo impiegato *ABL* come gene di controllo. Tuttavia abbiamo successivamente scelto di adoperare *GUS* come gene di controllo per le nostre determinazioni, dal momento che pregresse evidenze di letteratura avevano individuato in *GUS* il gene di riferimento più appropriato per campioni che esprimono alti livelli di BCR-ABL^{IS}, come nel caso della diagnosi. L'analisi è stata quindi condotta due volte, una

con *ABL* e una con *GUS*, e la disponibilità dei campioni ha limitato le analisi a 146 dei 186 pazienti di nuova diagnosi non intolleranti alla terapia.

I soggetti sono stati stratificati in due gruppi in base al conseguimento di quattro differenti risposte: CCyR a 12 mesi, FFS, EFS (definizione dello studio Hammersmith) e risposta ottimale. Per ogni risposta abbiamo osservato che i pazienti con la peggiore risposta ad IM sono stati quelli con più alti livelli di BCR-ABL^{IS} alla diagnosi. Nel dettaglio, individui che non hanno ottenuto una CCyR dopo un anno di trattamento hanno presentato livelli mediani di trascritto superiori rispetto a quelli che hanno ottenuto una CCyR (20.47% vs 11.88%; $p=3.21e^{-6}$; Figura 18A). I pazienti che hanno fallito IM hanno avuto livelli mediani di trascritto più alti rispetto a quelli che hanno beneficiato del farmaco (24.92% vs 11.95%; $p=4.07e^{-7}$; Figura 18B). I soggetti che hanno presentato un evento hanno mostrato livelli di BCR-ABL^{IS} più alti rispetto a quelli che non hanno avuto un evento (25.59% vs 11.94%; $p=8.06e^{-8}$; Figura 18C). Infine, i pazienti che hanno fallito IM o che hanno ottenuto una risposta subottimale hanno esibito livelli mediani di BCR-ABL^{IS} alla diagnosi più alti rispetto a quelli che hanno conseguito una risposta ottimale (23.07% vs 10.95%; $p=7.46e^{-$

¹³; Figura 18D). Analisi multivariate non hanno mostrato nessuna associazione tra i livelli di BCR-ABL^{IS} alla diagnosi e le caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti come l'età, il sesso, l'emoglobina, la conta dei leucociti o delle piastrine, l'indice Sokal e il numero di metafasi Philadelphia-positive.

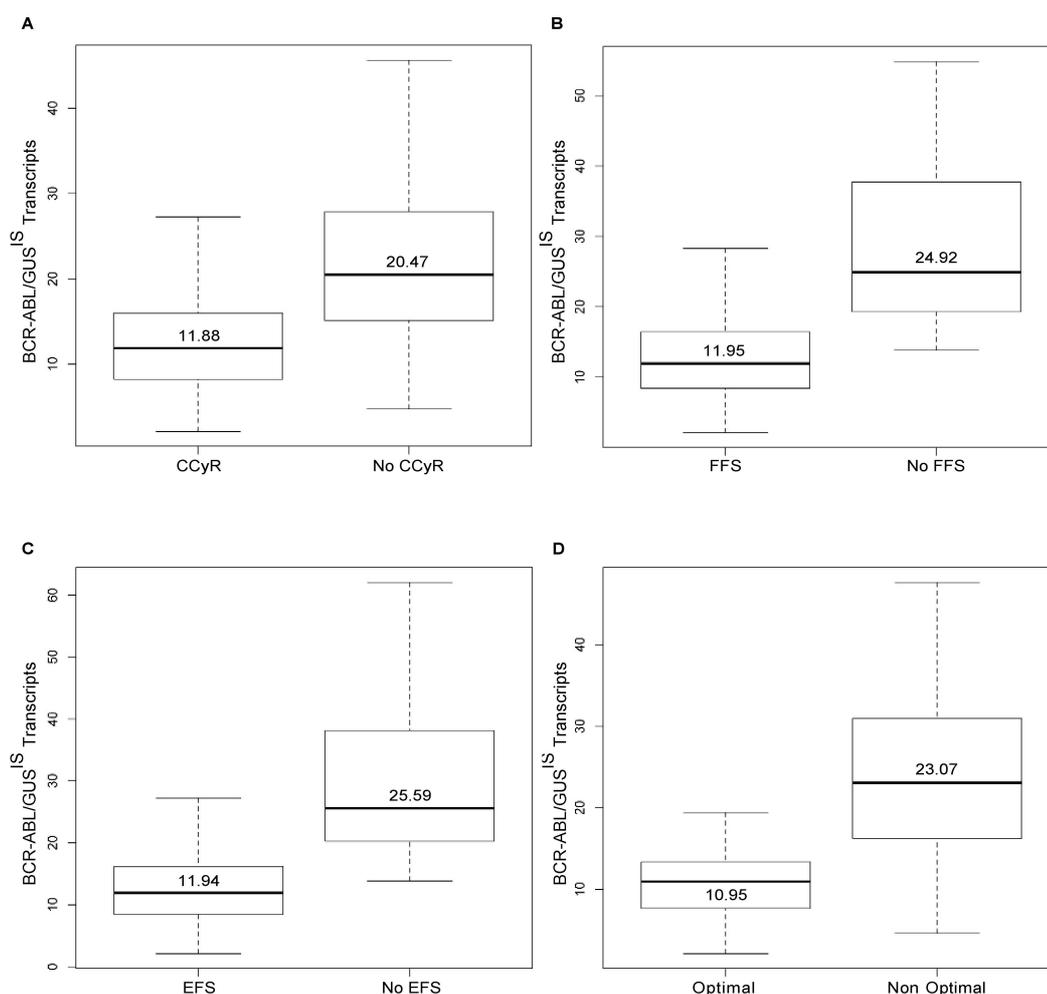


Figura 18. Incidenza di (A) CCyR dopo 1 anno di IM, (B) FFS, (C) EFS e (D) risposta ottimale in base ai livelli di BCR-ABL^{IS} alla diagnosi.

I pazienti sono stati suddivisi in base alla loro risposta citogenetica dopo 12 mesi di IM (CCyR vs no CCyR), alla loro mancanza di resistenza ad IM (FFS vs no FFS), all'assenza di un evento (EFS vs no EFS) o alla loro risposta

ad IM secondo i criteri ELN 2009 (ottimali vs non ottimali). I livelli di trascritto BCR-ABL^{IS} (calcolati come *BCR-ABL/GUS*) sono stati quantificati per ogni gruppo e raffigurati come boxplot delimitati dal 25° (limite inferiore) e dal 75° (limite superiore) percentile. Le linee orizzontali sopra e sotto ogni boxplot indicano, rispettivamente il 5° ed il 95° percentile. Le linee orizzontali in ogni boxplot rappresentano i livelli mediani di BCR-ABL^{IS} per ciascun gruppo. I pazienti che non raggiungono una CCyR ($p=3.21e^{-6}$), che falliscono la terapia con IM ($p=4.07e^{-7}$), che presentano eventi ($p=8.06e^{-8}$) o che non ottengono una risposta ottimale ($p=7.46e^{-13}$) mostrano alti livelli di trascritto BCR-ABL^{IS} alla diagnosi.

5. DISCUSSIONE

Nel studio osservazionale SCREEN abbiamo descritto le risposte di 192 pazienti affetti da LMC alla terapia con IM. Lo scopo principale di questo studio è stato di ricercare parametri molecolari associati ad una risposta insoddisfacente al farmaco che consentissero la tempestiva identificazione di pazienti con basse probabilità di beneficiare della terapia con IM e che potessero quindi essere indirizzati verso approcci terapeutici alternativi.

I nostri risultati suggeriscono che la quantizzazione molecolare dei livelli di *BCR-ABL* alla diagnosi e durante i primi 3 e 6 mesi di terapia potrebbe identificare i pazienti che hanno basse probabilità di ottenere risposte soddisfacenti con IM.

Nella nostra popolazione, abbiamo osservato un'incidenza cumulativa di risposta ematologica completa del 97.91%, sovrapponibile a quella riportata dagli studi IRIS e Hammersmith [48, 51]. Allo stesso modo, l'incidenza della risposta citogenetica completa, dopo cinque anni, è stata dell'89.5% rispetto all'87% riportata dai ricercatori dello studio IRIS e all'82.7% riscontrata dal gruppo dell'Hammersmith Hospital. Poichè l'incidenza a 5 anni della risposta molecolare

maggiore misurata sulla Scala Internazionale (IS) non è stata calcolata nei pazienti arruolati nello studio IRIS, abbiamo paragonato l'incidenza cumulativa a 5 anni di MMR e CMR dei nostri pazienti (64.7% e 12.2%) con quella riportata nello studio Hammersmith (50.1% e 8.3%), riscontrando numeri assai simili.

Le probabilità a 5 anni di sopravvivenza globale (93.3%), di sopravvivenza libera da progressione (97.6%) e di sopravvivenza libera da eventi (80.5%) riscontrate nella nostra casistica sono simili a quelle dello studio IRIS (OS 89%, PFS 93%, EFS 81.3%). Quando abbiamo utilizzato la definizione di EFS impiegata da de Lavallade e colleghi, la probabilità a 5 anni di EFS da noi calcolata è stata del 69.5%, rispetto al 62.7% del gruppo dell'Hammersmith. In sostanza, tutti i nostri risultati sono sovrapponibili a quelli precedentemente riportati in letteratura.

I criteri ELN 2009 sottolineano come i pazienti affetti da LMC che assumono IM dovrebbero raggiungere una CCyR entro 12 mesi. Questo obiettivo è associato ad un alta probabilità di evitare la presentazione di un evento avverso [50]. Anche nel nostro studio, i pazienti con una CCyR entro un anno di terapia mostrano una EFS significativamente maggiore rispetto a quelli in cui permangono metafasi Ph-positive,

indipendentemente dalla definizione di EFS usata per l'analisi. Un altro obiettivo dei criteri ELN 2009 è il raggiungimento di una MMR dopo 18 mesi di trattamento. I nostri dati hanno confermato l'importanza di questo obiettivo clinico-molecolare poichè nessuno dei soggetti che hanno ottenuto una MMR dopo 18 mesi di IM ha sviluppato un evento, diversamente da quanto accaduto nei soggetti con livelli di BCR-ABL^{IS} >0.1%.

Abbiamo anche voluto verificare se fosse possibile identificare precocemente parametri molecolari associati con una risposta sfavorevole all'IM. Evidenze preliminari hanno suggerito che modeste riduzioni nei livelli di BCR-ABL^{IS} dopo 6, 12 e 18 mesi di IM sono associate con basse probabilità di PFS ed EFS. Abbiamo voluto valutare se determinazioni precoci (dopo 3 e 6 mesi di IM) di BCR-ABL^{IS} potessero identificare pazienti con risposte inferiori alla terapia [54-55]. I nostri dati indicano che soggetti che, dopo 6 mesi di IM, presentano livelli di BCR-ABL^{IS} tra 1% e 10% e >10% hanno una probabilità significativamente minore di raggiungere una CCyR ($p=3.91e^{-14}$). Allo stesso modo, livelli di trascritto BCR-ABL^{IS} tra 1-10% e >10% sono associati a basse percentuali di risposte ottimali ($p=2.63^{-16}$). Quando abbiamo ripetuto questa analisi sui livelli di BCR-ABL^{IS} misurati dopo 3 mesi di IM, abbiamo trovato che

livelli di trascritto >10% sono associati a basse percentuali di CCyR e di risposta ottimale ($p=0.0044$ e $p=0.0009$, rispettivamente).

Infine, abbiamo voluto stabilire se i livelli di trascritto per BCR-ABL alla diagnosi potessero identificare pazienti con minore probabilità di beneficiare del farmaco. Abbiamo quantizzato il trascritto BCR-ABL^{IS} alla diagnosi in 146 di 192 pazienti reclutati nello studio SCREEN utilizzando GUS come gene di riferimento, come già suggerito in precedenti studi per campioni che presentano alti livelli di BCR-ABL^{IS}. I 146 pazienti sono quindi stati stratificati secondo 4 variabili: i) risposta citogenetica dopo 12 mesi, ii) FFS, iii) EFS e iv) risposta ottimale. Abbiamo scoperto che per ogni obiettivo prefissato, i pazienti che evoluzione meno favorevole (non CCyR dopo 12 mesi di IM, non FFS, non EFS e risposta subottimale o resistenza ad IM) mostrano alti livelli mediani di trascritto BCR-ABL^{IS} alla diagnosi. Tutte queste differenze sono altamente significative dal punto di vista statistico.

Abbiamo eseguito un'analisi univariata per correlare il trascritto alla diagnosi con età, sesso, emoglobina, conta dei globuli bianchi, numero di metafasi Ph+ e indice di rischio Sokal ma non abbiamo riscontrato nessuna correlazione tra il

trascritto BCR-ABL^{IS} alla diagnosi e i parametri clinici e molecolari sopra indicati. La mancanza di correlazione tra la conta dei globuli bianchi ed i livelli di BCR-ABL^{IS} alla diagnosi suggerisce che alti valori di BCR-ABL^{IS} sono indipendenti dal carico leucemico (ad esempio numero di neutrofili Ph+ alla diagnosi) e sono probabilmente indicativi di più alte quantità di trascritto all'interno delle singole cellule leucemiche [52-53].

A tutt'oggi, il raggiungimento di una risposta ottimale in accordo con le ultime linee guida ELN è un obiettivo obbligatorio per molti pazienti affetti da LMC. Tuttavia, ci sono pochi parametri molecolari capaci di identificare in maniera precoce individui che potrebbero ottenere una risposta insoddisfacente all'IM. I nostri risultati suggeriscono che pazienti con alti livelli di BCR-ABL^{IS} alla diagnosi e dopo 3 e 6 mesi di trattamento hanno una minore probabilità di ottenere benefici di lunga durata dall'IM. Al contrario, i pazienti con bassi livelli di BCR-ABL^{IS} hanno un'alta probabilità di ottenere una CCyR e di conseguire una risposta ottimale.

In conclusione la quantizzazione dei livelli di BCR-ABL^{IS} alla diagnosi e dopo 3 e 6 mesi di terapia potrebbe rappresentare una riproducibile parametro molecolare indicativo

dell'aggressività della malattia e del beneficio della terapia con
IM.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Deininger M.W. and B.J. Druker, *Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib*. Pharmacol Rev, 2003. 55(3): p. 401-23.
2. Cervantes F., et al., *The changing profile of Ph-positive chronic myeloid leukemia at presentation: possible impact of earlier diagnosis on survival*. Haematologica, 1999. 84(4): p. 324-7.
3. Kurzrock R., et al., *Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics*. Ann Intern Med, 2003. 138(10): p. 819-30.
4. Kantarjian H.M., et al., *Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients*. Am J Med, 1987. 83(3): p. 445-54.
5. Faderl S., et al., *The biology of chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. 341(3): p. 164-72.
6. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Druker BJ: *Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia*. Annu Rev Med 2002, 53:369-381.

7. Kurzrock R., J.U. Gutterman, and M. Talpaz, *The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias*. N Engl J Med, 1988. 319(15): p. 990-8.
8. Martin Sattler and James D.Griffin. Molecular Mechanisms of Transformation by the Bcr-Abl Oncogene. Seminars in Hematology. 2003; Vol 40, suppl 2: 4-10
9. Michael W.N.Deininger, Jhon M.Goldman, and Junia V. Melo. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000; Vol.96, No.10
- 10.Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP et al. Fused Trascript of Abl and Bcr genes in CML. Nature. 1995; 315: 550-554.
- 11.Razelle Kurzrock, MD, Hagop M.Kantarjian ,MD ,Brian J. Druker, MD et al. Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. Annals of Internal Medicine. 2003; Vol.138, No.10.
- 12.Sawyers C.L., *Chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **340**(17): p. 1330-40.
- 13.Vigneri P. and J.Y. Wang, *Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment*

- of BCR-ABL tyrosine kinase. Nat Med, 2001. 7(2): p. 228-34.*
14. Maru Y. and O.N. Witte, *The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. Cell, 1991. 67(3): p. 459-68.*
15. Melo JV, Gordon DE, Cross NCP, et al. *The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. Blood. 1993*
16. Laurent E., et al., *The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. Cancer Res, 2001. 61(6): p. 2343-55.*
17. Arico M. et al., *Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, 2000. 342(14): p. 998-1006.*
18. Fainstein E., et al., *A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia. Nature, 1987. 330(6146): p. 386-8.*
19. Martinelli G, Iacobucci I, Rosti G, Pane F, Amabile M, Castagnetti F, et al. *Prediction of response to imatinib by prospective quantitation of BCR-ABL transcript in late*

- chronic phase chronic myeloid leukemia patients. Ann Oncol* 2006;17:495-502.
- 20.Saglio G., et al., *BCR/ABL rearrangement and leukemia phenotype. Leukemia*, 1999. 13 Suppl 1: p. S96.
- 21.Hantschel O et Superti-Furga G. *Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Jan;5(1):33-44. Review.
- 22.Goldman, J.M. and J.V. Melo, *Chronic myeloid leukemia-- advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med*, 2003. 349(15): p. 1451-64.
- 23.Calabretta B. and D. Perrotti, *The biology of LMC blast crisis. Blood*, 2004. 103(11): p. 4010-22.
- 24.Steelman L.S., et al., *JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia*, 2004. 18(2): p. 189-218.
- 25.Djaldetti M., et al., *Prolonged remission in chronic myeloid leukemia after one course of busulfan. Blood*, 1966. 27(1): p. 103-9.
- 26.Hehlmann R., et al., *Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic*

myelogenous leukemia. The German LMC Study Group. Blood, 1994. 84(12): p. 4064-77.

27. Gratwohl A., et al., *Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. Lancet, 1998. 352(9134): p. 1087-92.

28. Hochhaus A., Kantarjian H.M., Baccarani M., et al. *Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy*. Blood 2007; 109: 2303-09.

29. Kantarjian H., Pasquini R., Hamerschlak N., et al. *Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of first-line imatinib: a randomized phase 2 trial*. Blood 2007; 109: 5143-50.

30. Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. Br J Cancer. 2006 Jun 19;94(12):1765-9. Epub 2006 May 23

31. Heather A. Bradeen, Christopher A. Eide, Thomas O'Hare, Kara J. Johnson, Stephanie G. Willis, Francis Y. Lee, Brian J. Druker, Michael W. Deininger. *Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in a N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations.* Blood 2006; 108: 2332-2338
32. Jorgensen H.G., Allan E.K., Joardanides N.E., Mountford J.C., Holyoake T.L. *Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ LMC cells.* Blood 2007; 109: 4016-19.
33. Copland M., Hamilton A., Eirick L.J., et al. *Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary LMC but does not eliminate the quiescent fraction.* Blood 2006; 107: 4532-39.
34. Cohen M.H., Williams G., Johnson J.R., et al. *Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia.* Clin Cancer Res 2002; 8: 935-42.

35. Buchdunger E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. 295(1): p. 139-45.
36. Druker B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells.* Nat Med, 1996. 2(5): p. 561-6.
37. Hantschel O and Superti-Furga G. *Regulation of the C-ABL and BCR-ABL Tyrosine Kinases.* Nature 2004 Vol.5 (35-44).
38. Leguay T., Desplat V., Lagarde V., Marit G., Reifers J., Mahon F. X. *An amino-acid switch in the BCR-ABL kinase domain modifies sensitivity to imatinib mesylate.* Leukemia 2005; 19: 1671-73.
39. Manley PW, Cowan-Jacob SW, Mestan J. *Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia.* Biochim Biophys Acta. 2005 Dec 30;1754(1-2):3-13. Epub 2005 Sep

40. Apperley J. F., *Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia*. *Lancet Oncol* 2007; 8:1018-29
41. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. *Molecular and chromosomal mechanisms Of resistance to imatinib (STI571) therapy*. *Leukemia* 2002; 16: 2190-96.
42. Layahe T., Riehm B., Berger U., et al. *Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL positive leukemias treated with imatinib in a single center – A 4.5-year follow-up*. *Cancer* 2005; 103: 1659-69.
43. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ et al. *Glivec induces hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukaemia: results of phase II study*. *Blood*. 2002; 99: 1928-37.
44. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E et al. *Glivec induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukaemia in myeloid blast crisis: results of phase II study*. *Blood*. 2002; 99: 3530-3539.

45. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A et al. Gleevec induces hematologic and cytogenetic responses in the majority of patients with chronic myeloid leukaemia in chronic myeloid leukaemia in chronic phase: results of a phase II study. *N Engl Med* 2002; 346: 645-652.
46. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification*. *Science* 2001; 293: 876-80
47. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase myeloid leucemia*. *N Engl Med* 2003; 348:994.
48. Druker B, Guilhot F, O'Brien S, et al. *Five-years follow-up of imatinib therapy for newly diagnosed chronic myelogenous leukaemia in chronic phase shows sustained responses and high overall survival*. *N Engl J Med*. 2006;335:2408-2417.
49. Baccarani M, Saglio G, Goldman J 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(6):1809-20.*
50. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. *Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol 2009; 27:6041-51.*
51. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, et al. *Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. J Clin Oncol 2008; 26:3358-63.*
52. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. *Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. J Clin Invest 2010; 120:2254-64.*
53. Deininger M. *Hematology: curing CML with imatinib--a dream come true? Nat Rev Clin Oncol 2011; 8:127-8.*
54. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. *Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). Blood 2010; 116:3758-65.*
55. Hanfstein B, Muller MC, Erben P, et al. *Molecular Response After 3 Months of 1st Line Imatinib Therapy Is*

*Predictive for Treatment Failure and Disease Progression
In Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia
- a Follow-up Analysis of the German CML Study IV. ASH
Annual Meeting Abstracts 2010; 116:360.*