

Alma Mater Studiorum
Università degli studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA
IN EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE
Ciclo XX

Settore disciplinare di afferenza: MED/15

*Risposta molecolare nei pazienti affetti da CML,
resistenti o refrattari ad Imatinib, trattati con
Nilotinib*

**Tesi presentata da:
Dott.ssa Angela Poerio**

**Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. S. A. Pileri**

**Relatore
Chiar.mo Prof. G. Martinelli**

Esame finale anno 2008

INDICE

1.	INTRODUZIONE	pag. 1
1.1	La Leucemia Mieloide Cronica	pag. 1
1.2	Il cromosoma Philadelphia	pag. 2
1.3	Il gene Abl	pag. 4
1.4	Il gene Bcr	pag. 5
1.5	Il gene di fusione Bcr-Abl	pag. 6
1.6	I meccanismi di trasformazione di Bcr-Abl	pag. 8
1.7	Terapie convenzionali	pag. 14
1.8	La terapia molecolare mirata delle leucemie Ph+:Imatinib	pag. 16
1.9	Resistenza ad Imatinib	pag. 20
1.9.1	Meccanismi di resistenza Bcr- Abl dipendenti	pag. 20
1.9.2	Meccanismi di resistenza Bcr-Abl indipendenti	pag. 25
1.10	Il trattamento dei pazienti resistenti a Imatinib	pag. 26
1.11	Nilotinib	pag. 27
2.	SCOPI DELLA TESI	pag. 30

3.	MATERIALI E METODI	pag. 32
3.1	Pazienti e disegno dello studio	pag. 32
3.2	Materiale biologico	pag. 33
3.3	Separazione su Ficoll	pag. 33
3.4	Estrazione dell'RNA	pag. 34
3.5	Sintesi del c-DNA	pag. 34
3.6	PCR	pag. 35
3.7	Real time PCR	pag. 36
3.8	Nested PCR	pag. 42
3.9	Amplificazione del trascritto per screening mutazionale	pag. 42
3.10	Screening mutazionale tramite DHPLC	pag. 45
3.11	Sequenziamento	pag. 49
3.12	Definizioni	pag. 50
4.	RISULTATI	pag 52
4.1	Risultati dell'analisi mutazionale effettuata al baseline	pag. 52
4.2	Risultati del monitoraggio dei livelli di trascritto in corso di trattamento	pag. 52
4.3	Risultati del monitoraggio mutazionale	pag. 53
5.	DISCUSSIONE	pag. 58

01. INTRODUZIONE

1.1 La Leucemia Mieloide Cronica

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è una neoplasia che si origina dalla trasformazione clonale di una cellula staminale emolinfopoietica.

Ha un'incidenza nel mondo pari a 1-2 casi su 100000^(1,2), rappresentando ogni anno il 15-20% dei nuovi casi di leucemia fra gli adulti⁽³⁾. Il quadro clinico spesso include granulocitosi, ipercellularità midollare e splenomegalia⁽²⁾. Circa il 40% dei pazienti sono asintomatici al momento della diagnosi, che si basa su un'anormale conta delle cellule del sangue. Il decorso clinico della malattia ha andamento trifasico. Inizialmente si ha la fase cronica (FC), relativamente stabile, nella quale i neutrofili si espandono mantenendo la capacità di differenziarsi; nell'arco di 4-6 anni la malattia progredisce prima ad una fase accelerata (FA, che può durare fino ad 1 anno) e poi ad una fatale leucemia acuta, chiamata crisi blastica^(4,5) (CB), caratterizzata dall'arresto della maturazione e dall'accumulo di

progenitori non differenziati mieloidi (nei due terzi dei pazienti) o linfoidi (in un terzo dei pazienti)^(6,7).

Ogni fase della malattia diventa più resistente alla terapia.

Negli ultimi anni la sopravvivenza media, con le terapie convenzionali, si è attestata intorno ai 5 o 6 anni. Alcuni pazienti, comunque, possono avere un andamento più aggressivo e morire anche ad 1 anno dalla diagnosi, mentre altri possono sopravvivere per 20 anni o più^(8,9,10).

1.2 Il Cromosoma Philadelphia

Nel 1960 viene scoperto il cromosoma Philadelphia (Ph) quale anomalia associata alla LMC e nel 1973 si spiega la sua presenza come risultato di una traslocazione reciproca $t(9;22)(q34;q11)$ che genera un derivativo 9q+ e un 22q- più corto, definito appunto cromosoma Philadelphia. Dieci anni più tardi si vede come la traslocazione coinvolga il proto-oncogene c-ABL, che viene rimosso dal cromosoma 9 e inserito in un gene allora sconosciuto, più tardi definito BCR (Breakpoint Cluster Region)⁽⁹⁾, formando un oncogene chimerico detto BCR-ABL.

Il cromosoma Philadelphia è presente approssimativamente nel 95% dei pazienti affetti da LMC. Circa nella metà del restante 5% è stato trovato il gene di fusione BCR-ABL mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) e tali pazienti sono stati classificati come cromosoma-Philadelphia-negativi BCR-ABL-positivi⁽⁴⁾.

Questi ultimi hanno stesso andamento clinico e stessa risposta alla terapia rispetto ai pazienti LMC Philadelphia-cromosoma-positivi Bcr-Abl-positivi.

Alcuni pazienti LMC risultano invece BCR-ABL negativi sia all'analisi citogenetica che all'analisi molecolare. Il loro andamento clinico è diverso dalla controparte BCR-ABL positiva: in particolare si ha raramente la manifestazione della crisi blastica⁽¹⁰⁾.

Il cromosoma Philadelphia è presente anche in pazienti con leucemia acuta linfoblastica (LAL) e in pazienti con leucemia acuta mieloide (LAM) con queste percentuali: LAL dell'adulto 20%; LAL del bambino 5%; LAM 2%.

Numerosi modelli sperimentali hanno dimostrato che BCR-ABL è un oncogene ed è sufficiente ad indurre nei topi la LMC: il trapianto negli animali di cellule staminali ematopoietiche trasdotte con il gene di fusione genera malattie "CML-like".⁽⁴⁾

Se l'espressione del gene BCR-ABL è sufficiente a causare la fase cronica della patologia, nella progressione della malattia attraverso la fase accelerata fino alla crisi blastica hanno un ruolo molto importante alterazioni genetiche aggiuntive⁽⁷⁾.

La comparsa di anomalie cariotipiche in aggiunta alla t(9;22) viene considerata come indice di progressione della malattia. Le più comuni sono: trisomia dell'8, anomalie del cromosoma 17q e trisomia del 19; le meno frequenti sono: monosomie (7,17 o Y), trisomie (17 e 21) e traslocazioni t(3;21)(q26;q22)⁽⁶⁾.

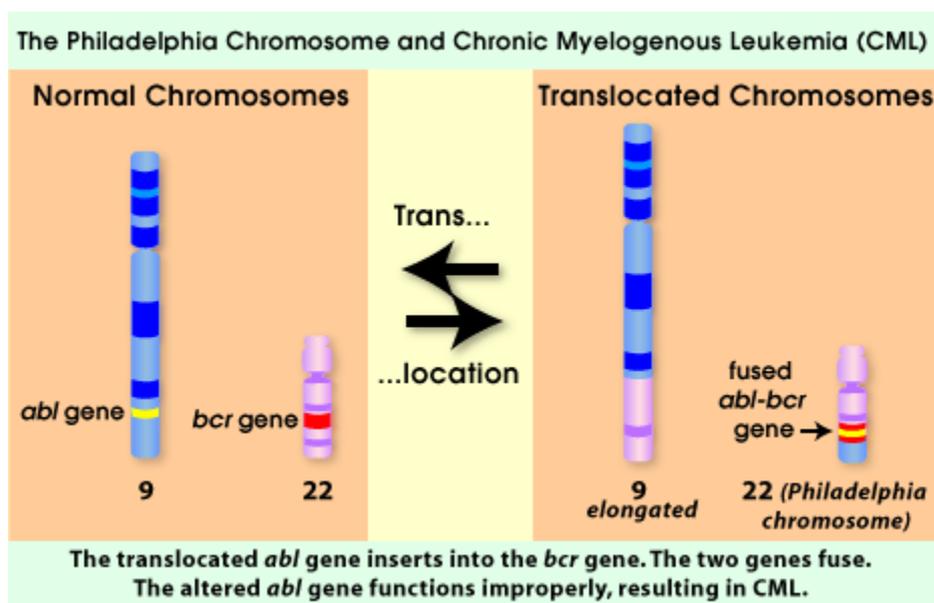


Figura 1. La formazione del cromosoma Philadelphia

1.3 Il gene Abl

Il gene Abl è l'omologo umano dell'oncogene virale v-Abl presente nel Virus della Leucemia Murina di Abelson(A-MuLV)^(11,12).

Il gene Abl si estende su un segmento di DNA di 230 kilobasi e presenta 12 esoni; la sua trascrizione, attraverso un meccanismo di splicing alternativo, può dare diversi m-RNA di 6 o 7 kilobasi, rispettivamente, a seconda che venga incluso nel trascritto maturo l'esone 1a o l'1b. In entrambi i casi il prodotto risultante è una proteina di 145 kDa che codifica per una tirosin-kinasi non recettoriale⁽¹³⁾ localizzata sia nel citoplasma, dove lega l'actina del citoscheletro, sia nel nucleo, dove lega il DNA.

La proteina Abl contiene tre domini SRC Homology (SH) vicino all'N-terminale: il dominio SH1 possiede l'attività tirosin-kinasica, mentre i domini SH2 e SH3 hanno un ruolo nell'interazione con le altre proteine; inoltre SH2 ha un'elevata affinità per il primo esone di Bcr. Y393 è il maggior sito di autofosforilazione nel dominio kinasico.

La porzione centrale della proteina contiene regioni ricche in prolina capaci di legare i domini SH3 di altre proteine, come Crk e presenta anche un NLS (Nuclear Localization Signal). Nella porzione C-terminale si hanno domini di legame all'actina (F-actina e G-actina) e al Dna e domini NLS e NES (Nuclear Export Signal)⁽¹⁰⁾.

La proteina Abl normale è una tirosin-kinasi coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, nella risposta agli stress genotossici, nella trasmissione, attraverso segnali di adesione, di informazioni riguardanti l'ambiente cellulare e nell'apoptosi⁽⁹⁾. Le tirosin-kinasi sono enzimi che promuovono il trasferimento di un gruppo fosfato dall'ATP ad una tirosina del substrato. La normale attività di fosforilazione in Abl è fortemente controllata, probabilmente dal

motivo N-terminale: la perdita della regione comporta un' aumentata e deregolata attività tirosin-kinasica (come accade in Bcr-Abl).

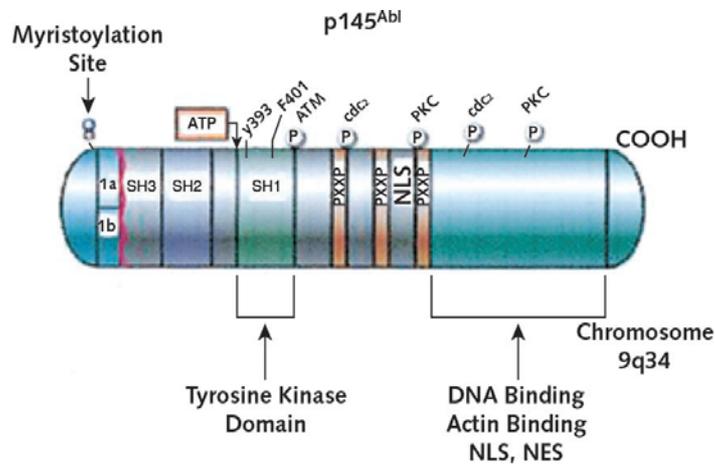


Figura 2. Il gene Abl

1.4 Il gene Bcr

Il gene Bcr si estende su di un segmento di DNA di 130 kilobasi ed è costituito da 23 esoni. Sono stati trovati diversi trascritti di tale gene, tra cui un m-Rna di 4.5 kilobasi e un altro di 6.7 kilobasi. Anche i prodotti proteici sono diversi e tra questi i due più importanti hanno peso molecolare di 130 kDa e 160 kDa.

La proteina Bcr normale si trova sia nel citoplasma che nel nucleo, dove si associa al DNA condensato sia in metafase che in interfase.

Bcr ha un dominio di oligomerizzazione nei primi 61 aminoacidi che è necessario per l'attivazione della kinasi Abl in Bcr-Abl⁽¹⁴⁾. Il dominio serin-treonin kinasico è nell'esone 1 (l'unico presente in tutti i prodotti di fusione Bcr-Abl) e può portare alla fosforilazione dei substrati ma anche dello stesso Bcr. Nell'esone 1 sono presenti anche i siti che

legano i domini SH2: ad esempio Grb-2 (coinvolto nell'attivazione di Ras) si associa con il sito che contiene una fosfotirosina in posizione 177; Abl interagisce con altri di questi.

Il centro della molecola contiene un dominio GEF (Guanine Exchange Factor) promuovendo lo scambio di GTP con GDP in proteine che attivano fattori di trascrizione come NF-Kb. Nella porzione C-terminale ha un dominio GAP (Guanosine triphosphate-Activating Protein) che agisce su RAC, una GTPasi della superfamiglia RAS⁽⁹⁾.

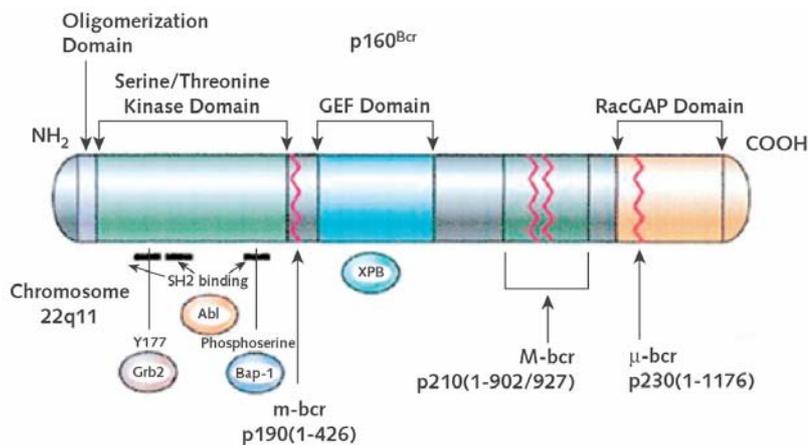


Figura 3. Il gene Bcr

1.5 Il gene di fusione Bcr-Abl

Con la traslocazione reciproca t(9;22)(q34;q11) il punto di rottura sul gene Abl si può avere in una zona di più di 300 kilobasi lungo l'estremità 5' a monte dell'esone Ib o a valle dell'esone Ia o più frequentemente tra i due; gli esoni da a2 ad a11 sono sempre inclusi nella traslocazione, mentre gli esoni Ia e Ib non sempre e comunque,

anche se vengono traslocati sul cromosoma 22, non vengono mai trascritti.

Nella maggior parte dei pazienti con LMC e in circa un terzo dei pazienti con LAL Ph⁺, la rottura del gene Bcr avviene in una zona di 5.8 kilobasi, su cui si estendono gli esoni denominati con la lettera b e numerati da 1 a 5: la regione è detta “Breakpoint Cluster Region” (M-bcr). Tutti gli esoni posti al 3’ rispetto al punto di rottura vengono rimossi e traslocati sul cromosoma 9, mentre gli esoni posti al 5’ restano sul cromosoma 22.⁽⁹⁾ Le modalità di rottura più frequenti nella M-bcr sono quella tra l’esone b2 e l’esone b3 e quella tra l’esone b3 e l’esone b4: di conseguenza le sequenze prossimali del gene Bcr, b2 o b3, sono giustapposte alle sequenze terminali del secondo esone di Abl (a2), in un assetto testa-coda, formando il gene chimerico Bcr-Abl sul cromosoma 22. Entrambi gli m-RNA, derivanti dalla giunzione **b2a2** e da **b3a2**, codificano per una proteina di 210kDa, detta **p210**.

Nei restanti pazienti di LAL e raramente nei casi di LMC i punti di rottura di Bcr si trovano tra l’esone 1 e il 2 nella “minor breakpoint cluster region” (m-bcr) e l’ m-RNA risultante (**e1a2**) è tradotto in una proteina di 190 kilobasi detta **p190**.

Esiste un terzo punto di rottura a valle dell’esone 19 del gene Bcr nella regione denominata μ -bcr, dove il riarrangiamento **e19a2** permette la formazione di un prodotto di 230 kilobasi (**p230**), associato ad una forma di leucemia cronica neutrofilica.

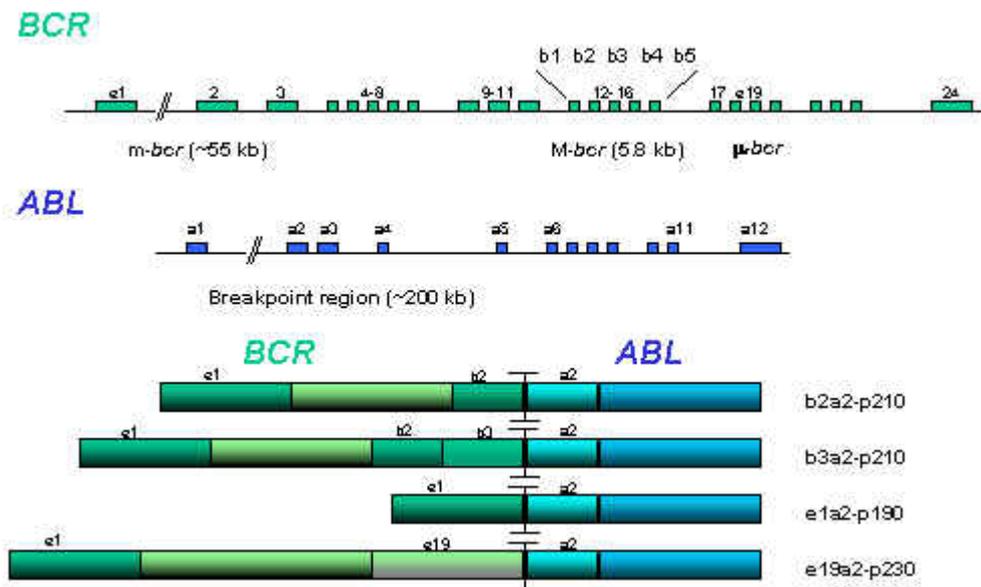


Fig. 4. Organizzazione genomica dei loci BCR e ABL e formazione dei diversi tipi di trascritto.

1.6 I meccanismi di trasformazione di Bcr-Abl

Il gene di fusione Bcr-Abl codifica per una proteina citoplasmatica con attività tirosin-kinasica costitutiva, la quale non è in grado di legarsi al DNA ed è distribuita nel citoplasma, legata all'actina grazie al dominio C-terminale. Bcr-Abl forma omo-oligomeri ed etero-oligomeri con la kinasi Bcr attraverso il dominio di dimerizzazione all'N-terminale e la sua autofosforilazione crea siti di legame per proteine contenenti domini SH, come Grb-2, Ras-Gap, PLC- γ , la subunità 85 della kinasi PI3K⁽¹⁶⁾.

A) PROPRIETA' DI ADESIONE ALTERATE

La LMC è caratterizzata da un rilascio prematuro delle cellule progenitrici dal midollo osseo, un fenomeno che può essere attribuito a difetti nelle molecole di adesione di tali cellule⁽¹⁰⁾. Bcr-Abl riduce l'adesione cellulare alla matrice stromale portando ad una minore interazione tra le cellule emopoietiche e quelle stromali, ma anche ad un'interruzione dei segnali mediati dalle molecole di adesione, con la conseguenza che la fase di proliferazione dura maggiormente e che la differenziazione sia ritardata⁽⁴⁾.

Le cellule leucemiche esprimono, ad esempio, una variante della integrina $\beta 1$, inibitrice dell'adesione, che non si ritrova nei normali progenitori. Probabilmente i segnali inibitori della crescita, che normalmente scaturiscono dall'interazione tra integrine e recettori, non sono sufficienti nelle cellule leucemiche. Visto che Abl è normalmente coinvolta nella traduzione di tali segnali, la presenza nel citoplasma del prodotto di fusione Bcr-Abl ostacolerebbe ulteriormente la trasmissione dei segnali nella cellula.

Un ruolo importante ha Crkl, una delle proteine fosforilate dall'attività kinasica di Bcr-Abl, la quale è coinvolta nella regolazione della motilità cellulare e nell'adesione cellulare mediata dalle integrine, associandosi a proteine come la paxillina e la FAK (Focal Adhesion Kinase)⁽⁹⁾.

B) ATTIVAZIONE DEI SEGNALI MITOGENI

Ras e Map kinasi

E' presente nelle cellule trasformate l'attivazione costitutiva di Ras e la ridotta attività Ras-Gap⁽¹⁴⁾.

L'attivazione di Ras è mediata da Bcr-Abl tramite proteine adattatrici come Grb-2: l'autofosforilazione nella tirosina in posizione 177

(Tyr177) procura un sito di legame per Grb-2⁽¹⁷⁾, che, dopo il legame con Sos, stabilizza Ras nella forma attiva legata al GTP. Altre molecole adattatrici possono attivare Ras: Shc e Crkl che legano Bcr-Abl rispettivamente con un dominio SH2 e uno SH3.

L'importanza dell'attivazione di Ras per la patogenesi delle leucemie Philadelphia positive si intuisce notando l'assenza di mutazioni attivanti Ras anche nella fase blastica, al contrario di quello che accade in molti altri tumori: ciò implica che la via di Ras sia costitutivamente attivata, senza ulteriori mutazioni.

In condizioni fisiologiche la stimolazione di recettori di citokine o fattori di crescita, come l'IL3, porta all'attivazione di Ras ed al conseguente reclutamento sulla membrana cellulare della serin-treonin kinasi Raf. Raf induce la cascata del segnale attraverso le serin-treonin kinasi Mek1/Mek2 ed Erk, che infine portano all'attivazione di geni coinvolti nei processo mitogenici⁽¹⁹⁾.

Jak-Stat

La costitutiva fosforilazione dei fattori di trascrizione Stat (Stat1 e Stat5) è stata evidenziata in diverse linee cellulari Bcr-Abl positive⁽⁹⁾. Nelle linee cellulari trasformate dalla p190 c'è anche attivazione di Stat6.⁽¹⁴⁾

Se sotto normali stimoli le Jak (Janus family kinase) fosforilano e quindi attivano i fattori Stat, Bcr-Abl può direttamente attivare Stat1 e Stat5 senza intermediari. Anche se Stat5 ha numerose funzioni, il suo principale effetto nelle cellule Bcr-Abl-trasformate pare essere anti-apoptotico e coinvolgerebbe l'attivazione trascrizionale di Bcl-xl (proteina anti-apoptotica).

Il ruolo di Ras e Jak nella risposta ai fattori di crescita può spiegare come Bcr-Abl renda delle linee cellulari indipendenti da fattori di crescita: ad esempio è stato riportato che la proteina di fusione induce un loop autocrino di G-CSF e di IL-3 nei progenitori immaturi.

PI3 kinasi (PI3K)

Bcr-Abl determina una costitutiva attivazione di PI3K. Questa kinasi fosforila il fosfatidilinositolo (PI) in posizione D3 e produce in vivo PI-(3,4)-bisfosfato e PI-(3,4,5)-trisfosfato, che possono fungere da secondi messaggeri.

Le funzioni biologiche di PI3K includono la regolazione di AKT (sopravvivenza, crescita cellulare), di RAC (motilità, sopravvivenza cellulare), di S6kinasi (sintesi proteica)⁽¹⁴⁾. Rilevante è il ruolo della serina-treonina kinasi AKT per due motivi:

- 1) AKT è a valle del segnale dell'IL-3 Receptor, quindi Bcr-Abl sarebbe in grado di mimare il segnale di sopravvivenza di IL-3 in modo PI3K dipendente;
- 2) AKT ha come substrato Bad (proteina con funzione proapoptotica), la cui fosforilazione ne determina l'inattivazione: normalmente Bad non fosforilato si lega a Bcl-xl, inibendo la sua funzione antiapoptotica e promuove la morte cellulare⁽¹⁵⁾.

Myc

L'overespressione di Myc è stata dimostrata in molte trasformazioni maligne. L'attivazione di Myc da parte di Bcr-Abl si ha attraverso un dominio SH2. Si pensa che i segnali da Bcr-Abl a Myc siano trasdotti attraverso Ras/Raf, le kinasi dipendenti da cicline (cdks) e i fattori di trascrizione E2F che infine attivano il promotore di Myc. A seconda del contesto cellulare Myc può innescare un segnale proliferativo oppure antiapoptotico.

C) INIBIZIONE DELL'APOPTOSI

E' necessario premettere che molti segnali derivanti da Bcr-Abl hanno caratteristiche proliferative e anti-apoptotiche difficilmente distinguibili.

Oltre ad AKT anche Raf-1, immediatamente a valle di Ras, fosforila la proteina Bad che, così inattivata, non può più legare proteine anti-apoptotiche come Bcl-xl. Come già detto quest'ultimo è trascrizionalmente attivato da STAT5 nelle cellule Bcr-Abl positive.

Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che tali cellule sono resistenti all'apoptosi innescata da danni al DNA: il meccanismo non è chiaro, ma pare che le cellule trasformate siano in grado di bloccare l'attivazione delle caspasi, forse grazie alle proteine della famiglia Bcl-2, con la mediazione del segnale in modo PI3K o Ras dipendente⁽¹⁵⁾. Infine risultati ottenuti da sistemi di cellule trasfettate suggeriscono che Bcr-Abl inibisce l'apoptosi mediante la via Fas/FasL⁽¹⁸⁾.

D) DEGRADAZIONE DI PROTEINE INIBITORIE

Bcr-Abl induce la degradazione proteasomiale di Abi-1 e Abi-2, due proteine con funzione inibitoria. Anche se la degradazione di queste due proteine è specifica per le leucemie acute Philadelphia positive, tale meccanismo è indicazione di un altro meccanismo di trasformazione di Bcr-Abl⁽¹⁶⁾.

E) RIPARAZIONE DEL DNA

Bcr-Abl condiziona in diversi modi il processo di riparazione del DNA. Interagisce con il prodotto del gene XPB (Xeroderma Pigmentosus B) ed aumenta la sensibilità alle radiazioni. L'alterata riparazione del DNA può condurre ad ulteriori errori genetici che si manifestano nell'evoluzione clonale nella progressione verso la CB.

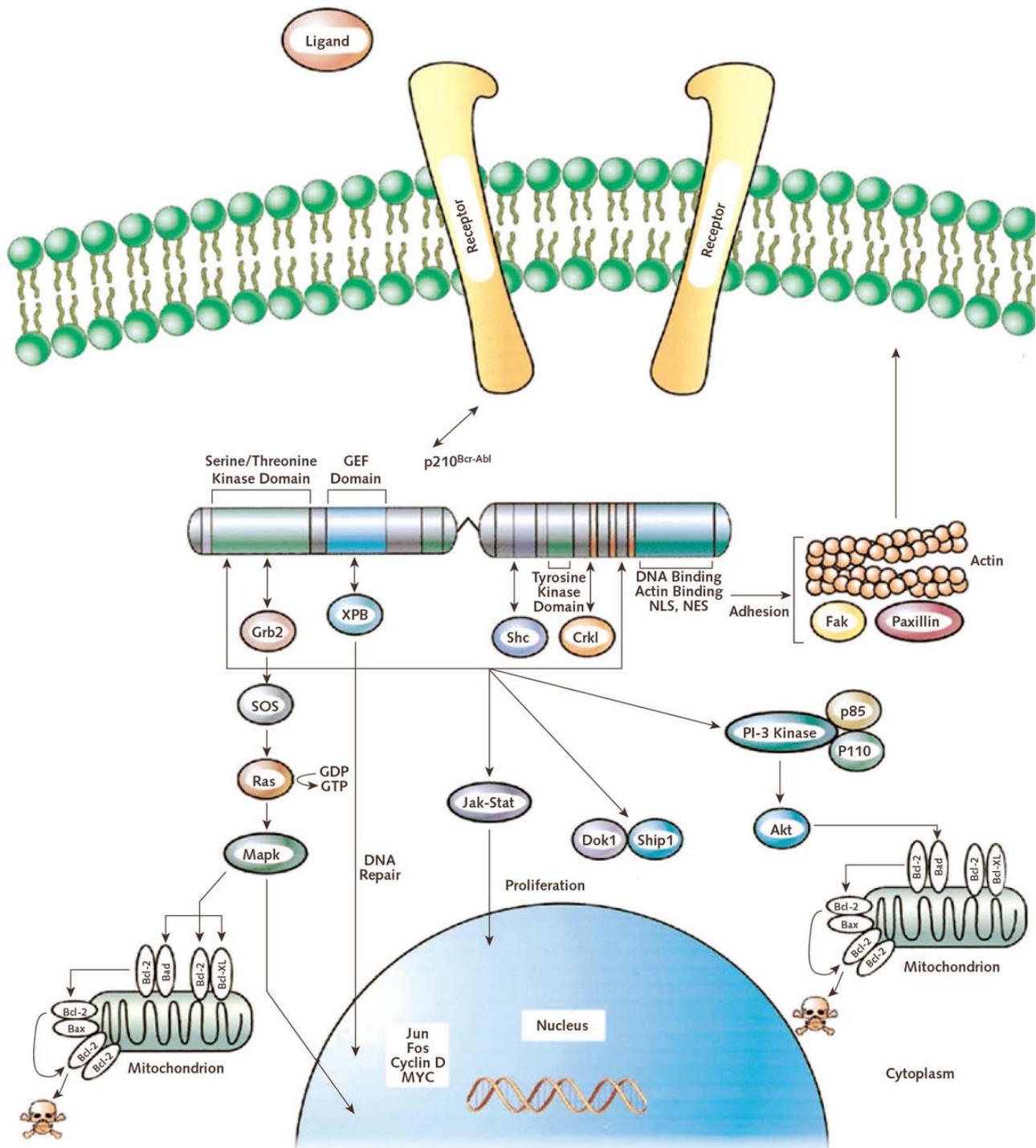


Figura 5. I meccanismi di trasformazione cellulare della proteina p210, prodotto del gene Bcr-Abl.

1.7 Terapie convenzionali

Il trattamento della LMC è stato inizialmente diretto al controllo della massa cellulare leucemica. La prima terapia applicata ha sfruttato le radiazioni ionizzanti (irradiazione della milza) durante la prima metà del secolo, mentre si sono affermati nella seconda metà gli agenti citotossici, il busulfano (1950-59) e l'idrossiurea(1960-69)⁽²⁾, i quali limitatamente alla FC, hanno migliorato la qualità della vita, ma non hanno evitato la progressione della malattia verso la FA e la CB. La terapia convenzionale con questi due citotossici orali é stata dunque riconosciuta come un semplice palliativo. Nel tempo si è arrivati alla conclusione che il busulfano era superiore alle radiazioni ionizzanti e che l'idrossiurea era superiore al busulfano. Con il busulfano si è riscontrata una sopravvivenza media di 3-4 anni; con l'introduzione dell'idrossiurea la LMC è stata identificata come malattia fatale con una sopravvivenza media di 4-5 anni e una sopravvivenza a 10 anni del 5% ⁽²⁰⁾. Entrambi hanno mostrato una risposta ematologica del 90%, ma una rara risposta citogenetica (0.9-5%).

Negli anni 70 ha fatto seguito il rapido sviluppo del trapianto di midollo osseo allogenico, i cui punti cardini sono stati individuati in: aumento dei limiti di età, ricerca di donatori non correlati ai pazienti, controllo della mortalità e della morbilità da trapianto e lo sfruttamento del potenziale terapeutico insito nel sistema immunitario allogenico⁽²⁰⁾. Il trapianto allogenico di midollo rimane l'unica terapia con potenziale curativo nella LMC con una sopravvivenza a 3-5 anni del 38-80% e a 10 anni del 50-60%⁽²¹⁾. L'indicazione elettiva è rappresentata da soggetti con meno di 55 anni in fase cronica precoce e con possibilità di un familiare donatore: è praticabile in poco più di 1/3 dei soggetti con età < 55 anni, mentre in soggetti più anziani l'indicazione diventa più limitata e la prognosi meno favorevole.

La mortalità è elevata; i risultati in fase blastica o in caso di secondo trapianto sono scarsi. Ulteriore limitazione al trapianto è la morbilità che comprende anche la cGVHD (Graft versus Host Disease).

A metà degli anni 80 è stato introdotto l'Interferone (IFN), che ha ridimensionato il ruolo della chemioterapia convenzionale e ha iniziato a limitare le indicazioni al trapianto allogenico. L'IFN- α deve essere somministrato per via subcutanea e riesce a contenere il numero delle cellule in circa i due terzi dei pazienti. L'IFN- α risulta più efficace della chemioterapia convenzionale, soprattutto in fase cronica precoce e in pazienti a basso rischio evolutivo (4 fattori di rischio definiti da Sokal: età, entità della splenomegalia, percentuale di mieloblasti periferici, numero di piastrine). La risposta ematologica completa con IFN- α è circa dell'80%; la remissione citogenetica può globalmente essere ottenuta nel 60% dei pazienti (la risposta citogenetica completa è definita come 0% metafasi cromosoma Ph-positive) e il 40% manifesta una risposta maggiore (la risposta citogenetica maggiore è definita come 1-35% metafasi cromosoma Philadelphia positive); la sopravvivenza media è di 60-89 mesi. La risposta citogenetica comincia a manifestarsi mediamente dopo 3-6 mesi, ma spesso viene raggiunta solo dopo 12-18 mesi.

Effetti collaterali e tossicità sono importanti fattori limitanti: 1/4 dei pazienti interrompe il trattamento per problemi di tossicità. L' IFN- α agisce con un meccanismo sconosciuto, ma studi in vitro hanno dimostrato un'azione antiproliferativa sulle cellule progenitrici. Esso agisce anche con un meccanismo indiretto sulla sopravvivenza delle cellule leucemiche attraverso la diminuzione dell'adesione cellulare, l'aumento delle cellule deputate alla sorveglianza del sistema immune e con l'aumento della citotossicità delle cellule natural killer.

1.8. la terapia molecolare mirata delle leucemie Ph+: imatinib.

La comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono alla trasformazione neoplastica nelle leucemie Ph+ ha spianato la strada alla realizzazione del primo, efficace esempio di terapia molecolare mirata: imatinib mesilato.

Imatinib è un derivato 2-fenil-amino-pirimidinico ed inibisce l'attività tirosin-kinasica delle proteine Abl e Bcr-Abl, di KIT, di PDGF-R (platelet-derived growth factor) e di ARG (Abl-related gene).

La sintesi risale al 1992 e nel 1996 si dimostra come sia efficace nell'inibire la proliferazione di cellule Bcr-Abl positive.

Nel 1998 è stato trattato con Imatinib il primo paziente affetto da LMC, nell'ambito di un trial clinico di fase I. Al 1999 e al 2000 risalgono rispettivamente il primo trial di fase II e il primo di fase III.

L'approvazione da parte della FDA (Food and Drug Administration) è datata 2001, ma è nel 2002 che sia la FDA che l'EMEA (European Medicines Evaluation Agency) approvano Imatinib come farmaco di prima scelta per la LMC⁽²²⁾.

Nelle cellule Philadelphia positive, Imatinib determina la rapida inibizione (in pochi minuti) della proteina oncogenica Bcr-Abl, valutata attraverso il suo livello di autofosforilazione o di fosforilazione di alcuni substrati come Crkl. Dal punto di vista cellulare l'inibizione si associa ad una diminuzione della proliferazione e all'induzione dell'apoptosi⁽²³⁾. La riduzione della proliferazione e la rimozione dei segnali bloccanti l'apoptosi, associati al ripristino della normale adesività delle cellule allo stroma midollare, comportano il ritorno all'emopoiesi normale.

Inizialmente si riteneva che Imatinib agisse come inibitore competitivo dell'attività enzimatica della proteina Bcr-Abl, a livello

del sito di legame con l'ATP. Tuttavia, lo studio della struttura cristallografica del dominio catalitico di Abl complessato con un omologo di Imatinib, ha dimostrato che il farmaco si lega alla proteina Bcr-Abl e la blocca nella conformazione inattiva, che non lega ATP⁽²⁴⁾, evitando così il trasferimento di fosfato dall'ATP ai substrati e quindi l'attivazione delle vie di segnalazione a valle.

Il dominio catalitico delle tirosin kinasi ha sempre una struttura bilobale; tra i due lobi (N-terminale e C-terminale) vi sono residui altamente conservati che formano *il sito di legame dell'ATP, il loop catalitico e il loop di attivazione*. Quest'ultimo subisce un cambio conformazionale in relazione allo stato di attivazione o inattivazione dell'attività enzimatica: nella forma inattiva il loop preclude l'accesso dell'ATP alla sua tasca di legame, mentre col passaggio alla forma attiva il legame dell'ATP viene reso possibile. Gli studi cristallografici della proteina c-Abl legata all' Imatinib hanno chiarito che il sito di legame del farmaco corrisponde solo parzialmente a quello dell'ATP e che la sua interazione con la proteina è possibile solo quando c-Abl è in conformazione inattiva. La transizione verso la forma inattiva è dunque cruciale per l'Imatinib che agisce infine stabilizzando la proteina in tale conformazione e impedendo i successivi passaggi⁽²⁵⁾.

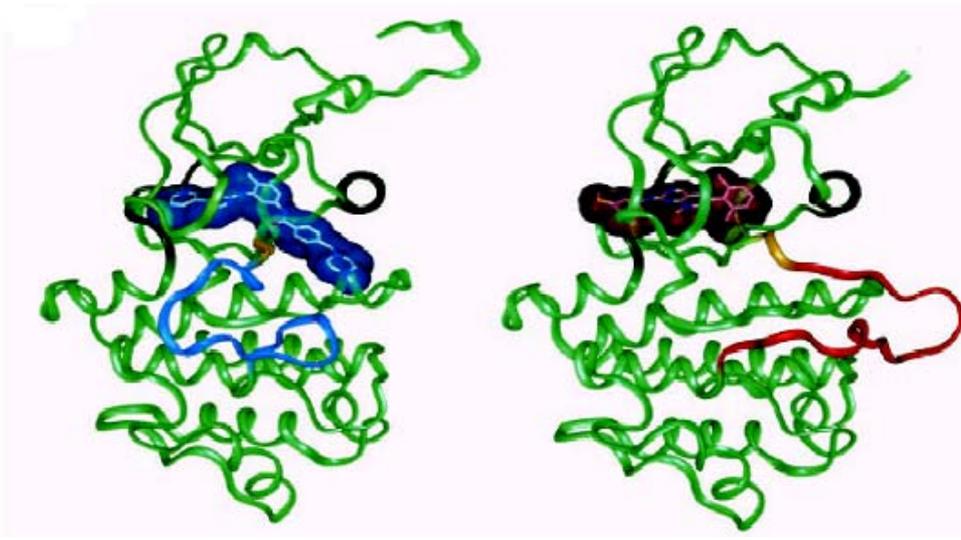


Figura 6. Loop di attivazione del dominio kinasico della proteina c-Abl nella conformazione inattiva (sinistra) ed attiva (destra)

Nelle cellule Philadelphia positive la proteina c-Abl è fusa con i residui terminali della proteina Bcr ed è in forma fosforilata e costituzionalmente attiva; quindi il loop si trova prevalentemente in forma aperta, non permettendo il legame dell' Imatinib. Le ipotesi di azione dell'Imatinib sono due: il farmaco agirebbe sfruttando l'azione delle fosfatasi intracellulari, le quali rendono dinamico lo stato di fosforilazione di Bcr-Abl; l'altra ipotesi è che l'Imatinib si leghi alla proteina Bcr-Abl di nuova sintesi e quindi ancora inattiva, rendendone così impossibile l'attivazione.

Gli studi in vitro sulla crescita di linee cellulari esposte ad Imatinib hanno confermato che il farmaco esercita una spiccata azione antiproliferativa esclusivamente sulle popolazioni cellulari che esprimono la proteina Bcr-Abl. Sulle linee cellulari Bcr-Abl negative Imatinib non manifesta alcuna attività, indipendentemente dalla concentrazione utilizzata.

Nei pazienti con LMC in FC trattati con Imatinib (alla dose standard di 400mg/die) in prima linea si è ottenuta una risposta ematologia completa (CHR) del 98% ed una risposta citogenetica completa (CCR) dell'87%, con un follow up medio di 5 anni (studio IRIS).

Imatinib differisce in modo evidente dalle terapie tradizionali per quanto riguarda gli effetti tossici: l'effetto più comune è una moderata nausea; edema, mialgia, artralgia, diarrea e rash cutaneo si riscontrano nel 10% dei pazienti; raramente si hanno edema periorbitale e più in generale sindrome da ritenzione di fluidi. La mielosoppressione è più comune in fase blastica che in cronica⁽²⁾.

Dal punto di vista farmacocinetico Imatinib viene assorbito completamente dopo somministrazione orale; ha una biodisponibilità del 98% e un'emivita terminale di circa 18-22 ore.

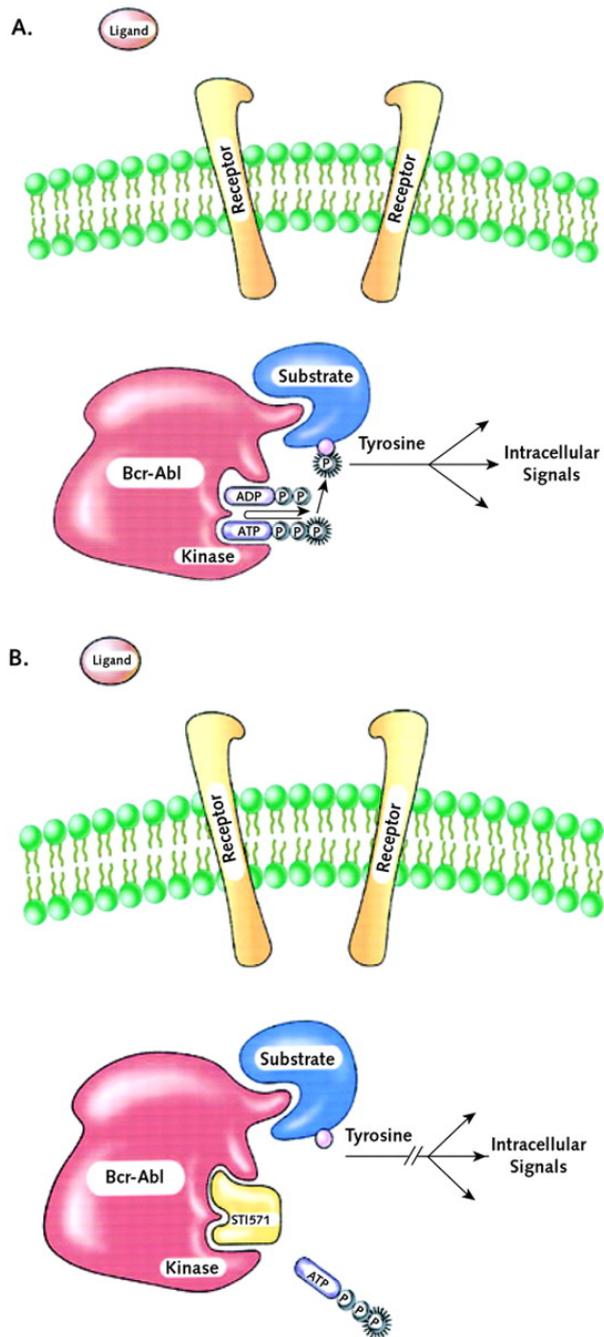


Fig. 7A. La proteina Bcr-Abl lega l'ATP e trasferisce un fosfato dall'ATP al residuo di tirosina sui suoi substrati, trasmettendo vari segnali intracellulari.

Fig. 7B. Quando Imatinib occupa la tasca della kinasi blocca l'azione dell'ATP, sopprimendo quindi la fosforilazione delle molecole effettrici a valle.

(STI571=Imatinib, ADP= Adenosina disfosfato)

1.9 Resistenza a Imatinib

Nonostante i risultati clinici eccellenti che si sono ottenuti con Imatinib, una percentuale di pazienti che varia dalle poche unità fra coloro che vengono trattati in FC alla maggior parte di coloro che vengono trattati in FA o in CB, non rispondono o ricadono in corso di trattamento (farmacoresistenza).^(26,27,28)

Si può definire resistenza primaria il mancato raggiungimento della remissione ematologica entro tre mesi dall'inizio del trattamento oppure il mancato raggiungimento della risposta citogenetica maggiore (MCgR) entro dodici mesi.

Si definisce resistenza acquisita o secondaria la perdita della risposta ematologica, citogenetica, molecolare o, peggio, la progressione alla fase accelerata o alla crisi blastica⁽²⁹⁾.

I vari meccanismi di resistenza caratterizzati o quanto meno ipotizzati possono essere di due tipi:

- 1) Meccanismi Bcr-Abl dipendenti, quando le cellule resistenti al farmaco dimostravano un'elevata attività enzimatica tirosin kinasica.
- 2) Meccanismi Bcr-Abl indipendenti, nei casi in cui le cellule resistenti dimostravano un'inibizione di tale attività enzimatica.

1.9.1 Meccanismi di resistenza Bcr-Abl dipendenti

AMPLIFICAZIONE GENICA

L'amplificazione del gene Bcr-Abl in cellule leucemiche resistenti all'Imatinib è stata inizialmente descritta nella linea cellulare LAMA84R, generata coltivando le cellule a concentrazioni crescenti di Imatinib. Il fattore cruciale nel generare questa linea cellulare da paziente affetto da LMC in CB, è stato utilizzare una concentrazione del farmaco inferiore a quella che permette il 50% dell'inibizione (IC_{50})⁽³²⁾.

La farmacoresistenza ottenuta in tale modo è stata spiegata dall'elevata quantità di proteina Bcr-Abl dovuta all'amplificazione genica.

L'individuazione dell'amplificazione si ha con la tecnica FISH (Fluorescence In Situ Ibridization).

Da ulteriori studi di tale tipo è emerso, però, che gli elevati livelli della proteina chimerica possono insorgere anche senza l'amplificazione genica, lasciando spazio ad altri meccanismi di resistenza.⁽³³⁾

OVERESPRESSIONE DELLA P-GLICOPROTEINA

Mahon et al.⁽³⁴⁾ hanno riscontrato, tra i meccanismi di resistenza nella linea cellulare LAMA84, l'overespressione della P-glicoproteina, codificata dal gene MDR-1, la quale altera l'uptake del farmaco all'interno della cellula.

In particolare la P-glicoproteina causa l'efflusso del farmaco dalla cellula attraverso la membrana plasmatica e non permette dunque la sua attività.

SEQUESTRO DI BCR-ABL NEL CITOPLASMA

La kinasi Abl normale può indurre apoptosi quando è presente nel nucleo della cellula. Bcr-Abl, che ha anche esso questa capacità, si localizza soprattutto nel citoplasma dove promuove la leucemogenesi.

E' stato visto come Imatinib favorisca lo spostamento della proteina nel nucleo, in modo da indurre appunto l'apoptosi. Un meccanismo di resistenza consisterebbe dunque nel ritorno di Bcr-Abl nel citoplasma dopo la terapia con Imatinib⁽³⁶⁾.

EVOLUZIONE CITOGENETICA CLONALE

La resistenza può derivare anche da alterazioni citogenetiche addizionali, come osservato anche da Hochhaus⁽³⁾ in 19 pazienti su 36: sono state riscontrate monosomie, trisomie, duplicazione del cromosoma Philadelphia, alterazioni del braccio corto del cromosoma 17 con perdita di un allele del gene p53 e infine nuove traslocazioni reciproche.

OVERESPRESSIONE DELLA α 1-GLICOPROTEINA ACIDA (AGP)

L'AGP, una proteina plasmatica della fase acuta, ha la capacità di inibire l'attività dell'Imatinib poichè legherebbe il farmaco e lo renderebbe così biologicamente inattivo. Gambacorti-Passerini⁽³⁷⁾ ha dimostrato, utilizzando l'eritromicina, competitore dell'Imatinib per il legame all' α 1-glicoproteina, che una grande percentuale di farmaco nel plasma è legato a tale proteina e per questo inattiva.

Studi successivi⁽³⁸⁾ hanno riportato che, sebbene la concentrazione di AGP sia spesso elevata nei pazienti LMC, la stessa non sarebbe alla base di un meccanismo di resistenza verso l'Imatinib.

MUTAZIONI PUNTIFORMI

Il principale meccanismo responsabile della riattivazione dell'attività kinasica nelle cellule leucemiche resistenti è rappresentato dall'insorgenza e dalla selezione di mutazioni puntiformi nel dominio tirosin chionasico di Bcr-Abl. Tali mutazioni impediscano il legame dell'Imatinib alla proteina, in alcuni casi modificando residui

aminoacidici critici per tale legame, oppure, più spesso, determinano una transizione dalla forma inattiva alla forma attiva della kinasi, che imatinib non è più in grado di legare.

Nell'ambito del dominio tirosin-kinasico di Abl, le mutazioni si concentrano in 4 regioni "critiche":

1) *Mutazioni nel sito di legame con l'Imatinib*: V289A, T315I, F317L.

Con la mutazione T315I (Fig. 8) vengono persi un legame a idrogeno, che normalmente permette l'interazione tra la proteina e la componente fenilamino del farmaco, ed un'interazione di Van der Waals; con V289A e F317L viene persa in entrambi i casi un'interazione di Van der Waals. Pertanto le mutazioni del primo gruppo impediscono l'azione del farmaco modificando la conformazione sterica del suo sito di legame a livello del dominio catalitico di Bcr-Abl.

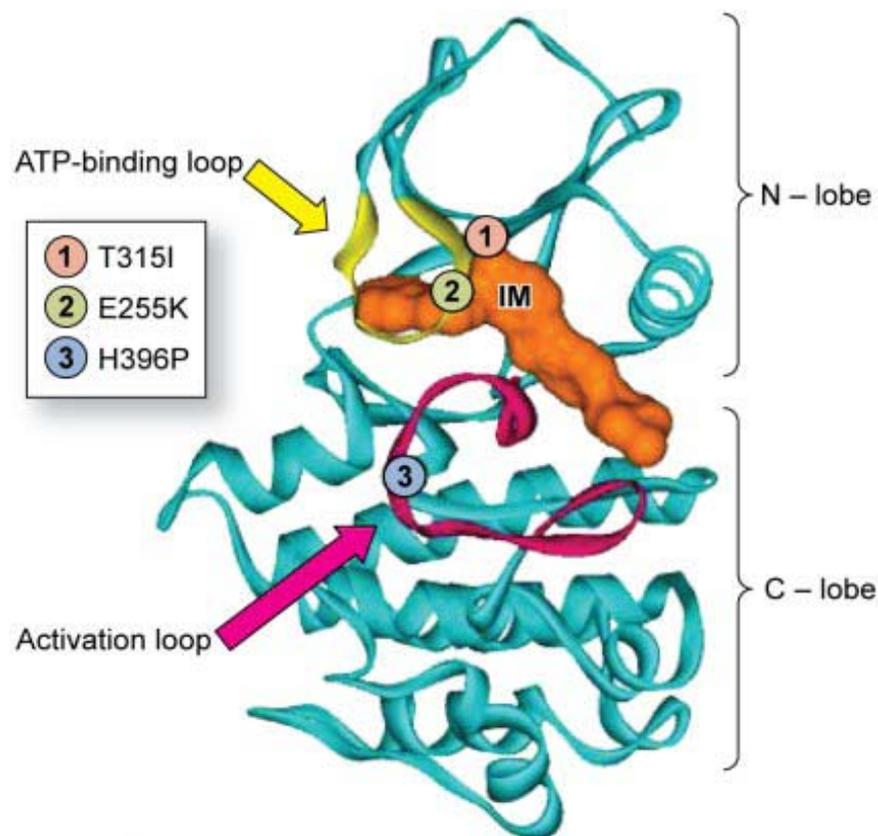


Fig. 8. Le mutazioni T315I, E255K e H396P e loro posizione.

2) Mutazioni nel loop che lega l'ATP: Y253F, G250E, E255K, Q252H.

Tra i residui che legano l'ATP, cioè gli amminoacidi formanti il cosiddetto P-loop, Y253 ha interazioni di Van der Waals con l'Imatinib, mentre gli altri tre residui non interagiscono direttamente con l'inibitore. Le mutazioni Y253H e Y253F causano la perdita di un legame a idrogeno; si ha una piccola riduzione nelle interazioni idrofobiche in quanto la catena laterale dell'istidina è più piccola di quella della tirosina. La perdita di un legame ad idrogeno è probabilmente il maggior fattore contribuente alla resistenza, poiché causa un cambiamento nell'equilibrio tra la conformazione inattiva e quella attiva, favorendo quest'ultima.

La mutazione G250E riduce lo spazio disponibile all'entrata dell'Imatinib nella tasca di legame.

Dagli studi sulla struttura cristallografica non è stata invece spiegata la relazione tra le mutazioni Q252H e E255K e la resistenza, in quanto le catene laterali dei residui puntano verso il solvente.

3) Mutazioni nel loop di attivazione: H396P.

L'introduzione di una prolina in posizione 396 nella conformazione inattiva favorisce l'activation loop ad assumere la forma attiva.

4) Mutazioni distanti dal sito di legame per l'Imatinib: M351T, F486S.

L'introduzione nella tasca idrofobica di residui polari (treonina o serina, rispettivamente in M351T e in F486S) riduce la forza delle interazioni idrofobiche e, poiché la tasca idrofobica è fondamentale

per la conformazione inattiva, si ha un'instabilità strutturale e un'induzione alla conformazione attiva.

Allo stato attuale sono state individuate da pazienti in ricaduta, resistenti al trattamento con Imatinib, circa 50 differenti sostituzioni aminoacidiche.

L'incidenza di mutazioni in pazienti resistenti, in uno studio condotto dal GIMEMA-LMC working party, è risultata essere di circa il 40%. Andando poi a scorporare tale incidenza per fase di malattia, è possibile notare come le mutazioni siano significativamente più frequenti con l'avanzare dello stadio di LMC, nonché nelle LLA. In queste fasi, le mutazioni del P-loop e la mutazione T315I sono particolarmente frequenti.

Inoltre è stato osservato che le mutazioni possono essere associate sia a resistenza primaria che a resistenza acquisita; tuttavia, sono decisamente più frequenti in quest'ultimo caso.

Diversi studi in vitro hanno valutato il grado di resistenza a imatinib conferito dalle diverse forme mutanti⁽³⁷⁾. Dai risultati di questi studi è emerso come le mutazioni possano suddividere in due grandi gruppi:

- quelle che fanno registrare solo un moderato incremento del valore di IC50 di imatinib (la concentrazione intracellulare di inibitore che deve essere aggiunta per inibire la crescita del 50% delle cellule Bcr/Abl positive, o per inibire del 50% l'attività enzimatica della kinasi), e che quindi potrebbero essere bypassate da un incremento del dosaggio (ad esempio la F311L e la E355G)
- quelle che invece fanno registrare un drammatico incremento di IC50, corrispondono a concentrazioni di inibitore che non possono essere raggiunte in vivo.

1.9.2 Meccanismi di resistenza Bcr-Abl indipendenti

Lo sviluppo della resistenza può essere dovuta all'acquisizione di eventi oncogenici aggiuntivi oppure all'attivazione di percorsi di traduzione del segnale alternativi, che rendono la crescita delle cellule leucemiche Ph⁺ indipendenti dall'attività tirosin-kinasica di Bcr-Abl. Nel primo caso, la resistenza può quindi essere dovuta alla comparsa di anomalie citogenetiche addizionali, che si acquisiscono nella progressione della malattia e che infatti si ritrovano in più dell'80% dei pazienti in CB, dove appunto è elevato il tasso di recidiva alla terapia con imatinib. Nel secondo caso, la resistenza può essere dovuta ad aberrazioni a carico di mediatori-chiave a valle di Bcr-Abl. Un caso di questo tipo si è osservato in una linea cellulare K562 resistente ad Imatinib, ma con una forma di Bcr-Abl sensibile all'inibitore. L'aggiunta del farmaco alle cellule in coltura impediva la fosforilazione della kinasi stessa e di molti dei suoi substrati. L'inefficacia di imatinib dipendeva da un'anomala overespressione della kinasi Lyn della famiglia Src; infatti la sua inattivazione mediante oligonucleotidi antisenso o inibitori specifici era in grado di ripristinare la sensibilità all'inibitore.

1.10 Il trattamento dei pazienti resistenti a imatinib.

Nonostante diversi meccanismi possano intervenire nella resistenza a imatinib, le mutazioni puntiformi rappresentano quello più frequente. La valutazione dello status mutazionale di un paziente che abbia una risposta subottimale a imatinib o addirittura manifesti evidenza di resistenza sta entrando nella pratica clinica poiché può fornire un contributo prezioso ad una più razionale gestione terapeutica dei pazienti. Nel caso in cui la mutazione riscontrata in un paziente resistente determini un incremento modesto dell'IC50 di

imatinib, un aumento del dosaggio da 400mg/die a 800mg/die viene generalmente tentato. In tutti gli altri casi, proseguire il trattamento con imatinib non porta alcun beneficio e la LMC può rapidamente progredire se una strategia terapeutica alternativa non viene adottata. Fino a poco tempo fa, in realtà, l'unica alternativa "non palliativa" era rappresentata dal ricorso al trapianto allogenico di cellule staminali, ammesso che esistesse per il paziente per il paziente donatore compatibile. Oggi però l'armamentario terapeutico utilizzabile nei pazienti che sviluppano resistenza a imatinib si sta arricchendo di diversi inibitori di seconda generazione. I principali sono:

1. Nilotinib (Tasigna, AMN107), per il quale è terminata la fase II di sperimentazione ed è stata appena ottenuta l'approvazione da parte del FDA e dell'EMA come trattamento di seconda linea nei pazienti affetti da CML resistenti o intolleranti al trattamento con Imatinib ⁽³⁸⁻³⁹⁾
2. Dasatinib (Sprycel, BMS354825), anche esso di recente approvato da parte del FDA ed EMA come trattamento di seconda linea per pazienti affetti da LMC o LLA Ph+ resistenti o intolleranti a imatinib ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾
3. Bosutinib (SKI606), attualmente in fase II di sperimentazione ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾
4. Inno-406 (NS-187), attualmente in fase preclinica di sperimentazione. ⁽⁵⁹⁻⁶⁰⁾

Poiché gli inibitori di Bcr-Abl di prima e di seconda generazione sono incapaci di neutralizzare la resistenza dovuta alla presenza della mutazione puntiforme T315I, si stanno inoltre testando alcune molecole (inibitori delle aurora chinasi) in grado di agire su cellule che presentano questa particolare mutazione.

1. VX680 (MK0457): attualmente in fase I di sperimentazione ^(48, 49)

2. PHA-739358: attualmente in fase I di sperimentazione (50-52)

1.11 Nilotinib.

Nilotinib é un inibitore delle tirosin chinasi di seconda generazione che nasce dallo studio razionale della struttura cristallografica dell'interazione di imatinib con Abelson. (38-39)

Si era infatti osservato che pur mantenendo lo scheletro di base della molecola e la sua ottima solubilità, alcune sue piccole modifiche avrebbero potuto incrementare l'affinità dell'inibitore per Bcr-Abl.

Pur legandosi, come Imatinib, soltanto alla conformazione inattiva di Bcr-Abl, l'ottimizzazione della struttura dell'inibitore lo rende 30 volte più potente, molto più specifico (la specificità di Nilotinib è infatti Abl (IC₅₀24nM)>PDFR(IC₅₀53nM)> KIT(IC₅₀158nM) mentre quella di Imatinib era PDFR(IC₅₀39nM)> KIT(IC₅₀120nM)>Abl(IC₅₀649nM) e attivo, almeno in vitro contro 32/33 forme mutanti di Bcr-Abl (con l'eccezione della T315I). Questa aumentata efficienza é probabilmente dovuta ad una aumentata affinità di legame alla conformazione inattiva a sua volta determinata da un numero maggiore di interazioni liofiliche nonché ad una struttura sterica leggermente più piccola che risulta essere meno rigorosa nell'instaurare i legami con la tasca tirosin chinasi di Abelson. Infatti Imatinib basa la sua interazione soprattutto sull'instaurazione di legami ad H, i quali necessitano una direzione ben precisa oltre ad utilizzare una superficie di contatto maggiore, che rendono il farmaco particolarmente sensibile ai cambiamenti della superficie di contatti in seguito alla comparsa di mutazioni puntiformi. La resistenza osservata nei confronti della mutazione T315I é dovuta come nel caso di Imatinib al fatto che il residuo 315 ha una posizione critica e controlla l'accessibilità della tasca di legame di ATP. La sostituzione di treonina con isoleucina, molto più ingombrante e idrofoba, crea un ingombro sterico tale da impedire il corretto

posizionamento di Nilotinib all'interno della tasca di legame per l'ATP, ed inoltre fa sì che venga meno un legame a H fondamentale per l'interazione fra Nilotinib (come Imatinib) e Bcr-Abl.

Sospinto dagli incoraggianti risultati pre clinici, nilotinib è entrato in fase clinica nel maggio del 2004. I risultati del trial clinico di fase I mirante a valutare la sicurezza e la tollerabilità di nilotinib, nonché il suo dosaggio ottimale, in pazienti affetti da LMC in varie fasi di malattia ed in pazienti affetti da ALL sono stati da poco pubblicati ⁽⁴³⁾ Ottime percentuali di risposta ematologica e citogenetica sono state ottenute sia nel gruppo di pazienti in FC (92% CHR, 35% CCR), sia nel gruppo di pazienti in FA (75% HR, 55%CR) e in FB (39%HR, 27%CR).

Il farmaco ha mostrato inoltre un buon profilo di tollerabilità. I trials di fase II iniziati nell'aprile 2005 hanno ottenuto ottime percentuali di risposte sia ematologiche che citogenetiche. Infatti dopo 6 mesi di trattamento con una dose standard di 800mg/die di nilotinib, le percentuali di risposta, nei pazienti affetti da CML resistenti o intolleranti ad imatinib, sono state le seguenti: 48% MCgR, 31% CCgR; 16% PCgR.

mentre la sopravvivenza stimata a 12 mesi è stata del 95%. ⁽⁴³⁾

Gli eccellenti risultati ottenuti dagli studi di fase I/II hanno costituito la base per la recente approvazione del nilotinib da parte della Food and Drug Administration (FDA) e successivamente dall-European Medicine Evaluation Agency (EMEA) come trattamento di seconda linea per pazienti con LMC resistenti o intolleranti al precedente trattamento con imatinib.

2. SCOPI DELLA TESI

Nonostante l'inibitore tirosin/kinasico imatinib abbia dimostrato, e stia dimostrando, un'efficacia senza precedenti nei pazienti affetti da leucemie Ph+, casi di farmacoresistenza si possono osservare in una piccola percentuale di pazienti con LMC trattati in FC e nella maggior parte dei pazienti trattati in fase avanzata o con LLA. Nella maggior

parte di questi casi si osserva la riattivazione dell'attività tirosin/chinasica di Bcr/Abl in seguito alla selezione di mutazioni puntiformi che vanno a colpire residui critici di contatto o che comunque inducono una conformazione di Bcr/Abl che imatinib non è più in grado di legare. Per contrastare il problema della farmacoresistenza si è cercato di disegnare razionalmente inibitori di seconda generazione dotati di una maggiore flessibilità di legame, in modo tale da rendere il composto attivo contro eventuali forme mutate di Bcr/Abl. Tra questi Nilotinib ad essere entrato in sperimentazione clinica per leucemie Ph⁺ resistenti al trattamento con Imatinib. Nilotinib nasce dallo studio razionale e dalla conseguente ottimizzazione dell'interazione di imatinib e abelson. Grazie a questa prerogativa Nilotinib risulta essere efficace, in vitro, contro numerose forme mutanti di Bcr/Abl, con unica eccezione della mutazione T315I. A partire da Luglio 2005, 45 pazienti affetti da leucemia Ph⁺ resistenti o intolleranti al trattamento con Imatinib ed afferenti alla nostra Istituzione sono stati arruolati in una serie di protocolli clinici di fase II con Nilotinib alla dose di 800mg/die.

Lo scopo di tale studio è stato:

1. valutare la risposta molecolare di tali pazienti
2. valutare l'efficacia di Nilotinib in funzione dello status mutazionale al baseline
3. valutare la cinetica di scomparsa delle mutazioni presenti e/o di comparsa di nuove mutazioni

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti e Disegno dello studio

A partire da Luglio 2005, 45 pazienti affetti da LMC o LLA Ph+ afferenti alla nostra Istituzione sono stati arruolati in 2 studi clinici internazionali, uno di fase II (protocollo CAMN107A2101) ed unodi fase III (protocollo CAMN107A2109). I pazienti studiati in questa tesi sono stati 30 in quanto 15 sono usciti prematuramente dai protocolli per intolleranza al farmaco per cui non è stato possibile eseguire su questi alcuna analisi molecolare.

I due studi avevano, rispettivamente, lo scopo di:

- Valutare la sicurezza di impiego e l'efficacia di nilotinib alla dose standard di 800mg/die in pazienti affetti da LMC in diversi stadi di malattia (CB, FA e FC) ed in pazienti affetti da LLA Ph+ resistenti o intolleranti al trattamento con imatinib
- Garantire la disponibilità del trattamento con nilotinib, alla dose di 800mg/die, fino al momento della sua commercializzazione in pazienti affetti da LMC resistenti o intolleranti al trattamento con imatinib

I criteri di inclusione in questi protocolli sono stati i seguenti:

1. la maggiore età;
2. il consenso scritto volontario.
3. la presenza di LMC Ph+ in diversi stadi di malattia resistenti o intolleranti ad imatinib;
4. la presenza di LLA PH+ ricaduta o refrattaria

I criteri di esclusione, invece, sono stati:

1. infiltrazione del SNC
2. compromissione della funzionalità cardiaca
3. compromissione della funzionalità gastrointestinale
4. impiego di wafarin
5. epatopatie
6. gravidanza ed allattamento

7. infezione da HIV

I pazienti che sono stati analizzati in questo studio sono stati 30, mentre 15 non sono stati analizzati in quanto o deceduti o perché hanno interrotto il trattamento con nilotinib molto precocemente.

Sia l'analisi quantitativa che quella mutazionale era prevista ad intervalli regolari, rispettivamente

- ogni mese per i primi tre mesi, e successivamente ogni tre mesi
- a cadenze trimestrale

3.2 Materiale biologico

Per l'estrazione dell'RNA sono state utilizzate cellule mononucleate, ottenute da sangue midollare e periferico mediante separazione su gradiente di densità con Ficoll-Paque.

3.3 Separazione su Ficoll

I campioni di sangue midollare sono stati filtrati, diluiti 1 a 3 con soluzione fisiologica e stratificati in provette contenenti Lymphoprep. Il sangue periferico è stato invece diluito 1 a 1 con soluzione fisiologica senza essere prima filtrato. Dopo centrifugazione (1500rpm per 25 minuti), è stato raccolto l'anello della frazione mononucleata e successivamente è stato sottoposto a lavaggio con soluzione fisiologica e recuperato mediante centrifugazione a 1800 rpm per 10 minuti. Infine, il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato risospeso in 500 μ l di guanidinio isotiocinato (GITC) e conservato a -20°C .

3.4 Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'RNA da cellule mononucleate è stato utilizzato il kit Rneasy (Qiagen). Un volume di 350 μ l di cellule mononucleate risospese in GITC, dopo aggiunta di una pari quantità di etanolo al 70%, viene applicato ad una mini colonna Rneasy. Qui l'RNA totale si lega ad una membrana di silice e i contaminanti sono efficientemente lavati via mediante successive centrifugazioni con i buffers RW1 e RPE. L'RNA è poi stato eluito in 30 μ l di acqua a cui è stata aggiunta 1U di Rnase inhibitor (RNAsin, Roche). La qualità dell'RNA estratto è stato saggiata mediante gel di agarosio al 2% in cui sono visibili le bande ribosomiali 28S e 18S.

3.5 Sintesi del c-DNA

All'estrazione dell'RNA è seguita la trascrizione inversa a cDNA attraverso l'attività dell'enzima DNA polimerasi RNA dipendente.

L'RNA di partenza è stato dapprima denaturato per 5 minuti a 70°C e poi mantenuto in ghiaccio per almeno 10 minuti. La retrotrascrizione è stata realizzata in un volume finale di 20 μ l di reazione, contenente 5 μ M di Random Examers (Applied Biosystem) , 1 μ g di RNA, 4 mM di DTT (Invitrogen), 200 μ M di ciascun deossinucleotide trifosfato 1(Invitrogen), 10 μ l di RT buffer 5x (Invitrogen), 24U RNAsin (Roche) e 200U di Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (mMLV) (Invitrogen). La reazione è stata incubata per 60 minuti a 37°C e successivamente per 5 minuti a 95°.

3.6 PCR

La PCR (Reazione a catena della Polimerasi) è una metodica che permette di amplificare una sequenza specifica, partendo da un campione eterogeneo che può essere di DNA o cDNA. Per effettuare questa reazione è necessario sintetizzare una coppia di primers, un “senso” (forward) ed un “antisenso” (reverse), la cui funzione è quella di legarsi alla regione 5' fiancheggiante le sequenze di interesse dei due filamenti del DNA. La loro lunghezza può variare, da 15 a 30 nucleotidi: maggiore è la lunghezza dei primers, maggiore sarà la loro specificità. La reazione di PCR è costituita da più cicli, in maniera tale che il prodotto di amplificazione dei vari cicli funga da stampo per la sintesi di nuovi amplificati. Si ottiene così un'amplificazione esponenziale. L'enzima utilizzato è la Taq DNA Polimerasi, una DNA polimerasi DNA-dipendente resistente al calore, originariamente purificata dal termofilo estremo *Thermus Aquaticus* e disponibile ora in una forma ingegnerizzata geneticamente. Questo enzima ha un'attività esonucleasica 5'-3'. Per l'incorporazione dei nucleotidi la Taq DNA Polimerasi lavora in modo ottimale alla temperatura di 75°-80° C. La sua attività polimerasica si riduce di un fattore di 2 a 60° C e pari a 10 a 37° C. Per l'amplificazione del trascritto Bcr-Abl sono stati effettuati 45 cicli con le seguenti condizioni:

- 95° C per 30 secondi per la denaturazione del template
- 60° C per 30 secondi per l'annealing dei primers alle sequenze complementari sul template
- 72° C per 30 secondi per la sintesi del DNA

Ogni PCR è stata allestita in un volume finale di 50 μ l, di cui ognuna conteneva i seguenti componenti:

1. cDNA 5 μ l
2. Bufer 10X 5 μ l
3. dNTPs 100 μ M
4. DMSO 2 μ l
5. Primers (BCR/b1A e ABL/a3B) 50nM (25pmoli) vedi tabella
6. Taq enzima 5U/ μ l
7. acqua distillata sterile fino a volume

Al termine della reazione di amplificazione il trascritto Bcr/Abl è evidenziato, in un gel d'agarosio al 2% in TBE all'1%, da una banda da 313 bp per il trascritto b2a2 e di 388 bp per il trascritto b3a2

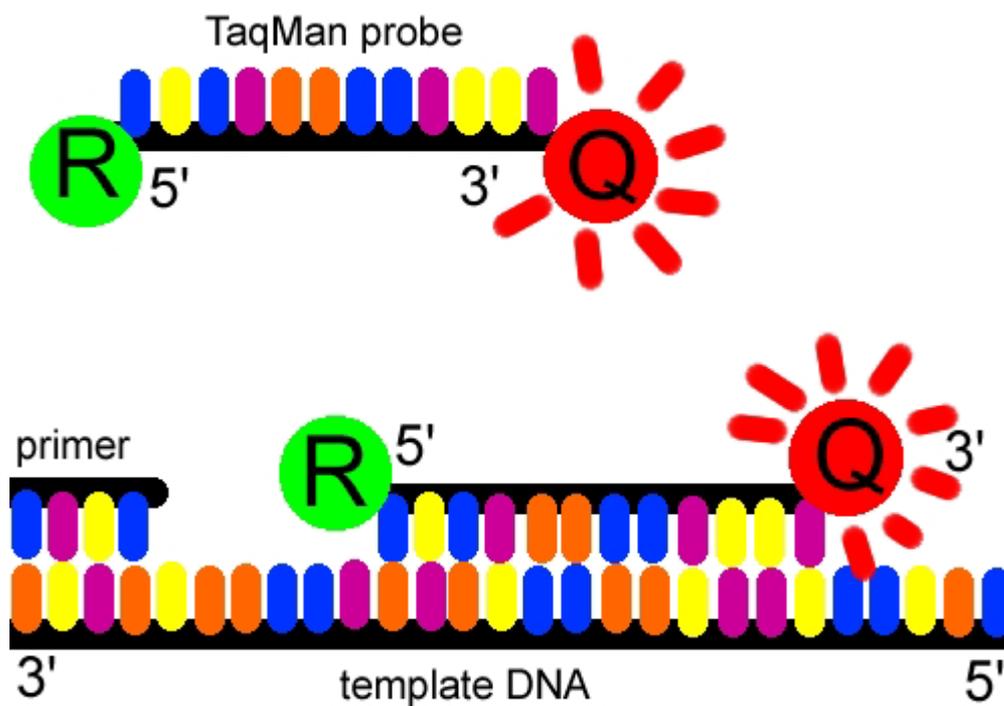


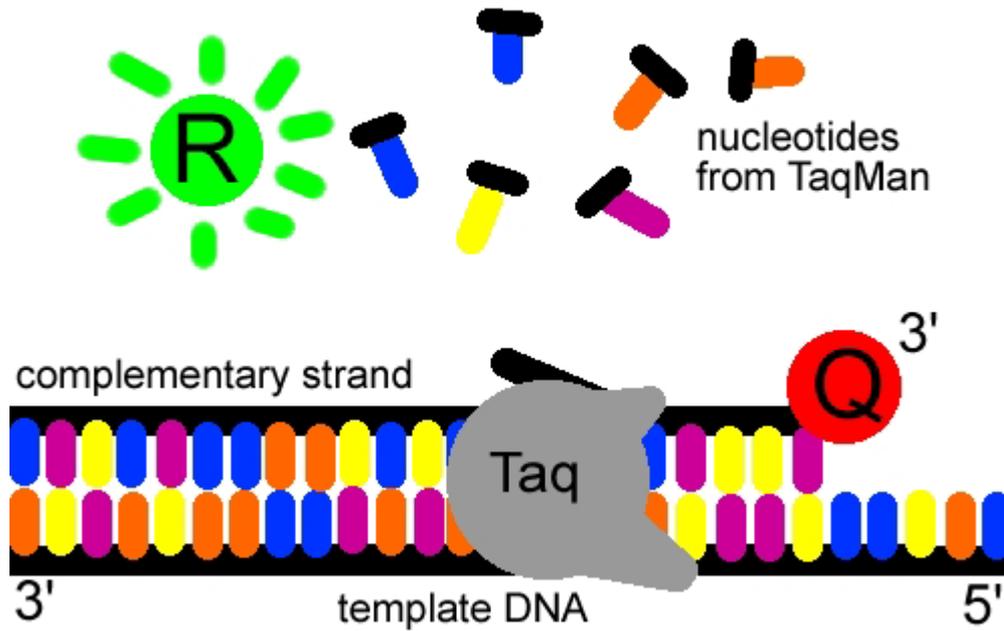
Nome dei Primers	Sequenza dei primers (5'-3')
BCR-b1A	GAAGTGTTCAGAAGCTTCTCC
ABL-a3B	GTTTGGGCTTCACACCATTC

3.7 Real time PCR

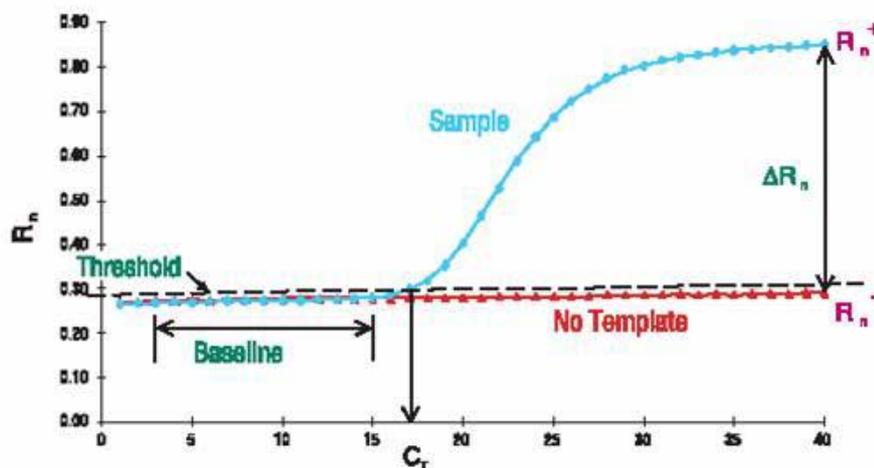
La real-time è una tecnica che permette contemporaneamente l'amplificazione del template, la generazione, la raccolta e l'elaborazione di un segnale. Si basa sull'attività esonucleasica 5'/3' della Taq DNA polimerasi e sull'utilizzo di una sonda oligonucleotidica complementare ad un tratto interno alla sequenza di

DNA analizzato. La sonda è caratterizzata dalla presenza di un quencer (Q) e di un reporter (R) legati rispettivamente alle estremità 3' e 5'. Il reporter emette luce se viene eccitato ad una determinata lunghezza d'onda, il quencer sopprime l'intensità di fluorescenza del reporter quando sono vicini. Durante la reazione di amplificazione la Taq polimerasi, grazie alla sua attività esonucleasica, determina la degradazione della sonda, in tal modo il reporter viene allontanato dal quencer e si genera un segnale di fluorescenza.

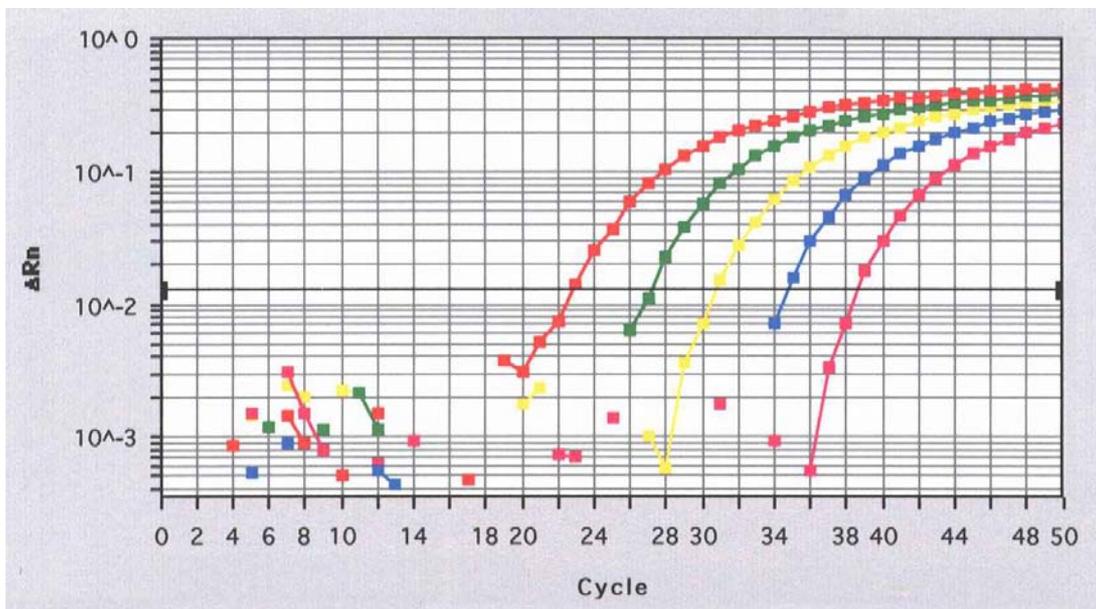




La variazione di fluorescenza necessaria (ΔR_n) per determinare il numero di molecole contenute nel campione analizzato, viene calcolato come $\Delta R_n = R^+ - R^-$. R^+ è la fluorescenza del campione analizzato, normalizzata rispetto alla fluorescenza di ROX, un reporter passivo presente nella Universal Master Mix. R^- è la fluorescenza del Not Template Control (NTC), normalizzata rispetto alla fluorescenza di ROX.

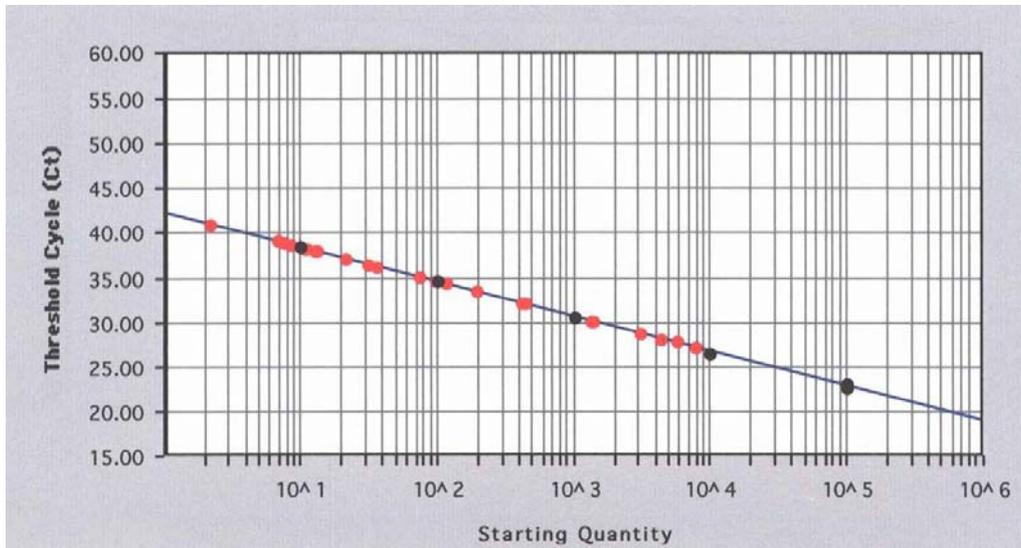


Lo strumento è in grado di rilevare l'intensità di fluorescenza ad ogni ciclo di reazione, permettendo di monitorare la crescita esponenziale del template. Nell'analisi dei dati ottenuti si considera il ciclo soglia (Ct, cycle threshold) come il ciclo nel quale si avverte il primo significativo aumento del segnale di fluorescenza, convenzionalmente viene definito come dieci volte la deviazione standard del segnale di fluorescenza nei primi 15 cicli. Durante l'analisi cinetica viene utilizzato il valore di Ct in quanto è proporzionale al numero di copie iniziali del template.



Per ricavare il numero iniziale di template che si studia è quindi necessario costruire una curva standard, a partire da campioni

standard, ossia plasmidi a concentrazione nota, contenenti la sequenza studiata. La curva standard viene costruita utilizzando la relazione lineare tra il Ct ed il logaritmo della concentrazione iniziale del template nei campioni analizzati.



Una caratteristica di questo sistema di quantificazione è la possibilità di eliminare eventuali contaminazioni, nella fase iniziale della reazione, grazie all'attività di AmpErase UNG (Uracil N/Glycosylase). Questo enzima evita che avvenga l'amplificazione di sequenze contaminanti grazie alla sua capacità di riconoscere e tagliare tratti contenenti dUTP, mentre lascia inalterati gli acidi nucleici che includono dTTP. Ciò significa che se nella mix di reazione è presente RNA, questo sarà distrutto, mentre il cDNA resterà inalterato. Il vantaggio di questa metodica deriva dal fatto che non occorre una manipolazione post-PCR, per cui non c'è il rischio di contaminazione del prodotto. Inoltre, è possibile studiare contemporaneamente numerosi campioni, in quanto l'apparecchiatura in cui avviene la reazione ne può analizzare fino a 96.

La quantificazione Real-time è condotta mediante ABI PRISM 7900 Sequence Detector System (Applied Biosystem).⁽⁴⁰⁾ Tutte le sonde sono state marcate FAM come Reporter e TAMRA come Quencer. La

determinazione della concentrazione di primers e sonda, per la standardizzazione della metodica Real-time, viene eseguita costruendo una matrice di primers a diverse concentrazioni. Tra le diverse concentrazioni di primers e sonda utilizzate nella matrice, si scelgono le concentrazioni che producono il più alto ΔR_n con il più basso Ct.

	Forward	50nM	300nM	900nM
Reverse				
50nM		50/50	50/300	50/900
300nM		300/50	300/300	300/900
900nM		900/50	900/300	900/900

A seguire sono riportate le sequenze dei primers e delle sonde utilizzate.

Sequenza dei primers e sonda del BCR-ABL
BCR-ABL Rew: 5'TGGGTCCAGCGAGAAGGTT3'
BCR-ABL Fwd: 5'GCATTCCGCTGACCATCCAAT3'
BCR-ABLProbe:5'FAM-CCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGG-TAMRA3'

Sequenza dei primers e sonda di ABL
ABL Rew: 5'TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT3'
ABL Fwd: 5'GATGTAGTTGCTTGGGACCCA3'
ABLProbe:5'FAM-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-TAMRA3'

Ciascun esperimento è stato condotto in duplicato, in un volume finale di 25 μ l, utilizzando:

- 12,5 μ l di Universal Master Mix 2X (Applied Biosystem)
- primers
- sonda
- 6 μ l di una diluizione 1:3 del cDNA in esame.

Contemporaneamente ai campioni sperimentali, è stata eseguita la quantificazione di cinque diluizioni note (10^6 - 10^5 - 10^3 - 10^2 -10) di un plasmide del gene in esame, al fine di costruire una curva standard da cui è possibile ricavare informazioni sulla quantità assoluta di molecole di cDNA del gene target. Le diluizioni dei plasmidi usate per generare la curva standard sono state fornite dalla IPSOGEN. Il profilo termico della reazione Taqman è caratterizzato dal seguente andamento:

- I. 50°C per 2'
- II. 95°C per 10'
- III. 95°C per 15''
- IV. 60°C per 1' } Ripetuti per 50 volte

L'acquisizione dei dati avviene unicamente durante la fase di elongazione a 60°C. Per normalizzare l'espressione del trascritto analizzato si rapporta il suo valore a quello di un gene housekeeping che per lo studio sperimentale è il gene Abelson (Abl). Il motivo per cui si usa l'Abl è che il gene è stabilmente ed altamente espresso in tutte le cellule del midollo. La quantità di trascritto viene espressa tramite la rato BCR-ABL/ABLx100. per essere certi che l'RNA non sia degradato, i campioni che danno valori di Ct di Abl maggiori di 30 sono scartati.

3.8 Nested PCR

Al fine di aumentare la sensibilità e la specificità dell'amplificazione del dominio kinasico di Abl, è stata utilizzata la Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR), che prevede due successivi step di amplificazione, il secondo dei quali viene effettuato mediante l'utilizzo di una coppia di primers posizionati più internamente rispetto alla prima. Il ricorso a questa metodica è stato dettato dall'esigenza di aumentare la sensibilità dell'amplificazione in quei pazienti in cui l'analisi quantitativa risultavano undetectable

(ratiox100<0.001). In tal modo la sensibilità viene aumentata di un logaritmo, passando da 10⁻⁵ a 10⁻⁶. Il protocollo per l'amplificazione del primo step corrisponde a quello del PCR qualitativa con una riduzione a 35, invece di 45, dei cicli del termociclatore, con l'impiego di 5µl di cDNA.

Il secondo step, utilizza i primer BCR-b2C e ABL-a3D che risultano più interni e la cui sequenza è la seguente:

Nome dei Primers	Sequenza dei primers (5'-3')
BCR-b2C	CAGATGCTGACCAACTGTGT
ABL-a3D	TTCCCCATTGTFGATTATAGCCTA

La riamplicazione è stata effettuata su un'aliquota di 1 µl del prodotto di PCR del primo step con una coppia di primers posizionati più internamente sulle sequenze del gene di fusione Bcr-Abl, mentre il protocollo di amplificazione rimane lo stesso.⁽⁴¹⁾

3.9 Amplificazione del trascritto per screening mutazionale

Per lo screening mutazionale si utilizza la Nested-PCR a causa di una duplice esigenza:

- Aumentare la sensibilità dell'amplificazione
- Selezionare per l'analisi solo l'allele Bcr-Abl riarrangiato e non l'allele Abl Wild-type (il che aumenta ulteriormente la sensibilità dell'analisi)

Il primo step di amplificazione è stato effettuato con 4µl di c-Dna utilizzando un primer forward p210 (posizionato al confine tra gli esoni 12 e 13 dell'mRNA di Bcr) o un primer forward p190 (posizionato sull'esone 1 dell'm-RNA di Bcr) (BCR-F, Tabelle 2), e con un primer

reverse (ABL-R, Tabella 2) posizionato sull'esone 10 DELL'M-rna DI Abl. Un'iniziale step di denaturazione di 5 minuti alla temperatura di 95° è stato seguito dall'amplificazione che avviene in 30 cicli, ciascuno dei quali costituito da:

- 1) denaturazione per 30 secondi a 95°;
- 2) annealing per 1 minuto a 61°;
- 3) estensione per 2 minuti e 30 secondi a 72°.

Alla fine dei 30 cicli di amplificazione si è avuta una fase finale di estensione per 7 minuti a 72°. L'amplicone risultante aveva una lunghezza di 1475 bp nel caso di riarrangiamento b3a2) oppure di 1401 bp (nel caso di riarrangiamento b2a2). La riamplicazione è stata effettuata su un'aliquota di 2 µl del prodotto di PCR del primo step (precedentemente diluito 1:50) con due coppie di primers posizionati più internamente sulle sequenze del gene Abl: F-ABL-A/R-ABL-A e F-ABL-B/R-ABL-B (**Tabella 2**). In questo modo il dominio kinasico di Abl è stato diviso in 2 frammenti che si sovrappongono parzialmente: la coppia ABL-A ha permesso l'amplificazione del frammento comprendente gli esoni 206-335 (Frammento A, di lunghezza pari a 393 bp), mentre la coppia ABL-B ha permesso di amplificare la regione comprendente gli esoni 262-421 (Frammento B, di lunghezza pari a 482 bp) e la coppia ABL-C che amplifica la regione comprendente gli esoni 371-574 (Frammento C, di lunghezza pari a 464bp). Il secondo step di amplificazione è stato effettuato alle seguenti condizioni di reazione: denaturazione iniziale per 5 minuti a 95° ed estensione finale per 7 minuti a 72° sono comuni all'amplificazione del Frammento A e del Frammento B. Per il primo dei due sono previsti 35 cicli di amplificazione, ognuno caratterizzato da uno step di denaturazione per 30 secondi a 95°, uno step di annealing per 30 secondi a 60° e uno step di estensione per 50 secondi a 72°. Per il Frammento B i 35 cicli hanno le seguenti

condizioni: denaturazione per 30 secondi a 95°, annealing per 30 secondi a 61° ed estensione per 40 secondi a 72°.

Il volume finale in tutte le reazioni di PCR è di 50µl contenente 200µM di ciascun deossinucleotide trifosfato (Invitrogen), 5µl di buffer 10x (Transgenomic), 0.5µM di ciascun primer (Invitrogen), 1.5mM di MgSO₄ (Transgenomic), 1µl (2.5U) di polimerasi (Transgenomic Optimase Polymerase).

Nome dei Primers	Sequenza (5'→3')	Posizione
Fwd-BCR p210	GAG CAG CAG AAG AAG TGT TTC AGA	BCR, esone 12/13
Fwd-BCR p190	CAA CAG TCC TTC GAC AGC AGC AG	BCR, esone 1
Fwd-ABL-A	CAT CAT TCA ACG TGT GCC GAC GG	ABL esone 4
Rev-ABL-A	GTT GCA CTC CCT CAG GTA GTC	ABL esone 6
Fwd-ABL-B	GAA GAA ATA CAG CCT GAC GGT G	ABL esone 4
Rev-ABL-B	CGT CGG ACT TGA TGG AGA A	ABL esone 7
Fwd-ABL-C	TGG TAG GGG AGA ACC ACT TG	ABL esone 7
Rev-ABL-C	CCT GCA GCA AGG TAC TCA CA	ABL esone 10

Tabella 2. Primers Utilizzati per l'amplificazione del dominio tirosin-kinasico di Bcr-Abl.

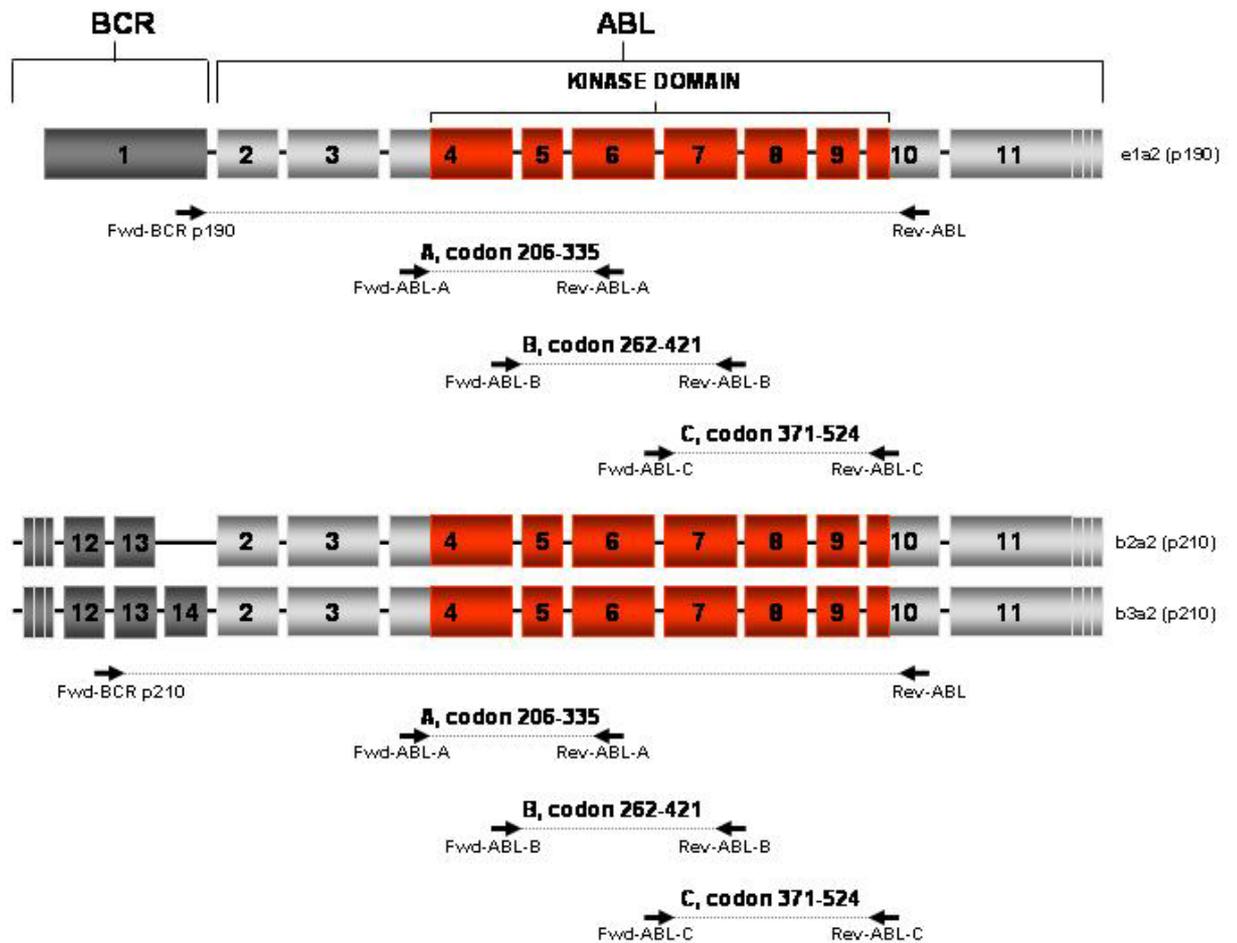


Figura. Rappresentazione schematica del dominio kinasico di ABL e della strategia di amplificazione utilizzata per generare i 3 frammenti da sottoporre ad analisi mutazionale.

3.10 Screening mutazionale tramite D-HPLC

Per lo screening mutazionale dei frammenti precedentemente amplificati è stata impiegata una metodica basata sulla Denaturing High-Performance Liquid Chromatography.

La D-HPLC è una metodica che negli ultimi anni ha incontrato una diffusione sempre maggiore nello screening mutazionale in quanto è rapida, sensibile, completamente automatizzabili e (fatto salvo

l'investimento iniziale per l'acquisizione dello strumento) è caratterizzata da costi operativi ridotti. L'individuazione di mutazioni mediante D-HPLC si basa sulla differente velocità di eluizione degli eteroduplici e degli omoduplici all'interno di una colonna cromatografia apposita. Questi formano quando un amplicone di dna mutato ed uno non mutato vengono denaturati termicamente, e successivamente lasciati rinaturare a temperatura ambiente. Se l'amplicone non contiene mutazioni, in fase di rinaturazione si formeranno soltanto omoduplici, in quanto i due filamenti di DNA che si riassociano sono perfettamente complementari; nel caso in cui siano presenti una o più mutazioni nella sequenza dell'amplicone, oltre agli omoduplici si genererà anche una certa percentuale di eteroduplici dalla combinazione di un filamento wild-type e uno mutato. La D-HPLC è in grado di separare gli omoduplici, che ad una determinata temperatura sono ancora sotto forma di doppia elica, dagli eteroduplici, che alla stessa temperatura mostrano una parziale denaturazione in corrispondenza del punto di mancato appaiamento (mismatch): si parla di temperatura di "quasi denaturazione". In caso di eterozigosi, cioè nel caso in cui un cromosoma porti la mutazione e l'altro sia normale, si formeranno sia omoduplici che eteroduplici; in caso di omozigosi, in cui la stessa mutazione puntiforme è presente su entrambi i cromosomi, non c'è formazione di eteroduplici; per ovviare a questo inconveniente si procede sempre analizzando un'aliquota di campione tal quale e un'aliquota di campione miscelata ad un'eguale aliquota di un campione wild-type che fornisca lo strand normale, permettendo così la rivelazione della mutazione.

Il D-HPLC impiega il meccanismo di ripartizione di fase inversa ad accoppiamento ionico, che separa ed eluisce le molecole in base alla loro dimensione crescente. L'accoppiamento è ottenuto con l'ausilio di un controione, ossia una molecola con doppia funzionalità (lipofila ed idrofila), in grado di interagire sia con la molecola da analizzare (il nostro amplicone) sia con il supporto cromatografico (fase stazionaria). Nel nostro caso la fase stazionaria è costituita da particelle alchilate non porose di polistirene-divinilbenzene del diametro di 2-3 Micron⁽⁴²⁾, capaci di separare acidi nucleici a doppio filamento. L'accoppiamento ionico si ottiene tramite il Trietil ammonio Acetato (TEAA), la cui funzionalità polare interagisce con il DNA, mentre quella apolare interagisce con la fase stazionaria. La ritenzione del DNA nella colonna è dovuta alle interazioni elettrostatiche tra il potenziale di superficie positivo dato dagli ioni Trietil ammonio a contatto con la fase stazionaria e la carica negativa dello scheletro zucchero-fosfato del Dna. Al contrario della cromatografia a scambio ionico, l'eluizione del DNA, nella cromatografia ad accoppiamento ionico in fase inversa non avviene aumentando la carica ionica, ma aumentando la concentrazione del solvente organico (nel nostro caso acetonitrile) nella fase mobile.

L'analisi mutazionale tramite D-HPLC sfrutta il fatto che il DNA a doppia elica contenente un mismatch viene trattenuto meno sul supporto cromatografico rispetto al DNA omoduplex perfettamente appaiato. Come risultato cromatografico si hanno due tipi di situazioni: il campione senza mutazioni avrà nel tracciato elaborato dal software un solo picco; la presenza di mutazioni si evidenzia invece sotto forma di uno o più picchi addizionali.

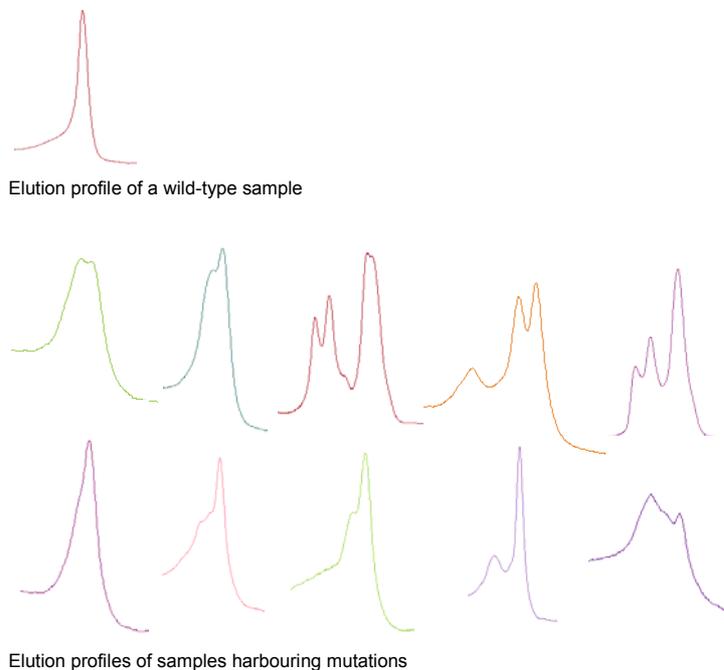
Per lo screening mutazionale mediante D-HPLC è stato impiegato un protocollo precedentemente messo a punto e validato che, in sintesi, prevedeva i seguenti passaggi e le seguenti condizioni analitiche:

1. per ciascun prodotto di amplificazione sono state preparate 2 aliquote di 30 μ l di ciascuna, la prima corrispondente al campione tal quale, la seconda corrispondente allo stesso campione mescolato ad un'eguale quantità di campione wild-type;
2. le aliquote sono state quindi denaturate per 10 minuti a 96° e poi fatte rinaturare per 10 minuti a temperatura ambiente per permettere l'eventuale formazione di eteroduplici;

ciascuna aliquota è stata poi analizzata in triplicato alle condizioni indicate in tabella (l'eluizione a 3 diverse temperatura si rende necessaria poiché soltanto l'analisi di melting dei frammenti di lunghezza compresa tra 300 3 500 bp solitamente individua più sub-frammenti che, sulla base della composizione in GC, sono caratterizzati da una ben precisa temperatura di melting; ripetendo l'eluizione a ciascuna di queste temperature si ha quindi la certezza di individuare con la massima sensibilità una mutazione puntiforme qualunque sia la sua posizione nel frammento in analisi). Il Dna è stato eluito dalla colonna, alle tre temperature scelte, da un gradiente lineare di acetonitrile in 0.1 mmol/L di buffer TEAA (Transgenomic) ad un flusso costante di 1.5 ml/min; il gradiente è stato realizzato miscelando buffer A (0.1 mmol/L di TEAA) e buffer B (0.1 mmol/L di TEAA contenente 250 ml/L di acetonitrile). Alla fine la rivelazione dell'eluito è stata effettuata con un rivelatore UV impostato ad una lunghezza d'onda di 260nm.

Frammenti	I°Temperatura	II°Temperatura	III°Temperatura
Abl-A	61.3°C	62.3°C	63.1°C
Abl-B	60.3°C	61.1°C	61.9°C
Abl-C	60.2°C	60.9°C	61.2°C

La determinazione della presenza/assenza di mutazioni (o polimorfismi) si ottiene sovrapponendo il tracciato elaborato dal software per il nostro campione a quello ottenuto dal campione wild-type e osservando le differenze: profili di eluizione che differiscono dal wild-type indicano la presenza di mutazioni (o polimorfismi). Nel caso si abbiano degli eteroduplici, poiché essi eluiscono prima degli omoduplici, si possono osservare picchi separati o gobbe immediatamente prima dei picchi dell'omoduplice.



3.11 Sequenziamento

la caratterizzazione della mutazione (o delle mutazioni) rilevate dalla D-HPLC è stata condotta mediante sequenziamento diretto.

Un'aliquota dello stesso prodotto di PCR sottoposto ad analisi D-HPLC è stata purificata con l'ausilio del Qiaquick PCR Purification Kit (Quiagen) e sequenziata usando il Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) ed un sequenziatore automatico ABI PRISM 377 DNA Analyser (Applied Biosystem). Il sequenziamento automatico è un'evoluzione del metodo introdotto da F. Sanger nel 1977, oggi chiamato "sequenziamento manuale". Il metodo di Sanger si basa sulla terminazione prematura della sintesi del DNA dovuta all'inclusione di dideossinucleotidi (ddNTPs) che fanno terminare la catena, (i ddNTPs sono molecole artificiali prive di un gruppo ossidrilico sia sul carbonio 2' che 3') in quanto non può formarsi il legame fosfodiesterico con il successivo nucleotide. La sintesi di DNA veniva iniziata con un primer marcato radioattivamente; si eseguivano quattro reazioni separate, ciascuna con un ddNTP (G, A, C o T) oltre alla sua normale base corrispondente. Quando il ddNTP veniva incorporato la sintesi del DNA si arrestava così che ciascuna reazione producesse una serie di prodotti che si estendevano dal primer radioattivo alla base sostituita dal ddNTP. I prodotti delle quattro reazioni erano separati mediante elettroforesi su gel e analizzati mediante autoradiografia. Il sequenziamento automatico prevede l'utilizzo di ddNTPs marcati con 4 differenti fluorocromi ed ha inizio da una PCR che usa un solo primer, in cui lo step di estensione avviene incorporando sia nucleotidi normali che modificati: quando si incorporano quelli modificati la reazione si interrompe. Usando quattro fluorocromi diversi si può fare un'unica lane di corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide poiché i colori vengono rilevati dal laser e letti in una camera apposita con filtri appropriati.

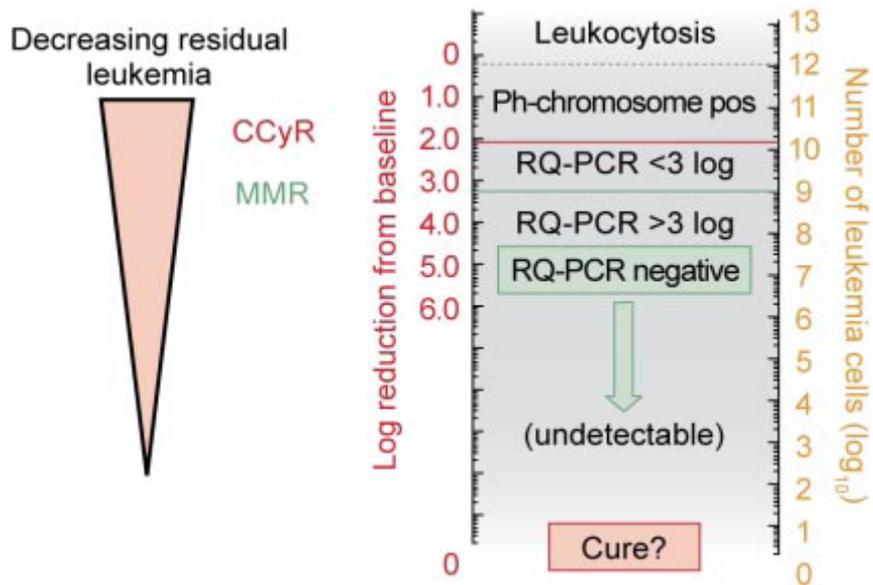
Per ciascun amplicone, entrambi i filamenti di DNA sono stati sottoposti a sequenziamento. La sequenza ottenuta per ciascun campione è stata confrontata con la sequenza wild-type di Abl

(Genbank Accession number=X16416), usando il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

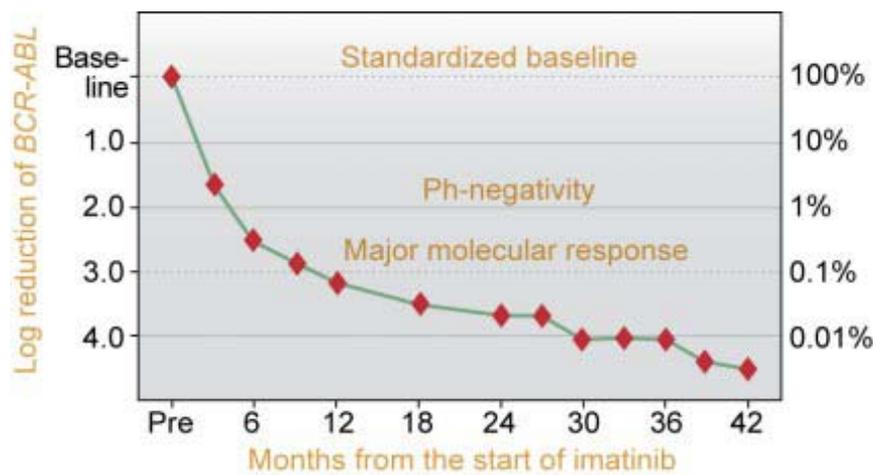
3.11 Definizioni.

La risposta citogenetica dei pazienti, basata sulla valutazione di un minimo di 20 metafasi è stata definita maggiore (MCgR) nel caso in cui venissero osservate più del 65% di metafasi Philadelphia-negative. La risposta ematologia è stata definita completa (CHR) se la conta leucocitaria era al di sotto di $10 \times 10^9/L$, se nessuna cellula immatura si registrava alla conta differenziale, se la conta delle piastrine era al di sotto del valore di $450 \times 10^9/L$ e infine se la milza non era palpabile.

La risposta molecolare (MR) è stata definita come valori di $\text{ratio} \times 100 < 1\%$ mentre la risposta molecolare maggiore (MMR) è stata definita in accordo alle recenti linee guide come rapporto $\text{BCR-ABL/ABL} = 0.1$ sull'IS corrispondente ad una riduzione del trascritto di 3 log come definito dallo studio IRIS. Questo valore corrisponde al nostro valore di $\text{ratio} \times 100 = 0.05$ moltiplicato per un fattore di conversione che è 0.60. La risposta molecolare completa (CMR) è stata definita come valore di $\text{ratio} \times 100 < 0.001$ con Nested-PCR negativa per almeno due volte consecutivamente.



Definizione di RMM e riduzione della MMR



4. RISULTATI

I 30 pazienti affetti da CML, resistenti o intolleranti a Imatinib (tabella n:1), arruolati nei protocolli CAMN107A2101 e CAMN107A2109 sono stati innanzi tutto analizzati per l'eventuale presenza di mutazioni puntiformi a livello del dominio tirosin kinasico di Bcr-Abl (tabella, n:2-3) I pazienti sono stati poi monitorati in corso di trattamento con Nilotinib sia per quanto riguarda la risposta molecolare sia per quanto riguarda l'evoluzione dello status mutazionale di Bcr-Abl.

4.1 Risultati dell'analisi mutazionale effettuata al baseline.

L'analisi mutazionale al baseline ha messo in evidenza la presenza di 20 mutazioni in 15/30 pazienti analizzati (4 dei quali presentavano mutazioni multiple). Nei 19 pazienti in CP è risultato che:

- 11 pazienti erano wt
- 8 pazienti risultavano mutati. Di questi: 3 pazienti presentavano la M244V, 1 paziente presentava la L248V, 1 paziente presentava la Y253H, 1 paziente presentava la E255K, 1 paziente presentava la H396R mentre 1 paziente presentava due mutazioni che sono la Y253H e la H396R.

la stessa analisi eseguita sugli 11 pazienti in FA/CB è emerso che:

- 3 pazienti erano wt
- 8 pazienti risultavano mutati. 3 pazienti presentavano delle mutazioni multiple (F317L-Y253H; Y253H-F359C; M351T- F359C); 1 paziente presentava la M351T, 1 paziente mostrava la T319P (mutazione estremamente rara); 1 paziente presentava la T3151, 1 paziente presentava la E255v e un paziente presentava la L384M.

4.2 Risultati del monitoraggio dei livelli di trascritto in corso di trattamento.

Analizzando la risposta molecolare (figura n.8-9) in accordo allo status mutazionale al baseline abbiamo osservato che:

- Degli 11 pazienti in CP e wt al pre terapia 7 pazienti hanno raggiunto una MR, di questi 6 pazienti hanno raggiunto una MMR, di cui 3 pazienti una CMR;
- Degli 8 pazienti in CP e mutati al pre terapia solo 3 pazienti hanno raggiunto una MR;
- Dei 3 pazienti in fase avanzata e wt al pre terapia, 2 pazienti hanno raggiunto una MR;
- Nessuno degli 8 pazienti in FA/CB e mutati al pre terapia ha raggiunto una MR.

È importante sottolineare il fatto che i pazienti che hanno raggiunto una risposta molecolare, non solo l'hanno mantenuta ma con il tempo la quantità di trascritto ha continuato a diminuire ed è rimasta stabile.

Inoltre abbiamo osservato che l'andamento della malattia minima residua, era dallo status mutazionale al pre terapia e rispecchiava l'IC₅₀ della mutazione presente. Infatti le mutazioni (E244V, H396R) che dagli studi in vitro risultavano avere un'alta sensibilità al trattamento con Nilotinib⁽⁶¹⁾, in vivo hanno determinato una netta riduzione di livelli di trascritto Bcr-Abl.

4.1 Risultati del monitoraggio mutazionale

Come possiamo osservare in tabella, in corso di trattamento con Nilotinib, le mutazioni M244V, M351T, L248V, T319P, H396R e L384M sono scomparse; mentre le mutazioni Y253H, E255K, E255V, T315I, F317L e F359C sono risultate persistenti almeno fino al 12° mese di trattamento.

In 1/11 pazienti che ha iniziato il trattamento in fase avanzata di malattia ed in un 1/19 pazienti trattati in fase cronica sono comparse mutazioni *ex novo* (E255V ed L273M, rispettivamente).

Caratteristiche	
Pazienti, n	30
M/F, n	13/17
Età mediana, anni (range)	55, (22-77)
Durata mediana di malattia, mesi (range)	44, (9-131)
Durata mediana di IM, mesi (range)	34, (3-71)
Resistenti IM, n	15
Intolleranti IM, n	15
CML FC, n	19
CML FA/CB, n	11

Tab.1: Caratteristiche dei pazienti trattati con Nilotinib.

	Pz FC	Best HR	Best CgR	Baseline	+3Mesi	+6Mesi	+9Mesi	+12Mesi
1	AS	CHR	CCgR	M244V	wt	wt	wt	wt
2	AM	CHR	CCgR	wt	wt	wt	wt	wt
3	BM	CHR	CCGR	wt	wt	wt	wt	wt
4	BB	CHR	PCR	E255K	E255K	E255K	E255K	E255K
5	CM	CHR	NV	wt	wt	wt	wt	wt
6	CA	CHR	CCgR	Y253H, H396R	Y253H, H396R	Y253H	Y253H	Y253H
7	FM	CHR	CCgR	wt	wt	wt	wt	wt
8	FI	CHR	CCgR	wt	wt	wt	wt	wt
9	LR	CHR	NONE	wt	wt	wt	wt	wt
10	MMG	CHR	CCgR	wt	wt	wt	wt	wt
11	NF	CHR	CCgR	wt	wt	wt	wt	wt
12	PA	CHR	CCgR	wt	wt	wt	wt	wt
13	SE	CHR	CCgR	wt	wt	wt	wt	wt
14	SG	PHR	PCR	wt	wt	L273M	L273M	L273M
15	TA	CHR	NV	M244V	wt	wt	wt	wt
16	LO	CHR	NV	L248V	wt	wt	wt	M351V
17	RL	CHR	NONE	M244V	wt	wt	wt	wt
18	BL	NV	NV	Y253H	Y253H	Y253H	Y253H	Y253H
19	ZE	CNR	CCgR	H396R	H396R	H396R	H396R	wt

Tab.2: Analisi longitudinale dei pazienti in fase cronica prima e durante il trattamento con Nilotinib. In grassetto i pazienti che hanno raggiunto una risposta molecolare MR.

	Pz FA/CB	Best HR	Best CgR	Baseline	+3Mesi	+6Mesi	+9Mesi	+12Mesi
1	CG	CHR	NV	F317L;Y253H	F317L;Y253H	NA	NA	NA
2	CM	NONE	NV	Y253H;F359C	Y253H;F359C	NA	NA	NA
3	MB	NONE	NV	wt	wt	wt	wt	Wt
4	PO	CHR	CCGR	wt	wt	wt	wt	Wt
5	SG	CHR	MINOR	M351T	M351T	M351T	M351T	M351T
6	BM	CHR	NONE	T319P	T319P	wt	Wt	Wt
7	FA	PHR	NV	M351T,F359C	F359C	F359C	F359C	F359C
8	CL	NONE	NV	T315I	T315I	T315I	T315I	T315I
9	FP	NONE	NV	E255V	E255V	NA	NA	NA
10	VG	CHR	CCGR	wt	NA	NA	NA	wt
11	SN	PHR	NONE	L384M	E255V	E255V	E255V	E255V

Tab.3: Analisi longitudinale dei pazienti in fase avanzata prima e durante il trattamento con Nilotinib. In grassetto i pazienti che hanno raggiunto una MR.

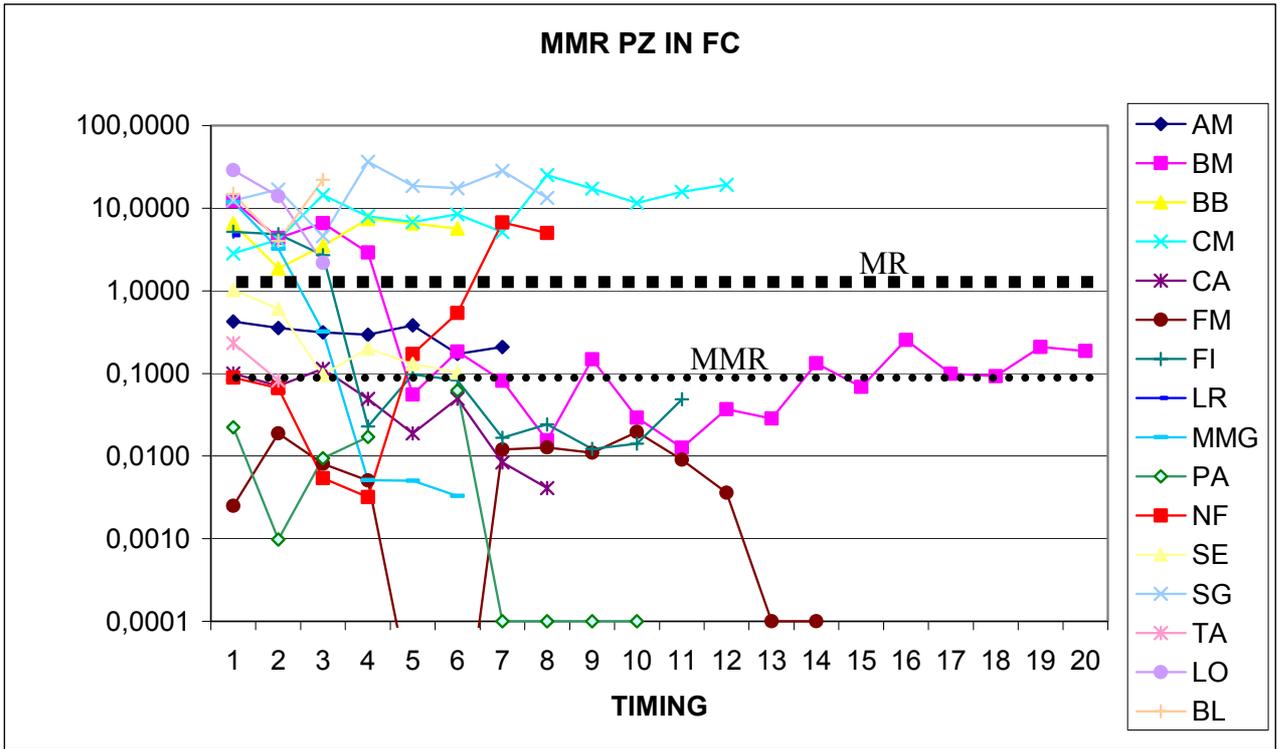


Fig. 9: Andamento della malattia minima residua dei pazienti in FC trattati con Nilotinib

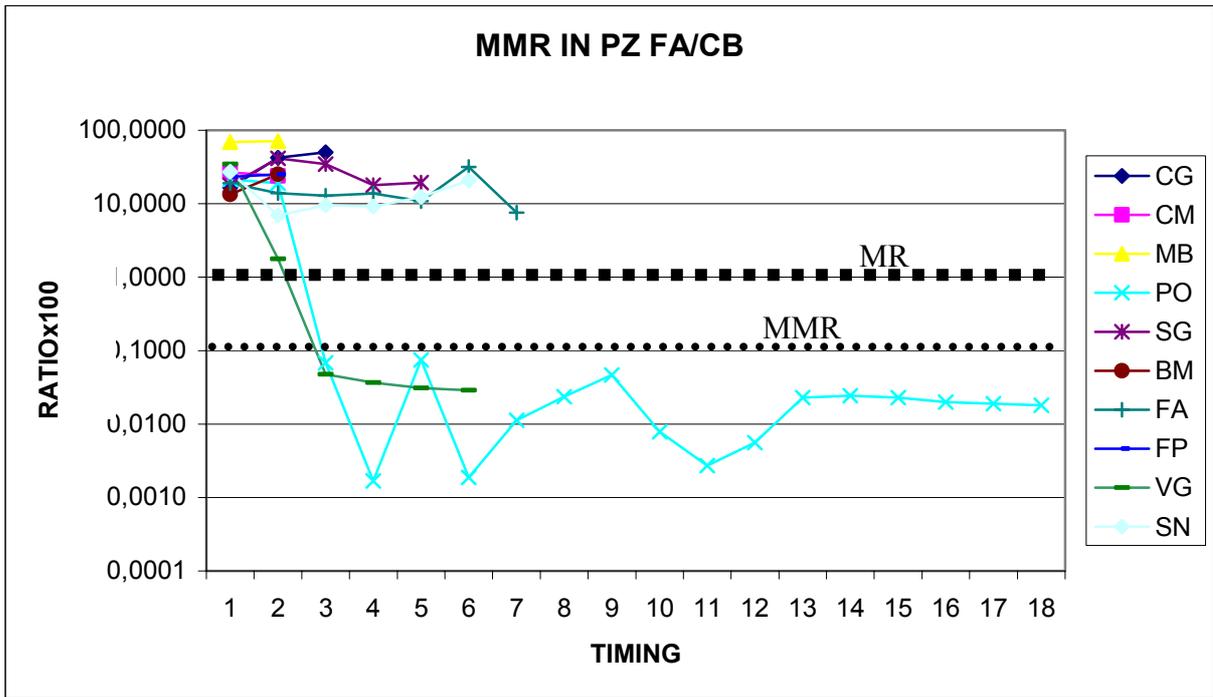


Fig. 10: Andamento della malattia minima residua dei pazienti in FA/CB trattati con Nilotinib

5. DISCUSSIONE

Nonostante i risultati eccellenti che si sono ottenuti con imatinib, una percentuale di pazienti non risponde oppure ricade in corso di trattamento. Il principale meccanismo responsabile della resistenza nelle cellule leucemiche è ormai noto per essere rappresentato dall'insorgenza di mutazioni puntiformi nel dominio kinasico di Bcr-Abl. Tali mutazioni impediscono il legame di imatinib alla proteina, in alcuni casi modificando residui aminoacidici critici per tale legame, oppure, più spesso, determinando una transizione conformazionale dalla forma inattiva alla forma attiva della kinasi, che imatinib non è più in grado di legare. Per ovviare a questa problematica sono stati sintetizzati inibitori di seconda generazione. Tra questi vi è il nilotinib, per il quale si è appena conclusa la fase II di sperimentazione clinica con l'approvazione, da parte di FDA ed EMEA, come trattamento di seconda linea per pazienti affetti da LMC resistenti o intolleranti ad imatinib.

La fase II di sperimentazione, attraverso i protocolli CAMN107A2101 e CAMN107A2109 (expanded access) ha coinvolto 40 centri in 12 paesi del mondo. Il nostro Istituto ha partecipato attivamente a questa sperimentazione, arruolando 45 pazienti resistenti o intolleranti al precedente trattamento con imatinib. Questi pazienti sono stati monitorati in corso di trattamento con nilotinib sia attraverso real-time RT-PCR, che ci ha permesso di valutare l'efficacia di nilotinib in termini di riduzione della malattia minima residua, sia attraverso uno screening mutazionale periodico, che ci ha permesso di valutare l'efficacia in vivo di nilotinib contro diverse forme mutanti di Bcr-Abl.

L'analisi mutazionale dei 30 pazienti effettuata prima dell'inizio del trattamento con nilotinib ha evidenziato come 8/19 pazienti in FC (42%) e 8/11 pazienti in FA (73%), rispettivamente, presentavano una o più mutazioni puntiformi a livello del dominio tirosin-chinasico di Bcr-Abl. E' noto, infatti, che i pazienti in FA resistenti a imatinib hanno un'incidenza maggiore di mutazioni rispetto ai pazienti in FC, riflesso di una maggiore instabilità genetica nelle fasi avanzate di LMC.

L'andamento della risposta molecolare è stato quindi correlato allo status mutazionale al momento dell'inizio del trattamento con nilotinib, al fine di verificare l'efficacia in vivo di questo inibitore sia in presenza di mutazioni, sia in presenza di altri meccanismi di resistenza a imatinib. Tra i pazienti in FC, ben 6 su 11 pazienti con Bcr-Abl wild-type hanno raggiunto una risposta molecolare maggiore. Due di questi pazienti hanno mostrato addirittura una risposta molecolare completa. Questo dato è senz'altro notevole e dimostra che nilotinib, in virtù della sua maggiore potenza e specificità, è effettivamente efficace laddove imatinib fallisce, e rappresenta quindi una valida strategia terapeutica di seconda linea. Per quanto riguarda gli 8 pazienti in fase cronica che avevano mutazioni di Bcr-ABL, 3 hanno raggiunto una risposta molecolare, anche se la riduzione dei livelli di trascritto Bcr-Abl non è mai stata tale da poter parlare di risposta molecolare maggiore. Questo non significa necessariamente che nilotinib sia scarsamente efficace in caso di mutazioni a livello di Bcr-Abl, perché è importante comunque valutare il tipo di mutazione che era presente in questi pazienti. 4/5 pazienti che non hanno raggiunto una risposta molecolare maggiore avevano infatti mutazioni a livello del P-loop, che dagli studi in vitro già erano state predette come essere solo moderatamente sensibili a nilotinib. Questi pazienti,

che non avevano risposto oppure erano ricaduti in corso di trattamento con imatinib, hanno comunque ottenuto o riacquisito, grazie alla terapia con nilotinib, una risposta ematologica e citogenetica.

Per quanto riguarda i casi in FA, due dei tre pazienti wild-type hanno raggiunto una risposta molecolare (mantenuta all'ultima valutazione di follow-up a 18 mesi), e anche se la riduzione dei livelli di trascritto Bcr-Abl non è stata così marcata come nei pazienti in FC, si tratta coque di un risultato importante in una categoria di pazienti talmente "critica". Nessuno dei pazienti mutati ha raggiunto una risposta molecolare, nonostante una risposta ematologiche e citogenetiche siano state comunque osservate in 7 e 1 casi, rispettivamente). Anche in questo caso è importante considerare che molte delle forme mutanti presenti al momento dell'inizio del trattamento con nilotinib (e più precisamente, la F359C, la E255V, la F317L) hanno un IC50 tale da giustificare la loro minore sensibilità a nilotinib rispetto a Bcr-Abl wild-type. Un altro paziente che non ha raggiunto la risposta molecolare (in questo caso non si è avuta neppure una risposta ematologica) era positivo per la mutazione T315I, nota per essere insensibile a nilotinib (così come alla maggior parte degli inibitori di seconda generazione).

L'analisi mutazionale è stata condotta parallelamente al monitoraggio della risposta molecolare in tutti e 30 i pazienti e ci ha permesso di valutare quali forme mutanti possano essere eliminate dal trattamento con nilotinib, quali tendano a persistere, e quali tendano ad essere selezionate da nilotinib stesso. Si è osservato come diverse mutazioni (e più precisamente, M244V, M351T, L248V, T319P, H396R e L384M) scompaiano in corso di trattamento con nilotinib. Questo è in linea con i dati ottenuti in vitro, che mostrano come tutti questi mutanti abbiano un IC50 in linea con quello di Bcr-Abl wild-type (24

nM). Altre mutazioni (Y253H, E255K, E255V, T315I, F317L e F359C) persistono. In alcuni casi (Y253H) questo non compromette il raggiungimento della risposta ematologica e citogenetica da parte del paziente, ed è anche ipotizzabile che l'eliminazione del clone mutato richieda tempi più lunghi rispetto a quello che è il follow-up attuale di questi pazienti. La persistenza della mutazione T315I non sorprende, sulla base dei risultati che si erano ottenuti in vitro ($IC_{50} > 10000$ nM), così come non sorprende il fatto che il paziente positivo per questa mutazione sia uscito prematuramente dal protocollo per mancata risposta. L'osservazione più interessante riguarda comunque le mutazioni non pre-esistenti emerse in corso di trattamento con nilotinib e quindi selezionate da nilotinib stesso, in quanto esse ci danno una stima di quanti e quali mutanti si mantengano problematici (oltre alla T315I) anche per questo inibitore di seconda generazione. Rispetto all'ampio spettro di mutazioni che vengono selezionate dal trattamento con imatinib, solo due sono i mutanti emersi in corso di trattamento con, nilotinib nella nostra casistica di pazienti. La prima è la mutazione E255V, che effettivamente si associa ad un valore di IC_{50} di 790 nM (33 volte superiore a quello di Bcr-Abl wild-type). La seconda (L273M) è particolarmente interessante in quanto si tratta di una mutazione mai descritta in pazienti resistenti a imatinib. Di questa mutazione non si conosce l' IC_{50} . Tuttavia, una sostituzione aminoacidica diversa a livello del residuo 273 (L273F) è stata identificata di recente nell'ambito di uno studio in vitro volto proprio ad identificare forme mutanti di Bcr-Abl potenzialmente associate a resistenza a nilotinib. Questo studio prevedeva una strategia di mutagenesi "random" delle sequenze di Bcr-Abl, seguita da transfezione in linee cellulari, esposizione delle linee cellulari mutanti così ottenute all'inibitore, e successivo recupero e caratterizzazione

dei cloni cellulari che sopravvivevano a tale esposizione. E' plausibile che anche la mutazione L273M, così come la L273F osservata insieme ad altre in questo studio, possa conferire resistenza a nilotinib, anche se sarà necessario aspettare i risultati ottenuti in casistiche di gran lunga più ampie di pazienti per poter verificare questa ipotesi. E' interessante, e al tempo stesso incoraggiante, notare come il trattamento con nilotinib, almeno nella nostra esperienza, non favorisca selezione di mutanti T315I e quindi l'accumulo di pazienti che ricadono sviluppando questa mutazione. Questi pazienti sarebbero infatti di gestione estremamente problematica dal momento che non esistono tuttora strategie terapeutiche efficaci in presenza di questa mutazione, e nonostante due inibitori delle aurora chinasi (MK0457 e PHA739358) siano attualmente in fase I di sperimentazione presso il nostro centro e pochi altri in Italia e al mondo, la loro efficacia non è ancora nota.

Ci siamo infine focalizzati su quei pazienti (n=15) che sono progrediti in corso di trattamento con nilotinib (con "progressione" intesa come perdita di risposta ematologia, citogenetica, molecolare o la progressione a fase accelerata e blastica). Di questi:

- 9 pz presentavano la stessa mutazione al baseline
- 2 pz hanno evidenziato la comparsa di nuove mutazioni non presenti al baseline
- 4 pz risultavano wt al baseline ed alla progressione

Questo suggerisce che la presenza o l'insorgenza di una mutazione insensibile a nilotinib non siano gli unici meccanismi di resistenza possibili. Come nel caso di imatinib, quindi, le mutazioni puntiformi del dominio tirosin-chinasico di Bcr-Abl sarebbero solamente uno dei possibili modi attraverso cui Bcr-Abl può evadere dall'inibizione. Purtroppo però, poco si sa di questi meccanismi mutazione-

indipendenti (e forse Bcr-Abl indipendenti). Se nel caso di imatinib sono stati ipotizzati, o almeno osservati in linee cellulari, fenomeni come l'attivazione costitutiva di molecole a valle di Bcr-Abl oppure alterazioni nei livelli di molecole responsabili del trasporto di imatinib dentro e fuori le cellule (hOCT1 e ABCB1, rispettivamente), ancora nulla si sa del loro contributo nel caso della resistenza a nilotinib.

In conclusione, la nostra esperienza con nilotinib in pazienti resistenti o intolleranti a imatinib ha dimostrato come nilotinib sia efficace sia in caso di Bcr-Abl che in caso di alcune specifiche mutazioni. In diversi casi in FC, nilotinib si è dimostrato in grado di ottenere o ripristinare, in pazienti che avevano fallito il trattamento con imatinib, non solo risposte ematologiche e citogenetiche, ma anche risposte molecolari, con cinetiche di riduzione del trascritto di Bcr-Abl di 2-3 o addirittura 4 (nested?) logaritmi, al pari di quelle che si ottengono in pazienti di nuova diagnosi in FC. Risposte molecolari sono state ottenute anche in 2 casi in FA, il che è senza dubbio ragguardevole considerato il fatto che entrambi questi pazienti avevano una lunga storia di malattia alle spalle, avevano fallito più linee di terapia e non avevano nessuna opzione trapiantologica.

Attualmente il nostro Istituto sta coordinando un protocollo clinico di fase II (il primo al mondo per numero di pazienti arruolati) che prevede l'utilizzo di nilotinib in prima linea in pazienti in FC di nuova diagnosi. Il monitoraggio molecolare di questi pazienti è in corso, e nonostante il follow-up mediano sia ancora troppo breve per presentare risultati e trarre conclusioni, i dati preliminari suggeriscono che la percentuale di risposte molecolari maggiori e complete in questi pazienti siano significativamente superiori a quelle che si ottengono con imatinib.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Mercedes E. Gorre, Mansoor Mohammed, Katharine Ellwood et al. Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy caused by Bcr-Abl Gene Mutation or Amplification. *Science*. 2001; Vol 293.
2. D.M. Talpaz. STI-571 in chronic myelogenous leukaemia. *British Journal of Hematology*. 2002; 119: 15-24.
3. A. Hochhaus, S Kreil, AS Corbin et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI-571) therapy. *Leukemia*. 2002; 16: 2190-2196.
4. David G. Savage, M.D., and Karen H. Antman, M. D. Imatinib Mesylate-A New Oral Targeted Therapy. *N Eng J Med*. 2002; Vol 346.
5. Amie S. Corbin, Elisabeth Buchdungers, Furet Pascal et al. Analysis of the Structural Basis of Specificity of Inhibition of the Abl Kinase by STI571. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; Vol 277, No.35.
6. Sarah Markt, David Marin, Nicola Foot et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Haematologica/journal of hematology*. 2003; Vol.88.
7. Andreas Hochhaus. Cytogenetic and Molecular Mechanism of Resistance to Imatinib. 2003. *Seminars in Hematology*; Vol.40, No 2, Suppl 2: 69-79.
8. Robert Roskosky Jr. STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 709-717.
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: 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.
- 11: Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase. *Seminars in Immunology*. 1995 ; 7 : 255-266.
12. Abelson HT, Rabstein LS.Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Research*. 1970; 30: 2213-2222.
13. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP et al. Fused Trascript of Abl and Bcr genes in CML. *Nature*. 1995; 315: 550-554.
14. 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.
15. Mehran S.Neshat, Arthur B.Raitano, Hong-Gang Wang et al. The Survival Function of the Bcr-Abl Oncogene Is Mediated by Bad-Dependent and –Independent Pathways: Roles for PI3 Kinase and Raf. *Molecular and Cellular Biology*. 2000; 1179-1186.
16. Pierre Laneuville. Abl tyrosine protein kinase. *Seminars in Immunology*. 1995; Vol.7: 255-266.
17. Pellicci G,Lanfrancone L, Salcini AE et al. Constitutive phoshorilation of SHC proteins in humans tumors. *Oncogene*. 1995; 11: 899-907.
18. McGahon AJ, Nishioka WK, Martin SJ et al. Regulation of the Fas apoptotic cell death pathway by Abl. *J Biol Chem*. 1995; 270: 22625-22631.
19. Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A. Signaling pathways: jack of all cascades. *Curr Biol*. 1996; 6: 16-19.
20. Brian J.Druker, Charles L.Sawyers, Renaud Capdeville et al. Chronic Myelogenous Leukemia. 2001. *Hematology*.
21. Horowitz M.M., Rowlings P.A et Passweg J.R. Allogenic bone marrow trasplantation for CML. *Bone Marrow Transplantation*. 1996; 17: S5.

22. Brian J.Druker, Stephen G.O'Brien, Jorge Cortes et al. Chronic Myelogenous Leukemia. 2002. Hematology.
23. P. le Coutre, L. Mologni, L. Cleris et al.1999. J Nat Cancer Inst; 91: 163-8.
24. Carlo B.Gambacorti-Passerini, Rosalind H Gunby, Rocco Piazza et al. Molecular Mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. 2003. The Lancet Oncology. Vol 4.
25. Nagar B., Bornmann W.G., Pellicena P. et al.Crystal Structures of Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib. 2002. Cancer Research; 62: 4236-43.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. J. V. Melo, T. P. Hughes, and J.F. Apperley. Chronic Myeloid Leukemia. American Society of Hematology. 2003.
30. Druker B.J., Talpaz M., Resta D.J. et al. N Eng J Med. 2001; 344: 1031-7.
31. Kantarjian H.M., Talpaz M., O'Brien S, et al.Blood. 2003; 101: 473-5.
32. le Coutre P., Tassi E., Varella-Garcia M, et al.Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through amplification. Blood. 2000; 95: 1758-1766.

33. Weisberg E. and Griffin J. D. Mechanisms of resistance to the Abl tyrosine kinase inhibitor STI571 in Bcr/Abl-transformed hematopoietic cell lines. *Blood*. 2000; 95: 3498-3505.
34. Mahon F.X., Deininger M.W., Schultheis B, et al. Selection and characterization of Bcr-Abl positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 2000; 96: 1070-1079.
35. Donato N., Wu J., Gallick G., et al. A dominant role for LYN Kinase in K562 cells selected for resistance to STI571. *ASH*. 2001; 3487(Abstract).
36. Vigneri P, Wang JY. Induction of apoptosis in chronic leukemia cells through nuclear entrapment of Bcr-Abl tyrosin kinase. *Nature Med*. 2001; 7: 228-234.
37. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple Bcr-Abl kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor Imatinib in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002; 2: 117-125.
38. [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
39. [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.
40. Gabert j, beillard e, van der velden vh, et al. standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17:2318-57.
41. [Van Dongen JJ](#), [Macintyre EA](#), [Gabert JA](#), [Delabesse E](#), [Rossi V](#), [Saglio G](#), [Gottardi E](#), [Rambaldi A](#), [Dotti G](#), [Griesinger F](#), [Parreira A](#), [Gameiro P](#), [Díaz MG](#), [Malec M](#), [Langerak AW](#), [San Miguel JF](#), [Biondi A](#). Standardized rt-pcr analysis of fusion gene transcripts from

chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease *Leukemia* 1999; vol.13:1901-1928

42. Huber CG, Oefner PJ, Bonn GK et al. High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on highly crosslinked polystyrene-divinylbenzene particles. *Anal Biochem.* 1993; 212: 351-358.

43. [Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG.](#) Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med.* 2006 Jun 15;354(24):2542-51.

44. Capdeville R, Silberman S. Imatinib: a targeted clinical drug development. *Semin Hematol* 40: 15-20.

45. A. Hochhaus and P. La Rosee. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia.* 2004; 18: 1321-1331.

46. O'Hare T, et al. *Cancer Res* 2005; 65(11).

47. A. Ray et al. Identification of BCR-ABL point mutations conferring resistance to the Abl kinase inhibitor AMN107 (nilotinib) by a random mutagenesis study. *BLOOD*, 1 JUNE 2007, VOLUME 109, NUMBER 11

48. [Giles FJ, Cortes J, Jones D, Bergstrom D, Kantarjian H, Freedman SJ.](#) MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Cancer Res.* 2006 Jan 15;66(2):2007

49. [Young MA, Shah NP, Chao LH, Seeliger M, Milanov ZV, Biggs WH 3rd, Treiber DK, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ, Sawyers CL, Kuriyan J.](#) Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680 *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):500-2

50. [Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, Benten D, Bokemeyer C, Fiedler W, Moll J, Brummendorf TH.](#) Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against Imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood*. 2008
51. [Carpinelli P, Ceruti R, Giorgini ML, Cappella P, Gianellini L, Croci V, Degrassi A, Texido G, Rocchetti M, Vianello P, Rusconi L, Storici P, Zugnoni P, Arrigoni C, Soncini C, Alli C, Patton V, Marsiglio A, Ballinari D, Pesenti E, Fancelli D, Moll J.](#) PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer. *Mol Cancer Ther*. 2007 Dec;6(12 Pt 1):3158-68.
52. [Modugno M, Casale E, Soncini C, Rosettani P, Colombo R, Lupi R, Rusconi L, Fancelli D, Carpinelli P, Cameron AD, Isacchi A, Moll J.](#) Crystal structure of the T315I Abl mutant in complex with the aurora kinases inhibitor PHA-739358. *Cancer Res*. 2007 Sep
53. [Steinberg M.](#) Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Ther*. 2007 Nov;29(11):2289-308. Review.
54. [Copland M, Pellicano F, Richmond L, Allan EK, Hamilton A, Lee FY, Weinmann R, Holyoake TL.](#) BMS-214662 potently induces apoptosis of chronic myeloid leukemia stem and progenitor cells and synergizes with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2843-53. Epub 2007 Dec 21.
55. [Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J.](#) Targeting ABL and SRC kinases in chronic myeloid leukemia: experience with dasatinib. *Future Oncol*. 2006 Dec;2(6):655-65. Review.
56. [Jallal H, Valentino ML, Chen G, Boschelli F, Ali S, Rabbani SA.](#) A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2007 Feb 15;67(4):1580-8.
57. [Mancini M, Brusa G, Zuffa E, Corrado P, Martinelli G, Grafone T, Barbieri E, Santucci MA.](#) Persistent Cdk2 inactivation drives growth

arrest of BCR-ABL-expressing cells in response to dual inhibitor of SRC and ABL kinases SKI606. *Leuk Res.* 2007 Jul;31(7):979-87. Epub 2006 Nov 28.

58. [Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, Donella-Deana A, Ahmed S, Redaelli S, Piazza R, Magistrini V, Andreoni F, Scapozza L, Formelli F, Gambacorti-Passerini C.](#) In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11314-22. Epub 2006 Nov 17.

59. [Pan J, Quintás-Cardama A, Manshouri T, Cortes J, Kantarjian H, Verstovsek S.](#) Sensitivity of human cells bearing oncogenic mutant kit isoforms to the novel tyrosine kinase inhibitor INNO-406. *Cancer Sci.* 2007 Aug;98(8):1223-5. Epub 2007 May 22.

60. [Kuroda J, Kimura S, Strasser A, Andreeff M, O'Reilly LA, Ashihara E, Kamitsuji Y, Yokota A, Kawata E, Takeuchi M, Tanaka R, Tabe Y, Taniwaki M, Maekawa T.](#) Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second-generation Bcr-Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia. *Cell Death Differ.* 2007 Sep;14(9):1667-77. Epub 2007 May 18.

61. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4500-5.