

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

Studiul mutațiilor BCR-ABL în leucemia granulocitară cronică prin tehnici de biologie moleculară. Impact asupra tratamentului

Doctorand: **Dr. Delia Monica Dima**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Ljubomir Petrov**

2015



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	4
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII defined.	Error! Bookmark not defined.
1. INTRODUCERE defined.	Error! Bookmark not defined.
2. SCURTISTORIC defined.	Error! Bookmark not defined.
3. INCIDENTĂ not defined.	Error! Bookmark not defined.
4. ETIOLOGIE not defined.	Error! Bookmark not defined.
5. FIZIOPATOLOGIE not defined.	Error! Bookmark not defined.
6. PREZENTARE CLINICĂ ȘI PARACLINICĂ	23
6.1 FAZĂ CRONICĂ	23
6.1.1. Clinic	23
6.1.2. Paraclinic	Error! Bookmark not defined.
6.1.3. Tratamentul Fazei Cronice	24
6.2. FAZA ACCELERATĂ	31
6.2.1. Clinic	31
6.2.2. Paraclinic	31
6.2.3. Tratament	31
6.3. FAZA BLASTICĂ	32
6.3.1. Clinic	32
6.3.2. Paraclinic	32
6.3.3. Tratament	32
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
IPOTEZA DE LUCRU	37
1. STUDIU I – STUDIUL MUTAȚIEI T315I LA PACIENȚII CU LGC FAZĂ CRONICĂ	39
1.1. INTRODUCERE	39

1.2.	OBIECTIVE	40
1.3.	MATERIALE ȘI METODĂ	41
1.4.	REZULTATE	48
1.5.	DISCUȚII	80
1.6.	CONCLUZII	82
2.	STUDIUL MUTAȚIEI T315I LA PACIENȚII CU LGC ÎN PUSEU BLASTIC	85
2.1.	INTRODUCERE	85
2.2.	OBIECTIVE	86
2.3.	MATERIALE ȘI METODĂ	86
2.4.	REZULTATE	88
2.5.	DISCUȚII	94
2.6.	CONCLUZII	95
3.	CONCLUZII GENERALE	97
	REFERINȚE	99
	Anexa 1	111
	Anexa 2	112

Cuvinte cheie: leucemie mieloidă cronică, transcript BCR-ABL, mutație T315I, rezistența, transplant

Introducere

Leucemia granulocitară/ mieloidă cronică (LMC) este o boală clonală a celulei stem pluripotente, caracterizată prin prezența cromozomului Philadelphia (Ph) și/sau a rearanjamentului BCR-ABL. LMC este primul cancer asociat cu o mutație genetică, care apare la nivelul celulei stem hematopoietice pluripotente, mutație necesară și suficientă pentru transformarea celulară. LMC este prima boală malignă hematologică în care s-au obținut rezultate spectaculare cu medicamente cu acțiune țintită moleculară antitirozinkinază (Imatinib mesylate, nilotinib și dasatinib). Introducerea inhibitorilor de tirozinkinază (ITK) în tratamentul LMC a redus dramatic mortalitatea și a crescut durata bolii. Din păcate, entuziasmul inițial a fost umbrat de apariția mecanismelor de rezistență, dintre care cele mai frecvente și mai profund studiate sunt mutațiile domeniului ABL. Analiza mutațională a evidențiat peste 100 mutații, cu frecvența în creștere în ultimii ani. Dintre mutațiile cunoscute, mutația T315I conferă rezistență la toți cei 3 inhibitori de tirozinkinază disponibili, iar trialurile clinice în derulare relevă până în acest moment rezistența și la multe alte preparate.

În acest moment, în România, analiza mutațională este posibilă doar într-un singur centru- Spitalul Clinic Fundeni. Decizia terapeutică de administrare și modificare a tratamentului se bazează pe evoluția clinică și hematologică, răspunsul citogenetic și molecular, reacții adverse la medicație și toleranța.

Având în vedere acestea, mi-am propus o analiză prospectivă a cazuisticii Clinicii de Hematologie Cluj-Napoca. Am luat în considerare cazurile diagnosticate cu LMC fază cronică în perioada 1986-2010, respectiv LMC-puseu blastic, în perioada 2008-2010. Am căutat identificarea mutației T315I în momentul intrării în studiu și pe parcursul evoluției, căutând corelații ale prezenței acestei mutații cu particularități clinico-biologice la acești pacienți: faza bolii, răspunsul la tratament, evoluție, supraviețuire. Pentru moment singurul tratament eficient în prezența mutației T315I este allotransplantul medular, care este posibil în țara noastră prin programe naționale de transplant medular. În acest sens, am urmărit indicația de allotransplant medular la pacienții cu mutație T315I și evoluția acestora.

Stadiul actual al cunoașterii

LMC este cea mai net conturată și mai individualizată afecțiune în cadrul sindromului mieloproliferativ cronic, prin prezența unei diferențieri și maturării cvasinormale, o proliferare de celule mature/ aparent mature și a cromozomului Philadelphia ca marker biologic.

În LMC o singură anomalie genetică care apare la nivelul celulei stem hematopoietice pluripotente este necesară și suficientă pentru transformarea celulară. În urma translocației reciproce 9, 22 se generează o oncogenă de fuziune, BCR-ABL, care la rândul ei codează o proteină cu acțiune tirozinkinazică.

LMC se caracterizează prin leucocitoză cu deviere la stânga a formulei leucocitare, bazofilie, anemie, frecvent trombocitoză și splenomegalie. Cromozomul Ph, implicat în patogeneza bolii, este prezent la 95% pacienți.

Evoluția naturală a bolii cuprinde 2 sau 3 faze clinice distincte: o fază cronică, de durată, caracterizată prin proliferare marcată hematopoietică dar cu diferențiere încă păstrată, cu trecere în timp spre faza accelerată, urmată de faza blastică în care diferențierea hematopoietică este oprită și blastii imaturi se acumulează în măduva osoasă și sângele periferic.

LMC este prima boală malignă hematologică care a beneficiat de un program național de medicamente, cu acțiune țintită moleculară.

În lumina ultimelor descoperiri, șansa de supraviețuire a acestor bolnavi a crescut semnificativ, chiar se discută despre vindecare și ultimele cercetări sunt axate pe acest target.

Prin progresele din ultimii ani, avem la dispoziție un panel larg de unelte clinice și de laborator pentru stabilirea corectă și completă a diagnosticului, pentru stabilirea prognosticului și a șansei de răspuns la tratament.

De asemenea, avem la dispoziție medicamente de ultimă generație/ molecule cu acțiune țintită care acționează inteligent. Introducerea Imatinib a modificat semnificativ supraviețuirea pacienților cu LMC fază cronică. Rata de răspunsuri și supraviețuire la pacienții cu LMC s-a modificat dramatic sub tratament cu Imatinib și alți inhibitori de tirozinkinază, la ora actuală speranța de viață a pacienților cu LMC fază cronică se apropie de normal.

Dar, studiile multicentrice, multinaționale au arătat că aproximativ 37% din pacienți care urmează tratament cu Imatinib în prima linie vor dezvolta rezistență. Este imperativă identificarea timpurie a acelor pacienți care nu răspund optim la tratament, fapt care are impact asupra evoluției pacientului, progresiei bolii și în final, supraviețuirii. Identificarea timpurie a acestor pacienți permite modificarea strategiei terapeutice.

Cel mai important mecanism de rezistență la tratament sunt mutațiile domeniului ABL. Evoluția/ progresia bolii se asociază cu apariția de mutații. În ceea ce privește tipul de tratament, studiile au arătat că tratamentul cu IM este asociat cu un risc de 30-50% de apariție a mutațiilor, iar Nilotinib și Dasatinib sunt asociate cu riscuri de 39%, respectiv 27%.

Mutația T315I reprezintă aproximativ 11-20% din mutațiile decelate la pacienții cu rezistența la Imatinib, toate fazele- cronică, accelerată, blastică. Prezența mutației se asociază cu reducerea supraviețuirii și intervalului liber de boală. Până în prezent nu există tratament eficient pentru pacienții cu LMC și mutația T315I, altul decât allotransplantul medular, care este grevat de o morbiditate și o mortalitate importantă legată de procedură.

Forurile internaționale- ELN, NCCN (National Comprehensive Cancer Network) recomandă analiza mutațională de câte ori răspunsul la tratament este suboptimal sau pierdut.

Există un raport favorabil cost/eficiență în identificarea acestor pacienți prin analiza mutațională. Costul analizei mutaționale este doar o mică parte din costul tratamentului și identificarea unor posibil non-responderi permite nu doar evitarea administrării unei terapii ineficiente și costisitoare, ci și optarea pentru o terapie mai eficientă.

Contributia personala

1. Studiul 1. Studiul mutației T315I la pacienții cu LGC faza cronică

Obiective: stabilirea prezenței mutației T315I la pacienții cu LMC fază cronică; identificarea particularităților clinice, biologice, evolutive și terapeutice ale pacienților cu LMC fază cronică cu/fără mutație T315I; analiza comparativă a pacienților cu mutația pozitivă față de cei cu mutația negativă; cercetarea impactului mutației T315I asupra prognosticului la pacienții cu LMC fază cronică.

Material si metodă: Am efectuat un studiu prospectiv pe un lot de 74 pacienți diagnosticați cu LMC fază cronică și tratați în Clinica Hematologie Cluj-Napoca, în perioada 1986-2010. Diagnosticul de LMC a fost stabilit pe baza criteriilor clinice, hematologice, examenul citologic al maduvei osoase, citogenetice și de biologie moleculară. Analiza mutației T315I s-a efectuat prin ARMS-PCR, din sânge venos periferic. S-au analizat parametrii demografici; clinici: modalitate de debut, prezența sau absența semnelor generale, prezența splenomegaliei și dimensiunea splinei; hematologici; biochimici; EKG. S-au calculat scorurile de prognostic: Sokal, Hasford, Eutos. Analiza mutațională a fost efectuată regulat, la 6 luni sau în momentul unui răspuns suboptimal, pierderii răspunsului sau evoluției bolii. La pacienții la care s-a decelat prezența mutației T315I s-a urmărit indicația de allotransplant medular și evoluția acestora. Urmărirea pacienților s-a efectuat regulat, conform indicațiilor ELN (European LeukemiaNet). A fost urmărită supraviețuirea pacienților de la diagnostic și până la încheierea studiului sau până la deces, fiind studiate cauzele decesului. Pentru analiza statistică s-au folosit programele SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versiunea 20 și programul Medcalc versiunea 12.3; iar pentru analiza multivariată s-au folosit regresia logistică binară și regresia Cox.

Rezultate: În studiu am inclus 44 femei și 30 bărbați, cu vârsta medie $51,5 \pm 14,3$ ani. 3 pacienți au prezentat mutația T315I. Media vârstei pacienților cu mutația T315I prezentă a fost semnificativ statistic mai mică decât cea a subiecților fără această mutație. Numărul mediu de leucocite a fost de $98,8 \cdot 10^3 \pm 81,6 \cdot 10^3$, iar cel de trombocite a fost de $498,4 \cdot 10^3 \pm 343,8 \cdot 10^3$. Pacienții cu mutația T315I prezentă au avut mai multe leucocite și trombocite decât cei cu mutația absentă, diferența nu a fost semnificativă statistic. Valoarea medie a hemoglobinei a fost $11,3 \pm 2,4$ g/dl, mai mică la subiecții cu mutație T315I, dar fără semnificație statistică. Numarul de bazofile, respectiv blaști nu a diferit

semnificativ între subiecții cu și fără mutația T315I. 26 pacienți au prezentat scor Sokal 1, 25 pacienți- scor Sokal 2 și 23 pacienți- scor Sokal 3. Nu au existat diferențe ale scorului Sokal între pacienții cu mutația T315I și cei fără mutație. 55 pacienți au primit Imatinib. Durata tratamentului cu Imatinib a fost în medie $32,2 \pm 24,4$ luni. Toți 3 pacienții la care s-a descoperit prezența mutației T315I au urmat tratament cu Imatinib, nu am determinat o asociere între terapia cu acest medicament și prezența mutației. Dasatinib a fost administrat la 11 pacienți. Durata terapiei cu Dasatinib a fost în medie $14,1 \pm 15,9$ luni, toți pacienții fiind tratați anterior cu Imatinib. Nilotinib a fost administrat la 18 pacienți. Durata terapiei cu Nilotinib a fost în medie $6,2 \pm 7,8$ luni. Am găsit o asociere între terapia cu Dasatinib, respectiv Nilotinib și prezența mutației T315I. Răspunsul hematologic complet după tratamentul inițial a fost observat la 60 pacienți. Răspunsul citogenetic complet a fost raportat la 26 pacienți. Răspunsul molecular complet a fost raportat la 3 pacienți. Răspunsurile hematologic, citogenetic, molecular nu au fost asociate cu prezența mutației T315I. 4 pacienți au prezentat modificări cromozomiale adiționale. Tratamentul cu Imatinib a fost modificat cu Dasatinib la 11 pacienți pentru eșec terapeutic sau intoleranță. Tratamentul cu Imatinib a fost modificat cu Nilotinib la 9 pacienți pentru eșec terapeutic și intoleranță. Răspunsul hematologic complet după tratamentul de linia a 2-a a fost notat la 14 pacienți, răspunsul citogenetic complet la 6 pacienți, răspunsul molecular complet la 4 pacienți. S-a observat evoluție spre fază blastică la 8 pacienți, dintre care 1 pacient cu mutație T315I și fază accelerată, la 4 pacienți, dintre care 1 pacient cu mutație T315I.

Concluzii:

Urmărirea pacienților a fost efectuată la standarde europene, conform indicațiilor European LeukemiaNet. Tehnica ARMS-PCR este o metodă sensibilă, utilă, ușor de utilizat pentru urmărirea mutației T315I. Mutația T315 I a fost decelată la un procent mic din pacienții studiați (4,05%), care se corelează cu datele din literatură. Prezența mutației T315I s-a corelat cu evoluția bolii la 2 din cei 3 pacienți cu mutație pozitivă. Mutația T315I s-a corelat cu factori de prognostic negativi: dublarea cromozomului Ph și vârsta tânără de debut a bolii (33 ani). Mutația T315I s-a corelat cu tratamentul în mai multe linii de inhibitori de tirozinkinaza. Supraviețuirea bolnavilor după decelarea mutației T315I este de scurtă durată. Rata de răspuns hematologic complet la prima și a doua linie de tratament ITK a fost foarte bună și este similară datelor existente în literatură (90,9%, respectiv 82,4%). Rata de răspuns citogenetic complet la prima linie de tratament a fost nesatisfăcătoare, ceea ce impune analiza aprofundată a multiplelor mecanisme de rezistență, altele decât mutația T315I. Supraviețuirea pacienților studiați s-a corelat cu scorul Sokal, cu scorul Hasford și respectiv parametrii cuprinși de aceștia. Lipsa de răspuns hematologic la prima linie de tratament cu ITK a crescut riscul de deces la pacienții studiați. Tratamentul cu Imatinib a scăzut riscul de deces la lotul de pacienți studiați. Supraviețuirea pacienților studiați este satisfăcătoare: 91,89 pacienți.

2. Studiul 2: Studiul mutației T315I la pacienții cu LGC puseu blastic

Obiective: stabilirea prezenței mutației T315I la pacienții cu LMC fază blastică; identificarea particularităților clinice, biologice, evolutive și terapeutice ale pacienților cu LMC fază blastică cu și fără mutație T315I; analiza comparativă a pacienților cu LGC fază cronică și LMC fază blastică; cercetarea impactului mutației T315I asupra prognosticului la pacienții cu LMC fază blastică.

Material și metoda: Am efectuat un studiu prospectiv pe un lot de 12 pacienți diagnosticați cu LMC fază blastică și tratați în Clinica Hematologie Cluj-Napoca, în perioada 2008-2010. La acești pacienți s-a efectuat analiza mutației T315I la intrarea în studiu. Diagnosticul de LMC fază blastică a fost stabilit pe baza criteriilor clinice, hematologice, examenul citologic al măduvei osoase, citogenetice și de biologie moleculară. S-au analizat parametrii demografici, clinici, hematologici, biochimici. Au fost calculate scorurile de prognostic. S-au analizat tipul de tratament administrat, răspunsul la tratament și posibilele complicații. Pentru analiza statistică s-au folosit programele SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versiunea 20 și programul Medcalc versiunea 12.3.

Rezultate: Lotul a cuprins 4 femei și 5 bărbați, cu vârsta medie $49,78 \pm 14,1$ ani, diagnosticați cu LMC puseu blastic la debut, 5 cu fenotip limfoblastic și 4 cu puseu blastic mieloid. 3 dintre pacienții diagnosticați în fază blastică au prezentat modificări cromozomiale adiționale. Toți pacienții cu diagnostic de fază blastică au fost încadrați în clasa de risc 3 Sokal. Am găsit diferențe înalte semnificative statistice ale scorului Sokal între pacienții din faza blastică și cea cronică. Numărul mediu de trombocite, de bazofile a fost semnificativ mai mic la pacienții din faza blastică față de cei din faza cronică. Subiecții diagnosticați în puseu blastic au avut o valoare mai mică a hemoglobinei decât a celor din faza cronică, diferența nu a fost

semnificativă statistic. Numărul de leucocite nu a fost diferit la pacienții diagnosticați în faza cronică, comparativ cu cei diagnosticați în puseul blastoc. Mediana valorilor LDH la pacienții la care a apărut puseul blastoc a fost semnificativ statistic mai mare decât la cea a subiecților cu fază cronică. Niciun pacient aflat în faza blastocă nu a prezentat mutația T315I. 4 din cei 9 pacienți cu diagnostic de puseu blastoc au fost tratați cu Imatinib 600 mg/zi în combinație cu chimioterapie. Pentru pacienții diagnosticați cu puseu mieloblastic s-a utilizat chimioterapia. Doar 2 pacienți în fază blastocă au urmat tratament cu linia a II-a de ITK: Dasatinib 2x70 mg/zi. 2 pacienți au prezentat răspuns hematologic și citogenetic complet, un pacient doar după a doua linie de ITK în asociere cu chimioterapia. Unul dintre acești pacienți a prezentat la debut modificări cromozomiale complexe. Doar 1 pacient, diagnosticat cu puseu limfoblastic mai este în viață la încheierea studiului. Urmărirea pacienților în faza blastocă LMC a fost maxim 29 luni.

Concluzii:

În studiul nostru mutația T315I nu s-a corelat cu faza avansată/blastocă a bolii la debut. Răspunsurile hematologic și citogenetic sunt inferioare în faza blastocă în comparație cu faza cronică a LMC.

Tratamentul cu inhibitori de tirozinkinază este important și eficient și în cazul puseului blastoc al LMC, dar rata de răspuns este inferioară celei din faza cronică. Pacienții cu puseu blastoc LGC necesită asocierea chimioterapiei cu ITK în doze crescute. La pacienți eligibili, allotransplantul medular este tratamentul de elecție. Supraviețuirea pacienților diagnosticați în puseu blastoc este nesatisfăcătoare.

Pe parcursul urmăririi pacienților s-au înregistrat 14 (16,8%) decese. Rata deceselor a fost înalt semnificativ mai mare în grupul pacienților aflați în puseu blastoc, comparativ cu grupul subiecților în fază cronică.

Concluzii generale:

Studiul nostru este primul efectuat în România privind mutația T315I în LMC, faza cronică și faza blastocă, lotul fiind reprezentativ.

Studiul nostru dovedește că urmărirea mutației T315I se poate efectua în condiții de lipsă de răspuns, pierdere a răspunsului hematologic, citogenetic sau molecular, nefiind necesară o urmărire regulată.

La ora actuală nu există tratament medicamentos eficient pentru pacienții cu LGC și mutație T315I.

Pacienții cu mutație T315I au indicație de transplant allogenic medular.

Studiul a arătat importanța răspunsului complet hematologic pentru supraviețuire la lotul de pacienți studiați, rezultatele fiind similare celor din literatură.

Riscul de deces a fost corelat cu vârsta de 61 ani de debut a bolii și cu valoarea $> 446 \times 10^3 / \mu\text{l}$ a trombocitelor la debutul bolii.

Luând în considerare rezultatele studiului, am propus un algoritm de urmărire a mutației T315I la pacienții cu LMC faza cronică.

Ca urmare a prezentului studiu, s-a implementat la Clinica Hematologie Cluj-Napoca, o metodă de diagnostic ușor de utilizat la pacienții cu LMC.

PhD Thesis

Abstract

**BCR-ABL mutational analysis in
chronic myelogenous leukemia
through molecular biology
techniques. Impact on treatment**

PhD Candidate: **Dr. Delia Monica Dima**

Scientific advisor: **Prof. Dr. Ljubomir Petrov**

2015



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of contents

INTRODUCTION	4
PRESENT KNOWLEDGE defined.	Error! Bookmark not defined.
1. INTRODUCTION defined.	Error! Bookmark not defined.
2. SHORT HYSTORY defined.	Error! Bookmark not defined.
3. INCIDENCE defined.	Error! Bookmark not defined.
4. ETIOLOGY not defined.	Error! Bookmark not defined.
5. PHYSIOPATHOLOGY not defined.	Error! Bookmark not defined.
6. CLINICAL AND PARACLINICAL PRESENTATION	23
6.1 CHROIC PHASE	23
6.1.1. Clinical.	23
6.1.2. Paraclinical	Error! Bookmark not defined.
6.1.3. Chronic phase treatment	24
6.2. ACCELERATED PHASE	31
6.2.1. Clinical	31
6.2.2. Paraclinical	31
6.2.3. Treatment	31
6.3. BLASTIC PHASE	32
6.3.1. Clinical	32
6.3.2. Paraclinical	32
6.3.3. Treatment	32
PERSONAL CONTRIBUTION	35

HYPOTHESIS	37
1. STUDY I – STUDY OF T315I MUTATION AT CHRONIC PHASE CML	
PACIENTS	39
1.1. INTRODUCTION	39
1.2. OBJECTIVES	40
1.3. METHODS	41
1.4. RESULTS	48
1.5. DISCUSSIONS	80
1.6. CONCLUSIONS	82
2. STUDY 2 – STUDY OF T315I MUTATION AT BLASTIC PHASE CML	
PACIENTS	85
2.1. INTRODUCTION	85
2.2. OBJECTIVES	86
2.3. METHOD	86
2.4. RESULTS	88
2.5. DISCUSSIONS	94
2.6. CONCLUSIONS	95
3. GENERAL CONCLUSIONS	97
REFERENCES	99
Annex 1	111
Annex 2	112

Keywords: chronic myeloid leukemia, BCR-ABL transcript, T315I mutation, resistance, transplant

Introduction

Chronic granulocytic/myeloid leukemia (CML) is a clonal disease of the pluripotent stem cell, characterized by the presence of Philadelphia (Ph) chromosome and/or BCR-ABL rearrangement. CML is the first cancer associated with a genetic mutation, that affects the pluripotent hematopoietic stem cell, and is necessary and sufficient for the cellular transformation. CML is the first malignant hematological disease where spectacular results were obtained with targeted drugs (Imatinib mesylate, nilotinib and dasatinib). The introduction of tyrosin kinase inhibitors (TKI) in CML treatment reduces dramatically the mortality and increased the duration of disease. Unfortunately, the initial enthusiasm was darkened by the appearance of resistance, among which the most frequent and studied mechanisms are the ABL domain mutations. Mutational analysis showed over 100 mutations, with increased frequency in the last years. The T315I mutation confers resistance to all 3 available TKIs and ongoing clinical trials show resistance to other TKIs.

Currently in Romania, mutational analysis is possible only in 1 center- Spitalul Clinic Fundeni. The therapeutic decision is based on clinical evolution, hematologic, cytogenetic and molecular responses, as well as adverse events and tolerance.

Taken all these into consideration, we propose a prospective analysis of all chronic phase CML cases diagnosed at Hematology Clinic Cluj-Napoca, during 1986-2010, and blastic phase CML diagnosed during 2008-2010. I searched to identify the T315I mutation at the time of entry into study and throughout the study, to correlate the presence of the mutation with clinical and biological particularities: phase of disease, response to treatment, evolution, survival. For the moment, the only efficient treatment in case of T315I positive CML is allogeneic stem cell transplantation, which is possible in Romania through national programs. We studied the indication for allogeneic transplantation in T315I positive CML patients and their evolution.

Present knowledge

CML is the most clear and individualized disease among chronic myeloproliferative syndromes, by the presence of cytochemically abnormal differentiation and maturation, maturation of mature/cytochemically abnormal cells and Philadelphia chromosome as biological marker.

In CML a single genetic anomaly that affects the pluripotent hematopoietic stem cell is necessary and sufficient for cellular transformation. The 9, 22 translocation generates a fusion oncogene, BCR-ABL, that encodes a protein with tyrosin kinase activity.

CML is characterized by leucocytosis with left shift, basophilia, anemia, frequent thrombocytosis and splenomegaly. Ph chromosome, implicated in the disease pathogenesis, is present in 95% cases.

The natural evolution of the disease has 2 or 3 phases: a long chronic phase, characterized by marked hematopoietic proliferation, with maintained differentiation, followed by accelerated and blastic phases, when hematopoietic differentiation is stopped and immature blasts accumulate in the bone marrow and peripheral blood.

CML is the first malignant hematological disease that benefited from targeted drugs in a national program.

Considering those mentioned above, the survival rate increased significantly. There is talk about cure and the last research is focused on that target.

Thanks to progress, we have a large panel of clinical and laboratory tools for the correct and complete diagnosis, for the correct prognostic and rate of response.

We also can use last generation drugs/ targeted molecules. The introduction of Imatinib modified significantly the survival of chronic phase CML patients. Rates of response and survival changes under TKI treatment, so the life expectancy in chronic phase CML approaches normal.

Unfortunately, multicentric studies showed 37% of patients under first line Imatinib will develop resistance. It is imperative to identify early those patients that have suboptimal response, with impact on evolution, progression and survival. Early identification allows a change in therapeutic strategy.

The most important resistance mechanism is ABL domain mutations. Disease progression is associated with the appearance of mutations. The clinical studies showed that IM treatment is associated with a 30-50% risk of mutation, and Nilotinib and Dasatinib are associated with 39%, respectively 27% risk of resistance.

T315I mutation represents approximately 11-20% of all mutations identified in IM resistant patients, all phases. The mutation is associated with reduced survival and progression free survival. So far, there is no efficient treatment for T315I positive CML patients, other than allogeneic bone marrow transplantation, which has important morbidity and mortality.

International forums- ELN, NCCN (National Comprehensive Cancer Network) recommend mutational analysis everytime the response is suboptimal or lost.

There is a favourable cost/efficiency ratio in identifying these patients through mutational analysis. The cost of mutational analysis is just a small part of the treatment costs and identifying non-responders allows to offer a more efficient therapy.

Personal contribution

3. Study 1. Study of T315I mutation in chronic phase CML

Objectives: establishing the presence of T315I mutation in chronic phase CML patients; identifying the clinical, biological, therapeutic characteristics of chronic phase patients with/without T315I mutation; comparative analysis of positive/negative T315I mutation patients; the impact of T315I mutation on prognosis of chronic phase CML patients.

Method: We performed a prospective study on 74 patients diagnosed in chronic phase CML, at Hematology Clinic Cluj-Napoca, during 1986-2010. The diagnosis was based in clinical criteria, hematological parameters, bone marrow cytology, cytogenetics and molecular biology. T315I mutational analysis was done by ARMS-PCR, from peripheral blood. We studied demographic, clinical (mode of debut, general symptoms, splenomegaly), hematological, biochemical parameters and ECG. We calculated prognostic score: Sokal, Hasford, Eutos. The mutational analysis was done regularly, at 6 months or in case of suboptimal response. Those patients identified with T315I mutation were referred for allogeneic bone marrow transplantation. We followed the ELN (European LeukemiaNet) indication for the follow up of CML patients. We calculated the survival rate and identified the cause of death. Statistical analysis was done using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 20 and Medcalc version 12.3 programs; for multivariate analysis we used binary logistical regression and Cox regression.

Results: There were 44 women and 30 men included, median age 51,5±14,3 years. 3 patients showed T315I mutation. Median age for T315I mutation positive patients was statistically lower than for negative patients. Median white cell count was $98,8 \cdot 10^3 \pm 81,6 \cdot 10^3$, and platelet count was $498,4 \cdot 10^3 \pm 343,8 \cdot 10^3$. T315I mutation positive patients had more white cells and platelets than negative patients, the difference was not statistically significant. Median hemoglobin value was $11,3 \pm 2,4$ g/dl, lower for T315I patients, but without statistical significance. Basophil and blast counts did not differ among patients with or without T315I mutation. 26 patients had Sokal score of 1, 25 patients- Sokal score 2 and 23 patients- Sokal score 3. There were no differences in Sokal score among T315I positive and negative patients. 55 patients received Imatinib. The Imatinib treatment duration was $32,2 \pm 24,4$ months. All 3 T315I positive patients received Imatinib, but we could not find a correlation between the drug and the mutation.

Dasatinib was administered at 11 patients, for $14,1 \pm 15,9$ months, and all patients were previously treated with Imatinib. Nilotinib was administered in 18 patients, for $6,2 \pm 7,8$ months. We found a strong association between Dasatinib, and Nilotinib treatment and T315I mutation. Complete hematological response was obtained in 60 patients. Complete cytogenetic response was observed in 26 patients. Complete molecular response was seen in 3 patients. Hematological, cytogenetic, molecular responses were not correlated with T315I mutation. 4 patients presented with additional chromosomal abnormalities. Imatinib treatment was modified for Dasatinib in 11 patients for therapeutic failure or intolerance. Imatinib treatment was modified for Nilotinib in 9 patients. Complete hematological response in second line treatment was observed in 14 patients, complete cytogenetic response in 6 patients, complete molecular response in 4 patients. There were 8 patients that evolved to blastic phase (among which 1 patient with T315I mutation) and 4 patients evolved to accelerated phase (1 patient with T315I mutation).

Conclusions:

The follow up of CML patients was done according to European LeukemiaNet recommendations.

ARMS-PCR is a sensible, easy to use technique for the detection and follow up of T315I mutation. T315I mutation was detected in a small percentage of patients (4,05%), which is correlated with the data from literature. The T315I mutation was also correlated with disease progression in 2 of 3 patients. There was a positive relation between T315I mutation and negative prognostic factors: double Ph chromosome, younger age at diagnosis (33 years). T315I mutation was observed after many lines of TKI treatment. The survival of T315I positive patients is short. Complete hematological response rate to first and second line TKI treatment was good and similar to the literature (90,9%, respectively 82,4%). Complete cytogenetic response to first line was unsatisfactory, which imposes a more profound analysis of resistance mechanisms, other than T315I mutation. The survival rate correlated with Sokal, Hasford scores and the parameters included. Lack of response in first line TKI treatment increased the risk of death. Imatinib treatment decreased the risk of death. Survival rate was good: 91,89 patients.

4. Study 2: Study of T315I mutation at blastic phase CML patients

Objective: establishing the T315I mutation at blastic phase CML patients; identifying clinical, biological, therapeutic particularities of blastic phase patients with or without T315I mutation; comparative analysis of chronic and blastic phase patients; impact of T315I mutation on blastic phase CML patients' prognosis.

Method: We performed a prospective study on 12 patients diagnosed with blastic phase CML at Hematology Clinic Cluj-Napoca, during 2008-2010. All patients were tested for T315I mutation at study entry. The blastic phase CML diagnosis was based on clinical, hematological, bone marrow cytology, cytogenetic and molecular biology criteria. We analysed demographic, clinical, hematological, biochemical parameters. We calculated prognostic scores. We analysed types of treatment, response to treatment and possible complications. Statistical analysis was done using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 20 and Medcalc version 12.3 programs.

Results: There were 4 women and 5 men, median age $49,78 \pm 14,1$ years, diagnosed with blastic phase CML, 5 with lymphoblastic phenotype and 4 with myeloid phenotype. 3 patients had additional chromosomal abnormalities. All patients were included in Sokal score 3. We found highly significant differences for Sokal score for blastic and chronic phase patients. Median platelet count, basophil count was significantly lower for blastic phase patients compared to chronic phase patients. All subjects diagnosed in blastic phase CML had a lower hemoglobin than those in chronic phase, but the difference was not significant statistically. White cell count did not differ for chronic or blastic phase patients. Median LDH value was significantly higher for blastic phase patients. No patient diagnosed in blastic phase showed T315I mutation. 4 of 9 patients diagnosed with lymphoblastic phase CML were treated with Imatinib 600 mg/day in combination with chemotherapy. Myeloid phase CML patients received chemotherapy. Only 2 patients received second line TKI: Dasatinib 2×70 mg/day. 2 patients had complete hematological and cytogenetic responses, one patient after second line TKI plus chemotherapy. One of these patients had complex chromosomal abnormalities. Only 1 patient, diagnosed in lymphoblastic phase CML was alive at end of study. Patients follow up was 29 months.

Conclusions:

In our study, T315I mutation did not correlate with advanced disease at diagnosis. Hematological and cytogenetic responses in blastic phase are inferior to those seen in chronic phase CML. TKI treatment is

important and efficient in blastic phase CML, but response rate is inferior to chronic phase. TKI treatment needs to be associated with chemotherapy. For eligible patients, the gold standard is allogeneic stem cell transplantation. Survival is unsatisfactory in blastic phase CML.

During the study, there were 14 (16,8%) deaths. The rate was significantly higher among the blastic phase CML patients compared to those in chronic phase.

General conclusions:

Our study is the first one in Romania addressing T315I mutation in chronic and blastic phases CML, and the lot is representative.

Our study proves that T315I mutation analysis can be done in case of lack of response, or hematological, cytogenetic or molecular response lost. There is no need for a more regular follow up.

Nowadays, there is no efficient drug treatment for T315I mutation CML patients, they can only be offered allogeneic bone marrow transplantation.

The study showed the importance of complete hematological response for the survival in our patients, and the results are according to those in the literature.

The risk of death was correlated with age - 61 years and platelet count $> 446 \times 10^3 / \mu\text{l}$ at diagnosis.

We propose an algorithm for T315I mutational analysis in chronic phase CML patients.

As a result of the current study, we implemented a new diagnostic procedure at the Hematology Clinica Cluj-Napoca, for CML patients.