



AMMINISTRAZIONE GENERALE
AREA PERSONE E ORGANIZZAZIONE
SETTORE DIDATTICA E CONTRATTI
UFFICIO RICERCATORI A TEMPO DETERMINATO E CEL

RIF. 2931

ALLEGATO C:

PROGETTI DI RICERCA:

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE NEI LINFOMI
(ENGLISH VERSION)

ALLEGATO 2:
ALLEGATO/2A

BIOLOGIA E TERAPIA DELLE LEUCEMIE LINFOBLASTICHE ACUTE
(ENGLISH VERSION)

ALLEGATO 3
ALLEGATO/3A

BIOLOGIA E TERAPIA DELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE
(ENGLISH VERSION)

ALLEGATO 4
ALLEGATO/4A

PROGETTO PER LA GUARIGIONE DELLA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA
(ENGLISH VERSION)

ALLEGATO 5
ALLEGATO/5A

All. n.2

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE NEI LINFOMI

Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale

Policlinico "Sant'Orsola-Malpighi", Università di Bologna,

via Massarenti 9, 40138 Bologna

INDICE

1. SOMMARIO
2. BACKGROUND
3. OBIETTIVI DEL PROGETTO
4. ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO
5. BIBLIOGRAFIA

L'incidenza dei linfomi è in continuo aumento, stante l'incremento dell'età media delle popolazioni occidentali. In Europa e negli Stati Uniti, almeno la metà dei pazienti giungono alla diagnosi ad un'età superiore ai 60 anni. Fino ad alcuni anni fa, le opzioni di trattamento per i linfomi in stadio avanzato consistevano esclusivamente nella chemioterapia, eventualmente in associazione alla radioterapia esterna. Tuttavia, tali trattamenti non hanno scongiurato la possibilità di recidiva della malattia: il *relapse* clinico, infatti, tende ad essere relativamente frequente, e nella maggior parte dei casi un linfoma in ricaduta diviene una patologia incurabile, con aumento progressivo della difficoltà di raggiungere una remissione parallelamente all'aumento delle linee di chemioterapia eseguite¹. Lo sviluppo negli ultimi anni della radioimmunoterapia è stato senza dubbio un importante passo avanti per quanto riguarda il trattamento dei pazienti con linfoma non-Hodgkin, così come il recente utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti-CD30 (brentuximab vedotin) sia nei linfomi di Hodgkin ricaduti e refrattari sia nei linfomi non Hodgkin che esprimono la molecola CD30 sulla superficie cellulare².

Il Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale dell'Università di Bologna rappresenta un centro di eccellenza e di riferimento nazionale per la terapia dei linfomi e partecipa, sia in veste di coordinatore sia di collaboratore, a numerosi trial no profit multicentrici, nazionali ed europei, sui linfomi. Il presente progetto di ricerca si propone come obiettivo lo studio e l'applicazione di innovative strategie terapeutiche per pazienti con linfoma, sia di nuova diagnosi sia in fase avanzata e refrattaria. Specificatamente gli obiettivi sono: 1) la gestione, l'aggiornamento e l'analisi dei dati relativi ai 5 studi attivati dal 2004 presso il nostro centro in cui la radioimmunoterapia è stata utilizzata in I linea come programma di consolidamento nei pazienti che avevano ottenuto una risposta dopo la chemio(immunoterapia); 2) la gestione, l'aggiornamento e l'analisi degli studi attivi presso il nostro Istituto in cui è stato utilizzato brentuximab vedotin; 3) la partecipazione e collaborazione a protocolli clinici multicentrici nazionali ed internazionali; 4) il disegno, la conduzione e l'analisi dei dati relativi a nuovi studi clinici multicentrici; 5) lo studio delle caratteristiche biologiche dei pazienti arruolati, per identificare eventuali fattori prognostici.

2.BACKGROUND

Il presente progetto si propone due ambiti di ricerca principali nel campo dei linfomi: 1) l'impiego e lo sviluppo della radioimmunoterapia; 2) l'impiego e lo sviluppo dell'anticorpo monoclonale anti-CD30 brentuximab vedotin.

La radioimmunoterapia combina in un solo agente i vantaggi della radioterapia con quelli dell'immunoterapia consentendo di trasportare un carico radioattivo direttamente sulla superficie delle cellule tumorali mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale che funge da veicolo: in questo modo viene favorita l'eliminazione selettiva delle cellule malate rispetto ai tessuti sani circostanti. Approcci terapeutici con anticorpi monoclonali radioimmunoconiugati vengono utilizzati da qualche anno in diversi tipi di neoplasie solide, con risultati eterogenei: i linfomi presentano il grosso vantaggio, rispetto alla maggior parte delle altre neoplasie, di essere particolarmente radiosensibili. Non sorprende, pertanto, che proprio per questo tipo di tumori siano stati raggiunti i risultati maggiormente promettenti³. Il radioimmunoconiugato consente di raggiungere e trattare contemporaneamente, e con grande efficacia, multiple localizzazioni di malattia; inoltre, è in grado di rintracciare cellule neoplastiche anche in uno stadio in cui queste non siano detectabili con le metodiche standard di diagnostica strumentale. La specificità dell'anticorpo per le cellule tumorali è, tuttavia, soltanto teorica: infatti, non esistono anticorpi strettamente specifici per le cellule tumorali, ma solo anticorpi che riconoscono antigeni espressi con densità più elevata da cellule tumorali rispetto alle cellule normali (antigeni tumore-associati), ovvero antigeni espressi in maniera selettiva – oltre che dal tumore – da una particolare linea cellulare (antigeni tessuto-specifici). È tale il caso dell'antigene CD20 bersaglio della radioimmunoterapia dei linfomi: esso è espresso sia a livello dei linfociti B normali, sia sulla superficie dei linfociti neoplastici rendendo l'anticorpo incapace di distinguere, a livello molecolare, le cellule linfomatose dai linfociti B sani. L'eliminazione selettiva di cellule B, tumorali e non tumorali, tuttavia, rappresenta già un enorme passo avanti nella selettività della radioimmunoterapia rispetto alla chemioterapia convenzionale e alla radioterapia esterna.

La densità e l'espressione più o meno selettiva dell'antigene bersaglio, pertanto, rappresentano due fattori cardine su cui si basa il potenziale terapeutico della radioimmunoterapia. Altri fattori chiave da prendere in considerazione sono: le dimensioni del tumore, la capacità del farmaco di penetrare la massa tumorale e le proprietà radioattive dell'isotopo stesso, in particolare il raggio di emissione. Quest'ultimo aspetto è di fondamentale importanza nella radioimmunoterapia, su di esso si basa il rationale di utilizzo. Il raggio d'azione degli isotopi radioattivi è 10-100 volte superiore al diametro di una singola cellula, pertanto l'anticorpo che riconosce l'antigene specifico sulla superficie di una determinata cellula avrà la capacità di irradiare anche le cellule che si trovano in prossimità della cellula cui si è legato. Questo effetto, cosiddetto di "fuoco incrociato", conduce sia ad un potenziamento della radiazione nel tessuto linfomatoso, sia all'eliminazione delle cellule che esprimono l'antigene in maniera debole, o che ne hanno modulato l'espressione. Inoltre, in questo modo possono essere colpite anche quelle cellule che, pur esprimendo

l'antigene di superficie, si trovano all'interno di aree necrotiche e poco vascolarizzate, difficilmente raggiungibili, quindi, dall'anticorpo monoclonale^{1,3}. In Europa il solo farmaco radioimmunoconjugato disponibile è il ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), autorizzato dalla FDA americana nel 2002 e dall'EMA nel 2004.

⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan è costituito da un anticorpo monoclonale di origine murina, IgG₁ montante catene κ, anti-CD20 (ibritumomab), legato tramite un chelante (tiuxetan) al radioisotopo ⁹⁰Y. Il chelante tiuxetan è unito tramite legame covalente al frammento cristallizzabile (Fc) dell'anticorpo, e consente di legare con elevata affinità sia l'isotopo ⁹⁰Y, sia l'isotopo ¹¹¹In, da impiegare a scopo di diagnostica per immagini⁴. L'ittrio 90 è un β-emittente puro, e decade in un nucleo stabile di zirconio 90 (⁹⁰Zr) emettendo un elettrone. L'elevata energia della particella β emessa nel decadimento, pari a 2,3 MeV, ha come risultante un raggio d'azione di 5-10 mm, entro i quali il 90% dell'energia stessa viene assorbita. Tale ampio raggio d'azione dà luogo, come si è detto in precedenza, all'effetto di "fuoco incrociato". La molecola CD20 non è un antigene tumore-specifico, bensì tessuto-specifico, in quanto si trova espresso in elevata densità sui linfociti B, incluso il 90% dei linfociti neoplastici.

Il CD20 non viene internalizzato né la sua espressione viene modulata all'atto del legame con l'anticorpo. Inoltre, non viene né dismesso né secreto in circolo, e solo raramente è colpito da mutazioni, per cui non rappresenta un mezzo attraverso il quale la cellula neoplastica acquisisce chemioresistenza. Per questi motivi, l'anticorpo può rimanere a lungo legato alla superficie della cellula che esprime il CD20 (con una costante di affinità corrispondente a 17 nM), sottoponendola in maniera continua all'azione della radiazione⁵. Diversamente dalla radioterapia esterna, che viene erogata in maniera frazionata, sebbene ad alte dosi per ogni singola frazione di trattamento, nella radioimmunoterapia la dose impartita è relativamente bassa, ma viene erogata in maniera continua (in ragione del legame dell'anticorpo con la cellula bersaglio). La curva dose/tempo assume un andamento esponenziale, decrescendo man mano che il radioisotopo decade. La radiazione determina la morte cellulare inducendo danni al DNA, che causano la messa in moto del meccanismo apoptotico. Vi sono inoltre evidenze che la piccola dose impartita in maniera continua dal radioimmunoconjugato possa determinare un arresto del ciclo cellulare in fase G₂, prevenendo l'entrata della cellula in mitosi. La sincronizzazione di una grossa popolazione cellulare in fase G₂ (il punto di transizione G₂/M è notoriamente la fase del ciclo cellulare maggiormente radiosensibile) costituisce il meccanismo principale attraverso cui si esplica la citotossicità di ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan. La citotossicità sembra infine essere potenziata dal blocco dei meccanismi di riparazione del DNA, che avverrebbe ancora una volta in relazione alla dose di radiazione impartita alle cellule bersaglio in maniera continua. Tale potenziamento non avviene quando si esegue una radioterapia esterna: nell'intervallo tra una frazione e l'altra, infatti, i meccanismi di riparazione del DNA sono estremamente attivi, contribuendo a limitare il danno genotossico radio-indotto⁶. Sebbene la capacità dell'anticorpo monoclonale di concentrare la radiazione sulle cellule

bersaglio, con il potenziamento determinato dall'effetto di "fuoco incrociato", sia il principale meccanismo su cui si basa l'efficacia del farmaco, sono presenti (ma in misura minore) anche altri meccanismi di citotossicità, che contribuiscono all'effetto antitumorale di ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan⁷. Tali meccanismi sono gli stessi che si riscontrano impiegando anticorpi monoclonali "freddi", quali il rituximab (anch'esso anti-CD20), e sono innescati dal legame dell'anticorpo stesso con il proprio antigene. Essi possono essere così riassunti⁵: citotossicità mediata dal complemento (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC), citotossicità mediata da anticorpi (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) e effetti citotossici diretti.

In questo contesto il Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale dell'Università di Bologna ha svolto un ruolo di fondamentale importanza. Allo scopo di indagare l'utilizzo di ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in prima linea in combinazione sequenziale con la chemioterapia citotossica, in relazione a diverse tipologie di pazienti e a diversi tipi istologici di linfoma non-Hodgkin, sono partiti nel 2004 presso l'Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "Lorenzo e Ariosto Seràgnoli" tre protocolli sperimentali di tipo nazionale con centro coordinatore Bologna:

- il primo studio riguarda pazienti di età superiore ai 18 anni, affetti da linfoma non-Hodgkin indolente non follicolare, non precedentemente trattato, che abbiano raggiunto una risposta parziale o completa dopo 6 cicli di chemioterapia di induzione secondo schema FM (fludarabina, mitoxantrone)⁸;
- il secondo studio riguarda pazienti di età superiore ai 18 anni, affetti da linfoma non-Hodgkin follicolare, esordito in stadio II-IV e non precedentemente trattato, che abbiano raggiunto una risposta parziale o completa dopo 6 cicli di chemioterapia di induzione con fludarabina *per os* e mitoxantrone (FLUMIZ)⁹;
- il terzo studio riguarda pazienti di età superiore ai 60 anni, affetti da linfoma non-Hodgkin B a grandi cellule, di tipo diffuso, non precedentemente trattato, che abbiano raggiunto una risposta parziale o completa dopo 6 cicli di chemioterapia di induzione secondo schema CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone)¹⁰;

Tali studi hanno mostrato risultati di efficacia particolarmente positivi, sia nel campo dei linfomi indolenti non follicolari (difficilmente aggredibili con la chemio-immunoterapia), sia per quanto concerne i linfomi aggressivi dell'anziano, contesto in cui risultano spesso precluse ulteriori linee di trattamento con chemioterapia standard. Risultati si sono registrati anche nel trattamento dei linfomi follicolari, per i quali sono attualmente in studio metodiche di monitoraggio della malattia minima residua, basate sulla determinazione in PCR del riarrangiamento del gene *Bcl-2*: ciò potrebbe suggerire ulteriori studi clinici in cui gli *endpoints* valutabili siano, oltre ai risultati di sopravvivenza, le risposte alla chemio-immuno-radioterapia sia a livello clinico, sia molecolare.

I dati raccolti da questi studi hanno costituito la base di partenza per il disegno di due ulteriori studi clinici, recentemente conclusi, il cui scopo è stato quello di implementare la radioimmunoterapia con una precedente chemio-immunoterapia di induzione, erogata riducendo da 6 a 4 il numero di cicli di trattamento (4 cicli R-CHOP ogni 21 giorni, seguiti da ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan, in pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule, ultrasessantenni, non precedentemente trattati¹¹; 4 cicli FMR, seguiti da ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan, in pazienti con linfoma follicolare, non precedentemente trattati¹²). Ciò allo scopo sia di valutare l'efficacia delle tre strategie terapeutiche, chemioterapia, immunoterapia e radioimmunoterapia impiegate contemporaneamente, sia di ridurre la tossicità legata alla chemioterapia standard, particolarmente correlata, nei pazienti anziani, alle antracicline.

Nei prossimi mesi come prosecuzione dei risultati ottenuti negli studi precedenti, l'Istituto Seragnoli condurrà lo studio monocentrico "Zeno", finalizzato a valutare l'efficacia e la sicurezza del trattamento in monoterapia con ⁹⁰Ybritumomab tiuxetan in pazienti con linfoma a cellule B della zona marginale extranodale del tessuto linfoide associate alla mucosa (linfoma MALT) e parteciperà ai seguenti studi: 1) ZEAL, studio internazionale di fase III randomizzato, finalizzato a valutare l'efficacia di Zevalin® versus l'osservazione in pazienti con età superiore a 60 anni affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B in prima remissione completa dopo R-CHOP/R-CHOP like; 2) FIL-FLAZ-12, studio cooperativo nazionale di fase II finalizzato a confrontare nei pazienti affetti da linfoma non Hodgkin follicolare sottoposti a II linea di trattamento, l'utilizzo in consolidamento di Zevalin® versus il trapianto autologo.

Il secondo campo di ricerca del presente progetto riguarda l'impiego e lo sviluppo del brentuximab vedotin (SGN35), un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene CD30 e coniugato con la monometilauristatina E.

L'antigene di superficie CD30 rappresenta un nuovo ed interessante target terapeutico in quanto è altamente espresso dalle cellule neoplastiche di linfoma di Hodgkin e di linfoma a grandi cellule anaplastico mentre è poco presente sulla superficie delle cellule sane¹³. Le cellule che normalmente possono esprimere il CD30 sono i linfociti T attivati, i macrofagi, i linfociti natural killer attivati, le cellule endoteliali ed i linfociti infettati dal virus di Epstein-Barr¹⁴.

Il CD30 è una proteina transmembrana appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNF (TNFR) che include anche Fas, CD40 e RANK^{15,16}. Tali proteine attraverso il loro dominio intracellulare sono in grado di regolare la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare¹⁷. Normalmente la porzione citoplasmatica del CD30 lega il fattore 2 associato al recettore di TNF (TRAF2) che così attivato è capace di interagire con TRADD (TNFR associated death domain), fattore che a sua volta è legato alla porzione citoplasmatica del recettore 1 del TNF (TNFR1). Il complesso TNFR1-TRADD-TRAF2 attiva la via di NFκB permettendo la sopravvivenza della cellula.

Sia TNFR1 che Fas contengono nella loro componente intracellulare un dominio specifico (*death domain*) che se attivato è in grado di regolare la via delle caspasi e quindi di determinare l'apoptosi cellulare. Nonostante la porzione citoplasmatica del CD30 non contenga un *death domain*, tale antigene è comunque in grado di indurre la morte cellulare programmata. Si pensa infatti che il legame tra il CD30 ed il suo ligando determini la degradazione di TRAF2, che quindi non può interagire con il complesso TNFR1-TRADD impedendo l'attivazione di NFκB e favorendo l'apoptosi¹⁵.

Brentuximab vedotin (SGN-35) è costituito da un anticorpo monoclonale chimerico, IgG₁ anti CD30 (SGN30) modificato per l'aggiunta di 4 dipeptidi (citrullina-valina) che legano la monometilauristatina E (MMAE). L'uso di dipeptidi *linker* permette la massima stabilità sierica del composto e un'adeguata idrolisi con il rilascio di MMAE da parte della catepsina B¹⁸.

In seguito al legame con il CD30 l'anticorpo coniugato viene internalizzato nella cellula per endocitosi. Nel citoplasma la vescicola contenente SGN35 si fonde con il lisosoma che contiene enzimi proteolitici quali la catepsina che rompe il legame tra i dipeptidi e la monometilauristatina E. La monometilauristatina E libera si lega alla tubulina impedendone la polimerizzazione e determinando la morte della cellula¹⁹. Sembra inoltre che una piccola frazione di MMAE diffonda al di fuori della cellula neoplastica esercitando il suo effetto citotossico sulle cellule adiacenti che costituiscono il microambiente tumorale²⁰.

In questo contesto il Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale dell'Università di Bologna ha partecipato allo studio di fase II multicentrico in cui il brentuximab vedotin era utilizzato nei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin ricaduti/refrattari dopo il trapianto autologo e attualmente sta coordinando un'analisi retrospettiva nazionale sull'utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti-CD30 in uso compassionevole per i pazienti affetti da linfoma di Hodgkin e linfoma non Hodgkin T a grandi cellule anaplastiche ricaduti/refrattari.

I primi risultati hanno evidenziato delle buone percentuali di risposta in pazienti precedentemente sottoposti a numerose linee di polichemioterapia. Nei prossimi mesi come prosecuzione dei risultati ottenuti negli studi precedenti, l'Istituto Seràgnoli condurrà i seguenti trial clinici: 1) studio di fase II, nazionale, multicentrico in cui si valuta l'efficacia del brentuximab vedotin in pazienti affetti da linfomi non Hodgkin di derivazione dai linfociti B periferici primitivo del mediastino ricaduti/refrattari; 2) studio di fase II monocentrico, in cui si valuta l'efficacia di brentuximab vedotin nei pazienti con età > a 65 anni affetti da linfoma di Hodgkin in I ricaduta. L'Istituto Seràgnoli, inoltre parteciperà ai seguenti studi: 1) studio di fase III, internazionale, multicentrico, prospettico randomizzato, in cui si confronta l'efficacia di brentuximab vedotin nei pazienti affetti da linfoma non Hodgkin di derivazione T linfocitaria cutanei versus le terapie convenzionali; 2) studio di fase III, internazionale, multicentrico, randomizzato in cui si confronta in I linea nei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin in stadio avanzato l'associazione tra brentuximab vedotin e AVD.

3.OBIETTIVI DEL PROGETTO

I principali obiettivi del presente progetto di ricerca saranno:

- migliorare e ottimizzare la terapia dei pazienti affetti da linfoma alla diagnosi e con malattia ricaduta/refrattaria, attraverso il disegno, la conduzione, la gestione e l'analisi di studi clinici multicentrici, nazionali e internazionali, a cui il Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale dell'Università di Bologna partecipa, sia come coordinatore che come collaboratore;
- identificare caratteristiche cliniche, biologiche e molecolari rilevanti sul piano prognostico;
- identificare caratteristiche cliniche, biologiche e molecolari rilevanti nello sviluppo di tossicità al trattamento.

4. ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO

Il progetto avrà una durata triennale e prevede lo studio e l'applicazione di strategie terapeutiche innovative per il pazienti con linfoma.

In dettaglio l'attività si articolerà nei seguenti punti:

1) Gestione, aggiornamento e analisi dei dati dei 5 studi clinici multicentrici italiani di fase II, di cui Bologna è centro coordinatore che hanno visto l'impiego della radioimmunoterapia in I linea come consolidamento dopo la chemio(immunoterapia). Tali studi sono stati eseguiti a partire dal 2004 e hanno arruolato in totale 163 pazienti affetti da linfoma non Hodgkin follicolare, indolente non follicolare e diffuso a grandi cellule sottoposti a Zevalin® in I linea dopo il trattamento con chemio (immunoterapia). L'obiettivo primario dei 5 studi condotti dal 2004 al 2008 era di valutare la sicurezza e l'efficacia della radioimmunoterapia con ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan come consolidamento di un trattamento iniziale chemioterapico in diverse tipologie di pazienti.

Gestione, aggiornamento dei dati dell'analisi retrospettiva nazionale sull'utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti-CD30 in uso compassionevole per i pazienti affetti da linfoma di Hodgkin e linfoma non Hodgkin T a grandi cellule anaplastiche ricaduti/refrattari.

2) Gestione, coordinamento, raccolta e analisi dei dati dei seguenti studi:

- studio monocentrico, prospettico ZENO;
- studio multicentrico, prospettico randomizzato di fase III internazionale ZEAL;
- studio multicentrico, prospettico randomizzato di fase II, nazionale FIL-FLAZ-12;
- studio monocentrico, prospettico di fase II "impiego del brentuximab vedotin nei pazienti affetti da linfoma primitivo del medistino ricaduti/refrattari";
- studio monocentrico, prospettico di fase II "utilizzo del brentuximab vedotin nel paziente con età > a 65 anni, affetto da linfoma di Hodgkin ricaduto dopo la I linea di polichemioterapia";
- studio multicentrico, prospettico randomizzato di fase III, internazionale " brentuximab vedotin versus chemioterapia standard nei pazienti affetti da linfoma non hodgkin di derivazione T linfocitaria (CTCL) all'esordio";
- studio multicentrico, prospettico randomizzato di fase III, internazionale " brentuximab vedotin in associazione allo schema AVD versus ABVD nei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin all'esordio in stadio avanzato";

3) Gestione di studi clinici sponsorizzati relativi al trattamento dei pazienti con malattia di nuova diagnosi o avanzata/refrattaria;

4) Disegno e conduzione di nuovi studi clinici. Nell'ambito del coordinamento nazionale e internazionale stabilito, saranno progettati e condotti nuovi studi clinici multicentrici sperimentali per la valutazione di nuove strategie terapeutiche;

5) Analisi dei risultati. Sarà effettuata un'analisi dei risultati per valutare l'efficacia delle nuove strategie terapeutiche nei linfomi. Saranno valutate in particolare: la valutazione della risposta ai farmaci, la sopravvivenza libera da malattia (PFS) e la sopravvivenza globale (OS);

6) Coordinamento degli studi biologici associati.

E' previsto nei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin che verranno trattati con brentuximab vedotin l'analisi dei campioni istologici con la tecnica di *Gene Expression Profile* al fine di identificare le caratteristiche biologiche dei pazienti responsivi o meno al trattamento.

7) Valutazione degli eventi avversi e della tossicità.

Si eseguirà un'analisi sistematica degli avventi avversi, avvalendosi della classificazione NCI CTCAE versione 4.0.

In particolare nell'ambito dell'utilizzo della radioimmunoterapia sarà monitorata a lungo termine l'incidenza delle sindromi mielodisplastiche e delle sindromi mieloproliferative acute.

Mentre nell'ambito di utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti-CD30 sarà monitorata insorgenza e l'evoluzione della tossicità neurologica e saranno analizzati coordinando uno studio nazionale i possibili fattori eziopatogenetici che potrebbero essere alla base dell'insorgenza della neuropatia periferica.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Hagenbeek A. et al. Radioimmunotherapy for NHL: experience of ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan in clinical practice. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(S4): S37-S47.
2. Katz J. et al. Brentuximab Vedotin *Clinical Cancer Research* 2011; 17:6428-6436.
3. Pezzutto A. I radioimmunoconiugati: impiego clinico. *Seminari di Ematologia Oncologica* 2006; 3(3): 207-226.
4. Marcus R. Use of ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan in non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 2005; 32: S36-S43.
5. Maloney DG. Concepts in radiotherapy and immunotherapy: anti-CD20 mechanisms of action and targets. *Semin Oncol* 2005; 32: S19-S26.
6. Bischof Delaloye A. The role of nuclear medicine in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Leuk Lymphoma* 2003; 44(S4): S37-S47.
7. Lemieux B, Coiffier B. Radio-immunotherapy in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Best Practice & Res Clin Haem* 2005; 18: 81-95.
8. Zinzani PL, et al. A phase 2 trial of fludarabine and mitoxantrone chemotherapy followed by yttrium-90 ibritumomab tiuxetan for patients with previously untreated, indolent, non follicular, non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2008 Feb 15;112(4):856-62.
9. Zinzani PL. et al. Long-term efficacy and toxicity results of the FLUMIZ trial (fludarabine and mitoxantrone followed by yttrium-90 ibritumomab tiuxetan in untreated follicular lymphoma). *Ann Oncol*. 2012 Mar;23(3):805-7.
10. Zinzani PL et al. A phase II trial of CHOP chemotherapy followed by yttrium 90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin) for previously untreated elderly diffuse large B- cell lymphoma patients. *Ann Oncol*. 2008 Apr;19(4):769-73.
11. Zinzani PL. et al Phase II trial of short-course R-CHOP followed by ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan in previously untreated high-risk elderly diffuse large B-cell lymphoma patients.. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 1;16(15):3998-4004.
12. Zinzani PL, A phase II trial of short course fludarabine, mitoxantrone, rituximab followed by ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan in untreated intermediate/high-risk follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2011 May 2.
13. Younes A, Kadin ME. Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligand and receptors in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 15;21(18):3526-34.
14. Chiarle R. et al. CD30 in normal and neoplastic cells. *Clin Immunol* 1999;90:157-64.
15. Duckett CS. et al. CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signalling and the control of cell survival. *Genes Dev* 1997;11:2810-21.
16. Mir SS. et al. Differential effect of CD30 activation in anaplastico large cell lymphoma and Hodgkin disease cell. *Blood* 2000; 4307-12.
17. Wilson NS. et al. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 2009; 10:348-55.
18. Sanderson RJ. et al. In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate. *Clin Cancer Res* 2005; 11:843-52.
19. Conner SD. et al. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422:37-44.
20. Alley SC. et al. Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr Opin Chem Biol* 2010;14:529-37.

All.n.2/A

NEW THERAPEUTIC STRATEGIES IN LYMPHOMA

Department of Experimental, Diagnostic and Specialized Medicine

“Sant’Orsola-Mapighi” Hospital, Bologna University

Via Massarenti n° 9, 40138 Bologna

INDEX

1. SUMMARY
2. BACKGROUND
3. THE PROJECT'S OBJECTIVES
4. THE PROJECT DEVELOPMENT
5. BIBLIOGRAPHY

1.SUMMARY

The incidence of lymphoma is continuously arising, in parallel with the ageing of Western population: in Europe and in the United States, almost half of lymphoma patients are older than sixty years. Treatment strategies consisting of chemotherapy, with or without radiotherapy, have shown so far their efficacy in producing good rates of response, although they have not eliminated the possibility of disease relapse.

It is known, in fact, that lymphoma relapse implies a great difficulty in obtaining further clinical remission, with disease becoming thus definitively incurable¹. In this sense, the recent development of radioimmunotherapy has undoubtedly represented a significant step forward in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma patient, in the same way of the monoclonal anti-CD30 monoclonal antibody (brentuximab vedotin) in both relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma and in CD30-positive non-Hodgkin's lymphoma².

The Experimental, Diagnostic and Specialized Medicine Department of the University of Bologna represents a national point of reference for the treatment of patients affected by lymphoproliferative disorders, and participates in several Italian and European multicentric no profit trials, both as the coordinating and as a collaborating center.

This project is firstly aimed at analyzing, and subsequently at applying new treatment strategies to patients with newly diagnosed Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, and in those with advanced and refractory disease.

The project goals are: 1) data management and update of our five clinical trials in which radioimmunotherapy was applied as consolidation treatment after chemo/immunotherapy in responding recently diagnosed lymphoma patients; 2) data management and update of clinical trials regarding the use of brentuximab vedotin; 3) participation in multicentric clinical trials and collaboration with other Hematology units, both nationally and internationally; 4) design of new multicentric clinical trials; 5) analysis of the biological characteristics of patients enrolled in clinical trials, in order to find out possible prognostic implications.

2. BACKGROUND

The two main fields of investigation are: 1) the development and the possible applications of radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma; 2) the use of brentuximab vedotin in CD30 expressing lymphoid neoplasms.

Radioimmunoconjugated monoclonal antibodies permit the delivery of a radioactive charge closely to neoplastic cells, thus selectively inhibiting the growth of tumor masses while sparing normal tissues. Since lymphoid neoplasm show a marked radiosensitivity, brilliant results have been achieved in non-Hodgkin's lymphoma. Radioimmunolabelled antibodies allow the concomitant treatment of multiple site of disease and may scavenge not otherwise detectable neoplastic cells³.

The CD20 antigen represents a suitable target for lymphoma radioimmunotherapy, as it is expressed on B lymphocytes throughout their entire development, as well as on their neoplastic counterparts: in this sense, CD20 is regarded as a tissue-specific target antigen, and the modulation of its expression on cell membranes is the pivotal factor the potential of radioimmunotherapy rests on. Other variables to be taken into account are: the dimensions of the neoplastic masses, the ability of the drug to penetrate in depth the tumor bulks and the radioactive properties of the radioisotope in terms of range of emission. It should be known that the range of emission of radioactive materials is generally 10 to 100 folds bigger than a single-cell diameter: this is why radioimmunoconjugates can also irradiate all the cells in close proximity of the target they bind to. Lymphoma bulks thus receive cross-irradiation from multiple scattered points: this effect is known as the "cross-fire effect", and permits to selectively concentrate the radioactive charge on neoplastic tissues, also in necrotic and poorly vascularized areas, in which any drug penetration can be severely compromised^{1,3}.

The only approved radioimmunconjugated drug in Europe is ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]), which was authorized by FDA in 2002 and by EMEA in 2004.

⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan is an anti-CD20, IgG1k murine monoclonal antibody (ibritumomab) covalently binded to 90-yttrium through a chelator, tiuxetan. 90-yttrium is a pure beta emitter, decaying to 90-zirconium with the emission of a 2.3 MeV electron.

The CD20 molecule through which the antibody binds to its target cells, is neither internalized nor its expression is modulated after binding; moreover, this molecule is rarely affected by mutations, thus it does not appear to be involved in neoplastic cell chemoresistance. The treatment radiating dose is delivered in a continuous manner to the target, without any fractionation: the tissue irradiation determines DNA damage, with subsequent cell apoptotic death; a cell-cycle arrest in G2-phase and also an inhibition of the DNA-repairing machinery.

Apart from the "cross-fire effect", ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan also displays an antibody-dependent cellular cytotoxicities, and is able to fix complement.

In order to investigate the role of ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in untreated lymphoma patients, as a consolidative treatment after chemo/immunotherapy, several clinical trials took place at the

Experimental, Diagnostic and Specialized Medicine Department of the University of Bologna, since 2004:

- in the first trial, previously untreated adult non-follicular indolent non Hodgkin's lymphoma patients could be enrolled once obtaining at least a partial response after 6 induction cycles according to the fludarabine-mitoxantrone regimen;
- the second trial was designed for previously untreated adult follicular non-Hodgkin's lymphoma patients (stage II to IV) in response after 6 induction cycles of oral fludarabine and i.v. mitoxantrone;
- the last trial involved elderly patients (60 years old and above) affected by previously untreated diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma achieving at least a partial response after 6 cycles of R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone) induction therapy.

Data from this clinical trials have suggested the design of two newer studies, recently concluded and both aimed at reducing the number of induction chemotherapy cycles (4 R-CHOP cycles every 21 days in previously untreated elderly diffuse large B cell lymphoma patients; 4 fludarabine-mitoxantrone-rituximab cycles in previously untreated follicular lymphoma patients) before the delivery of radioimmunotherapy. These two studies were mainly designed to evaluate the efficacy of the combined chemo-immuno-radioimmunotherapy strategy and to reduce chemotherapy-related hematological and extra-hematological toxicities, particularly in elderly patients.

As an extension of this studies, the Institute of Hematology and Medical Oncology "L. e A. Seràgnoli" will carry on a monocentric study, i.e. the "Zeno" trial, aimed at evaluating the efficacy and safety of single agent radioimmunotherapy with 90Y-ibritumomab tiuxetan in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) marginal zone lymphoma patients. The Institute will also participate in the following clinical trials: 1) ZEAL, an international phase III randomized clinical study, aimed at assessing the efficacy of Zevalin® vs observation in diffuse large B cell lymphoma patients, older than 60 years, in first complete remission after R-CHOP or R-CHOP-like regimens; 2) FIL-FLAZ-12, an Italian phase II study that compares the role of Zevalin® radioimmunotherapy vs autologous stem-cells transplantation in patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma as consolidation after second-line therapy.

The second research field of this project is about the use of Brentuximab vedotin (SGN35), a monoclonal antibody directed against CD30 antigen and conjugated with monomethyl auristatin A. The CD30 antigen is an attractive target for monoclonal antibody therapy because of its limited expression on normal tissues and its uniform, high-level expression on malignant cells in patients with classical Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma.¹³

The normal cells that express CD30 include activated T cells, macrophages, activated natural killer cells, endothelial cells and lymphoid cells infected with Epstein-Barr virus.

CD30 is a member of the TNF-receptor superfamily (TNFR), which comprises more than 25 members, including TNF receptor FAS, CD40, and RANK^{15,16}. Signaling through the TNFR superfamily of molecules affects cellular proliferation, survival, and differentiation, and these effects are mediated through the cytoplasmic domains of the receptors¹⁷. TNFR1 and FAS contain an 80-amino acid motif, designated the death domain, that induces apoptosis through interaction with FAS-associated death domain (FADD) and TNFR-associated death domain (TRADD), which in turn recruit caspases to initiate the apoptotic cascade. In contrast, TNFR1 can activate NF- κ B to prevent cell death through the interaction of TNFR1, TRADD, and TNFR-associated factor 2 (TRAF2). CD30 does not contain a death domain but it is able to produce an apoptotic stimulus. The mechanism for this effect is thought to be related to the degradation of TRAF2, which prevents its interaction with the TNFR1-TRADD complex, thereby enhancing death signaling through the TNFR¹⁵. CD30 ligand and monoclonal antibodies that interact with this signaling portion of the molecule are thought to induce apoptosis by initiating CD30 signaling without concurrent NF- κ B activation.

Brentuximab Vedotin (SGN-35) consists of monoclonal antibody (SGN30) modified by the addition of a dipeptide linker to permit attachment of microtubule polymerization monomethyl auristatin E (MMAE).

The protease-sensitive dipeptide linker is composed of citruline and valine. The advantage of the dipeptide linker is that it provides maximal serum stability with efficient hydrolysis and release of MMAE by human cathepsin B¹⁸. Internalization of SGN-35 is primarily the result of clathrin-mediated uptake. Within the cytoplasm, the clathrin-coated pit is stripped of clathrin, which is recirculated to the cell surface. The internalized ADC within the uncoated pit is joined to a lysosomal vesicle that contains proteolytic enzymes. The lysosomal protein cathepsin releases MMAE from the dipeptide linker of SGN-35, and the free MMAE is available to bind tubulin to prevent its polymerization¹⁹. A small fraction diffuses out of the targeted tumor cell, allowing it to exert cytotoxic effect on surrounding cells in the tumor microenvironment. The latter event may contribute significantly to the efficacy of SGN-35²⁰.

In this context the Experimental, Diagnostic and Specialized Medicine Department of the University of Bologna participated to a multicenter phase II study in which Brentuximab vedotin was used in Hodgkin's lymphoma patients relapsed/refractory after autologous stem cell transplantation, and actually is coordinating a national retrospective analysis on named patient program with monoclonal antibody anti-CD30 brentuximab vedotin for relapsed/refractory patient affected by Hodgkin's lymphoma and anaplastic large cell lymphoma.

The first results have shown a good response rate of brentuximab vedotin when used in relapsed and refractory patients. In the next few months our Institute coordinate the following studies: 1)

national multicenter open label non randomized phase II trial on patients affected by primary mediastinal lymphoma relapsed/refractory with brentuximab vedotin; 2) monocenter open label non randomized phase II trial on treatment with brentuximab vedotin in elderly patients affected by Hodgkin's lymphoma relapsed/refractory after first line therapy. Moreover, the Institute will participate to the following trials: 1) international phase II randomized study on treatment with brentuximab vedotin versus investigator's choice in patient with cutaneous T-cell lymphoma at diagnosis; 2) international phase II randomized study on treatment with brentuximab vedotin + AVD versus ABVD in patient with Hodgkin's lymphoma at diagnosis with advanced stage.

3.OBJECTIVES

Main objectives of the projects will be the following ones:

- to improve therapy of patients affected by lymphoma both at diagnosis and relapsed/refractory through the design, development, conduction e coordination of several multicenter clinical trials (national and international);
- to identify clinical, biological and molecular characteristics important for prognosis;
- to identify clinical, biological and molecular characteristics important for the development of the treatment-related toxicities.

4. PROJECT DEVELOPMENT

The duration of the project will be three years and will provide the knowledge and subsequent application of innovative therapeutic strategies for lymphoma patients.

More specifically:

1) Management, update and analysis of data of the 5 multicenter phase II Italian clinical trials of which Bologna is the Center coordinator regarding the use of radioimmunotherapy as front line therapy, ie as consolidation after chemo(immunotherapy). These studies have been conducted since 2004 for a total of 163 patients enrolled. Patients were affected by follicular non-Hodgkin's lymphoma, indolent non-follicular and diffuse large B-cell; they underwent Zevalin® in first line after treatment with chemo(immunotherapy). Primary objective was safety and efficacy of radioimmunotherapy with ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan as consolidation after initial chemotherapy in several types of patients.

Management and update of national retrospective analysis on named patient program with monoclonal antibody anti-CD30 brentuximab vedotin for relapsed/refractory patient affected by Hodgkin's lymphoma and anaplastic large cell lymphoma.

2) Management, coordination, collection and analysis of data of the following trials:

- ZENO: phase II, prospective monocenter
- ZEAL: international phase III multicenter randomized prospective
- FIL-FLAZ-12: national phase III multicenter randomized prospective
- national multicenter open label non randomized phase II trial on patients affected by primary mediastinal lymphoma relapsed/refractory with brentuximab vedotin
- monocenter open label non randomized phase II trial on treatment with brentuximab vedotin in elder patients affected by Hodgkin's lymphoma relapsed/refractory after first line therapy
- international phase II randomized study on treatment with brentuximab vedotin versus investigator's choice in patient with cutaneous T-cell lymphoma at diagnosis
- international phase II randomized study on treatment with brentuximab vedotin +AVD versus ABVD in patient with Hodgkin's lymphoma at diagnosis with advanced stage.

3) Management and analysis of data of company sponsored clinical trials regarding patients at diagnosis or with relapsed/refractory disease.

4) Design and conduction of new National multi center clinical trials for new therapeutic options.

5) Results analysis: all the results will be analyzed with particular attention to overall response rate, progression free survival and overall survival.

6) Coordination of Biological studies on histological samples of Hodgkin's lymphoma patients treated with brentuximab vedotin: analysis through *Gene Expression Profile* to identify biologic characteristics of patients, both responder and non responder.

7) Assessment of adverse events

All events adverse occurred during treatment and patients short follow up will be collected analyzed and categorized for incidence, type, grade and severity and relation to drug. NCI CTCAE v 4.0 will be used.

A longer monitoring of safety will be performed for radioimmunotherapy to control the occurrence of myelodysplastic syndrome and acute myeloproliferative leukemia, while regarding brentuximab vedotin the attention will be focused on the occurrence of peripheral neuropathy. In this regard, data on peripheral neuropathy will be collected and analysed on national basis to identify the possible factors cause of this specific adverse event.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Hagenbeek A. et al. Radioimmunotherapy for NHL: experience of ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in clinical practice. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(S4): S37-S47.
2. Katz J. et al. Brentuximab Vedotin *Clinical Cancer Research* 2011; 17:6428-6436.
3. Pezzutto A. I radioimmunoconiugati: impiego clinico. *Seminari di Ematologia Oncologica* 2006; 3(3): 207-226.
4. Marcus R. Use of ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 2005; 32: S36-S43.
5. Maloney DG. Concepts in radiotherapy and immunotherapy: anti-CD20 mechanisms of action and targets. *Semin Oncol* 2005; 32: S19-S26.
6. Bischof Delaloye A. The role of nuclear medicine in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Leuk Lymphoma* 2003; 44(S4): S37-S47.
7. Lemieux B, Coiffier B. Radio-immunotherapy in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Best Practice & Res Clin Haem* 2005; 18: 81-95.
8. Zinzani PL, et al. A phase 2 trial of fludarabine and mitoxantrone chemotherapy followed by yttrium-90 ibritumomab tiuxetan for patients with previously untreated, indolent, non follicular, non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2008 Feb 15;112(4):856-62.
9. Zinzani PL. et al. Long-term efficacy and toxicity results of the FLUMIZ trial (fludarabine and mitoxantrone followed by yttrium-90 ibritumomab tiuxetan in untreated follicular lymphoma). *Ann Oncol*. 2012 Mar;23(3):805-7.
10. Zinzani PL et al. A phase II trial of CHOP chemotherapy followed by yttrium 90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin) for previously untreated elderly diffuse large B- cell lymphoma patients. *Ann Oncol*. 2008 Apr;19(4):769-73.
11. Zinzani PL. et al Phase II trial of short-course R-CHOP followed by ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in previously untreated high-risk elderly diffuse large B-cell lymphoma patients.. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 1;16(15):3998-4004.
12. Zinzani PL, A phase II trial of short course fludarabine, mitoxantrone, rituximab followed by ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in untreated intermediate/high-risk follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2011 May 2.
13. Younes A, Kadin ME. Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligand and receptors in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 15;21(18):3526-34.
14. Chiarle R. et al. CD30 in normal and neoplastic cells. *Clin Immunol* 1999;90:157-64.
15. Duckett CS. et al. CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signalling and the control of cell survival. *Genes Dev* 1997;11:2810-21.
16. Mir SS. et al. Differential effect of CD30 activation in anaplastico large cell lymphoma and Hodgkin disease cell. *Blood* 2000; 4307-12.
17. Wilson NS. et al. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 2009; 10:348-55.
18. Sanderson RJ. et al. In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate. *Clin Cancer Res* 2005; 11:843-52.
19. Conner SD. et al. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422:37-44.
20. Alley SC. et al. Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr Opin Chem Biol* 2010;14:529-37.

BIOLOGIA E TERAPIA DELLE LEUCEMIE LINFOBLASTICHE ACUTE

Dipartimento di Ematologia e Oncologia "L. & A. Seràgnoli"

Università di Bologna

Via Massarenti 9, 40127 Bologna

Indice

1. Sommario	3
2. Introduzione	Errore. Il segnalibro non è definito.
Leucemia Linfoblastica Acuta	Errore. Il segnalibro non è definito.
3. Obiettivi dello studio	Errore. Il segnalibro non è definito.
4. Disegno dello studio	5

BIOLOGIA E TERAPIA DELLE LEUCEMIE LINFOBLASTICHE ACUTE

1. Sommario

La leucemia linfoblastica acuta (LAL) è un disordine eterogeneo caratterizzato dall'acquisizione somatica di alterazioni genetiche da parte della cellula progenitrice commissionata al differenziamento linfoide, che ne modificano i meccanismi normali di proliferazione e differenziazione. Negli ultimi anni, un sempre maggior numero di nuove mutazioni geniche e variazioni epigenetiche sono state identificate, che hanno evidenziato l'enorme eterogeneità genetica e molecolare di questa patologia. La scoperta di alcuni di questi cambiamenti genetici è stata facilitata dallo sviluppo di nuove tecnologie, quali l'analisi del profilo di espressione genica (GEP) e l'analisi dei polimorfismi a carico dei singoli nucleotidi (SNP).

La definizione diagnostica di questo gruppo di patologie, grazie alle nuove acquisizioni in termini patogenetici, si è pertanto modificata negli ultimi anni, con conseguente impatto clinico rilevante. In particolare, l'identificazione di alterazioni citogenetiche e molecolari ben determinate ha consentito sia di mettere a punto una stratificazione prognostica di questo gruppo eterogeneo di patologie, sia di aprire la strada allo sviluppo di nuovi farmaci ad azione mirata nei confronti dei principali target molecolari. Nell'ambito delle Leucemie Acute Linfoblastiche Philadelphia positive, per esempio, che rappresentano circa il 30% delle LAL ad insorgenza nell'età adulta, lo sviluppo e il trattamento con gli inibitori Tiroso Kinasi ha sensibilmente rivoluzionato l'andamento clinico dei pazienti affetti da questa patologia, modificandone in seno favorevole la prognosi.

Data la bassa incidenza di questa patologia nell'età adulta, tuttavia, si rende necessario valutare l'utilizzo di queste nuove molecole su ampie casistiche prospettiche, al fine di meglio identificare il ruolo di alcune alterazioni molecolari in ambito patogenetico, e del relativo potenziale impatto clinico. Lo scopo di questo progetto di ricerca sarà quindi: 1) l'implementazione e l'ottimizzazione delle terapie molecolarmente mirate delle LAL, sia Philadelphia positive che Philadelphia negative 2) l'identificazione delle caratteristiche biologiche e molecolari rilevanti sul piano terapeutico e prognostico per il trattamento e la prognosi di queste malattie.

2. Introduzione

La Leucemia Linfoblastica Acuta

Durante gli ultimi anni, sono emersi nuovi sviluppi nella diagnosi e nel trattamento delle LAL. Gli avanzamenti nelle tecnologie di genomica hanno permesso di identificare numerose alterazioni cromosomiche e molecolari che, in associazione a fattori non ancora conosciuti, cooperano alla insorgenza di questo gruppo eterogeneo di patologie. In particolare, sia nell'ambito delle Leucemia Acute Linfoblastiche Philadelphia positive, che presentano cioè la traslocazione t(9;22)(q34;q11) e il riarrangiamento BCR-ABL1 che ne deriva, sia nel contesto delle Leucemie Acute Linfoblastiche Philadelphia negative, la scoperta di nuovi indicatori molecolari ha permesso una miglior stratificazione prognostica e lo sviluppo di molecole specifiche, alcune delle quali in fase precoce di sperimentazione clinica.

Per quanto concerne il gruppo rappresentato dalle Leucemie Acute Linfoblastiche Philadelphia Positive, l'utilizzo degli inibitori Tirocino Kinasci di prima e di seconda generazione ha modificato favorevolmente l'andamento clinico dei pazienti, in termini di tassi di remissione completa, offrendo inoltre un profilo di tossicità sensibilmente più favorevole rispetto agli approcci convenzionali basati sulla chemioterapia. Ciononostante, l'insorgenza di meccanismi di resistenza, più frequentemente rappresentati dal riscontro di mutazioni puntiformi a carico del gene ABL, ha imposto lo sviluppo di nuovi inibitori di terza generazione che, all'interno di studi clinici di fase II-III sono tuttora oggetto di sperimentazione.

Nell'ambito delle Leucemie Acute Linfoblastiche Philadelphia negative, l'approccio terapeutico attuale si basa su un programma chemioterapico mutuato dall'esperienza maturata nel contesto pediatrico, basata su regimi intensificati di polichemioterapia. L'identificazione di pathway molecolari responsabili della patogenesi di questo gruppo eterogeneo di leucemie (p53, Hedgehog), ha aperto la strada allo sviluppo di nuove molecole, attualmente in fase precoce di sperimentazione clinica.

3. Obiettivi dello studio

I principali obiettivi di questo progetto di ricerca sono:

- Miglioramento ed implementazione delle terapie molecolari "target" nei pazienti con LAL

- Identificazione di caratteristiche biologiche e molecolari rilevanti per la patogenesi, il trattamento e la prognosi di queste patologie

4. Disegno dello studio

Il progetto ha una durata di 3 anni e si basa sulla integrazione tra attività clinica di diagnosi e trattamento dei pazienti con Leucemia Acuta Linfoblastica e ricerca traslazionale, che richiede la raccolta di campioni di sangue midollare dei pazienti stessi. In dettaglio, il progetto si articolerà in tre fasi principali:

1. Terapia delle LAL con terapie molecolari “target”

L'attività di ricerca prevede::

- Conduzione di studi clinici di Fase I-II con nuove terapie target
- Monitoraggio dei parametri clinici e di laboratorio dei pazienti con LAL trattati con queste nuove molecole
- Analisi dei risultati in termini di efficacia e sicurezza nel breve e lungo termine con l'utilizzo di queste nuove molecole

2. Identificazione di caratteristiche biologiche e molecolari rilevanti per la patogenesi, la terapia e la prognosi delle LAL

Per la realizzazione di questo progetto saranno raccolti campioni di sangue midollare, al momento della diagnosi e a differenti timepoints successivi all'inizio della terapia stessa, in particolare dopo ogni ciclo di terapia sperimentale, al momento della eventuale ricaduta o progressione di malattia o qualora si documenti la resistenza alla terapia stessa.

I metodi di studio comprendono:

- a) analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP arrays) su DNA estratto dalle cellule blastiche dei pazienti trattati, al fine di identificare lesioni genetiche (variazioni del numero di copie e disomia uniparentale) non altrimenti identificabili
- b) sequenziamento dell'intero trascrittoma dei pazienti con LAL per identificare nuove anomalie coinvolte nella patogenesi e nei meccanismi responsabili della progressione di malattia
- c) separazione di cellule staminali CD34 (+) CD38 (-), con analisi morfologica e funzionale delle popolazioni cellulari mediante immunofenotipo e profilo di espressione genica
- d) correlazione tra dati molecolari e risposta clinica alla terapia

BIOLOGY AND TREATMENT OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIAS

**Department of Hematology and Oncology "L. & A. Seràgnoli"
University of Bologna
Via Massarenti 9, 40127 Bologna**

Index

1. Summary 3

2. Background 4

 Acute lymphoblastic leukemia..... 4

3. Objectives of the study 4

4. Design of the study..... 5

BIOLOGY AND TREATMENT OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIAS

1. Summary

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a heterogeneous disorder characterized by the acquisition of somatic genetic alterations by the lymphoid progenitor cell differentiation committed cell, which alter the normal mechanisms of proliferation and differentiation. In recent years, an increasing number of new genetic mutations and epigenetic changes have been identified, which showed the enormous genetic and molecular heterogeneity of this disease. The discovery of some of these genetic changes has been facilitated by the development of new technologies, such as analysis of gene expression profiling (GEP) and the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs Array). The diagnostic definition of this group of diseases, thanks to new acquisitions in pathogenetic terms, has been therefore modified in recent years, resulting in significant clinical impact. In particular, the identification of cytogenetic and molecular alterations has allowed clinicians to develop a prognostic stratification of this heterogeneous group of disorders, opening the way for the development of new targeted drugs against the main molecular targets. As for Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia, for example, which represents approximately 30% of adult ALL, the development and treatment with tyrosine kinase inhibitors has greatly revolutionized the clinical course of patients with this disease, characterized by an improved prognosis. Given the low incidence of this pathology in adulthood, however, it is necessary to evaluate the use of these new molecules in large series of perspective trials, in order to better identify the pathogenetic role of some molecular alterations and their potential impact clinical. The purpose of this research project will be: 1) the implementation and optimization of molecularly targeted therapy of Philadelphia positive and Philadelphia negative ALL; 2) identification of relevant molecular alterations, and their role in terms of prognostic and therapeutic impact.

2. Background

Acute lymphoblastic leukemia

During the recent years, new developments in diagnosis and treatment of ALL have been reached. Advances in genomic technologies have identified numerous chromosomal and molecular alterations, in combination with factors not yet known, which cooperate to the onset of this heterogeneous group of disorders. In particular, both in Philadelphia positive ALL, which is characterized by the translocation t (9; 22) (q34, q11) and the presence of BCR-ABL1 rearrangement, and in the context of Philadelphia negative ALL, the discovery of new molecular markers has allowed a better prognostic stratification and development of specific compounds, some of which involved in the early phases of clinical development. As for the group represented by the Philadelphia Positive ALL, the use of first and second generation tyrosine kinase inhibitors, has favorably altered the patients clinical course, in terms of complete remission rates, and offering a toxicity profile significantly more favorable if compared to standard conventional chemotherapy. However, the onset of resistance, most often represented by the detection of point mutations in the *ABL* gene, has required the development of new third-generation inhibitors, currently tested in phase II-III clinical trials. As part for Philadelphia negative ALL, the current therapeutic approach is based on a chemotherapy program borrowed from the experience gained in the pediatric population, based on intensified regimens of standard chemotherapy. The identification of molecular pathways responsible for the pathogenesis of this heterogeneous group of leukemias (e.g. p53, Hedgehog), has pioneered the development of new molecules, currently in early clinical development.

3. Objectives of the study

The main objectives of this research project are:

- Improvement and implementation of molecular therapies "target" in patients with ALL
- Identification of the molecular and biological characteristics relevant to the pathogenesis, treatment and prognosis of these diseases

4. Design of the study

The project has a duration of 3 years and provides integration between the clinical activity of diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia patients and translational research, which required the use of bone marrow and peripheral blood patients samples. In detail, the research will follow three main directions:

1. Treatment of ALL with molecularly targeted drugs

The research includes :

- Conduction of Phase I-II clinical trials, based on new targeted therapies
- Monitoring of clinical and laboratory parameters of patients with ALL treated with these new molecules
- Analysis of the results in terms of efficacy and safety in the short and long term use of these new compounds

2. Identification of the molecular and biologic features relevant for the pathogenesis, treatment and prognosis of ALL

For the realization of this project, peripheral blood and bone marrow patients samples will be collected at diagnosis and at different timepoints after the start of the therapy, particularly after each cycle of experimental therapy, at any time of relapse or disease progression or if resistance to therapy is documented. The methods of study include: a) analysis of single nucleotide polymorphisms (SNP arrays) on DNA extracted from the blast cells of treated patients, in order to identify genetic lesions (changes in the number of copies and uniparental disomy) not otherwise identifiable b) sequencing of the entire transcriptome of patients with ALL to identify new anomalies involved in the pathogenesis and mechanisms responsible for disease progression c) the separation of stem cells CD34 (+) CD38 (-), with morphological and functional analysis of cell populations by immunophenotype and gene expression profile d) correlation between molecular data and clinical response to therapy.

ALL. N. 4

**BIOLOGIA E TERAPIA DELLE
LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE**

Dipartimento di Ematologia e Oncologia "L. & A. Seràgnoli"
Università di Bologna

Via Massarenti 9, 40127 Bologna

Indice

1. Sommario.....	4
2. Introduzione	Errore. Il segnalibro non è definito.
Leucemia Mieloide Acuta.....	Errore. Il segnalibro non è definito.
3. Obiettivi dello studio	5
4. Disegno dello studio.....	6

BIOLOGIA E TERAPIA DELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE

1. Sommario

La leucemia mieloide acuta (LAM) è un disordine eterogeneo caratterizzato dall'acquisizione somatica di alterazioni genetiche ed epigenetiche da parte della cellula staminale ematopoietica, che ne modificano i meccanismi normali di *self-renewal*, proliferazione e differenziazione. Negli ultimi anni, un sempre maggior numero di nuove mutazioni geniche e variazioni epigenetiche sono state identificate, che hanno evidenziato l'enorme eterogeneità molecolare di questa patologia. La scoperta di alcuni di questi cambiamenti genetici è stata facilitata dallo sviluppo di nuove tecnologie, quali l'analisi del profilo di espressione genica (GEP) e l'analisi dei polimorfismi a carico dei singoli nucleotidi (SNP).

La definizione diagnostica di questo gruppo di patologie, grazie alle nuove acquisizioni in termini patogenetici, si è pertanto modificata negli ultimi anni, con conseguente impatto clinico rilevante. Secondo la più recente classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), più della metà dei casi di AML sono infatti codificati in base al loro difetto genetico di fondo, andando così ad identificare entità clinico-patologiche distinte. Inoltre, le alterazioni citogenetiche e molecolari si sono dimostrate essere fra gli indicatori prognostici più rilevanti. Pertanto, nuove terapie mirate nei confronti di specifici target molecolari sono in corso di sperimentazione clinica. Quali gli inibitori tirosino chinasi (TKI) e gli agenti demetilanti.

Da un punto di vista clinico, l'utilizzo di questi biomarkers nella pratica medica presenta ancora alcuni limiti. In particolare, il loro effetto prognostico è stato dimostrato, nella maggior parte dei casi, in studi retrospettivi, spesso all'interno di popolazioni di pazienti poco numerose. Pertanto, al fine di meglio identificare il ruolo di alcune alterazioni molecolari in ambito patogenetico, e del relativo potenziale impatto clinico, è necessario valutare l'utilizzo di queste nuove molecole su più ampie casistiche prospettiche.

Lo scopo di questo progetto di ricerca sarà quindi: 1) l'implementazione e l'ottimizzazione delle terapie molecolarmente mirate delle LAM, 2) l'identificazione delle caratteristiche biologiche e molecolari rilevanti sul piano patogenetico, terapeutico e prognostico per il trattamento di queste malattie.

2. Introduzione

La Leucemia Mieloide Acuta

La recente introduzione di nuove metodiche molecolari ha permesso di raggiungere nuovi sviluppi nella diagnosi e nel trattamento delle LAM. L'identificazione di parte delle alterazioni genetiche e molecolari che caratterizzano questo gruppo eterogeneo di patologie ne hanno profondamente modificato i criteri di classificazione, rappresentandone ad oggi gli elementi principali. La storica classificazione basata sulle caratteristiche citogenetiche (cariotipo favorevole, sfavorevole o intermedio) è stata infatti approfondita dall'introduzione di alcune alterazioni molecolari. I pazienti citogeneticamente normali, che rappresentano circa 1/3 di tutti i casi di LAM, vengono ulteriormente classificati sulla base della presenza di alterazioni molecolari, alcune delle quali portatrici di implicazioni prognostiche rilevanti. Per esempio, le mutazioni ITD del gene FLT3 (FML-come la duplicazione in tandem interna della chinasi 3 della tirosina) si associano ad un fenotipo aggressivo, caratterizzato da prognosi sfavorevole. Al contrario, i pazienti con mutazione biallelica del gene CEBPA (che codifica per la proteina CCAAT) e NPM1 (nucleofosmina 1), in assenza della mutazione concomitante di FLT3- ITD identifica un sottogruppo a prognosi più favorevole. La presenza di altre mutazioni, come per esempio quella a carico del gene c-kit, è in grado di annullare il carattere prognosticamente favorevole correlato ad alcune alterazioni citogenetiche, come la traslocazione t(8;21) e l'inversione del cromosoma 16. Pertanto, l'identificazione di molecole ad attività mirata nei confronti delle suddette alterazioni, e di quelle che ancora non sono completamente note, si rende necessaria al fine di mettere a punto strategie terapeutiche "personalizzate", che possano migliorare i risultati sinora ottenuti, in termini di sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da malattia, con l'approccio chemioterapico standard, tuttora basata, come 40 anni fa, sull'associazione di Citosina Arabinoside e antracicline.

3. Obiettivi dello studio

I principali obiettivi del presente progetto di ricerca saranno:

- Implementare e ottimizzare le terapie molecolarmente mirate della LAM

- Identificare quali sono le caratteristiche biologiche e molecolari rilevanti sul piano patogenetico, prognostico e terapeutico

4. Disegno dello studio

Il progetto ha una durata di 3 anni e prevede un'integrazione fra l'attività clinica di diagnosi e cura dei pazienti affetti da LMA e l'attività di ricerca traslazionale, di natura biologica, per cui saranno utilizzati campioni di sangue midollare prelevati dai pazienti trattati presso questo Istituto all'interno di protocolli clinici.

In dettaglio, l'attività di ricerca seguirà 3 principali direzioni:

1. Terapia della LAM con farmaci a target molecolare

In dettaglio, l'attività di ricerca prevede 3 fasi:

- Conduzione di studi clinici di fase I-II che prevedono la sperimentazione di nuovi farmaci a target molecolare
- Monitoraggio dell'andamento clinico e di laboratorio dei pazienti con LAM trattati all'interno dei suddetti studi clinici
- Analisi a breve e a lungo termine dei dati di efficacia e sicurezza d'impiego delle suddette molecole

2. Identificazione delle caratteristiche biologiche e molecolari rilevanti sul piano patogenetico, terapeutico e prognostico nella LAM

Per la realizzazione di tale attività, saranno raccolti campioni di sangue midollare. Tali campioni verranno raccolti prima dell'inizio della terapia e a vari intervalli dall'inizio della terapia, in particolare dopo ogni ciclo di terapia sperimentale e al momento di eventuale fallimento della terapia, a causa di resistenza, progressione di malattia o intolleranza. I metodi di studio comprendono:

- a) analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP array) su DNA estratto da blasti leucemici, allo scopo di identificare altre lesioni genetiche responsabili della patogenesi della malattia
- b) sequenziamento massivo dell'intero trascrittoma (*whole deep transcriptome sequencing*) dei pazienti con LAM al fine di identificare nuove alterazioni coinvolte nella patogenesi/progressione di malattia

c) separazione di cellule staminali CD34(+)CD38(-), con caratterizzazione morfologica e funzionale di tali popolazioni cellulari mediante analisi immunofenotipica e gene expression profiling

d) correlazione fra i dati così ottenuti e i dati clinici di risposta alla terapia

ALL. N.4 A

**BIOLOGY AND TREATMENT OF
ACUTE MYELOID LEUKEMIAS**

Department of Hematology and Oncology "L. & A. Seràgnoli"
University of Bologna
Via Massarenti 9, 40127 Bologna

Index

1. Summary.....	3
2. Background.....	4
Acute myeloid leukemia.....	4
3. Objectives of the study.....	4
4. Design of the study.....	5

BIOLOGY AND TREATMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIAS

1. Summary

Acute myeloid leukemia (AML) is a genetically heterogeneous disorder characterized by the somatic acquisition of genetic and epigenetic alterations in hematopoietic progenitor cells that perturb normal mechanisms of self-renewal, proliferation, and differentiation. In the last years, an increasing number of gene mutations, deregulated expression of genes and noncoding RNAs (miRNAs), and epigenetic changes have been identified deciphering the enormous molecular heterogeneity of the disease. The discovery of some of these genetic changes has been largely facilitated by the development of genomics technologies such as global gene-expression analysis, next-generation sequencing, and single nucleotide polymorphism (SNP) array analysis.

In recent years, there has been increasing translation of genetic diagnostics into the clinical setting. In the current World Health Organization (WHO) classification, more than half of AML cases are categorized on the basis of their underlying genetic defect, in part defining distinct clinicopathologic entities. Furthermore, cytogenetic and molecular genetic changes have been shown to be among the most powerful prognostic markers. Finally, novel therapies are being developed that target some of these genetic and epigenetic changes, such as the use of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and demethylating agents.

There are still limitations with respect to the use of these new biomarkers in clinical practice. The prognostic impact of some of the markers was mostly evaluated in retrospective studies, often with relatively low patient numbers and not taking into account interactions with other molecular markers. Furthermore, for clinical decision making, predictive markers that are attributed to the clinical benefit of a specific treatment are needed.

The purpose of this research project will be: 1) the implementation and optimization of molecularly targeted therapies of AML, 2) the identification of biologic and molecular features which are relevant for the pathogenesis, treatment and prognosis of these diseases .

2. Background

Acute myeloid leukemia

In the last few years, there have been several practice-changing developments in the diagnosis and treatment of AML. Advances in genomics technologies have identified AML as a genetically highly heterogeneous disease, and an increasing number of AML patients can now be categorized into distinct clinicopathologic subgroups on the basis of their underlying molecular genetic defects. The old “favorable, intermediate, and unfavorable” prognostic categories, which were based on cytogenetic risk groups, are no longer adequate. Cytogenetically normal patients, who comprise the largest subgroup and have historically been assigned an “intermediate” prognosis, can now be further divided into a myriad of molecular subgroups, some of which are known to have significant prognostic implications. For example, mutations in FLT3-ITD (FML-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication) have been associated with an aggressive disease phenotype and poor outcomes. In contrast, patients with biallelic mutations in CEBPA (CCAAT enhancer-binding protein) and NPM1 (nucleophosmin 1) without concomitant mutations in FLT3-ITD have significantly more favorable outcomes. Prognostically important mutations have also been identified in patients with abnormal cytogenetics; for example, mutations in KIT may negate the “favorable” classification previously associated with t(8;21). The discovery of new molecular markers allows the development of specific target molecules, in order to improve the results obtained by the mainstay of initial treatment, which is still represented, from 40 years, by cytosine arabinoside (ara-C) combined with an anthracycline.

3. Objectives of the study

The main objectives of this research project are:

- Implementation and optimization of molecularly targeted therapies of AML

- Identification of the molecular and biologic features relevant for the pathogenesis, treatment and prognosis of these diseases

4. Design of the study

The project has a duration of 3 years and provides integration between the clinical activity of diagnosis and treatment of patients with acute myeloid leukemia and translational research, which required the use of samples of bone marrow blood of the patients. In detail, the research will follow three main directions:

1. Treatment of AML with molecularly targeted drugs

The activity will include:

- Conducting of clinical Phase I-II clinical trials with new targeted drugs
- Monitoring of clinical and laboratory findings of patients with AML treated with these new compounds
- Analysis of short and long-term data of efficacy and safety of the use of these new molecules

2. Identification of the molecular and biologic features relevant for the pathogenesis, treatment and prognosis of AML

For the realization of this activity samples of bone marrow will be collected. These samples will be collected at diagnosis and at various intervals after initiation of therapy, in particular after every cycle of experimental therapy, and at the time of eventual treatment failure due to resistance, disease progression or intolerance.

The methods of study include:

- a) analysis of single nucleotide polymorphisms (SNP arrays) on DNA extracted from blast cells of patients, to identify genetic lesions (copy number changes and events of uniparental disomy) not otherwise identifiable
- b) whole deep transcriptome sequencing of the patients with AML to identify new abnormalities involved in the pathogenesis/progression of disease
- c) separation of stem cells CD34 (+) CD38 (-), with morphological and functional analysis of these cell populations by immunophenotyping, and gene expression profiling
- d) correlation between the data thus obtained and the clinical response to therapy

All. n. 5

**UN PROGETTO PER LA GUARIGIONE DELLA
LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA**

Dipartimento di Ematologia e Scienze Oncologiche "L. e A. Seràgnoli",
Policlinico "S. Orsola-Malpighi", Università di Bologna, via Massarenti 9, 40138 Bologna

1. ABSTRACT

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è una patologia della cellula staminale emopoietica associata a una specifica traslocazione cromosomica nota con il nome di "Cromosoma Philadelphia (Ph)". Questa traslocazione determina la formazione del gene di fusione BCR-ABL che codifica per una proteina tirosino-chinasi con proprietà oncogeniche.

L'Imatinib (IM) è un inibitore delle tirosino-chinasi (Tyrosine-Kinase Inhibitor, TKI) che ha notevolmente aumentato la sopravvivenza dei pazienti con LMC; tuttavia, una quota significativa di pazienti è resistente o intollerante all'IM. Per tale motivo sono stati sviluppati inibitori di seconda generazione, come Dasatinib (DAS) e Nilotinib (NIL), che hanno dimostrato la loro efficacia come terapia di seconda linea. Inoltre, recentemente, DAS e NIL sono stati utilizzati in prima linea mostrando una maggiore efficacia e una migliore tollerabilità rispetto all'IM. Questi risultati hanno portato all'approvazione di NIL e DAS come terapia di prima linea.

La persistenza di malattia minima residua (Minimal Residual Disease, MRD) nella maggior parte dei pazienti preclude la sospensione dei TKIs. La MRD è sostenuta dalla presenza di cellule staminali leucemiche che non sono efficacemente eliminate dai TKIs. Nonostante ciò, in circa il 40% dei pazienti con risposta molecolare completa (Complete Molecular Response, CMR) confermata è stato possibile interrompere l'IM senza la ricaduta della malattia.

L'incidenza della LMC è bassa ma la prevalenza sta continuamente aumentando grazie all'incremento della sopravvivenza determinato dai TKIs. In considerazione dell'alto impatto sociale ed economico e dei possibili effetti collaterali a lungo termine legati all'uso prolungato dei TKI l'obiettivo futuro sarà la guarigione della LMC, rappresentata dalla sospensione della terapia senza la ricaduta della malattia.

Il presente progetto prevede: a) il disegno, la conduzione e l'analisi di studi nazionali e internazionali che testino quale sia la terapia migliore per raggiungere una CMR stabile, che è un requisito indispensabile per la sospensione della terapia. b) il disegno, la conduzione e l'analisi di studi nazionali e internazionali che esplorino la durata della CMR dopo la sospensione della terapia e che studino le caratteristiche biologiche dei pazienti ricaduti e di coloro i quali restano in CMR. c) il disegno, la conduzione e l'analisi di studi nazionali e internazionali che esplorino la fattibilità di sospensioni temporanee del trattamento, come ad esempio la terapia intermittente. d) il follow-up a lungo termine, su scala nazionale, di tutti i pazienti che sono trattati con TKIs per identificare effetti collaterali tardivi. e) la partecipazione agli studi sulle cellule staminali leucemiche, tra cui lo studio del ruolo dei micro-RNA e dei recettori purinergici nella modulazione della loro attività.

2. BACKGROUND

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è una patologia della cellula staminale leucemica associata a una specifica traslocazione cromosomica nota come Cromosoma Philadelphia (Ph).^{1,2} La conseguenza molecolare della traslocazione è la fusione del proto-oncogene Abl con il gene Bcr, che determina la produzione di una forma costitutivamente attivata della proteina tirosino-chinasi ABL^{3,4}; tale proteina conferisce un vantaggio proliferativo alla cellula leucemica, inibisce l'apoptosi e altera i meccanismi di adesione cellulare.^{5,6} È stato dimostrato che l'espressione della proteina BCR-ABL nel topo è in grado di indurre una leucemia simile alla LMC umana.⁷

Clinicamente, la LMC progredisce attraverso tre fasi distinte con grado crescente di resistenza alla terapia: la fase cronica (sopravvivenza mediana senza terapia tra i 3 e i 4 anni), la fase accelerata (sopravvivenza mediana 8-18 mesi) e la crisi blastica (sopravvivenza mediana 3-6 mesi). La maggior parte dei pazienti esordisce in fase cronica, caratterizzata da leucocitosi e splenomegalia, con generalmente pochi sintomi associati.

La LMC può essere efficacemente trattata con gli inibitori delle tirosino-chinasi (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs). L'Imatinib (IM) (Glivec, Novartis Pharma) è stato il primo TKI utilizzato nella terapia della LMC e sulla base dei risultati dello studio IRIS (International Randomized Study of Interferon vs STI571) è diventato lo standard terapeutico.⁸ Nel protocollo IRIS, dopo 6 anni di follow-up, il tasso cumulativo di risposta citogenetica completa è stato dell'82%; pertanto, non tutti i pazienti hanno raggiunto una risposta ottimale (resistenza primaria) e circa il 10% dei pazienti hanno perso la risposta precedentemente ottenuta (resistenza secondaria), soprattutto durante i primi 3 anni di terapia. Inoltre, una parte non trascurabile di pazienti ha sospeso l'IM per intolleranza.⁹ Dopo 8 anni solo il 56% dei pazienti era ancora in terapia con IM.¹⁰

Il meccanismo che più frequentemente conferisce resistenza agli inibitori di prima e seconda generazione è l'insorgenza di mutazioni puntiformi nel dominio tirosin-chinasico di ABL.

Con l'obiettivo di superare la resistenza e l'intolleranza all'IM sono stati sviluppati e utilizzati con successo inibitori di seconda generazione, Dasatinib (DAS)(Sprycel, Bristol-Myers-Squibb) e Nilotinib (NIL) (Tasigna, Novartis Pharma).^{11,12} Sebbene DAS e NIL siano attivi contro la maggior parte delle mutazioni puntiformi di ABL, la presenza della mutazione T315I conferisce una resistenza assoluta a IM, DAS e NIL.¹³

Il Ponatinib (Ariad Pharma) è un TKI di terza generazione che lega la proteina BCR-ABL anche se presente la mutazione T315I. Studi in pazienti resistenti o intolleranti a inibitori di seconda

generazione hanno mostrato risultati positivi; sono anche stati pianificati per il prossimo futuro studi per l'utilizzo del Ponatinib come terapia di prima linea.¹⁴

Negli ultimi anni, DAS e NIL sono stati studiati come terapia di prima linea della LMC dimostrando una maggiore efficacia e tollerabilità rispetto all'IM.^{15,16} In particolare sono stati ottenuti tassi di risposta citogenetica e molecolare più alti, riducendo la probabilità di progressione alle fasi accelerata e blastica. Grazie a questi risultati, sebbene siano da confermare con un più lungo follow-up, la FDA (Food and Drug Administration) e l'EMA (European Medicines Agency) hanno recentemente approvato DAS e NIL per la terapia di prima linea della CML.

Un altro punto cruciale della terapia della LMC è la persistenza di malattia minima residua (Minimal Residual Disease, MRD), dimostrabile con le più sensibili tecniche di biologia molecolare nella maggior parte dei pazienti trattati con TKIs. La MRD è probabilmente sostenuta dalla presenza di cellule staminali leucemiche Ph+ la cui sopravvivenza non è dipendente dall'attivazione di BCR-ABL; per tale motivo sono resistenti ai TKIs.¹⁷⁻¹⁹ Viceversa, un'importante via di segnalazione per la sopravvivenza della cellula staminale leucemica recentemente scoperta è quella di HedgeHog, attraverso il suo recettore Smoothed (Smo); inibitori di Smo sono stati sviluppati e sono attualmente testati nell'ambito di studi clinici.²⁰ Altri meccanismi potenzialmente coinvolti nella sopravvivenza della cellula staminale leucemica, come ad esempio micro-RNAs e recettori purinergici, sono in fase di studio pre-clinico.

Ciò nonostante, in una piccola quota di pazienti la MRD non è evidenziabile; questa condizione è definita come risposta molecolare completa (Complete Molecular Response, CMR). In un recente studio, il 41% dei pazienti che hanno sospeso IM dopo una CMR stabile da almeno 2 anni non sono ricaduti; inoltre, i pazienti ricaduti hanno ottenuto nuovamente una risposta molecolare dopo la ripresa della terapia con IM.²¹

Con queste premesse, il prossimo passo sulla strada della guarigione della LMC sarà aumentare il tasso di CMR, che è un requisito imprescindibile per la sospensione con successo della terapia con TKIs; una migliore e più approfondita comprensione dei meccanismi e dei bersagli molecolari che stanno alla base della persistenza delle cellule staminali leucemiche costituisce la controparte biologica di questo processo.

La LMC è una patologia rara, con un'incidenza secondo le diverse casistiche di 1-3 casi/100.000 persone/anno. Tuttavia, la prevalenza è in continuo aumento grazie al successo della terapia con TKIs.²²

In considerazione della bassa incidenza della LMC, la cooperazione di diversi Centri Ematologici costituisce il modo ottimale di condurre studi clinici su questa patologia. Il Dipartimento di Ematologia e Scienze Oncologiche "L. e A. Seràgnoli" dell'Università di Bologna, è uno dei Centri leader del GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto) CML (Chronic Myeloid Leukemia) Working Party (WP), che unisce oltre 100 Centri Ematologici Italiani e dell'ELN (European LeukemiaNet) CML WP che unisce i più importanti Centri Ematologici Europei. Questi due Gruppi Cooperatori sulla LMC hanno condotto numerosi studi clinici e continuano a lavorare per l'ulteriore miglioramento della terapia della LMC.

3. OBIETTIVI DEL PROGETTO

Questo progetto di ricerca si colloca in un programma Europeo volto alla trasformazione della LMC da una patologia cronica, trattata continuativamente, a una condizione che non richieda più una terapia cronica, ottenendo quindi, possibilmente, la guarigione della malattia.

Esistono diverse ragioni pratiche che rendono tale obiettivo molto importante:

- a) In seguito al successo dell'attuale terapia la prevalenza della LMC sta continuamente aumentando e si stima possa raddoppiare ogni 5-7 anni. Ciò condurrebbe a rilevanti problemi finanziari e logistici per qualsiasi sistema sanitario.
- b) Vivere con una patologia cronica che richiede una continua assunzione della terapia incide significativamente sulla qualità di vita, in particolare dei pazienti più giovani, essendo un ostacolo alla pianificazione della vita familiare, all'organizzazione del lavoro, ecc.
- c) I TKIs hanno multipli bersagli molecolari ed è ipotizzato che a causa di effetti fuori-bersaglio di questi farmaci, la tossicità a lungo termine possa costituire un problema, in particolare per quanto riguarda il sistema cardiovascolare, l'apparato respiratorio, il metabolismo glucidico e quello osseo.

Gli specifici obiettivi del progetto sono:

- 1) Il disegno, la conduzione e l'analisi di studi nazionali e internazionali che testino quale sia la terapia più efficace per raggiungere una CMR stabile, che è un requisito indispensabile per la sospensione della terapia. Saranno attivati i seguenti studi:
 - i) Uno studio con il NIL in prima linea
 - ii) Uno studio sulla combinazione di TKIs con farmaci attivi sulle cellule staminali leucemiche in seconda linea. In seguito tale combinazione sarà studiata in prima linea.
 - iii) Uno studio con TKIs di seconda generazione, in seconda linea, in pazienti che abbiano ricevuto una stabile risposta ottimale (ma non CMR) con IM.
 - iv) Uno studio con TKIs di terza generazione (Ponatinib) in prima linea.
- 2) Il disegno, la conduzione e l'analisi di studi nazionali e internazionali che esplorino la durata della CMR dopo l'interruzione della terapia con TKIs e che studino le caratteristiche biologiche dei pazienti ricaduti e di chi rimane in CMR.

- 3) Il disegno, la conduzione e l'analisi di studi nazionali che esplorino la fattibilità d'interruzioni temporanee della terapia con TKIs (es. terapia intermittente).
- 4) Il follow-up a lungo termine di tutti i pazienti trattati con TKIs a livello nazionale per identificare effetti collaterali tardivi.
- 5) Partecipazione agli studi biologici sulle cellule staminali leucemiche: caratterizzazione (molecolare, proteomica, cinetica e funzionale) delle cellule staminali leucemiche Ph+, in particolare sulla modulazione della loro attività da parte di micro-RNA e dei recettori purinergici. Identificazione di possibili relazioni tra queste caratteristiche biologiche e il risultato clinico dei pazienti trattati con TKIs.

4. ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO

Il progetto sarà condotto all'interno del Gruppo di ricerca sulla LMC del Dipartimento di Ematologia e Scienze Oncologiche "L. e A. Seràgnoli" dell'Università di Bologna che contiene tutte le strutture e la competenza necessaria per lo sviluppo clinico, per il supporto logistico e informatico e per la conduzione degli studi in laboratorio della LMC.

Il primo anno sarà dedicato all'analisi dei numerosi studi che sono già in corso: protocollo GIMEMA CML 0307, CML 0408 e INTERIM; saranno inoltre pianificati i nuovi studi con gli inibitori di terza generazione, gli studi di combinazione tra TKIs e i farmaci attivi sulle cellule staminali leucemiche, gli studi di sospensione della terapia dei pazienti in CMR.

Il secondo e il terzo anno saranno dedicati alla conduzione e gestione di questi studi, insieme alla raccolta di un registro con gli effetti collaterali tardivi della terapia con TKIs.

Durante l'intero periodo, il compito principale del ricercatore sarà la gestione dello studio GIMEMA CML 0811 così come di tutti gli studi che esplorino l'effetto della terapia con NIL in prima linea sul tasso di CMR, sulla sua durata e sul tasso di ricaduta molecolare dopo la sospensione della terapia. Inoltre il ricercatore sarà impegnato negli studi biologici sulla caratterizzazione delle cellule staminali leucemiche e sulle possibili relazioni tra dati biologici e clinici.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Nowell P, Hungerford D: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497, 1960
2. Rowley JD: Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290-3, 1973
3. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, et al: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315:550-4, 1985
4. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al: Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247:1079-82, 1990
5. Sawyers CL: Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 340:1330-40, 1999
6. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96:3343-56, 2000
7. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247:824-30, 1990
8. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al: Five-year follow-up of patients receiving IM for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355:2408-17, 2006
9. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, et al: Six-year follow-up of patients receiving IM for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 23:1054-61, 2009
10. Deininger MW, O'Brien SG, Guilhot F, et al: International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with IM. *Blood*. ASH Annual Meeting. 109:Abstract 1126, 2009
11. Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, et al: NIL is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after IM resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood* 117:1141-5, 2011
12. Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, et al: Intermittent target inhibition with DAS 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in IM-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 26:3204-12, 2008
13. Bixby D, Talpaz M: Seeking the causes and solutions to IM-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 25:7-22, 2011

14. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al: AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 16:401-12, 2009
15. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al: DAS versus IM in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362:2260-70, 2010
16. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al: NIL versus IM for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362:2251-9, 2010
17. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, et al: Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99:319-25, 2002
18. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al: DAS (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than IM in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 107:4532-9, 2006
19. Konig H, Holtz M, Modi H, et al: Enhanced BCR-ABL kinase inhibition does not result in increased inhibition of downstream signaling pathways or increased growth suppression in CML progenitors. *Leukemia* 22:748-55, 2008
20. Lin, T. L. and W. Matsui: Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. *Onco Targets Ther* 5: 47-58, 2012
21. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, et al: Discontinuation of IM in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop IM (STIM) trial. *Lancet Oncol* 11:1029-35, 2010
22. Rohrbacher, M. and J. Hasford: Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol* 22(3): 295-302, 2009

All. n. 5/A

A PROJECT FOR THE CURE OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Department of Hematology and Oncological Sciences "L. and A. Seràgnoli"
S.Orsola-Malpighi Hospital, University of Bologna, Via Massarenti 9, 40138, Bologna, Italy

1. ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a hematopoietic stem cell disorder associated with a specific chromosomal translocation known as the Philadelphia (Ph) chromosome. This translocation determines the formation of the fusion gene BCR-ABL that codes for a protein tyrosine-kinase with oncogenic activity.

Imatinib is a tyrosine-kinase inhibitor (TKI) that significantly improved survival of CML patients; however, a significant proportion of patients is resistant or intolerant to Imatinib. Therefore second generation TKIs, Dasatinib and Nilotinib, have been developed and demonstrated their efficacy as second line therapy. Recently, first line treatment with Dasatinib or Nilotinib showed higher efficacy and better tolerability compared to Imatinib, leading to their approval by FDA and EMEA as first line treatment.

The persistence of Minimal Residual Disease (MRD) in the majority of patients precludes the discontinuation of TKIs. MRD is sustained by the presence of leukemic stem cells that are not significantly affected by TKIs. Nevertheless, in 40% of patients in stable complete molecular response (CMR) it was possible to discontinue Imatinib without relapse of the disease.

The incidence of CML is low but the prevalence is steadily increasing due to the improved survival. Giving the high economical and social impact and the possible late side-effects of continuous treatment with TKIs the main objective in the future treatment of CML will be TKIs discontinuation.

The present project is aimed at: a) The design, the operation, and the analysis of national and international studies testing which treatment is better for achieving a stable CMR that is a prerequisite for treatment discontinuation. b) The design, the operation, and the analysis of national and international studies exploring the duration of the CMR after treatment discontinuation and investigating the biologic characteristics of relapse and of those who remains in CMR. c) The design, the operation and the analysis of national studies exploring the feasibility of temporary treatment discontinuations, like intermittent treatment. d) The long-term follow-up, on national basis, of all the patients who are treated with TKIs, to identify late, off-target side effects. e) Contribution to the biological studies on leukemic stem cells: characterization (molecular, proteomic, kinetic, functional) of CML leukemic stem cells, including the role of micro-RNAs and of purinergic receptors in the modulation of their activity.

2. BACKGROUND

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a hematopoietic stem cell disorder associated with a specific chromosomal translocation known as the Philadelphia (Ph) chromosome.^{1,2} The molecular consequence of the translocation is the fusion of the Abl proto-oncogene to the Bcr gene, resulting in the production of a constitutively activated form of the ABL protein-tyrosine kinase^{3,4}, whose activity gives growth advantage to leukemic cells, increases proliferation and cytokine-independent growth, inhibits apoptosis, and alters adhesion pathways.^{5,6} Expression of the BCR-ABL protein is able to induce leukemia in mice.⁷

Clinically, CML progresses through three distinct phases of increasing refractoriness to therapy: chronic phase (CP, median duration without TKI therapy 3 to 4 years), accelerated phase (AP, median survival 8 to 18 months), and blast phase (BP, median survival 3 to 6 months). Most of patients present in chronic phase, characterized by splenomegaly and leukocytosis with generally few symptoms.

CML can be effectively treated with tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Imatinib (Glivec, Novartis Pharma) was the first TKI used in the therapy of CML and, based on the results of International Randomized Study of Interferon vs STI571 (IRIS Trial) became the gold standard treatment.⁸ In the IRIS trial, after 6-year follow-up, the cumulative complete cytogenetic response (CCgR) rate of was 82%⁹; however not all patients achieve an optimal response (primary resistance) and about 10% of patients loose the previously obtained response (secondary resistance), particularly within the first three years of treatment. Moreover, a not negligible proportion of patients discontinue Imatinib due to intolerance.⁹ After 8 years, only 56% of the patients were still on imatinib treatment.¹⁰

The mechanism that more frequently confers resistance to first and second generation TKIs is the occurrence of point mutations in the tyrosine-kinase domain of ABL.

In order to overcome imatinib resistance and intolerance second generation TKIs, Dasatinib (Sprycell, Bristol-Myers-Squibb) and Nilotinib (Tasigna, Novartis Pharma), have been developed and used successfully.^{11,12} Although Dasatinib and Nilotinib are active against the majority of ABL point mutations described, the presence of the mutation T315I confers an absolute resistance to Imatinib, Dasatinib, and Nilotinib.¹⁵

Ponatinib is a third generation TKI that binds the BCR-ABL protein even in the presence of the T315I mutation. Studies in patients resistant or intolerant to second generation TKIs are encouraging, and studies for the frontline use of Ponatinib have been planned.¹⁶

More recently, Dasatinib and Nilotinib have been studied in the front line treatment of CML demonstrating better efficacy and tolerability compared to Imatinib.^{13,14} In particular they induced a higher rates of cytogenetic and molecular response, reducing the probability of progression to accelerated-blastic phase. Based on these results, although to be confirmed with a longer follow-up, Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) have recently approved Nilotinib and Dasatinib for the front line treatment of CML.

Another crucial issue in the treatment of CML is the persistence of a minimal residual disease (MRD) that is demonstrable in the majority of patient treated with TKIs using extremely sensitive molecular biology techniques. MRD is probably supported by the presence Ph⁺ leukemic stem cells that are considered independent from BCR-ABL for their survival and therefore are resistant to TKIs.¹⁷⁻¹⁹ One important pathway in the self-renewal of leukemic stem cells is the HedgeHog signaling pathway, through its receptor Smoothed (Smo); Smo-Inhibitors have been developed and are now tested in clinical trials.²⁰ Other mechanisms, i.e. those involving micro-RNAs and purinergic receptors, are under investigation in the pre-clinical setting.

Nevertheless, in a small proportion of patient MRD is not detectable; this condition is referred as Complete Molecular Response (CMR). In a recent study a significant proportion (40%) of patients that suspended Imatinib after a stable CMR (at least 2 years) did not relapsed; importantly, patients that relapsed obtained again a molecular response after re-treatment with imatinib.²¹

On that basis, the next goal in the way to cure CML is to increase the rate of CMR, that is a prerequisite for the successfully discontinuation of TKIs; a better understanding of the mechanisms and the molecular targets that underlie the persistence of leukemic stem cells represents the biological counterpart of this process.

CML is a rare disease, with an incidence of 1-3 cases/100.000 persons/year, depending on the different series. However, prevalence is continuously increasing as a consequence of the successful treatment with TKIs.²²

Due to the low incidence of CML the optimal way to conduct clinical trials on CML is through the cooperation of different Hematologic Centres. The Department of Hematology and Oncological Sciences "L. and A. Seràgnoli", University of Bologna, is one of the leading Centres of the GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto) CML Working Party (WP), that represents

more than 100 Hematologic Centres in Italy, and of ELN (European LeukemiaNet) CML WP, that links the most important hematologic Centres in Europe. These two Cooperative Groups on CML have conducted important studies in CML and are planning clinical trials for the further improvement of CML therapy.

3. OBJECTIVES

This is a research project that is set within the framework of a multinational European programme aiming at transforming CML from a chronic condition requiring a lifelong treatment to a condition that does not require chronic treatment, resulting, possibly, in a complete cure of the disease.

There are several practical reasons that make this target important and very significant:

- a) Due to the success of current therapy, the prevalence of the disease is steadily increasing, and is estimated to double every 5 to 7 years. This will lead to financial and logistic problems for any health system.
- b) Living with chronic disease, and on continuous chronic treatment, affects substantially the quality of life, particularly of the young patients, and is a great obstacle to the family programming, work organization, insurance, etc.
- c) TKIs have multiple molecular targets and is predicted that due to the off-target effects of these agents, long-term toxicity will become a problem, particularly concerning the cardiovascular system, the respiratory system, glucose tolerance, and bone metabolism.

The specific objectives of the project are the following:

- 1) The design, the operation, and the analysis of national and international studies testing which treatment is better for achieving a stable CMR that is a prerequisite for treatment discontinuation. The following studies will be activated:
 - i) A study of Nilotinib alone frontline.
 - ii) A study of TKI in combination with stem cells inhibitors, second line, than frontline.
 - iii) A study of 2nd generation TKIs, second line, in patients who achieved a stable optimal response with Imatinib.
 - iv) A study of 3rd generation TKIs frontline.
- 2) The design, the operation, and the analysis of national and international studies exploring the duration of the CMR after treatment discontinuation and investigating the biologic characteristics of relapse and of those who remains in CMR

- 3) The design, the operation and the analysis of national studies exploring the feasibility of temporary treatment discontinuations, like intermittent treatment.
- 4) The long-term follow-up, on national basis, of all the patients who are treated with TKIs, to identify late, off-target side effects.
- 5) Contribution to the biological studies on leukemic stem cells: characterization (molecular, proteomic, kinetic, functional) of CML leukemic stem cells, including the role of micro-RNAs and of purinergic receptors in the modulation of their activity.

4. PROJECT PLAN

The project is operated within the CML research Unit of the Department of Haematology and Oncological Sciences "L. and A. Seràgnoli", that includes all the necessary facilities and competence, for the clinical development, for logistic and informatics issues, and for the studies of the biology of CML.

The first year will be dedicated to the analysis of the several studies that are already operative, namely the GIMEMA studies CML 0307, CML 0408, and INTERIM, as well as to the design of the studies of the new TKIs and of their combination with stem cell agents.

The second year and the third year will be dedicated to the operation and management of such studies, and to a registry of the late, off-target side effects of TKIs treatment.

During the whole period, the main task of the investigator will be the management of the GIMEMA study CML 0811, as well as of all the studies testing the effect of Nilotinib first line on the rate and the duration of CMR and on the rate of molecular relapse after treatment discontinuation. In addition the investigator will be involved in the biological studies on the characterization of leukemic stem cells, in particular in order to identify possible relations between biological data and clinical outcome.

BIBLIOGRAPHY

1. Nowell P, Hungerford D: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497, 1960
2. Rowley JD: Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290-3, 1973
3. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, et al: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315:550-4, 1985
4. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al: Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247:1079-82, 1990
5. Sawyers CL: Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 340:1330-40, 1999
6. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96:3343-56, 2000
7. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247:824-30, 1990
8. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al: Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355:2408-17, 2006
9. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, et al: Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 23:1054-61, 2009
10. Deininger MW, O'Brien SG, Guilhot F, et al: International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *Blood. ASH Annual Meeting.* 109:Abstract 1126, 2009
11. Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, et al: Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood* 117:1141-5, 2011
12. Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, et al: Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 26:3204-12, 2008
13. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al: Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362:2260-70, 2010

14. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al: Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362:2251-9, 2010
15. Bixby D, Talpaz M: Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 25:7-22, 2011
16. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al: AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 16:401-12, 2009
17. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, et al: Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99:319-25, 2002
18. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al: Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 107:4532-9, 2006
19. Konig H, Holtz M, Modi H, et al: Enhanced BCR-ABL kinase inhibition does not result in increased inhibition of downstream signaling pathways or increased growth suppression in CML progenitors. *Leukemia* 22:748-55, 2008
20. Lin, T. L. and W. Matsui: Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. *Onco Targets Ther* 5: 47-58, 2012
21. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, et al: Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 11:1029-35, 2010
22. Rohrbacher, M. and J. Hasford: Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol* 22(3): 295-302, 2009