

## LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

### MECANISMOS GENETICOS DE RESISTENCIA AL IMATINIB

**RAQUEL M. BENGIO, PATRICIA GARGALLO, PAULA BARREYRO, ROBERTO BITTON<sup>1</sup>, IRENE LARRIPA**

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires; <sup>1</sup>Laboratorio Novartis*

**Resumen** La resistencia al tratamiento con Imatinib resulta de mecanismos dependientes del BCR/ABL tales como la sobre-expresión y la adquisición de mutaciones de punto en sitios críticos del dominio kinasa de ABL o de diferentes mecanismos independientes, como la evolución clonal. El propósito de este estudio fue identificar las mutaciones del dominio kinasa del gen ABL y la amplificación del reordenamiento genómico BCR/ABL en pacientes con LMC con falta o pérdida de respuesta hematológica y/o citogenética al tratamiento con Imatinib. Se incluyeron 96 pacientes, de los cuales 79 fueron evaluables. En veintiseis pacientes (33%) se identificó algún mecanismo de resistencia: 20 (25%) presentaron mutaciones de punto en el dominio kinasa, 5 (6.3%) duplicación del cromosoma Ph<sup>+</sup> y solo 1 (1.2%) mostró amplificación del BCR/ABL. La mutación T315I se observó en 1 caso. La mediana de edad en los pacientes con mutaciones fue de 45 años [20-63] y la de los que no se presentaron mutaciones 49 años (24-75)  $p=0.099$ . Se detectaron mutaciones en 20 pacientes, 5 en fase crónica (25%), 12 en fase acelerada (60%) y 3 en crisis blástica (15%) ( $p=0.007$ ). La mediana de aparición de las mismas fue de 61 meses desde el diagnóstico de LMC (1.4-158) y 40 meses (1-66.5) desde el inicio de la terapia con Imatinib ( $p=0.08$  y  $p=0.224$  respectivamente). Las mutaciones en la región p-loop fueron las más frecuentes. El análisis univariado demostró que la fase avanzada de la enfermedad se asoció significativamente con presencia de mutaciones. Las mutaciones en el dominio kinasa se reconocen como el principal mecanismo de resistencia al tratamiento con Imatinib y su detección puede determinar un cambio en la estrategia terapéutica.

**Palabras clave:** leucemia mieloide crónica, resistencia al Imatinib, mutaciones

**Summary** *Chronic myeloid leukemia. Genetic mechanisms of resistance to Imatinib.* There is a subset of patients treated with Imatinib who either fail to achieve or lose hematological/ complete cytogenetic response (CCyR). Both BCR-ABL dependent and independent mechanisms of resistance have been described. We have performed an open label, multi-centric, non randomized, cross sectional study in order to investigate ABL kinase domain mutations, amplifications/overexpression of BCR-ABL transcripts in Imatinib resistant patients. A total of 96 patients (pts) were studied and 79 were evaluable. Twenty mutations were detected (25%), one patient (1.2%) had BCR-ABL amplifications with 4-6 signals in interphase nucleus and five patients (6.3%) had clonal evolution with double Ph chromosome. T315I mutation was detected in one patient. Median time from CML diagnosis and initiation of Imatinib therapy was 61 (1.4-158) and 40 (1-66.5) months respectively. ( $p=0.08$  and  $p=0.224$ ). In a univariate model, advanced stage disease at time of Imatinib failure ( $p=0.007$ ) was associated with development of mutations. P loop mutations were the most frequent. Point mutations of the Abl kinase domain appear to be the more common mechanism of Imatinib resistance. Its early detection may induce changes in therapeutic strategy such as dose escalation, combination therapy or second generation tyrosine kinase inhibitors.

**Key words:** chronic myeloid leukemia, Imatinib resistance, mutations

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden hematológico clonal que representa el 15% de las leucemias del adulto y afecta a 1-2 personas por cada 100.000 habitantes. Se describen 3 fases de la enfermedad: crónica, acelerada y blástica<sup>1</sup>. El uso del mesilato de Imatinib (Gleevec, STI571, Novartis Pharma AG)<sup>2-4, 7</sup> marcó el inicio de la era de las terapias antineoplásicas dirigidas contra blancos genéticos específicos<sup>5-7</sup> y constituye el tratamiento standard de los pacientes con LMC

en fase crónica. La resistencia al tratamiento<sup>8-10</sup> puede resultar de mecanismos dependientes del BCR/ABL tales como la sobre-expresión y la adquisición de mutaciones de punto en sitios críticos del dominio kinasa de ABL o de mecanismos independientes como la evolución cariotípica clonal, la activación de alguna tirosina kinasa (TK) alternativa, la sobre-expresión del gen de resistencia a drogas (MDR) y la presencia de células Ph<sup>+</sup> quiescentes insensibles al Imatinib. Las mutaciones de punto dentro del dominio kinasa del ABL representan uno de los mecanismos más frecuentes de reactivación de la actividad kinasa. Se ha postulado que las TK pueden modificar la

unión del fármaco mencionado por alteraciones en los sitios críticos de contacto entre el Imatinib y la proteína o inducir un cambio conformacional en el cual el Imatinib es inestable en su unión. Hasta ahora se han reportado y caracterizado un número considerable de mutaciones con diferente capacidad y grado de inducción de resistencia<sup>10-14</sup>.

Un estudio de detección de mutaciones fue diseñado y puesto en práctica por los departamentos de Clínica Hematológica y Genética de nuestro Instituto. Se trata de un estudio de corte transversal, multicéntrico, cuyo propósito es identificar las mutaciones del dominio quinasa del gen ABL. Se investiga también la amplificación del reordenamiento genómico BCR/ABL, en todos los casos, en pacientes con LMC con falta o pérdida de la respuesta hematológica y/o citogenética durante el tratamiento con Imatinib<sup>15</sup>.

## Material y métodos

Estudio multi-céntrico, abierto, no randomizado, de corte transversal. Se incluyeron pacientes mayores de 18 años, con evidencia de resistencia hematológica a los 6 meses o citogenética a los 12 meses de iniciado el tratamiento con Imatinib, como así también aquellos que perdieron la respuesta (hematológica y/o citogenética) durante la fase crónica y los que progresaron a fase acelerada o crisis blástica. Todos los pacientes fueron evaluados para mutaciones de punto en el dominio quinasa del Abl, para amplificación del gen de fusión BCR/ABL<sup>17</sup> y cuantificación de transcritos BCR/ABL. Se tomaron muestras de sangre periférica (SP) con EDTA para los estudios moleculares y con heparina para las evaluaciones citogenéticas y los estudios de FISH. Los pacientes se agruparon de acuerdo a los criterios de riesgo de Sokal en 3 categorías: Bajo riesgo: <0.8, riesgo intermedio: 0.8-1.2, alto riesgo: >1.2.

Se tomaron como criterios de resistencia al Imatinib los descriptos por Hochhaus<sup>15</sup>. Las aprobaciones para el estudio fueron revisadas por el comité de ética de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado de acuerdo a regulaciones internacionales.

**Análisis de FISH:** Para evaluar reordenamiento BCR/ABL (LSI ES BCR/ABL, Vysis, Downer Grove, IL)<sup>17, 18</sup>.

**RT-Q PCR:** Estudio de cuantificación de los transcritos BCR/ABL por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Método Syber green por Light Cycler (Roche)<sup>20</sup>.

**Método de screening de mutaciones:** Conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE)<sup>18</sup>.

**El análisis CSGE:** Se realiza mediante la amplificación por PCR del dominio quinasa del ABL de los exones 4, 5, 6 y 7 usando primers que analizan todo el dominio quinasa. Con los productos de PCR se efectúa la corrida electroforética en geles de poliacrilamida. Los patrones de señales que difieren del normal se secuencian para determinación de las mutaciones. Se usa el ABI 310 DNA xl genetic analyzer applied (Biosystems).

## Resultados

El estudio se inicia en octubre de 2005, continúa abierto y la presente evaluación corresponde a marzo de 2007.

Este análisis interino, incluye noventa y seis muestras de pacientes de diferentes centros de Argentina y Uruguay que fueron referidas para su análisis. De ellas 79 fueron evaluables para estudio. Las características de la población se expresan en la Tabla 1.

Se identificaron 26 pacientes (33%) con algún mecanismo de resistencia. Veinte pacientes (25%) presentaron mutaciones de punto en el dominio BCR/ABL quinasa, cinco (6.3%) mostraron duplicación del cromosoma Ph y sólo un paciente (1.2%) mostró amplificación en el gen de fusión BCR/ABL, asociado a una mutación. De las mutaciones encontradas, doce se ubican en el p-loop: G250E (n=2), Q252H (n=2), E255K (n=2), E255V(n=2), L248V (n=1), Y253H (n=2) y T240A (n=1), siete en el sitio de unión al Imatinib: T315I (n=1), F359C (n=1), M351T (n=2), L298V (n=1), V289F (n=1) y una en A-loop: A406S (n=1). La mediana de edad fue de 49 años para los no mutados (23-76) y 45 para los mutados (20-63)  $p=0.099$  (Tabla 2). El 25% (5/20) de las mutaciones se detectaron en fase crónica, 60% (12/20) en fase acelerada y 15% (3/20) en crisis blástica ( $p=0.007$ ). La mediana de aparición de las mismas fue de 61 meses desde el diagnóstico de LMC (1.4-158) y 40 meses (1-66.5) desde el inicio de la terapia con Imatinib. ( $p=0.08$  y  $p=0.224$  respectivamente). El análisis univariado demostró que la fase avanzada de la enfermedad se asoció significativamente con la presencia de mutaciones. El tratamiento previo con interferón, la duración del tratamiento con Imatinib y el tiempo de evolución de la enfermedad desde el diagnóstico no se asociaron con la aparición de mutaciones (Tabla 2).

Respecto al nivel de transcritos BCR/ABL por PCR cuantitativa, el 95% (19/20) de los pacientes con muta-

TABLA 1.- Características de la población

	N (%)
Sexo	
Femenino	32 (40)
Masculino	47 (60)
Sokal	
Bajo	26 (33)
Intermedio	27 (34)
Alto	26 (33)
Fase de enfermedad	
Crónica	42 (54)
Acelerada	26 (32)
Blástica	11 (14)
Tratamiento previo con Interferon	
Sí	46 (58)
No	33 (42)

TABLA 2.– *Análisis estadístico de las mutaciones*

Características	Mutación		p
	NO (N=59)	SI (N=20)	
Edad (años)	49 (23-76)	45 (20-63)	0.099
Tiempo desde diagnóstico (meses)	34.5 (4-181)	61 (1.4-158)	0.080
Duración de Imatinib (meses)	23 (3.5-68)	40 (1-66.5)	0.224
<b>Fase</b>			
Fase Crónica	37 (62.7%)	5 (25%)	0.007
Fase Acelerada	14 (23.7%)	12 (60%)	
Crisis Blástica	8 (13.6%)	3 (15%)	
<b>Tratamiento previo con IFN</b>			
NO	27 (46%)	6 (30%)	0.217
SI	32 (54%)	14 (70%)	

ciones, tenían respuestas moleculares con reducción menor a 3 log. (nula, mínima y menor). De la población evaluable (79 pacientes) el 83% presentó respuestas moleculares insuficientes. Estos resultados son coherentes con las características de la población seleccionada, si bien no fueron analizados estadísticamente. La mayoría de los pacientes presentó score de Sokal de intermedio riesgo (Tabla 1).

## Discusión

En este estudio hemos evaluado los mecanismos de resistencia en un grupo de 96 pacientes con evidencia de falta o pérdida de la respuesta hematológica y/o genética al tratamiento con Imatinib (79 evaluables) y encontramos 20 con mutaciones (25%) en el dominio kinasa, identificadas en diferentes sitios, siendo las ubicadas en p-loop las más frecuentes, en coincidencia con lo reportado por otros autores<sup>23</sup>. La mutación T315I en este análisis preliminar se encontró en 1 paciente. Existen trabajos<sup>10, 14</sup> que han reportado esta mutación en un mayor porcentaje de casos.

Bradford et al.<sup>11</sup> en 2003 demostraron que las mutaciones en el p-loop estaban asociadas con pobre pronóstico. Las curvas de supervivencia realizadas en ese trabajo indican diferencias significativas entre los casos con mutaciones en el p-loop vs. aquellas ubicadas fuera del p-loop. Nuestros 12 pacientes con mutaciones en p-loop también mostraron una mala evolución, pero debido al pequeño tamaño de la muestra no se realizó la evaluación de supervivencia.

La emergencia de mutaciones en los casos tratados con Imatinib no mostró diferencias estadísticamente significativas en relación a tiempo desde el diagnóstico y

tiempo de tratamiento con Imatinib, lo cual puede atribuirse al tamaño de la muestra, en este análisis preliminar. Jabbour et al.<sup>23</sup> encontró una asociación estadística entre la terapia previa con interferón y el desarrollo de mutaciones. En nuestro trabajo este hallazgo no ha podido ser confirmado.

La amplificación genómica fue observada en un caso que estaba en fase acelerada de la enfermedad. La identificación de este mecanismo de resistencia sugiere que aunque el Imatinib produce una disminución en los niveles de señalización dependientes de BCR/ABL, la gran cantidad de proteína oncogénica no podría ser eficientemente inhibida con las dosis convencionales de Imatinib<sup>9, 10, 20</sup>. En la literatura este fenómeno fue reportado en menor porcentaje que las mutaciones de punto del dominio ABL kinasa. Hochhaus<sup>10</sup> reportó 6% de casos con amplificación génica como mecanismo de resistencia, mientras que Gambacorti-Passerini<sup>20</sup> reporta una frecuencia de 18% en las leucemias Ph+ resistentes al Imatinib. El tiempo de seguimiento de nuestros pacientes no permite sacar conclusiones respecto al impacto de las mutaciones en la supervivencia.

Se presenta el análisis interino de un estudio único en Latinoamérica. El número de pacientes incluidos provenientes de 54 centros de Argentina y Uruguay constituyen un interesante aporte para la evaluación de los casos de resistencia al tratamiento de primera línea en LMC. Las mutaciones dentro del dominio Abl kinasa representan el principal mecanismo hasta ahora identificado en pacientes con LMC de falta o pérdida de respuestas al Imatinib. Nuestros resultados sugieren que las mutaciones deben ser identificadas, ya que permiten definir el mecanismo de resistencia en un considerable número de casos y contribuyen al adecuado replanteo de la estrategia terapéutica. La determinación cuantitativa de los

transcriptos (RT-QPCR) utilizada como monitoreo de la evolución clonal, resulta importante para la detección precoz de clones resistentes. La continuidad del estudio de mutaciones en LMC permitirá confirmar datos estadísticos actuales.

**Agradecimiento:** Al Dr. Miguel de Tezanos Pinto, por su apoyo y asesoramiento.

## Bibliografía

- Kantarjian HM, and Talpaz M. Definition of the accelerated phase of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1998; 6: 180-2.
- Deininger MW, Goldman JM, and Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3343-56.
- Jahagirdar BN, Miller JS, Shet A, Verfaillie CM. Novel therapies for chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 2001; 29: 543-56.
- Mc Glave P and Verfaillie CM. Biology and therapy of chronic myelogenous leukemia. *Hematology/Oncology Clinics* 1998, 12: 31-81.
- Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J and Matter A. GLIVEC (STI-571, Imatinib) a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev* 2002; 1: 493-502.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for the STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289:1938.
- O'Brien SG, Guihot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 994-1004.
- Hui C., Hughes T. Strategies for the treatment of Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin Adv in Hematol Oncol* 2003; 1: 538-59.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, and Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR/ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876-80.
- Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to Imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190-6.
- Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop Imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2003; 99:3472-5.
- Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu Y, Gradel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002; 100: 1014-8.
- Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10700-5
- Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor Imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2:117-25.
- Hochhaus A., La Rosée P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 2004; 18: 1321-31.
- Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R, Trujillo J. Gutterman J: Interferon alpha produces sustained cytogenetic responses in Philadelphia positive chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 1991; 114: 532-38.
- Mitelman F, editor.1995. ISCN: an international system for human cytogenetic nomenclature. Recommendations of the international standing committee on human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger.
- Williams IJ, Abuzenadah A, Winship PR, Preston FE, Dolan G, Wright, et al. Precise carrier diagnosis in families with Haemophilia A: Use of conformation sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. *Thromb Haemost* 1998; 79: 723-6.
- Kreil S, Muller C, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanism of resistance in CML patients FTER sti571 (Glivec) therapy. *Blood* 2001; 98: 435a (abstr 1823).
- Gambacorti-Passerini C, Gunby R., Piazza R., et al. Molecular mechanisms of resistance to Imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukemias. *Lancet* 2003; 4: 75-84.
- O'Dwyer ME et al. The impact of clonal evolution on response to Gleevec in accelerate phase CML. *Blood* 2002; 100.
- Soverini S et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up front cytogenetic resistant to Imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA working party on chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2005. 23: 4100-4109.
- Jabbour E, et al. Frequency and clinical significance of BCR/ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with Imatinib mesylate. *Leukemia* 2006; 20: 1767-1773.