

Gaceta Médica de México

Volumen
Volume **139**

Suplemento
Supplement **2**

Marzo-Abril
March-April **2003**

Artículo:

Aspectos moleculares de la leucemia mieloide crónica

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

I. Introducción

Rafael Hurtado-Monroy*

La publicación reciente de la Organización Mundial de la Salud de la clasificación de tumores, define a la LMC como una enfermedad mieloproliferativa que se origina de una célula "madre" (Stem Cell) pluripotencial y que se asocia al cromosoma Filadelfia o al gene de fusión BCR-ABL.

Los avances recientes en el conocimiento de las alteraciones citogenéticas en leucemias y otras hemopatías malignas no sólo proporcionaron la asociación pronóstica sino que la disección minuciosa de los mecanismos moleculares involucrados ahora explican el desarrollo de estas enfermedades y como consecuencia el avance hacia el tratamiento contra "blancos" específicos que intervienen en la inhibición de esas señales moleculares inherentes en la fisiopatología de la enfermedad.

En la LMC los estudios *in vitro* y en animales de experimentación demostraron que la expresión de la fusión BCR-ABL producen las mismas características de la LMC en humanos y por lo tanto se les consideran los principales mediadores de la transformación y proliferación de la enfermedad.

La clonación de los puntos de ruptura de la translocación, identificaron un espectro de proteínas del tipo Tirosino Cinasa autoactivadas con fusiones solas y que son necesarias y suficientes para reproducir el fenotipo de la enfermedad en modelos murinos.

El conocimiento de la mutación específica ("blanco") tiene implicaciones clínicas y terapéuticas para el diseño de inhibidores moleculares específicos. Por otro lado la presencia de mutaciones en los sitios de acción farmacológica de los inhibidores o la amplificación del cromosoma Filadelfia explica la falla de respuesta al inicio o en la evolución del tratamiento.

En la siguiente sesión se darán a conocer los conocimientos más recientes de los estudios de la genética molecular en LMC y proporcionan las bases de un tratamiento específico y abre las nuevas opciones hacia el mejor conocimiento de la Biología Molecular y el tratamiento.

Referencias

1. **Vardiman JW, Imbert M, Pierre R, et al.** Chronic myelogenous leucemia, in Jaffe ES, Harris NL, Hastien H, et al (eds): Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of tumors. Lyon, France, AIRC Press 2001, p20-26.
2. **Kantarjian HM, Faderl S, Talpaz M.** Chronic Myelogenous Leukemia, in De Vita VT Jr, Hellman S Rosenmberg SA (eds): Cancer Principles and Practice of Oncology (eds), Philadelphia, PA, Lippincott, Williams and Wilkins, 2001, pp 2433-2465.
3. **Barnes DJ, Melo JV.** Management of Chronic Myeloid Leukemia: Targets for molecular Therapy. Semin Hematol 40:34-49;2003.

II. Desarrollo de Resistencia Molecular a Imatinib

Eduardo E. Cervera-Ceballos**

El oncogen BCR-ABL se expresa en todas las etapas clínicas de la Leucemia mieloide crónica (LMC), por lo que, la proteína Bcr-Abl resultante representa un blanco ideal para el desarrollo de nuevas drogas en LMC.¹

El Imatinib es una 2-fenilaminopirimidina que induce remisión hematológica en 95% y en el 60% molecular en pacientes en fase crónica como (en pocos casos) fase acelerada o blástica.^{2,3} Mientras que en fase crónica las respuestas son durables, esto no ocurre en fases más avanzadas de la enfermedad y en general no se sostiene

más de 2-6 meses, a pesar de seguir con el tratamiento.³ Con el desarrollo de formas aceleradas o blásticas aparecen también múltiples cambios adicionales, moleculares y genéticos.⁴

En los últimos 4 años, el Imatinib es objeto de investigación clínica y básica intensa, con una inclusión superior a 20,000 pacientes que reciben el medicamento.⁵ Estudios de laboratorio demuestran que en las células que expresan el oncogen BCR-ABL ocurren tres mecanismos por los cuales el Imatinib ejerce su efecto:

* Jefe de Hematología . Hospital Angeles del Pedregal .D. F

** Laboratorio Clínico. Instituto Nacional de Cancerología

1. Inhibición de la autofosforilación de BCR-ABL y la de sustratos moleculares.
2. Inhibición de la proliferación celular.
3. Inducción de apoptosis.

La inhibición de la fosforilación se puede observar al minuto después de la exposición del Imatinib, mientras que el bloqueo de la proliferación e inducción de apoptosis requiere mayor tiempo (16 a 20 horas). Existe una mayor cinética de inducción de apoptosis en formas blásticas y leucemia aguda que lo que se requiere para el mismo efecto de las formas crónicas de LMC. Esto se explica por el hallazgo de anomalías cromosómicas adicionales en leucemia aguda que en ausencia de la actividad de BCR-ABL, pueden encaminar hacia otras vías proapoptóticas.⁶

De inicio el imatinib se propuso como un inhibidor competitivo del sitio de unión de ATP en el dominio catalítico de la cinasa de ABL, sin embargo, recientemente se demostró que la droga ocupa sólo una parte del sitio de unión de ATP y que en realidad ejerce su efecto inhibitorio por unión y estabilización de la molécula no activa.^{5,6}

Al usar los criterios de respuesta convencionales, se define la resistencia a Imatinib como la ausencia de respuesta hematológica o citogenética significativa o bien la falla para mantenerla.^{5,7} Cerca del 60% de pacientes en crisis blástica mieloide eventualmente presentan alguna forma de respuesta a Imatinib y un tercio presentan respuesta completa y en los pacientes con crisis blástica linfoide se pueden obtener respuestas superiores, sin embargo, a pesar de las respuestas prometedoras iniciales, todos o la mayoría de estos pacientes recaen, siendo que las remisiones duraderas son con mucho, la excepción y no la regla.³ Estas recaídas se observan dentro de los 2-4 meses en los pacientes con crisis blástica linfoide y ligeramente después en pacientes con crisis blástica mieloide.^{3,4}

Se debe diferenciar también la resistencia primaria (falla en lograr alguna forma de respuesta, sobre todo en pacientes en fase crónica S/N evolución clonal) de la resistencia adquirida (pérdida de la respuesta obtenida) y quizás se pueda proponer un tercer grupo de pacientes en los que se activaron vías leucemogénicas diferentes e independientes a Bcr-Abl, con la incapacidad del imatinib para inhibir esas señales (por su alta especificidad) y la consecuente (re)activación del proceso leucémico.^{5,7}

Recientemente se informaron algunas de las formas de resistencia al Imatinib.^{7,9}

- a. Mediadas por el huésped (disminución de la biodisponibilidad de la droga, inactivación de la molécula por fenómenos biológicos y farmacológicos, y otras);

- b. Intrínseco a la célula (amplificación génica, mutaciones en el dominio de cinasa, exportación de la droga al exterior de la célula, y otras).

La efectividad del imatinib puede variar de acuerdo a la etapa de diferenciación de la célula blanco y se conoce que Bcr-Abl se inhibe preferentemente (más rápido) en células ontogénicamente más maduras y células quiescentes pueden ser relativamente insensibles al imatinib, estas células podrían adquirir una ventaja replicativa y de auto-renovación y eventualmente convertirse con el tiempo en clones dominantes.^{5,7}

Los cambios genéticos secundarios dentro de la clona Ph+ (inestabilidad clonal) pueden otorgar señales oncogénicas que desplazan al Bcr-Abl como la única determinante de la transformación así el Bcr-Abl se vuelve irrelevante y la recaída se deberá al crecimiento celular independiente de Bcr-Abl.^{4,5}

El Bcr-Abl se puede reactivar o bien la dosis de imatinib es insuficiente de acuerdo a la expresión de Bcr-Abl. Los posibles mecanismos de reactivación incluyen la amplificación del gen Bcr-Abl o bien la expresión exagerada del gen de resistencia múltiple a drogas (MDR-1) que conduce a aumento en los niveles de glicoproteína P la cual disminuye la concentración intracelular del fármaco.⁷

Es importante señalar que más del 50% de los pacientes con recaída y quizás cerca del 90% de los pacientes con resistencia al imatinib presentan mutaciones puntuales en Bcr-Abl en al menos alguno de 13 aminoácidos (principalmente en posiciones 250, 252, 253, 255, 289, 315, 317, 351, 396 y 486) que se reparten a través del dominio de cinasa de Abl (y algunas fuera de él).⁶ Las dos mutaciones más frecuentes afectan los aminoácidos E255 y T315. En el primer caso el ácido glutámico es sustituido por lisina (E255K) o valina (E255V) y en la posición 315 treonina es sustituida por un residuo de isoleucina (T315I). Estas mutaciones no confieren ventaja proliferativa o de crecimiento en ausencia de imatinib. El corto tiempo requerido para la emergencia de resistencia sugiere que los mutantes ya eran presentes antes del tratamiento con imatinib y fueron seleccionadas (negativamente) debido a la especificidad ejercida por el medicamento. Estos puntos y la extrema heterogeneidad de las leucemias agudas Ph+ sugieren que las clonas que contienen mutaciones probablemente existan en casi todos los genes y así poder ser seleccionados (por no inhibición) si una presión específica es aplicada (para el caso la inhibición específica por imatinib de las otras clonas). Estas mutaciones no han sido encontradas en pacientes con resistencia primaria.^{5,7}

Otros pacientes presentan expresión exagerada de Bcr-Abl a nivel genómico o de transcripción y se conoce

que ocurre por la amplificación del gen BCR-ABL y sólo en algunos casos se observa expresión exagerada *S/N* amplificación del gen sugiriendo la existencia de otros mecanismos como cambios en el control de las concentraciones de BCR-ABL a nivel transcripcional, traslacional o post-traslacional. Por otro lado el imatinib produce disminución en el grado de la señalización que resulta de una cantidad dada de proteína, las células leucémicas que expresan cantidades aumentadas de esa proteína se seleccionan y se reclutan. Estas células resistentes mantienen la cantidad mínima de transducción de señales necesaria para la supervivencia de la célula (y de la clona), aun en presencia de imatinib.^{5-7,10}

Por último, la droga se puede inactivar en su función *in vivo* a través de modificaciones enzimáticas o de biotransformación (por ejemplo, mediante el sistema hepático del citocromo P450), o ser funcionalmente secuestrada por reactantes de fase aguda como $\alpha 1$ -Glicoproteína ácida la cual fija al imatinib en la circulación y por tanto la inactiva y disminuye sus concentraciones celulares efectivas.⁵⁻⁷ Resulta interesante el efecto competitivo entre imatinib y macrólidos (eritromicina, clindamicina) por la $\alpha 1$ -Glicoproteína ácida.⁶

El estudio de los mecanismos moleculares de resistencia a imatinib dará por un lado un mejor conocimiento de la biología de la LMC y por otro, proporcionará el conocimiento que permita superar la limitante terapéutica.

Sin importar el mecanismo de resistencia, la cinasa de Bcr-Abl permanece como un blanco terapéutico idóneo. Ya se inicia la síntesis de inhibidores de la cinasa de Abl, con especificidad diferente a la del imatinib ¿qué tanto estos inhibidores serán efectivos o no contra Bcr-Abl mutantes?, es una cuestión que deberá esclarecerse. Es probable que en el futuro lo que se requiera sea un cóctel de diversos inhibidores con especificidades diferentes que se seleccionen con base en el perfil molecular de las mutaciones encontradas en el paciente individual.¹¹ Si la actividad de cinasa de Bcr-Abl se reactivó en pacientes en recaída, podría ser útil localizar una vía de señalización activada por debajo de la cascada de eventos, como

RAF/MEK/ERK, PI-3 cinasa, AKT o ras y de manera alterna, se podrían desarrollar estrategias para disminuir los niveles de proteína Bcr-Abl con agentes como geldanamicina, 17-AAG o trióxido de arsénico.¹²

Referencias

1. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;346:645-52.
2. Druker BJ, Talpaz M, Resta D, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
3. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344:1038-42.
4. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, et al. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood* 2002;100:1628-33.
5. Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukemias. *The Lancet Oncol* 2003;4:75-85.
6. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000;289:1938-42.
7. Sawyers C. Molecular studies in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Semin Hematol* 2001;38(suppl 8):15-21.
8. Goldman J. Implications of imatinib mesylate for hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Hematol* 2001;38(suppl 38):28-34.
9. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, et al. Alpha 1 acid glycoprotein (AGP) binds to STI571 and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2003;9: in press.
10. Sawyers CL. Research on resistance to cancer drug Gleevec. *Science* 2001;294:1834.
11. Druker BJ, O'Brien SG, Cortes J, Radich J. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2002;111-35.
12. Hoover RR, Mahon FX, Melo JV, Daley GQ. Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 2002;100:1068-71.



III. Resultados con Imatinib en Leucemia Mieloide Crónica (LMC) en fase acelerada y blástica

Eduardo Cervera-Ceballos*

I. Estudios fase I

El estudio original Fase I, con escalamiento de dosis, comenzó en Estados Unidos en junio de 1998 en 3 centros; inicialmente sólo se incluyeron pacientes en fase crónica, pero vistos sus primeros resultados se permitió posteriormente la incorporación de pacientes en crisis blástica y pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LAL) Filadelfia positiva. Imatinib fue bien tolerado con mínimos efectos colaterales. La dosis se escaló de 25 a 1,000 mg en 14 cohortes de pacientes. Los beneficios clínicos significativos se observaron con dosis superiores a 300 mg/día. En pacientes con crisis blástica mieloide, 21/38 pacientes respondieron (55%) tratados con dosis superiores a 300 mg/día. En 18% la respuesta fue posible sostenerla más de un año.¹

II. Estudios Fase II

Para estos estudios, también se aceptaron pacientes en fase acelerada, crisis blástica mieloide o LAL Filadelfia positiva. Entre 6-9 meses se reclutaron más de 1,000 pacientes (grupo total, incluye fase crónica) en 30 centros de 6 países. El criterio de inclusión (fase acelerada) fue el de 15-30% de blastos o más de 30% de blastos mas promielocitos en sangre periférica o médula ósea, más de 20% de basófilos en médula ósea o sangre periférica, o bien cuenta plaquetaria menor de $100 \times 10^9 L$, no relacionada con la terapéutica. Doscientos treinta y cinco pacientes con criterios de aceleramiento o fase blástica, fueron incluidos. Ochenta y dos por ciento presentaron alguna forma de respuesta hematológica y 34% alcanzaron la respuesta hematológica completa (RHC). Veinticuatro por ciento presentaron respuesta citogenética mayor (RCM). Las tasas de supervivencia global y libre de progresión, estimadas a 12 meses, fueron de 59% y 74%, respectivamente. Nuevamente estas respuestas se asociaron a mínima toxicidad. La respuesta citogenética a los 3 meses de tratamiento fue asociada con mayor tasa de supervivencia libre de progresión.²

En pacientes con crisis blástica mieloide (260 pacientes) se encontró una respuesta global de 52%, con

remisión hematológica sostenida por al menos 4 semanas en 31% de pacientes. Ocho por ciento presentaron RHC y otro 4% eliminaron los datos hematológicos de enfermedad en la médula ósea, pero debido a citopenias persistentes no llenaban criterios para RHC. Dieciocho por ciento regresaron a fase crónica o presentaron respuestas parciales. RCM fue vista en 16% y 7% respuesta citogenética completa (RCC). La mediana de supervivencia se acercó a los 7 meses, 20% aún vivos a 18 meses con un aplanamiento importante de la curva de supervivencia (SV). Estos resultados se compararon con grupos históricos tratados con quimioterapia, de manera muy favorable para imatinib. En aquéllos la mediana de SV fue de aproximadamente de 3 meses (Cuadro I).³

Cuadro I. Resultados de Imatinib en estudios fase II, enfermedad acelerada o crisis blástica (%)

Evolución	Fase acelerada	Fase blástica
RHC	34	8
RCM	24	16
RCC	17	7
Progresión de enfermedad	40	80

RHC: Respuesta hematológica completa; RCM: Respuesta citogenética mayor; RCC: Respuesta citogenética completa

En pacientes con LAL Filadelfia +, 29/48 (60%) respondieron a Imatinib como agente único. Sin embargo, la duración de la respuesta fue relativamente corta, con un tiempo estimado de progresión de sólo 2.2 meses.

III. Resultados con incremento de dosis

Como se ha visto, en fases avanzadas de la enfermedad, las recaídas son frecuentes y se ha presumido que ello puede deberse al desarrollo de resistencia a imatinib. Dos estrategias terapéuticas se han planteado:

- En aquellos pacientes con enfermedad sensible a imatinib, incrementar dosis para nuevamente alcanzar rangos terapéuticos eficaces.

* Jefe de Laboratorio Clínico del Instituto Nacional de Cancerología.

- Combinaciones de quimioterapia con imatinib en aquellos pacientes con enfermedad avanzada, para lo cual se han investigado diversos agentes con sinergia a imatinib.

En el estudio fase II con pacientes en fase acelerada, 77 pacientes fueron tratados con 400 mg y 158 con 600 mg.⁴ En crisis blástica mieloide, 36 pacientes fueron tratados con 400 mg y 223 con 600 mg. En el análisis retrospectivo, en cuanto a factores pronósticos, se vio que en el grupo de pacientes con fase acelerada, los subgrupos de 400 y 600 mg estuvieron bien balanceados. En ambos estudios hubo clara tendencia hacia mejores respuestas citogenéticas y hematológicas en el grupo de 600 mg. En el grupo de fase acelerada, hubo mejoría significativa estadística en el tiempo de progresión de enfermedad y SV.²

En un estudio subsiguiente con pacientes en fase acelerada, éstos fueron tratados con 600 mg/día de imatinib. A diferencia del protocolo citado con anterioridad, en este estudio, pacientes con fase crónica y alteraciones citogenéticas adicionales al Filadelfia, fueron incluidos en el criterio de aceleración. Quince pacientes de estas características fueron incluidos en quienes la mediana de duración de la enfermedad fue de 45 meses (fase crónica tardía con evolución clonal citogenética). Con una mediana de seguimiento de 12 meses, la RCM fue de 80%, (12/15), con RCC de 67% (10/15). Al tiempo del informe del estudio, ninguno de estos pacientes había recaído.⁵ No obstante lo pequeño del estudio y algunos otros factores metodológicos, es de notar la importante respuesta encontrada. Estos datos sugieren que dosis mayores de 400 mg/día otorgan mejores respuestas. Sin embargo, en fase acelerada o blástica, el principal impacto de dosis superiores ha sido en el tiempo de progresión y SV (Cuadro II).

IV. Conclusión

Con el desarrollo de inhibidores altamente específicos para moléculas clave en el desarrollo leucemogénico se ha abierto una vía de tratamiento que implica el desarrollo de métodos moleculares tanto para definir la estrategia terapéutica como para monitorear y evaluar el resultado de la misma. Cada día nuevos resultados de estudios en desarrollo en todo el mundo nos enseñan más sobre la enfermedad y su tratamiento. No obstante, debemos reconocer que para fases avanzadas de LMC los resultados están lejos a satisfacernos. El propósito más simplista es el de que el tratamiento de la leucemia cure a todos los pacientes sin toxicidad importante. El trasplante hematopoyético de células progenitoras es el único tratamiento que ha probado ser curativo para la LMC, pero el procedimiento sólo puede estar disponible en un tercio de

los pacientes y conlleva riesgos importantes en cuanto a toxicidad. Es evidente que se requiere investigar nuevos tratamientos en LMC, así como desarrollar herramientas que permitan conocer qué pacientes no responderán adecuadamente al manejo inicial con imatinib. Las remisiones moleculares (completas) sólo se han visto en una minoría de pacientes tratados con imatinib. El objetivo entonces se ha centrado en investigar modalidades terapéuticas con blancos moleculares específicos que podrían eventualmente llevar al bloqueo secuencial de vías de señalización intracelular, que conduzcan a remisiones moleculares completas e, idealmente, la curación en LMC. Es quizás, concebible que en el futuro, los pacientes con LMC requieran de un cóctel de diferentes inhibidores (como ahora es el manejo del VIH-SIDA), seleccionados con base en el perfil molecular de las mutaciones presentes en cada paciente. Ese conocimiento del perfil molecular del paciente en lo individual en conjunto con el desarrollo de terapias molecularmente dirigidas serán lo que marcará en mucho el estudio y manejo del paciente con LMC en los próximos años.

Cuadro II. Resultados con 400 mg/d versus 600 mg/d en LMC, pacientes con fase avanzada

Respuesta	Fase acelerada		Fase blástica	
	400 mg	600 mg	400 mg	600 mg
RH	65%	71%	9%	35%
RHC	27%	37%	3%	14%
RCM	16%	28%	6%	18%
TpP	8 meses P=0.002	No alcanzada		
SV 12 meses	65% P=0.014	78%		

Referencias

1. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344:1038-42.
2. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 2002;99:1928-37.
3. Druker BJ, O'Brien SG, Cortes J, Radich J. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2002;111-35.
4. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 2002;99:3530-39.
5. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, et al. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (ST1571) in accelerated phase CML. *Blood* 2002;100:1628-33.

IV. Evolución Citogenética y Molecular en Pacientes Tratados con Imatinib

Pablo Vargas-Viveros*

A partir del reporte inicial de Drucker¹ en el que describe los primeros resultados del uso de Mesilato de Imatinib en humanos para el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), se abrió una nueva perspectiva al conocimiento del comportamiento biológico de la enfermedad, por lo que originó una nueva era en la investigación terapéutica de esta enfermedad. Por otro lado surgieron también nuevas intrigas e interrogantes como es el desarrollo de la evolución clonal, molecular y citogenética en los pacientes en tratamiento con Mesilato de Imatinib.

Actualmente se acepta el término de Evolución Clonal (EC) para definir la emergencia de anomalías citogenéticas diferentes a la del cromosoma Filadelfia *t(9;22)*, en pacientes con LMC con tratamiento convencional y su desarrollo indica que la progresión de la enfermedad hacia fases avanzadas es inminente. En la patogénesis de su desarrollo es fundamental la inestabilidad cromosómica de la clona maligna, la cual se exemplifica de manera clara desde el punto de vista de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA): La inestabilidad genética es una característica común en LMA, en la que suceden translocaciones cromosómicas balanceadas como la *t(15;17)*, *t(8;21)* que conducen a la formación de transcriptos de fusión específicos de la leucemia sin ganancia o pérdida de material genético, sin embargo, las anomalías cromosómicas "desbalanceadas" sí resultan en ganancia o pérdida de material de todo un cromosoma o parte del mismo, que ocurre tanto en LMA como en LMC en las que estas aberraciones citogenéticas se asocian a pronóstico adverso en la primera y a transformación a fases avanzadas de la enfermedad (Fase Blástica) en la segunda. La translocación *t(9;22)* existe como única anomalía a través de la fase crónica y su expresión persiste durante la crisis blástica, sin embargo, 50 a 80 % de los pacientes presentan anomalías cromosómicas adicionales con la progresión de la enfermedad.² El desarrollo de cariotipos complejos incluyen principalmente: trisomía 8, trisomía 19, isocromosoma 17q con pérdida o alteración del antígeno p53 y copias adicionales del cromosoma Filadelfia (Ph). El significado pronóstico de la evolución clonal depende de varios factores:

1. La alteración citogenética específica.
2. Su frecuencia o presencia cuantitativa en el análisis citogenético.
3. Su asociación con otras alteraciones citogenéticas y clínicas de progresión de la enfermedad.
4. La relación temporal de su aparición con la evolución de la enfermedad (estadio temprano o tardío).
5. Influencia de tratamientos previos (Interferón alfa, alquilantes, quimioterapia).^{3,4}

El significado de la Evolución Clonal (EC) es menos clara en pacientes que reciben tratamiento con Imatinib. La importancia de los factores pronósticos en los diferentes estadios de la enfermedad pueden ser alterados de manera drástica con la introducción de este tratamiento y cambia el pronóstico de manera significativa. El Mesilato de Imatinib es hasta ahora el tratamiento más efectivo para LMC fuera del contexto del Trasplante Alogénico de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TACPH). La evolución citogenética se considera un factor de progresión independiente de manera total o parcial de las anomalías derivadas del evento molecular primario (Ph), por lo tanto, el significado pronóstico de la evolución clonal citogenética podría influir en los pacientes con LMC en tratamiento con Imatinib.

Objetivo

El objetivo de la presente comunicación es informar los resultados de los cambios citogenéticos y su influencia en el pronóstico de pacientes con LMC en tratamiento con Mesilato de Imatinib.

Material y Métodos

Analizamos 27 pacientes con el diagnóstico de LMC Ph+ (BCR/ABL+) con objeto de identificar EC citogenética durante el tratamiento con Mesilato de Imatinib y determinar su impacto en la evolución de la enfermedad logro de Respuesta Hematológica Completa (RHC), Respuesta Citogenética (RCg) y supervivencia. Se realizó análisis citogenético mediante cariotipo con Bandas GTG

* Servicio de Hematología. Hospital Angeles del Pedregal.

Cuadro I. Características de los Pacientes previo al Tratamiento con STI571

	Fase Crónica	Fase Acelerada	Fase Blástica
Pacientes (n)	15	7	5
Evolución de la Enfermedad (meses)	36 (1-131)	100 (6-206)	70 (2-256)
Evolución de la Fase (meses)	36 (1-131)	3 (1-6)	1 (2 sem.- 3 meses)
n (%)			
Evolución Clonal Previa al tratamiento con Mesilato de Imatinib	4 (26.6) -12. Ph+Ph. -4, -8, -17, -22, -Y. -5, -Y.	3 (42.8) Hiperploidías. -11. pqh+.	1 (20) -Y.

Cuadro II. Evolución de LMC durante el tratamiento con STI571

	Fase Crónica	Fase Acelerada	Fase Blástica
n(%)			
EC Durante Tratamiento con STI571	9/15 (60)	4/7 (57.1)	1/3 (33.3)
RHC	14/15 (93.3)	6/7 85.7	2/3 (66.6)
n(%)			
Tiempo para RHC (Semanas)	3 (1-6)	4 (2-6)	1-3
RCg	14/15 (93.3)	6/7 (85.7)	1/3 (33.3)
RCgC	7 (46.69)	0	0
RCgM	7 (46.6)	6 (85.7)	1 (33.3)
Tiempo para RCg (Meses)	9 (3-12)	9 (3-12)	6
EC n(%)	9/15 (60)	4/7 (57.1)	1
Alt. Cg	Recaída		
Ph+Ph, +8	Hematológica	Alt. Cg	Recaída
Ph+Ph, AblX	Hematológica		
-Y, Ph+Ph, AblX	Citogenética	Hiper, -22	
-Y		Hiper,	-14
-21, +14		-22	Recaída
AblX,			Citogenética
Hiper		-5, -8, -19, -22	
AblX			
AblX, -22		+8	Hematológica

y técnica de FISH [$t(9;22)$] a los 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 y 36 meses del seguimiento.

Quince pacientes presentaron Fase Crónica y se trataron con Mesilato de Imatinib a la dosis de 400 mg/día; Siete pacientes en Fase Acelerada con tratamiento de 600 mg/día de Imatinib y por último 5 pacientes en

Fase Blástica con dosis diaria de 600 a 800 mg de Imatinib. Previo al inicio del tratamiento con Imatinib 4 pacientes (26.6%) en FC presentaron EC y todos los defectos estaban presentes en clonas Ph-. De los pacientes en FA, la EC estaba presente en 3 (42.8%) pacientes en clonas Ph-, y en sólo un paciente (20%) de FB (Cuadro I).

Resultados

Fase Crónica

El análisis citogenético previo y durante el periodo de seguimiento detectó EC en 9 de los 15 (60%) pacientes en FC. Las alteraciones cromosómicas más frecuentes fueron: amplificación de ABL, doble cromosoma Filadelfia e hiperploidías, todas en clonas Ph+. Las alteraciones citogenéticas previas al tratamiento de los 4 pacientes mencionados, desaparecieron al tercer mes de tratamiento, sin embargo se presentó el desarrollo de nuevas y diferentes alteraciones en el transcurso de la evolución. Catorce de los 15 (93.3%) pacientes en FC lograron la RHC en una mediana de 3 semanas (1 a 6 semanas). Se logró Respuesta Citogenética (RCg) en 14 (93.3%) de los 15 pacientes en un promedio de 9 meses de tratamiento, 3 de los cuales presentaron EC previa. Durante el periodo de tratamiento con Imatinib se presentó progresión de la enfermedad en 3 pacientes. La frecuencia de desarrollo de EC y sus característica e impacto en la evolución de la enfermedad se muestran en el cuadro II.

Fase Acelerada

Tres pacientes en FA presentaban EC al inicio del tratamiento de los que sólo uno logró RCgM (Cuadro I). Se presentó EC en el 57.1% de los pacientes (n= 4). Las alteraciones Cg más frecuentes fueron -22 en 3 casos e hiperploidías en 2. Se presentó progresión de la enfermedad en un paciente que desarrolló +8 a los 18 meses. Los otros pacientes continúan en RHC y RCgM a los 24 meses de seguimiento (Cuadro II).

Fase Blástica

En uno de 7 pacientes en FB se presentó EC (-Y) al inicio del tratamiento y murió a las 4 semanas. Sólo 3 pacientes sin EC previa fueron evaluables para el seguimiento: Dos lograron RHC pero recayeron a entre la semana 8 y 12 con progresión sin poder analizar nuevo estudio citogenético. En el tercer paciente se logró sólo RH parcial con RCgM y desarrolló EC al mes 9 con pérdida del cromosoma 14 (-14) que desapareció a los 12 meses y progresó con recaída Cg a los 18 meses de seguimiento. La paciente murió a los 24 meses de evento no relacionado con LMC.

Discusión

En el análisis preliminar de los pacientes se encontró que el desarrollo de EC citogenética no influyó en la proporción

de RHC ni RCg (93.3%) en contraste con lo descrito en la literatura. La frecuencia de desarrollo de EC en los pacientes en tratamiento con Imatinib fue mayor a lo reportado en otras series (60% vs. 8.4-25%) y el impacto del desarrollo de EC en la evolución de la enfermedad es evidente al analizar la frecuencia de progresión de la enfermedad en el 21% (3/114) de los casos en FC. y se asoció con la presencia de doble cromosoma Ph+, amplificación de ABL y Trisomía del cromosoma 8. En otro 28.5 % de los casos (4/14) se desarrolló amplificación de ABL en clonas Ph+, pero continúan en RCgM a 36 meses de seguimiento. Las alteraciones cromosómicas que representan un factor de riesgo para progresión de la enfermedad en pacientes en FC en tratamiento con Imatinib son la presencia de Doble Cromosoma Ph+, Amplificación de ABL, Trisomía del cromosoma 8 y la asociación entre ellas, ya que una proporción de los pacientes desarrolló amplificación de ABL y hasta el momento se mantienen en RCgM. En los pacientes de FA el 85% (6/7) presentó EC previo o durante el tratamiento pero 4/7 (57%) de ellos alcanzaron la RCgM sostenida. Las alteraciones cromosómicas más frecuentes fueron hiperploidías en el 100% y -22 en 3 (50%) y no tuvieron ningún impacto en la evolución de la LMC. Los pacientes en FB no fueron evaluables debido al corto periodo de seguimiento.

Conclusión

La EC es un fenómeno reconocido pero cuyos mecanismos moleculares de desarrollo e inducción de progresión en LMC se desconocen. La emergencia del desarrollo de EC durante tratamiento con Imatinib en nuestros pacientes de FC es mayor de lo reportado en la literatura y quizás se podría atribuir a la larga evolución de la enfermedad previa al inicio del tratamiento, pero también hay que considerar la posible influencia de los tratamientos previos y prolongados con agentes alquilantes (Hidroxiurea y Busulfán) con el efecto conocido de inducir alteraciones citogenéticas con su uso prolongado y que se trata de fármacos con amplísimo uso en nuestro país como único tratamiento accesible a la mayoría de los pacientes. Llamala atención que los pacientes con FA clínicamente y con EC lograran 85.7% de RCgM sostenida, comparado con el 12.5% reportado por O'Dwyer y 34.4% de Marktel; sin embargo desconocemos el impacto que tendrá en la evolución futura, si lograrán RCgC o la frecuencia de recaídas en estos pacientes.

La evolución clonal citogenética y/o molecular juega un papel importante en el desarrollo de progresión de la enfermedad, las alteraciones citogenéticas más frecuentes y con impacto negativo en la supervivencia libre de progresión en este grupo de pacientes fueron doble cromosoma Filadelfia, amplificación de Abl y trisomía del cromosoma 8.

A la luz de los conocimientos actuales no podemos inferir que el tratamiento de LMC con Mesilato de Imatinib induzca o facilite los cambios citogenéticos (EC) ya que sendas alteraciones cromosómicas son las mismas descritas en la evolución natural de la LMC. Es clave esta información para definir implicación pronóstica al inicio del tratamiento con Imatinib como criterio de selección y para que los casos con EC reciban un esquema de tratamiento diferente.

Referencias

1. Drucker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and Safety of a specific inhibitor of the BCR/ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344:1031-1037;2001.
2. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, et al. The impact of clonal evolution on response to Imatinib mesylate (ST1571) in accelerated phase CML. *Blood* 100:1628-1633;2002.
3. Majlis A, Smith TL, O'Brien S, et al. Significance of cytogenetic clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14:196-203.
4. Cortés J, Talpaz M, O'Brien S, et al. Suppression of cytogenetic clonal evolution with interferon alfa therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*. 1998;16:3279-3285.
5. Gorre ME, Mansoor M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 2001;293:876-880.
6. Marktel S, G. Khalid, V. de Melo, et al. Emergence of additional chromosomal abnormalities following treatment with ST1571 (Imatinib mesylate) for Philadelphia positive chronic myeloid leukemia in chronic phase. *British Journal of Hematology*, 2002;117(Suppl. 1)Abstract No. 35.
7. Marktel S, Marin D, Foot N, et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to Imatinib: The occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Blood* 100: No. 11(Suppl 1)Abstract 3106.November 16, 2002.
8. Eric J. Feldman, Vesna Najfeld, Michael W. Schuster, et al. The emergence of Philadelphia chromosome (Ph) negative, trisomy 8 positive cells in patients with chronic myelogenous leukemia (CML) treated with Imatinib mesylate: Clinical evidence for a multistep pathogenesis. *Blood* 100: No. 11 (Suppl 1) Abstract 2299. November 16, 2002.
9. Jorge E. Cortés, Moshe Talpaz, Francis Giles, et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on Imatinib mesylate therapy. *Blood*. First edition paper, prepublished online January 30, 2003; DOI 10.1182/blood-2002-09-2.

V. New Molecular Targets for the Treatment of CML

Jorge Cortes*

Summary

Multiple new agents are currently being developed in CML. The majority of these agents are now being investigated in patients who have developed resistance to imatinib. Their mechanisms of action are diverse and many may be synergistic

Imatinib mesylate (Gleevec, ST1571) is a highly effective agent that has changed our approach to treatment of CML. It should now be considered the treatment of choice for patients with CML at the time of their diagnosis. However, there is still a need to identify other effective therapies for CML. First, use of single agent therapy in cancer has generally resulted in eventual development of resistance. Several mechanisms of resistance have already been identified in patients treated with imatinib. Although these mainly have occurred in patients treated in accelerated or blastic phase, there is the potential for additional patients becoming resistant to single-agent imatinib. Also, although

with imatinib. These agents will soon be used in different combinations, most likely including imatinib, with the hope of obtaining complete blockade of intracellular pathways triggered by Bcr-Abl. If this is successful, complete eradication of disease may become a reality for the majority of patients with CML.

hematologic and cytogenetic responses to imatinib have been spectacular, to date only a small fraction (5-7%) of patients treated in chronic phase with standard-dose imatinib as first line of therapy have achieved molecular remission. As patients remain on therapy, molecular responses improve and these rates may yet improve, but it is likely that a significant fraction of patients may not achieve this desirable outcome. Finally, there are multiple other potential targets for therapy that have been identified and several agents that can be directed to these targets. There is evidence of activity of many of these agents in preclinical studies and in some instances in early clinical

* Department of Leukemia. The University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center

trials. Furthermore, these agents can be synergistic with imatinib in imatinib-sensitive and, most important, imatinib-resistant cells. Here we will describe some potential targets and targeted therapies for treatment of CML. A partial list of these targets and agents directed towards them is presented in Table 1. Some of these targets will be described here and others will be presented.

DNA Methylation

DNA methylation is an epigenetic phenomenon that results in gene silencing. Hypermethylation of regulatory genes involved in cell proliferation and differentiation is a common phenomenon in cancer.¹ In CML, there is increased methylation of several genes, including the Pa promoter of ABL1, BCR, and p15. Methylation may increase with disease progression, although it is unclear whether this is a cause or a consequence of the progression. There are currently at least two hypomethylating agents under investigation: 5-azacytidine and 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). Decitabine has been the most widely investigated among these agents in CML. Initial studies used MTD of 50-100 mg/m² over 6 h every 12 h for 5 days. Among 32 patients with myeloid blast phase treated with decitabine, two patients achieved CR and six had objective responses (hematologic improvement or back-to-chronic phase) for overall response rate of 26%.² Nine of 17 (53%) patients treated in accelerated phase had an objective response.³ It is now clear that lower doses achieve optimal hypomethylation, while higher doses result in a direct cytotoxic effect. A study investigating minimal effective dose of decitabine was recently conducted and identified 15 mg/m² daily for 10 days as optimal dose.⁴ Decitabine is currently being investigated employing this dose schedule in patients with imatinib-resistant CML in chronic, accelerated, and blast phases. In addition, decitabine is synergistic *in vitro* against CML. An ongoing study is investigating use of this combination in imatinib-resistant patients with CML in accelerated or blastic phase.

Farnesyl Transferase (FTase) Inhibitors (FTI)

Ras activation is one of the main downstream events resulting from autophosphorylation of Bcr/Abl⁵. To be active, Ras must undergo post-translational modifications that allow attachment of Ras to cellular membrane. These changes are achieved through prenylation that is mediated by at least two different enzymes, most prominently Ftase.⁶ FTI were initially designed to inhibit Ras activation and are highly effective to achieve inhibition of this enzyme. However, there are multiple enzymes, both

constitutional and regulatory, that require farnesylation for activation, and it is unclear at present which one (or several) of these is most important for anti-leukemia activity of FTI, but it is most likely not Ras. Other candidates are RhoB and CNEP-E and -F. There are several FTI currently under clinical development⁷ with demonstrated activity against solid tumors and hematologic malignancies.⁸⁻¹⁰ SCH66336, an FTI, induced dose-dependent inhibition of colony formation and proliferation of Bcr/Abl-transformed BaF3 cells and primary cells from patients with CML.¹¹ Mice treated with SCH66336 after injection of Bcr/Abl-BaF3 cells survived for up to 12 months, whereas all mice treated with vehicle only died of leukemia. SCH66336 was equally effective in a Bcr/Abl-positive ALL mouse model.¹² In addition, SCH66336 inhibited proliferation of imatinib-resistant Bcr/Abl positive cell lines and colony formation of cells from imatinib-resistant CML patients¹³. SCH66336 sensitized ST1571-resistant cells to ST1571-induced apoptosis.¹³ Clinically, R115777, an FTI induced hematologic response in six of 22 (32%) CML patients treated included four patients who achieved transient minor cytogenetic response¹⁴. In a phase I study of R115777 in acute leukemias, both patients with blast phase Ph-positive CML achieved partial hematologic response. SCH66336 has also demonstrated activity in this setting. Combination studies are also ongoing of FTI with Gleevec.

Arsenic Trioxide

Arsenicals were among the first therapies to be used for CML.¹⁵ More recently, arsenic trioxide (As₂O₃) demonstrated clinical activity in acute promyelocytic leukemia¹⁶ and additional evidence of activity was documented in other hematologic malignancies, including multiple myeloma, myelodysplastic syndromes, and lymphomas.^{17,18} In CML, As₂O₃ induced dose-dependent growth inhibition and apoptosis to Bcr-Abl-positive cell lines.¹⁹ This was accompanied by reduced expression of p210^{Bcr-Abl} protein.^{19,20} As₂O₃ is also synergistic with imatinib in inducing growth inhibition and apoptosis of CML cell lines.^{21,22}

Proteasomes and Proteasome Inhibition

The ubiquitin-proteasome pathway is the principal intracellular pathway responsible for protein degradation.²³ These include proteins with a variety of cellular functions, from structural to those that participate in cell cycle regulation and tumor growth. Proteasome inhibitors are being investigated as a new approach for anti-cancer therapy, with PS-341 (bortezomib) being the first generation of these agents to be tested in the clinic. Bortezomib has

anti-neoplastic activity against multiple tumor types, but the specific mechanism by which bortezomib exerts its anti-neoplastic activity is not clear. Inactivation of NF- κ B appears to play a prominent role. NF- κ B is inhibited in cytoplasm through binding to I κ B, a substrate for the ubiquitin proteasome pathway.²⁴ In CML, Bcr/Abl activates NF- κ B-dependent transcription and NF- κ B may be required for Bcr/Abl mediated transformation.^{25,26} Proteasome inhibition with the agent N-carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-norvalinal (LLnV) induced reduction in expression of Bcr/Abl protein in K562 cells.²⁷ PS-341 has inhibited the growth and induced apoptosis of several Bcr/Abl positive cell lines and ST1571-sensitive and –resistant cell lines.²⁸

Table I. Molecular targets and targeted agents for treatment of CML

Target	Examples
Protein production	Homoharringtonine
Methylation	Decitabine, 5-azacytidine
Hystone deacetylase	Depsipeptide, valproic acid
Farnesyl transferase	R115777, SCH66336, BMS214662
Arsenicals	Arsenic trioxide
Proteasomes	PS-341
Angiogenesis	
VEGF	Bevacizumab
VEGF-receptor	PTK787
Vaccines	Bcr-Abl junction peptides PR1 HSP-70
Tyrosine kinase (Bcr/Abl and others)	AG957 AG490 Adaphostin
Bcl-2	GenaSense

Anti-angiogenic agents

Angiogenesis plays an important role in CML. Plasma levels of VEGF are elevated in CML compared to controls (76.3 vs. 26.7 pg/mL), and similar elevations of bFGF, HGF and TNF α occur.²⁹ These elevations are accompanied by increased number of blood vessels and area of vascularity in bone marrow.²⁹ Increased cellular expression of VEGF has been reported as associated with shorter survival in patients with CML in chronic phase. The mechanism by which these changes play a role in CML is

only beginning to be understood. VEGF suppresses the function of dendritic cells *in vitro*³¹ and in some myeloid leukemias, VEGF directly stimulates growth of leukemia. Antibodies to VEGF may enhance the function of dendritic cells and induce apoptosis of leukemia cells.³² Therefore, inhibition of VEGF either by suppressing production or interfering with VEGF in circulation (e.g., monoclonal antibodies such as bevacizumab) or blocking its receptor might prove beneficial in CML.

References

1. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. Ann Intern Medi. 2001;134:573-586.
2. Sacchi S, Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Rios MB, Giles FJ, Beran M, Koller CA, Keating MJ, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients. Cancer. 1999;86:2632-2641.
3. Kantarjian HM, O'Brien SM, Keating M, Beran M, Estey E, Giralt S, Kornblau S, Rios MB, de Vos D, Talpaz M. Results of decitabine therapy in the accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. Leukemia. 1997;11:1617-1620.
4. Issa JP, Garcia-Manero G, Mannari R, Thomas D, Giles F, Cortes J, Estey E, Kantarjian H. Minimal effective dose of the hypomethylating agent decitabine in hematopoietic malignancies. Blood. 2001;98:594a.
5. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. N Engl J Medi. 1999;341:164-172.
6. Beupre DM, Kurzrock R. RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. J Clin Oncol. 1999;17:1071-1079.
7. Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesytransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. J Clin Oncol. 1999;17:3631-3652.
8. Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, End DW, Wright JJ, Bol K, Horak I, Tidwell ML, Liesveld J, Kottke TJ, Ange D, Buddharaju L, Gojo I, Highsmith WE, Belly RT, Hohl RJ, Rybak ME, Thibault A, Rosenblatt J. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. Blood. 2001;97:3361-3369.
9. Kurzrock R, Sebti SM, Kantarjian HM, Wright J, Cortes JE, Thomas DA, Wilson E, Beran M, Koller CA, O'Brien S, Freireich EJ, Talpaz M. Phase I study of a farnesyltransferase inhibitor, R115777, in patients with myelodysplastic syndrome. Blood. 2001;98:623a.
10. Kurzrock R, Cortes JE, Ryback ME, Thibault A, Faderl S, Estey E, Garcia-Manero G, Giles F, Thomas DA, O'Brien S, Talpaz M, Kantarjian HM. Phase II study of R115777, a farnesyltransferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome. Blood. 2001;98:848a.
11. Peters DG, Hoover RR, Gerlach MJ, Koh EY, Zhang H, Choe K, Kirschmeier P, Bishop WR, Daley GQ. Activity of the farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 against BCR/ABL-induced murine leukemia and primary cells from patients with chronic myeloid leukemia. Blood. 2001;97:1404-1412.

12. Reichert A, Heisterkamp N, Daley GQ, Groffen J. Treatment of Bcr/Abl-positive acute lymphoblastic leukemia in P190 transgenic mice with the farnesyltransferase inhibitor SCH66336. *Blood*. 2001;97:1399-1403.
13. Hoover RR, Mahon F-X, Melo JV, Daley GQ. Overcoming ST1571 resistance with the farnesyltransferase inhibitor SCH66336. *Blood*. 2001;98:617a.
14. Thomas D, Cortés J, O'Brien S, García-Manero G, Kurzrock R, Giles F, Faderl S, Thibault A, Ryback ME, Kantarjian HM. R115777, a farnesyl transferase inhibitor (FTI), has significant anti-leukemia activity in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98:727a.
15. Forkner CE, Scott TFM. Arsenic as a therapeutic agent in chronic myelogenous leukemia. *JAMA*. 1931;97:3.
16. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrell RP, Jr. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med*. 1998;339:1341-1348.
17. Rousselot P, Labaume S, Marolleau JP, Larghero J, Noguera MH, Brouet JC, Fermand JP. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Res*. 1999;59:1041-1048.
18. Wang ZG, Rivi R, Delva L, Konig A, Scheinberg DA, Gambacorti-Passerini C, Gabrilove JL, Warrell RP, Jr., Pandolfi PP. Arsenic trioxide and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML-RARalpha independent manner. *Blood*. 1998;92:1497-1504.
19. Perkins C, Kim CN, Fang G, Bhalla KN. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood*. 2000;95:1014-1022.
20. Puccetti E, Guller S, Orleth A, Bruggenolte N, Hoelzer D, Ottmann OG, Ruthardt M. BCR-ABL mediates arsenic trioxide-induced apoptosis independently of its aberrant kinase activity. *Cancer Res*. 2000;60:3409-3413.
21. La Rosee P, Johnson K, Moseson EM, O'Dwyer M, Druker BJ. Preclinical evaluation of the efficacy of ST1571 in combination with a variety of novel anticancer agents. *Blood*. 2001;98:839a.
22. Porosnicu M, Nimmanapalli R, Nguyen D, Worthington E, Perkins C, Bhalla KN. Co-treatment with As2O3 enhances selective cytotoxic effects of STI-571 against Bcr-Abl-positive acute leukemia cells. *Leukemia*. 2001;15:772-778.
23. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research*. 1999;59:2615-2622.
24. Rothwarf DM, Karin M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Science's STKE (Electronic Resource): Signal transduction knowledge environment*. 1999;1999:RE1.
25. Hamdane M, David-Cordonnier MH, D'Halluin JC. Activation of p65 NF-kappa B protein by p210BCR-ABL in a myeloid cell line (P210BCR-ABL activates p65 NF-kappa B). *Oncogene*. 1997;15:2267-2275.
26. Reuther JY, Reuther GW, Cortéz D, Pendegast AM, Baldwin AS, Jr. A requirement for NF-kappa B activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev*. 1998;12:968-981.
27. Dou QP, McGuire TF, Peng Y, An B. Proteasome inhibition leads to significant reduction of Bcr-Abl expression and subsequent induction of apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *J Pharmacol Experi Ther*. 1999;289:781-790.
28. Gatto SR, Scappini B, Verstovsek S, Milella M, Onida F, Ball G, Kantarjian HM, Keating MJ, Cortes J, Beran M. *In vitro* effects of PS-341 alone and in combination with ST1571 in BCR-ABL positive cell lines both sensitive and resistant to ST1571. *Blood*. 2001;98:101a.
29. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000;96:2240-2245.
30. Verstovsek S, Kantarjian H, Manshouri T, Cortes J, Giles FJ, Rogers A, Albitar M. Prognostic significance of cellular vascular endothelial growth factor expression in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2002;99:2265-2267.
31. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medi*. 1996;2:1096-1103.
32. Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, Carbone DP. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2963-2970.

