Stichting Kinderoncologie Nederland
SKION
Dutch Childhood Oncology Group
DCOG

Leyweg 299, 2545 CJ The Hague
PO box 43515, 2504 AM The Hague
Tel. +31 (0)70 367 45 45
Fax +31 (0)70 367 08 68
E-mail: info@skion.nl

PROTOCOL ALL 10

Protocol voor diagnostiek en behandeling van kinderen en adolescenten (1 – 19 jaar) met Acute Lymfatische Leukemie (ALL)

Herziene versie 1.1 (1 februari 2005)
Amendementen van 25 april 2006
17 april 2007 en 13 juni 2007

huidige versie 1.3 24-10-2008

STICHTING KINDERONCOLOGIE NEDERLAND
PROTOCOL ALL 10

Protocol voor diagnostiek en behandeling van kinderen en adolescenten (1 – 19 jaar) met Acute Lymfatische Leukemie (ALL)

BESTUUR	Prof. Dr. R.M. Egeler, voorzitter Prof. Dr. R. Pieters, secretaris Prof. Dr. H.N. Caron, penningmeester Dr. M. Bierings Prof. Dr. P.M. Hoogerbrugge Prof. Dr. W.A. Kamps Dr. G.J.L. Kaspers
CENTRAAL BUREAU	Dr. A. van der Does-van den Berg, directeur
LABORATORIUM	Dr. E.R. van Wering, hoofd laboratorium A.A. Choluj L.J. Goudriaan J. Koningen E. Laene-Bruyn W.L. de Lannoy-Houtschild B.E.M. van der Linden-Schrever E.T.J.M. Roeffen Drs. A.J. van der Sluijs-Gelling J.M. van Wijngaarde-Schmitz
SECRETARIAAT	J.M.F. Bouwman I.A. van Rijn S.S.M. van Steensel-van der Meulen A.K.Touwen
DATAMANAGEMENT	Ir. C. Korbijn, hoofd datamanagement Drs. M. van den Berg Dr. H.A. de Groot-Kruseman Drs. B.P. van Ruiven-Schuurmans M.M.Scheffers-van Schie
APPLICATIE BEHEER	M.L. Tros-Batist J. Godlieb
FINANCIËN	H. Blokdijk-van der Veen M.J. van den Bos-van der Kaag

Herziene versie 1.3 (24.10.2008)

Protocol DCOG ALL-10

Treatment study protocol of the Dutch Childhood Oncology Group for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia

DCOG ALL-10 Protocol committee

Prof. Dr. R. Pieters, chairman	Erasmus MC-Sophia, Rotterdam
Dr. H. van den Berg	AMC/EKZ, Amsterdam
M. van den Berg, MSc.	senior datamanager/junior statistician DCOG
Dr. E. de Bont	AZG, Groningen
Prof. Dr. R. M. Egeler	LUMC, Leiden
Prof. Dr. P. Hoogerbrugge	AZN, Nijmegen
Dr. G.J.L. Kaspers	VUMC, Amsterdam
Dr. T. Révész, untill 01-09-04	UMC-WKZ, Utrecht

Advisors:

Prof. Dr. J.C. van Houwelingen	Medical Statistics, LUMC, Leiden
Prof. Dr. J.J.M. van Dongen	Immunology, Erasmus MC, Rotterdam
Dr. A. van der Does-van den Berg	DCOG, The Hague
Dr. C.E. vd Schoot	Sanquin, Amsterdam

DCOG Committee Supportive Care

Dr. W.J.E. Tissing, chairman	Erasmus MC-Sophia, Rotterdam
Prof. Dr. W.A. Kamps	AZG, Groningen
Dr. A.Y.N. Schouten-van Meeteren	VUMC, Amsterdam
Dr. M. van Wetering	AMC/EKZ, Amsterdam
Dr. A. van der Does-van den Berg	DCOG, The Hague

DCOG Committee Stem Cell Transplantation

Dr. M. Bierings, chairman	UMC-WKZ, Utrecht
Prof. Dr. R.M. Egeler	LUMC, Leiden
Prof. Dr. P.M. Hoogerbrugge	AZN, Nijmegen
Dr. R.Y.J. Tamminga	AZG, Groningen
Dr. A. van der Does-van den Berg	DCOG, The Hague

DCOG ALL Disease Committee

Prof. Dr. R. Pieters	Erasmus MC-Sophia, Rotterdam
Prof. Dr. W.A. Kamps	AZG, Groningen
Dr. T. Révész, untill 01-09-04	UMC-WKZ, Utrecht
Dr. M.B. Bierings, from 10-09-04	UMC-WKZ, Utrecht

Table of contents

1. ABSTRACT 6
2. AIMS 6
2.1 Standard risk (SR) group 6
2.2 Medium risk (MR) group 6
2.3 High risk (HR) group 7
3. BACKGROUND AND RATIONALE 7
3.1 Background of the SR group 8
3.2 Background of the MR group 8
3.3 Background of the HR group 10
4. PATIENT ELIGIBILITY 10
4.1 Eligibility criteria for the study are: 10
4.2 Exclusion criteria: 10
5. DEFINITIONS AND RISK GROUP STRATIFICATION 11
5.1 Definitions 11
5.1.1 CNS-status and CNS involvement 11
5.1.2 Testicular involvement 11
5.1.3 Mediastinal mass 11
5.1.4 Prednisone response 11
5.1.5 Bone marrow status 11
5.1.6 Complete remission (at day 33) 11
5.1.7 Complete remission (after day 33) 11
5.1.8 Minimal residual disease 12
5.1.9 Relapse 12
5.2 Risk group stratification 12
5.2.1 Stratification to the SR treatment: 13
5.2.2 Stratification to the MR treatment 13
5.2.3 Stratification to the HR treatment: 13
6. TREATMENT 14
6.1 Therapy elements for SR, MR and HR 14
6.1.1 Protocol I 15
6.1.1.1 Protocol I A 15
6.1.1.2 Protocol I B 16
6.1.2 Protocol M 18
6.2 Therapy for SR patients 20
6.2.1 Protocol IV for SR Patients 20
6.2.2 Maintenance therapy for SR patients 21
6.3 Therapy for MR patients 22
6.3.1 DCOG intensification/continuation for MR patients 22
6.4 Therapy for HR patients 25
6.4.1 High Risk Blocks 26
6.4.1.1 High Risk Course 1 (HR 1) 27
6.4.1.2 High Risk Course 2 (HR 2) 29
6.4.1.3 High Risk Course 3 (HR 3) 30
6.4.1.4 High Risk Course 4 (HR 4) 31
6.4.1.5 High Risk Course 5 (HR 5) 33
6.4.1.6 High Risk Course 6 (HR 6) 34
6.4.2 Protocol II 35
6.4.3 Cranial irradiation 36
6.4.4 Maintenance Therapy HR Patients 37
7. STEM CELL TRANSPLANTATION FOR HR PATIENTS 38
7.1 Aims 38
7.2 Indications for SCT 38
7.3 HLA typing and choice of donors 38
7.4 Stem cells and harvesting 40
7.5 SCT procedures 40
7.6 Immunosuppression and supportive care post SCT 42
7.7 Guidelines for Total Body Irradiation (TBI) 42
8. CNS THERAPY 43
8.1 Intrathecal therapy for CNS involvement, CNS2 and TLP+ 43
8.2 Cranial Irradiation for high-risk patients 43

9. INITIAL TESTICULAR INVOLVEMENT 43
10. STATISTICS 44
10.1 Statistics for SR 44
10.2 Statistics for MR 45
10.3 Statistics for HR 45
11. REFERENCES 47
12. LABORATORIUMONDERZOEK ALL10 49
12.1 Beenmerg- en bloedonderzoek: Cytologisch en immunophenotypisch 49
12.1.1 Cytologische diagnostiek (uitstrijkpreparaten) 49
12.1.2 Immunophenotypering en DNA-ploidie (Hemoblok – SKION) 49
12.2 Minimal Residual Disease (MRD) onderzoek en prednison respons 50
12.3 Liquordiagnostiek (SKION-liquorblok) 50
12.4 Cytogenetisch onderzoek 51
12.5 Checklist SKION bij diagnose en follow-up 52
Hemoblok 52
Liquorblok 52
Diagnose en (verdenking) recidief 52
Verzenden per BLS koerier naar het SKION laboratorium 52
13. DIAGNOSTIEK/ ONDERZOEK BIJ DIAGNOSE 53
14. DIAGNOSTIEK/ ONDERZOEK NA BEHANDELING 53
15. SUPPORTIVE CARE RICHTLIJNEN; ONDERSTEUNENDE MAATREGELEN 54
16. INFORMED CONSENT EN PATIËNTENINFORMATIE 59
17. BIJLAGE: RESEARCH PROJECTEN 72
17.1 Research study: Clinical relevance of genomic, proteomic and signalling profiling in childhood ALL: identification of new therapeutic targets and diagnostic markers associated with leukemogenesis and outcome: CI-04/0500;OC-2004-0007 73
17.2 Research study: Flow cytometric MRD analysis in childhood ALL treated according to the DCOG-ALL10 protocol: CI-04/0085;OC-2004-0006 88
17.3 Research study: Detection of chromosomal aberrations in childhood acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at residual disease by array-based comparative genomic hybridization (arrayCGH): CI-04/0084B;OC-2004-0004 94
17.4 Research study: Interactions between NFκB- and Glucocorticoid Receptor signaling pathways as molecular control mechanisms of Glucocorticoid Resistance in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at initial diagnosis (and at relapse): CI-04/0092;OC-2004-0009 98
17.5 Research study: The relationship of humoral and innate immunity with infections in children with acute lymphoblastic leukaemia: CI-04/0484;OC-2004/0001 103
17.6 Research study: Genetische polymorfismen in relatie tot bijwerkingen van de therapie en tot *in vivo* en *in vitro* gevoeligheid voor prednison bij kinderen met ALL: CI-04/0405;OC-2004/0002 105
18. BEREKENING LICHAAMSOPPERVLAK (VOLGENS GEHAN AND GEORGE) 112
19. HYPOTHETISCH SCHEMA LYMFATISCHE DIFFERENTIATIE 113
20. PERFORMANCE STATUS 114
LANSKY Score – for children aged to 9 years 114
KARNOFSKY Score – for children aged 10 years and older 115
21. THERAPIESCHEMA'S 116
22. TOXICITEITSREGISTRATIE 133
23 METC Erasmus MC: Verklaring van geen bezwaar MEC-2004-203 138

1. ABSTRACT

Levels of minimal residual disease (MRD) during initial treatment are a very important prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). In the ALL-10 protocol MRD levels will therefore be used to stratify patients into 3 risk groups.

Patients with low, no detectable MRD have an excellent prognosis, with a disease free survival (DFS) of >96%: they will therefore be stratified as standard risk (SR). This SR group will consist of about 40% of all ALL patients. In these patients chemotherapy will be reduced to obtain the same high cure rate with less therapy and less side effects. In the SR group, two control groups will be used: a historical control series and patients treated according to the standard arm of the current BFM-2000 SR trial which treatment is identical to that of the historical controls.

Patients with intermediate MRD levels have an expected outcome of 78% DFS: they will be stratified to the medium risk (MR) group. The outcome of this MR group might be improved by intensification of therapy. This intensification is realized with the slightly modified high risk intensification/continuation therapy of the DFCI. This therapy regimen has shown to give favorable treatment results in high risk patients with B- and T-lineage ALL, according to NCI-criteria based on age and white blood cell count at diagnosis. The aim will be to improve the results from 78% to 85% DFS in this group, which consists of about 50% of all ALL patients. The treatment results of patients in the ALL10 MR group will be compared with those of 2 control groups: a historical control series and patients treated according to the standard arm of the current BFM-2000 MR trial, which treatment is identical to that of the historical controls.

The high-risk (HR) group (10% of all ALL patients) will consist of patients with high MRD levels plus patients who have an unfavorable chromosomal translocation (t[9;22] or t[4;11]) or an unfavorable response to initial therapy (prednisone poor response at day 8 or no CR at day 33). Actually, the DFS in this group is 30% or less. Therefore a very intensive treatment schedule will be applied with the objective to increase the DFS to at least 40% in this risk group. This part of the protocol will be performed in collaboration with the Australian and New Zealand Children's Cancer Study Group (ANZCCSG). This collaboration will guarantee that the number of patients will be sufficient to show statistically significant improvement in outcome. Also, treatment results of this HR group will be compared with those of two control groups: a historical control series and the patients treated according to the standard arm of the current BFM-2000 HR trial, which treatment is identical to that of the historical controls.

2. AIMS

The aim of Protocol ALL-10 is to improve the overall treatment results in terms of EFS and to decrease treatment intensity in patients with a pEFS of >95%. Therapy will be tailored according to the risk of relapse as determined by the MRD levels at 2 time points during the first months of therapy. This tailored therapy should lead to less intensive therapy for patients with low risk of relapse and to intensification of therapy for patients with medium and high risk of relapse.

2.1 Standard risk (SR) group

The aim of the study is to investigate whether therapy reduction in SR patients is feasible without increasing the risk of relapse. Therefore, the efficacy of a reduced and modified protocol IV will be compared to that of protocol II of the historical control group and of protocol II of the standard arm for the BFM-2000 SR patients. The reduction of protocol IV versus protocol II consists of deletion of the second part of protocol II (14 days 6-thioguanine 60 mg/m^2/day; 1 dose of cyclophosphamide 1000 mg/m^2; 8 days araC 75 mg/m^2/dose; 2 intrathecal doses of MTX), deletion of 4 doses of doxorubicin (30 mg/m^2/dose), reduction of VCR (1.5 mg/m^2/dose) from 4 to 2 doses and dexamethasone (10 mg/m^2/day) from 3 weeks to 2 weeks and replacing 4 doses of E. coli Asparaginase (10.000 U/m^2/dose) by 1 dose of PEG-Asparaginase (2.500 U/m^2).

2.2 Medium risk (MR) group

The aim of the study is to investigate whether in MR patients more intensive therapy according to the slightly modified DFCI-high risk intensification/continuation protocol, called DCOG intensification/continuation protocol, will improve DFS for these patients, compared to the DFS of the historical controls (78% at 3 years), treated with BFM protocol II and continuation therapy and compared to the DFS of the standard arm of the BFM-2000 MR group, which treatment is identical to that of the historical control group. The DCOG intensification/continuation therapy schedule consists of dexamethasone (6 mg/m^2/day for 5 days, q 3 weeks), VCR (2 mg/m^2/dose q 3 weeks), PEG-Asparaginase (2500 U//m^2/dose q 2 weeks x15), daily 6-MP (50 mg/m^2/day) every first 2 out of 3

weeks and doxorubicin (30 mg/m^2/dose, q 3 weeks, cumulative dose 300 mg/m^2). After completion of doxorubicin administration weekly MTX i.v. (30 mg/m^2/dose) is started, and 6-MP is given daily without interruption.

2.3 High risk (HR) group

The aim of the study is to investigate whether a series of intensive courses of chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation for eligible patients will lead to a better outcome compared to the outcome of the historical control group (30% DFS at 3 years) and compared to the outcome of the BFM-2000 HR standard arm, which treatment is identical to that of the historical control group. This study will be performed in collaboration with the Australian and New Zealand Children's Cancer Study Group (ANZCCSG). Dutch HR patients will receive the same intensive treatment as the Australian and New Zealand patients. Characteristic for this treatment regimen are 3 - 6 courses of chemotherapy consisting of the following combinations: high dose cytosine arabinoside and mitoxantrone, high dose cyclophosphamide and etoposide, and high dose cytosine arabinoside, idarubicin and fludarabine respectively. Part of the HR patients will undergo allogeneic Stem Cell Transplantation (SCT). The treatment results of the HR treatment in protocol ALL10 will be compared with the effectivity of the classical BFM HR blocks.

3. BACKGROUND AND RATIONALE

The overall long-term event-free survival for children with ALL using current treatment schedules is about 75% (1,3). Several risk factors have been identified, such as the presence of cytogenetic abnormalities (t[9;22], t[4;11]), a poor response to initial therapy, as measured by the response to prednisone in the peripheral blood after one week of therapy, or induction failure after 4 or 6 weeks of chemotherapy. In a prospective, international study the clinical relevance of PCR-based levels of minimal residual disease (MRD) at multiple time points during treatment and follow-up was assessed in children, treated according to BFM-oriented therapy (3). This therapy consisted of induction therapy (protocol I), a block focused on treatment of the central nervous system and other extramedullary sites (Protocol M), a reinduction course (protocol II), followed by continuation therapy with oral 6 MP and MTX, to a total duration of treatment of two years. With the combination of MRD information from the first two follow-up points (day 33 and before the start of protocol M) three patient groups could be identified: a standard risk group (SR) (n=55; 43% of all patients; relapse rate at 3 years: 2% (95% CI: 0.05-12%)), a high risk group (HR) (n=19; 15% of all patients; relapse rate at 3 years: 75% (95% CI: 55-95%)) and an intermediate group (MR) (n=55; 43% of all patients; relapse rate at 3 years: 23% (95% CI: 13-36%)) (Figure 1).

These results allow for a study to investigate whether therapy reduction is possible for patients with an excellent prognosis on current treatment protocols (SR patients) and whether further intensification of therapy improves the outcome for patients in the MR and HR group (3-5). In the ALL-10 protocol all patients will receive BFM protocol I for induction and protocol M. Patients will be stratified into 3 risk groups, based on the MRD levels at the above mentioned two time points (day 33 of protocol I and before protocol M). The patient groups of the international study will serve as historical control groups for comparison of treatment results.

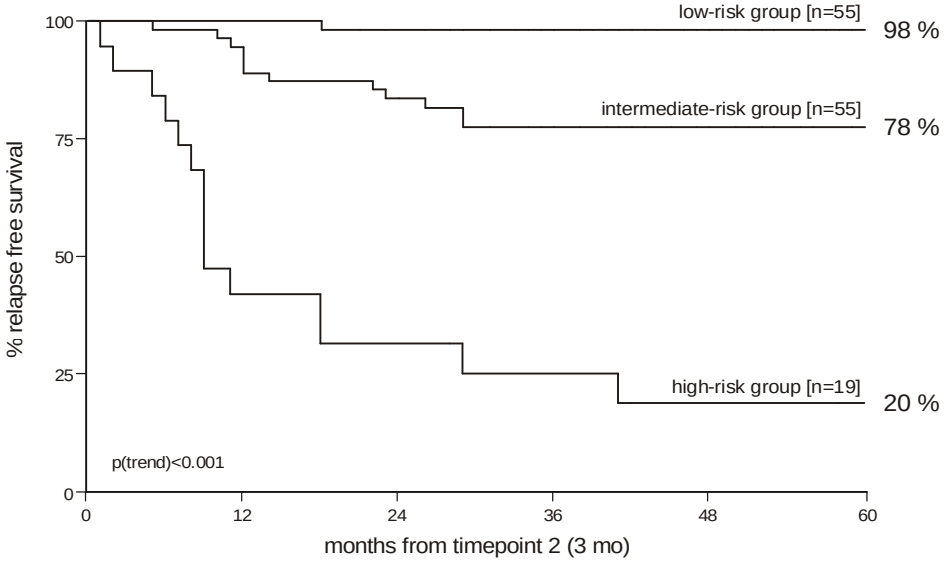


Figure 1

3.1 Background of the SR group

Since MRD levels are determined at day 33 and at the start of protocol M, in protocol ALL-10 the results for stratification will only be available during protocol M. So therapy reduction for SR patients is feasible only after protocol M and preferably in the reinduction fase BFM protocol II. The COALL study group has shown that reduction of anthracyclines and dexamethasone in BFM protocol II results in significantly less infections and less hospitalization days (6). Furthermore although the omission of protocol II in the DCLSG protocol ALL-7 for SR-patients (not stratified on the basis of MRD levels) resulted in a poorer outcome in these patients than in those who did receive protocol II, the majority of patients treated without protocol II appeared to be long-term survivors (7). This means that if patients could carefully be identified as belonging to the lowest risk group on the basis of MRD levels, these patients might be treated without protocol II or with a reduced BFM protocol II. With PCR based MRD detection a group of patients with an excellent prognosis (MRD negative with two sensitive MRD targets a sensitivity level of at least 10^{-4} both at day 33 and before protocol M; DFS at 3 years 98%) could be identified and they are candidates for reduction of therapy (3).

In protocol ALL10 the original BFM protocol II will be reduced to protocol IV for SR patients. This reduction consists of the deletion of the second part of protocol II (14 days 6-thioguanine 60 mg/m^2/day; 1 dose of cyclophosphamide 1000 mg/m^2; 8 days araC 75 mg/m2/dose; 2 intrathecal doses of MTX), the deletion of 4 doses of doxocubicin (30 mg/m^2/dose), the reduction of VCR (1.5 mg/m^2/dose) from 4 to 2 doses and of dexamethasone (10 mg/m^2/day) from 3 weeks to 2 weeks and the modification of 4 doses of E. coli Asparaginase (10.000 U/m^2/dose) to 1 dose of PEG-Asparaginase (2.500 U/m^2). The treatment results of ALL10 SR patients will be compared to those of the historical control group (3), treated with the complete BFM protocol II, and secondly with the results of the SR patients treated according to the current German BFM-2000 study in which the MRD based stratification of patients is identical to the stratification in protocol ALL10. In the German BFM study SR patients are randomized into two groups: one group (control group) is treated identically to the historical group including a complete protocol II; the other group (experimental arm) receives protocol III, which is a slightly reduced protocol II instead of the complete protocol II. The ALL10 protocol IV can be regarded as a further reduction of the BFM protocol III. This will finally result in the comparison of the EFS of MRD SR patients treated with protocol II (two groups: historical group and the BFM 2000 control arm), a slightly reduced protocol III (BFM 2000 experimental arm) and a further reduced protocol IV (DCOG ALL10).

3.2 Background of the MR group

Based on the results the international study (3) patients with MRD levels of $< 10^{-3}$ or even MRD negative at the start of protocol M, but MRD positive (generally levels $\geq 10^{-4}$) at day 33 are defined as MR group patients (DFS after three years: 78%). Because about one third of all relapses occur in this group, the overall outcome in children with ALL will improve with the improvement of the treatment of the MR group. In the current German BFM-2000 study, these MR patients are randomized to receive protocol II once (control arm) or protocol III twice (experimental arm).

In a CCG study a so-called double induction (DI) significantly improved the treatment results (8). It is however difficult to select the most effective therapy for this group of patients: the comparison of treatment schedules with children with ALL around the world is hampered by the fact that treatment results of selected patient groups are reported and by the fact that patients are classified into low- and high-risk groups according to different criteria. The best comparison of treatment results of the major treatment consortia has been published in a special issue of Leukemia in 2000 (9-20). All groups reported their results uniformly, by categorizing patients according to the NCI risk criteria of age and white blood cell count (WBC) at diagnosis. The results for both B-lineage and T-lineage patients are shown in the table below.

Table 1 5 yr Event Free Survival of treatment consortia

B-lineage ALL (5yr EFS)	**T-lineage ALL** (5yr EFS)
1. DFCI (84%)	1. DFCI (79%)
2. BFM (80%)	2. CCG (73%)
3. St Jude (80%)	3. COALL (71%)
4. NOPHO (79%)	4. ALL-8 (71%)
5. COALL (78%)	
6. CCG (75%)	
7. AIEOP (75%)	
8. ALL-8 (73%)	
B-lineage ALL NCI-SR	**T –lineage ALL NCI-SR**
1. St Jude (88%)	1. DFCI (100%)
2. BFM (87%)	2. COALL (86%)
3. DFCI (85%)	3. ALL-8 (86%)
4. NOPHO (85%)	4. CCG (80%)
5. COALL (82%)	5. NOPHO (75%)
6. CCG (80%)	6. BFM (72%)
7. AIEOP (80%)	
8. ALL-8 (79%)	
B-lineage ALL NCI-HR	**T-lineage ALL NCI-HR**
1. DFCI (82%)	1. DFCI (74%)
2. COALL (76%)	2. CCG (70%)
3. St Jude (70%)	3. COALL (68%)
4. NOPHO (68%)	4. ALL-8 (67%)
5. CCG (67%)	5. St Jude (65%)
6. ALL-7/8 (67%)	6. EORTC (63%)
7. BFM (66%)	

NCI-SR: age 1-9 yr <u>and</u> WBC < 50 x 10^9/L
NCI-HR: age > 9 yr <u>or</u> WBC > 50 x 10^9/L

Both for high risk B- and T-lineage ALL, the DFCI regimen shows the most favorable results. This regimen uses, after induction and CNS directed therapy, an intensification regimen, consisting of series of short reinduction courses. The 3-weekly intensification courses consist of prednisolone (5 days), VCR and doxorubicin plus weekly administration of asparaginase and the use of 6-MP during the first 2 out of 3 weeks. Continuation therapy consists of oral 6-MP and iv MTX plus pulse therapy with 5 days of prednisone and one dose of VCR every 3 weeks.
In the ALL-10 protocol, this DFCI regimen will be applied for MR patients, after protocol M. However, since dexamethasone has a stronger antileukemic effect than prednisone, in the ALL10 protocol prednisone will be substituted by dexamethasone (21). Also, PEG-asparaginase will be used instead of native E.coli asparaginase, because of its favorable pharmacokinetic and toxicity profile (22, 23).
The outcome of the ALL10 MR patients will be compared with the outcome of the historical control patients (treated with BFM protocol II) (3) and with the outcome of the 2 randomized arms for MR patients of the current German BFM-2000 study. In this BFM-study, the MR patients are stratified according to the same MRD levels as in ALL10 and randomized into two groups. For one group (control arm) the treatment is identical to that of the historical control group (4), including a complete protocol II; for patients in the experimental arm protocol II has been substituted by protocol III twice. This will finally result in the comparison of the outcome of MRD stratified MR patients treated with ALL10 (modified DFCI-HR intensification/continuation) with the outcome of patients treated with protocol II (two groups: the historical group and BFM control arm) and patients treated with protocol III twice (BFM-2000 experimental arm).

3.3 Background of the HR group

For patients with high levels of MRD ($\geq 10^{-3}$) at the start of protocol M (MRD HR patients), the DFS is < 30% after 3 years (3).

Several other categories of patients, in part overlapping with the MRD HR group, also have a dismal outcome: patients with a poor response to prednisone treatment, patients who are not in CR at day 33, and patients with unfavorable chromosomal translocations t(9;22) (see paragraph 4.2) or t(4;11) in their leukemic cells. In the ALL10 protocol these patients together form the HR group. Because of their poor prognosis with current treatment regimens the prognosis for these patients might be improved with further intensification of therapy. In the German BFM-2000 protocol a randomized study is performed to investigate the efficacy of two cycles of three BFM intensive chemotherapy blocks versus the effectiveness of one cycle of these 3 blocks followed by 3 times protocol III (experimental arm).

Many small studies suggest that the following combinations of drugs might improve the outcome by better synergism (24-33):

a. High dose cytosine arabinoside and mitoxantrone
b. High dose cyclophosphamide and etoposide
c. Idarubicin, fludarabine and cytosine arabinoside

Based upon these studies, the Australian and New Zealand Children's Cancer Study Group (ANZCCSG) has proposed the use of 6 consecutive courses of therapy for HR patients followed by protocol II and continuation therapy. Based on the analysis of the BFM treatment results most of HR patients are eligible for stem cell transplantation (SCT) after 3 HR courses. In protocol ALL-10 HR patients will be treated identically to this proposal, which will allow a combined analysis of these patients. In the DCOG ALL10-, the ANZCCSG ALL8- and ALL-BFM 2000 protocol HR patients are defined by exactly the same criteria. The outcome of the combined group of DCOG and ANZCCSG HR patents will firstly be compared to the outcome of the historical control group, secondly to the outcome of the two randomized arms of the current ALL-BFM 2000 study. This will finally result in a possible comparison of the ANZCCSG/DCOG ALL10 HR protocol, the historical control HR patients, the BFM-2000 HR control arm and the BFM-2000 experimental arm.

4. PATIENT ELIGIBILITY

The protocol population includes children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (ALL) with ≥ 25% blasts in the bone marrow.

4.1 Eligibility criteria for the study are:

1. Newly diagnosed patients with T-lineage or precursor-B lineage ALL (patients with mature B-ALL are **not** eligible)
2. Age between ≥ 1 and < 19 years
3. Informed consent signed by parents/guardians and patient (if 12 years or older)
4. Diagnosis ALL confirmed by DCOG laboratory

4.2 Exclusion criteria:

1. Age ≥ 19 years at diagnosis
2. Age < 366 days at diagnosis (infant ALL)
3. Patients with secondary ALL
4. Patients with mature B-ALL (immunophenotypical or documented presence of karyotype t(8;14), t(2;8), t(8;22) and breakpoint as in B-ALL)
5. Patients with relapsed ALL
6. Clinical contra-indications for treatment according to (parts of) protocol ALL10.
7. Essential data missing (in consultation with the protocol chairman)
8. Treatment with systemic corticosteroids and/or cytostatics in a 4-week interval prior to diagnosis

PM. Patients with Ph-positive ALL (documented presence of t(9;22)(q34;q11) and / or of the BCR/ABL fusion transcript) will be transferred to the EsPhALL protocol after protocol I A. If no informed consent is given for the EsPhALL protocol, the patient is eligible for the ALL10 protocol

5. DEFINITIONS AND RISK GROUP STRATIFICATION

5.1 Definitions

5.1.1 CNS-status and CNS involvement

a) CNS **status** is defined as follows:

- **CNS1:** nontraumatic puncture, ≤ 5 WBC/µl CSF without leukemic cells after cytocentrifugation
- **CNS2:** nontraumatic puncture, ≤ 5 WBC/µl CSF with identifiable leukemic cells
- **CNS3:** nontraumatic puncture, > 5 WBC/µl CSF with identifiable leukemic cells
- **TLP+:** traumatic puncture with leukemic cells
- **TLP-**: traumatic puncture without leukemic cells

A traumatic lumbar puncture (TLP) is defined as 10 or more erythrocytes/µl CSF or as CSF macroscopically contaminated with blood.

b) CNS **involvement** is defined as follows:

- CNS3 status OR
- Intracerebral or meningeal mass seen on the MRI or CT scans OR
- Cranial nerve palsy (irrespective of CSF or imaging findings) OR
- Retinal Involvement (irrespective of CSF findings)

See also the remarks in paragraph 8.1

5.1.2 Testicular involvement

Testicular involvement is defined as leukemic infiltration of the testis, documented by biopsy.

5.1.3 Mediastinal mass

Mediastinal mass is defined as a mass of ≥ 1/3 thoracic diameter at the level of the 5th thoracic vertebra

5.1.4 Prednisone response

Prednisone response: determination of the number of leukemic blasts in peripheral blood on day 8 after 7 days of systemic treatment with prednisone and one dose of intrathecal methotrexate at day 1. Patients with ≥ 1000 leukemic blasts/µl blood at day 8 are defined as **prednisone poor responders (PPR)** and those with <1000 leukemic blasts/µl blood at day 8 **as prednisone good responders (PGR).**

5.1.5 Bone marrow status

M1/M2/M3 Bone marrow status:
M1 status: < 5% leukemic cells
M2 status: ≥ 5% and < 25% leukemic cells
M3 status: ≥ 25% leukemic cells

5.1.6 Complete remission (at day 33)

Bone marrow response **at day 33** of induction therapy (the end of protocol Ia). **Complete remission** (CR) **at day 33** is defined on morphological grounds by the presence of <5% leukemic blasts and by regenerating hematopoiesis and without documented extramedullary leukemia, with the exception of testicular enlargement (see ch. 9).
Patients with hypoplastic bone marrow at day 33 and no evidence of disease at any other site with:

- WBC ≥ 2 x 10^9/L and platelets ≥ 50 x 10^9/L are considered to be in complete remission.
- WBC < 2 x 10^9/L or platelets < 50 x 10^9/L should undergo an extra bone marrow puncture at the start of protocol 1B.

If this repeated bone marrow puncture still shows insufficient hematopoiesis recovery, the patient will continue with protocol 1B irrespective of the peripheral blood count. The day 79 BM will then be used tot determine whether a complete remission has been achieved.
Patients who have no CR at day 33 (i.e. M2 or M3 bone marrow status) will remain on the protocol and will receive protocol IB and then HR blocks (see 5.2.3 and 6.1).

5.1.7 Complete remission (after day 33)

Complete remission < 5% leukemic cells in the bone marrow and recovery of normal hematopoiesis, absence of peripheral blood leukemic cells and no evidence of disease at any other site.

5.1.8 Minimal residual disease

Minimal residual disease levels will be determined at two time points: day 33 (after protocol Ia, time point 1= TP1) and after 11 weeks of therapy at the start of protocol M (day 79) (time point 2= TP2).

a. *Definition of reproducible sensitivity and sensitivity of MRD-PCR targets*
The reproducible sensitivity (also called quantitative range) and sensitivity are defined according to the guidelines of the European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL).

b. *Guidelines for interpretation of real time quantitative PCR (RQ-PCR) results*
The guidelines for interpretation of the RQ-PCR results (positivity, negativity, background, correction of results according to control gene, etc) are according to the ESG-MRD-ALL.
Standard curves for quantitation are based on duplicate dilution steps of the original patient material at diagnosis. Follow-up samples will be analyzed in triplicate for each MRD-PCR target.

c. *Definition of MRD levels and sensitivity of MRD targets*
Definition of MRD 10^{-3} is: $\geq 5 \times 10^{-4}$ and $< 5 \times 10^{-3}$;
Definition of MRD 10^{-4} is: $\geq 5 \times 10^{-5}$ and $< 5 \times 10^{-4}$;
Definition of MRD negativity is: no MRD detectable with 2 MRD-PCR targets, which reach sufficient sensitivity: at least 1 target with a reproducible sensitivity $\leq 10^{-4}$ and 1 target with a reproducible sensitivity $\leq 10^{-3}$, both targets having a sensitivity of at least 10^{-4} .
If the two used MRD-PCR targets lead to different MRD levels, then the highest level will be used because the lower one might be due to a leukemic sub-clone.

d. *Requirements for PCR targets for MRD based stratification.*
Two sensitive MRD-PCR targets will be used. Only for HR classification MRD-PCR targets with a lower sensitivity can be used because this will not lead to misclassification.
For SR classification: at least 1 target with a reproducible sensitivity $\leq 10^{-4}$ and 1 target with a reproducible sensitivity $\leq 10^{-3}$,both targets having a sensitivity of at least $10^{-4;}$
For MR classification: 2 targets with a reproducible sensitivity $\leq 10^{-3}$
For HR classification: less sensitive targets can be used if both follow-up time points are positive $\geq 10^{-3}$.

e. *Definition of MRD-based risk groups*
SR group: TP1 and TP2 negative;
HR group: TP1 and TP 2 both positive at a level of $\geq 10^{-3}$.
MR group: TP1 and/or TP2 positive, but the MRD level at TP2 is $< 10^{-3}$.

5.1.9 Relapse

Relapse is recurrence of leukemia after CR has been documented. Relapse is defined as:

- > 5% leukemic blasts in the bone marrow by morphology and confirmed by immunophenotyping or genotyping AND/OR
- leukemic blasts in the peripheral blood by morphology, confirmed by immunophenotyping or genotyping AND/OR
- leukemic cells in the CSF by morphology, confirmed by immunophenotyping or genotyping. But if these leukemic cells in CSF are found within ≤ 5 WBC/µl CSF, an extra confirmation is needed by a repeated lumbar punction (e.g. after 4 weeks) AND/OR
- leukemic infiltration elsewhere

If a relapse is diagnosed in a patient in the SR group, the head of the central laboratory of the DCOG should be informed by telephone. After confirmation of the relapse, the data manager and protocol chairman will calculate whether the stopping rules are reached (see chapter 10).

5.2 Risk group stratification

The risk-group stratification in protocol ALL-10 is primarily based on the response to chemotherapy (Prednisone response, CR at day 33, MRD at TP1 and TP2). In addition to therapy response measurements, initial CNS and testis involvement, as well as specific chromosomal abnormalities in the leukemic cells are used for stratification.
Patients whose MRD response could not be determined, are not placed into the SR group, but into the MR or HR group, according to the other stratification factors (see

below). Risk group stratification will be done by the central office of the DCOG, and sent by fax to the treating physician.

5.2.1 Stratification to the SR treatment:

Patients who fulfill **all** of the following criteria will be treated according to the SR regimen

- a prednisone good response (PGR) on day 8 of the prephase therapy AND
- cytomorphological complete remission at day 33 AND
- MRD-negativity at day 33 ànd at day 79 (before start of Protocol M) AND
- no presence of the t(9;22) translocation (Philadelphia chromosome) or the corresponding fusion gene BCR/ABL in the leukemic cells at diagnosis AND
- no presence of the t(4;11)(q11;q23) translocation or the corresponding fusion gene MLL/AF4 in the leukemia cells at diagnosis AND
- no CNS or testis involvement at diagnosis

5.2.2 Stratification to the MR treatment

- Patients who fulfill **all** of the following criteria will be treated according to the MR regimen
- a prednisone good response on day 8 of the prephase therapy AND
- cytomorphological complete remission (CR) at day 33 AND
- MRD-positivity at day 33 and/or at day 79 (before the start of protocol M), but MRD level at day 79 $< 10^{-3}$ AND
- no presence of the t(9;22) translocation (Philadelphia chromosoma) or the corresponding fusion gene BCR/ABL in the leukemic cells at diagnosis AND
- no presence of the t(4;11)(q11;q23) translocation or the corresponding fusion gene MLL/AF4 in the leukemia cells at diagnosis

Patients with inconclusive or missing MRD data are also stratified into the MR group, except patients who are eligible for HR treatment. Patients with CNS and/or testis involvement at diagnosis are stratified into the MR group unless they have one of the HR criteria. Then they are stratified into the HR group.

5.2.3 Stratification to the HR treatment:

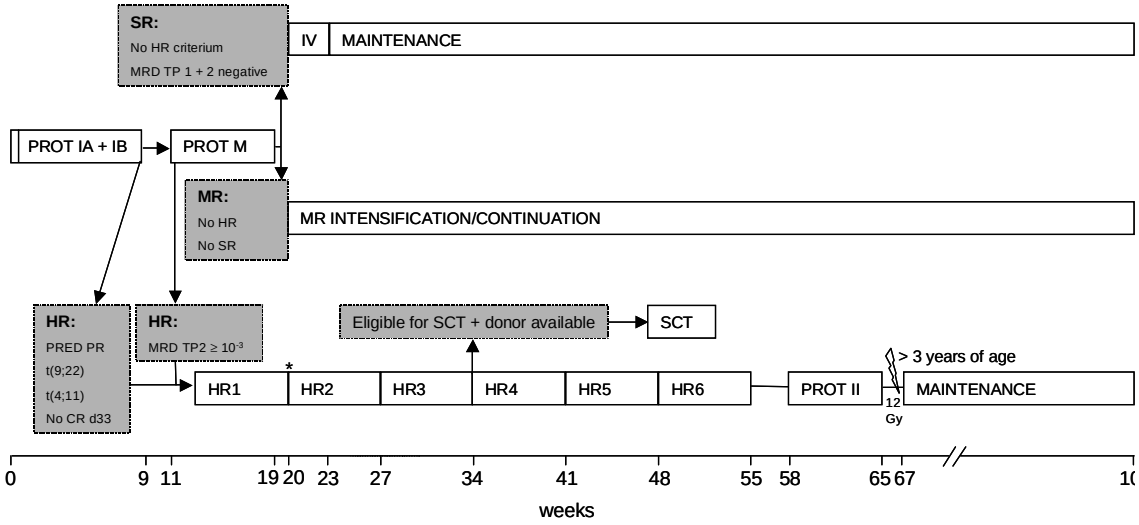
Patients who fulfill one or more of the following criteria will be treated according to the HRG regimen:

- a prednisone poor response (PPR) on day 8, OR
- MRD level $\geq 10^{-3}$ or unknown at day 33 and MRD level of $\geq 10^{-3}$ at day 79 (before start of Protocol M), OR
- presence of the t(4;11)(q11;q23) translocation or the corresponding fusion gene MLL/AF4, OR
- no complete remission at day 33, OR
- presence of the t(9;22) translocation (Philadelphia chromosome) or the corresponding fusion gene BCR/ABL in the leukemic cells if no informed consent is given for the EsPhALL protocol.

6. TREATMENT

DCOG ALL-10 Overview

ALL-10 OVERVIEW

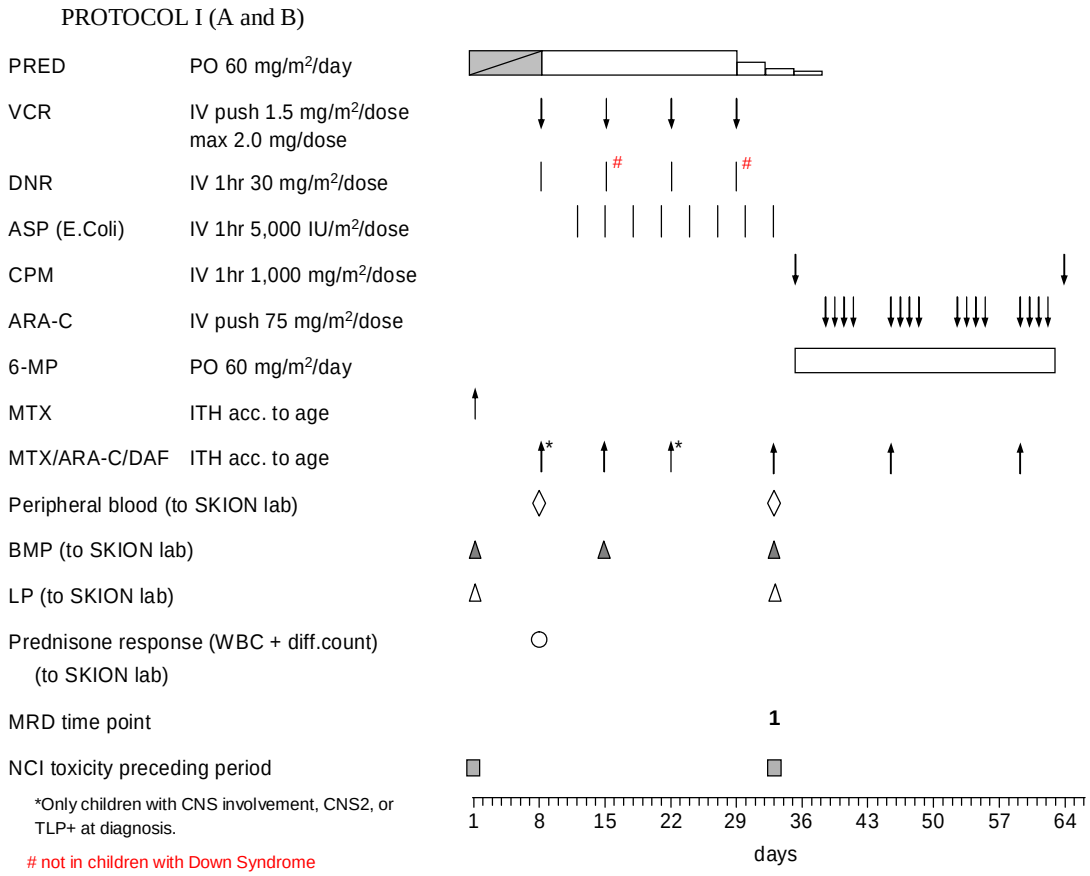


* duration of HR1-HR6 depends on neutrophil recovery

6.1 Therapy elements for SR, MR and HR

All SR and MR patients will receive protocol I and protocol M. After this, they will be treated according to their stratification group. HR patients identified by other criteria than MRD, i.e. prednisone poor response, t(9;22), t(4;11) or no CR at day 33, will not receive protocol M but will start with HR blocks after completing protocol I. HR patients identified by MRD while being on protocol M, will switch from protocol M to HR blocks as soon as possible, preferably at day 15 of protocol M, or otherwise after completing one of the consecutive HD-MTX infusions of protocol M.

6.1.1 Protocol I



6.1.1.1 Protocol I A

TRIPLE i.th. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F aquosum** at day 15 and 33. At day 1 only MTX intrathecally.

Dose according to age

Age (yrs)	MTX (mg)/ dose	Ara-C (mg)/ dose	DAF mg/d ose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Ensure that the platelet count is > 50 x 10^9 /L before performing a lumbar puncture.
- Additional triple Ith should only be administered at days 8 and 22 in patients with CNS involvement, CNS2 or TLP+ at diagnosis (see definitions in paragraph 5.1)
- Lowered-head position for at least 4 hours after triple i.th. application.

PRED **Prednisone/**Prednisolone 60 mg/m^2/day, i.v. or p.o. (divided into three single doses per day).
Days 1-7: Start with a reduced dose in case of high WBC*, increase the dose depending on therapy response (WBC-reduction, organ reduction, liver and kidney function) to 100% utterly at day 5 (e.g. 50% at day 3, 75% at day 4).
Cumulative dose at day 7 should be: $\geq$ 210 mg/m^2
*WBC: 25-100.10^9/L : 50% of the dose
>100.10^9/L : 25% of the dose
For prevention/treatment of acute cell lysis syndrome: see chapter on supportive care.
Days 8-28: Prednisone 60 mg/m^2/day p.o. divided into three single doses/day.
From day 29: Decrease of 3x3 days, each time with half the dosage.

The prednisone response is essential for risk group stratification. At day 8, send peripheral blood slides plus 1 ml heparin blood to central laboratory of DCOG (see chapter 12).

VCR **Vincristine** 1.5 mg/m^2/dose i.v. (max. single dose 2 mg) days 8, 15, 22, 29.

DNR **Daunorubicin** 30 mg/m^2/dose, i.v. over 1 hour, on days 8, 15, 22, 29.
Echocardiography before 1st dose.
In children with DOWN syndrome, the 2nd and 4th dose of DNR are not given. In case of a grade III/IV infection, do not administer the 1st and 3rd dose of DNR.

ASP **E.coli Asparaginase** 5,000 IU/m^2/dose i.v., over 1 hour, day 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 and 33.
In the case of hypersensitivity to native E.coli Asparaginase, another Asparaginase product should be applied.
Recommendations for substitution of E.coli Asparaginase:

- PEG Asparaginase 2,500 IU/m^2/dose, i.v., in 1 hour.
  One dose of PEG-Asparaginase substitutes for 4 doses of E.coli
  If hypersensitivity to native E.coli Asparaginase occurs:
  - during the first 4 doses, give 2 doses of PEG-Asparaginase, 10 days apart
  - during the 5-7th doses, one dose of PEG-Asparaginase should be given.
- If available: Erwinia Asparaginase 10,000 IU/m^2/dose, i.v. in 1 hour, on day 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, and 34.
  Six doses of Erwinia Asparaginase substitute for 4 doses of E.coli Asparaginase

The bone marrow puncture (BMP) at day 33 is essential for MRD-PCR detection (MRD time point 1) for identification and stratification of patients into Standard Risk, Medium Risk or High Risk Group.
A 'Hemoblok' with 5 ml bone marrow (heparinised) and 6 bone marrow slides should be sent to the DCOG-laboratory.
In case of logistic problems, the BMP at day 15 and day 33 may be taken one or maximum two days earlier or later.

6.1.1.2 Protocol I B

Requirements for the start of protocol I B

- Complete remission at day 33 (see also 5.1)
- Good clinical condition without serious infections
- Creatinine within normal limits according to age
- WBC > 2 x 10^9/L
- Platelets > 50 x 10^9/L

Requirements starting each block of cytosine arabinoside (ARA-C)

- WBC > 0.5 x 10^9/L
- Platelets > 30 x 10^9/L

Requirements for the second cyclophosphamide-dose at day 64

- WBC > 1 x 10^9/L
- Granulocytes > 0.3 x 10^9/L
- Platelets > 50 x 10^9/L

If the second cyclophosphamide dose has to be postponed for more than 2 weeks, delete this dose.
If possible, the ARA-C blocks should not be interrupted. If nevertheless an ARA-C block has to be postponed or interrupted because of clinical problems, the 6-mercaptopurine should also be interrupted. Omitted 6-mercaptopurine doses should be made up until the planned cumulative total dose of 1680 mg/m^2 (28 x 60 mg/m^2) is reached.

CPM **Cyclophosphamide** 1,000 mg/m^2/dose, i.v. over 1 hour, day 36 and 64.

Requirements during administration

- Hydration and cystitis prophylaxis: 3,000 ml/m^2 fluid/24 hr for a minimum of 6 hours;
- Mesna (Uromitexan®): 400 mg/m^2/dose i.v. before and 4 and 8 hours after the start of the CPM-infusion;
- In case of (microscopic) hematuria: increase i.v. fluid and Mesna;
- Furosemide 0.5 mg/kg i.v., 6 hours and 12 hours after CPM only if required for diuresis.

6MP **6 Mercaptopurine** 60 mg/m^2/day p.o., days 36-63 (28 days in total).
Administration: with empty stomach, in the evening, not with milk.
Omitted 6 MP-doses should be made up until the planned cumulative total dose of 1680 mg/m^2 (28 x 60 mg/$m^{2)}$ is reached.

ARA-C **Cytosine Arabinoside** 75 mg/m^2/dose i.v. push in four blocks, of 4 days each:
Days 38, 39, 40, 41
Days 45, 46, 47, 48
Days 52, 53, 54, 55
Days 59, 60, 61, 62

TRIPLE i.th. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F aquosum**
in an age adjusted dose on the same day as the first ARA-C dose in block 2 and 4 (day 45 and day 59).

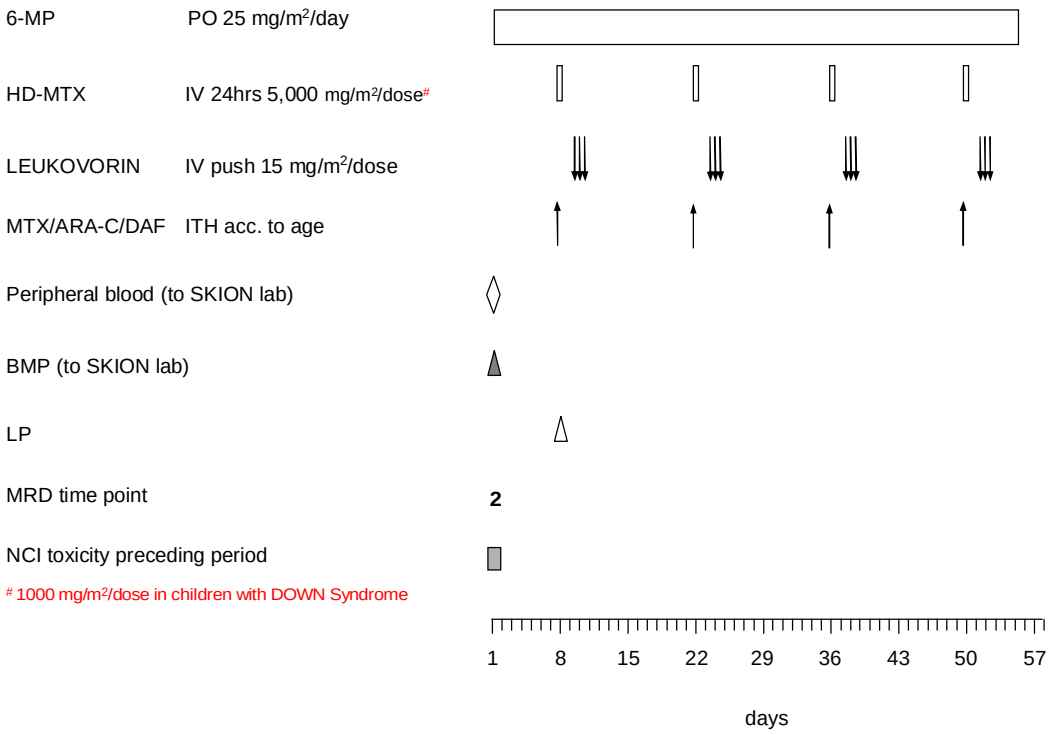
Dose according to age:

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Lowered head position for at least 4 hours after MTX i.th. application is recommended.

6.1.2 Protocol M

PROTOCOL M



- **On day 1: the BMP for MRD detection time point 2 has to be performed. This BMP is, together with the BMP at day 33 (time point 1) essential for identification and stratification of patients into standard risk (SR), medium risk (MR) and high risk (HR) groups. A 'Hemoblok' with 5 ml bone marrow and 6 bone marrow slides should be sent to the DCOG laboratory**
- **In the course of Protocol M the BM samples will be analyzed for MRD. The responsible pediatric oncologist will be informed via the DCOG about the results as soon as possible**
- **Patients with MRD positivity of ≥ 10^{-3} at the start of Protocol M will switch to HR-treatment (see paragraph 6.1)**

Protocol M begins 2 weeks after the completion of Protocol I with oral administration of 6 mercaptopurine.

Requirements for the start of Protocol M and for each course of HD-MTX

- Good clinical condition without severe infections
- Renal function within the normal age-adapted limits
- ASAT/ALAT < 5x upper normal limit
- WBC > 1.5 x 10^9/L
- Platelets > 50 x 10^9/L

Drug interactions

Drugs which compromise renal function, e.g. aminoglycosides, can decrease clearance of methotrexate and lead to systemic toxicity. Due to methotrexate metabolism interactions, cotrimoxazole should not be given at least 6 days prior to beginning methotrexate therapy, and should be resumed only after ending protocol M.

6MP **6-Mercaptopurine** 25 mg/m^2/day p.o., for 56 days.
Administration: with empty stomach, in the evening, not with milk.

HD-MTX **High dose Methotrexate** 5,000 mg/m^2/dose, i.v., over 24 hours, days 8, 22, 36, 50.
In children with DOWN syndrome the dose is 1000 mg/m^2.

Requirements for the administration of HD-MTX

- No severe infection, no mucositis
- Renal function within normal limits corrected for age
- No effusions
- ASAT/ALAT < 5x upper nomal limit for age
- If transaminases are between 5x and 20x upper limit of normal value, wait 36-48 hours and check to ensure that the levels are decreasing. If ASAT and/or ALAT are > 20 times of normal upper limits, contact the protocol chairman for further recommendations
- Urine alkalinization: urine pH between 7 and 8, before, during and for at least 48 hours after start MTX-infusion
- 10% of the total HD-MTX dose should be administered as a loading dose infused over 30 minutes
- 90% of the dose should be administered as continuous infusion over 23 ½ hours
- Determination of the MTX serum level: 24 and 48 hours after beginning of the MTX infusion
- In case of seizures, which may be due to MTX, the next course of MTX can be given according to protocol including i.th. therapy if no neurological symptoms remain. Otherwise, contact the protocol chairman
- It is recommended to start HD-MTX infusion at 8.00 or 14.00 hr, in order to give MTX i.th. and to measure MTX plasma concentrations during regular working hours.

LEUKOVORIN **Folinic Acid** 15mg/m^2/dose, i.v., 42, 48, 54 hours after beginning of Methotrexate infusion

TRIPLE it.h. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F Aquosum**
in an age-adjusted dose at the start of the methotrexate infusion (see also above) on days 8, 22, 36, 50.

Dose according to age:

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

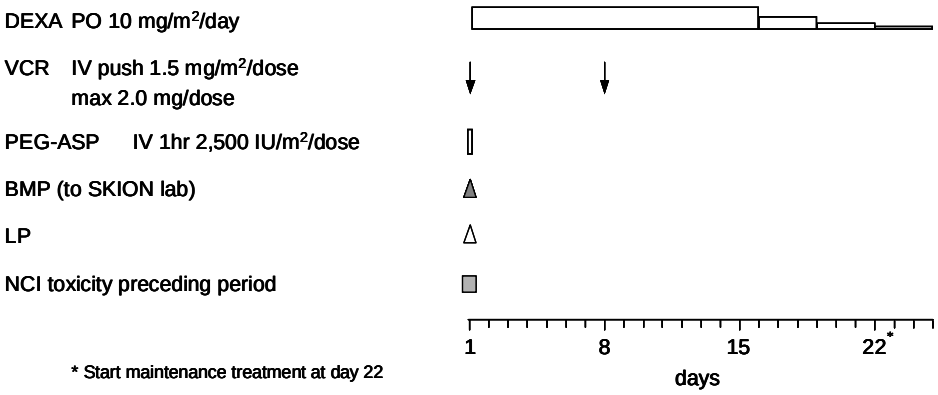
- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

6.2 Therapy for SR patients

After protocol I and M, SR patients will be treated with protocol IV, followed by maintenance therapy.

6.2.1 Protocol IV for SR Patients

PROTOCOL IV



Protocol IV starts 2 weeks after the start of the last HD-MTX infusion of protocol M.
Requirements for the start of protocol IV:

- Good clinical condition without serious infections;
- WBC > 2 x 10^9/L;
- Platelets > 50 x 10^9/L.

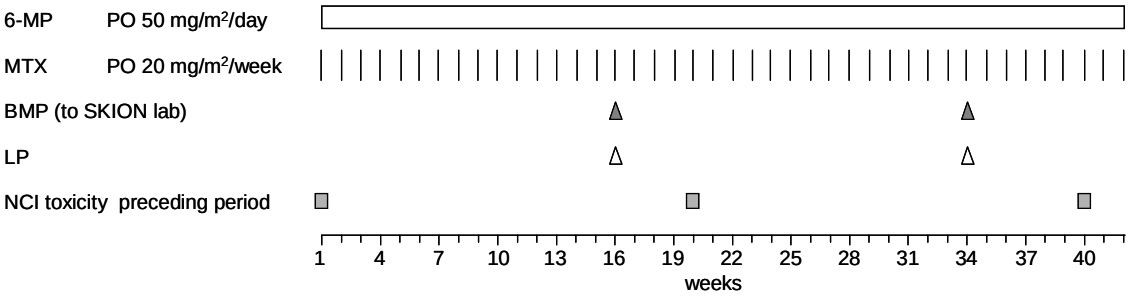
DEXA **Dexamethasone** 10 mg/m^2/day p.o., divided in three doses, days 1-15. From day 16: decrease of 3x3 days, each time with half the dosage. PM: start maintenance treatment at day 22.

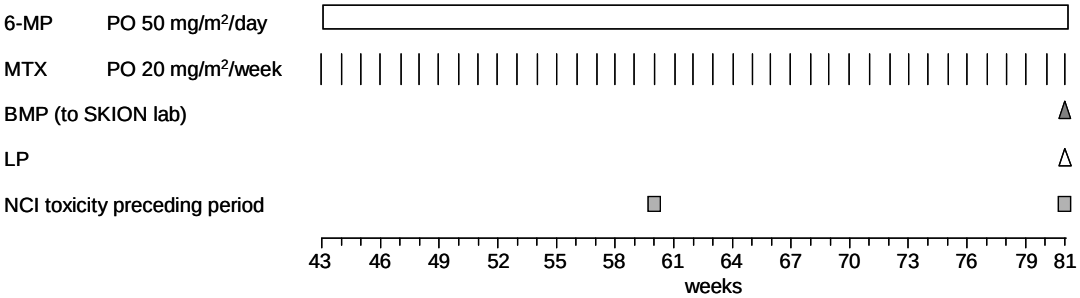
VCR **Vincristine** 1.5 mg/m^2/dose, i.v., (max. single dose 2 mg), day 1 and 8.

ASP **PEG Asparaginase** 2,500 IU/m^2/dose, i.v., in 1 hour, day 1.

6.2.2 Maintenance therapy for SR patients

SR-MAINTENANCE





Maintenance therapy starts at day 22 of protocol IV.

Requirements for the start of continuation treatment:

- good clinical condition without serious infections;
- WBC > 2 x 10^9/L;
- Platelets > 50 x 10^9/L;

Maintenance therapy will consist of:

- Weekly methotrexate 20 mg/m^2 p.o. and;
- Daily 6-mercaptopurine 50 mg/m^2/dose p.o.in the evening, empty stomach, without milk;
- Total duration of therapy from day of diagnosis to end of therapy is 104 weeks.

Dose guidelines

In case of leucopenia < 2.0 x 10^9/L, first stop administration of cotrimoxazol. If this does not result in recovery of leukocytes, then follow the dose reduction below.

Therapy management according to:	Count reading	% of dose MP/MTX
White cell count	< 1.0 x 10^9/L 1.0 – 2.0 x 10^9/L 2.0 – 3.0 x 10^9/L > 3.0 x 10^9/L	0 50 100 to 150*
Lymphocytes	< 0.3 x 10^9/L	50

*The dose of 6MP/MTX can be increased to a maximum of 200% in case the white cell count remains high after increasing the doses to 150%.

Frequency (minimum) of blood test in maintenance

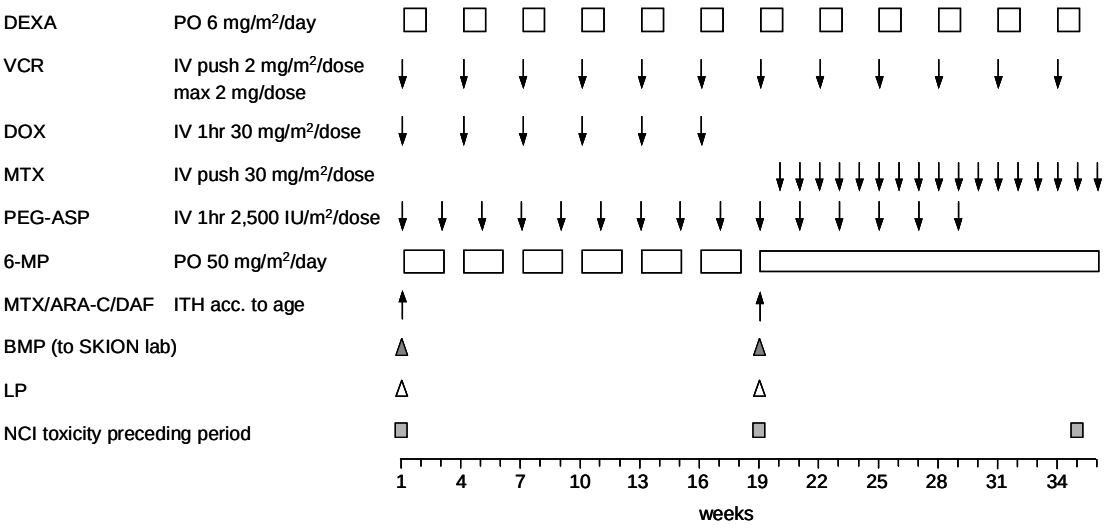
- Full blood count – every 2 - 3 weeks
- Liver function tests – should only be checked in case of clinical symptoms that may point to disturbed liver functions. In case of these clinical symptoms AND transaminases >10x the upper limit of normal OR bilirubin >5x the upper limit of normal, the doses of 6MP and MTX should be reduced.

6.3 Therapy for MR patients

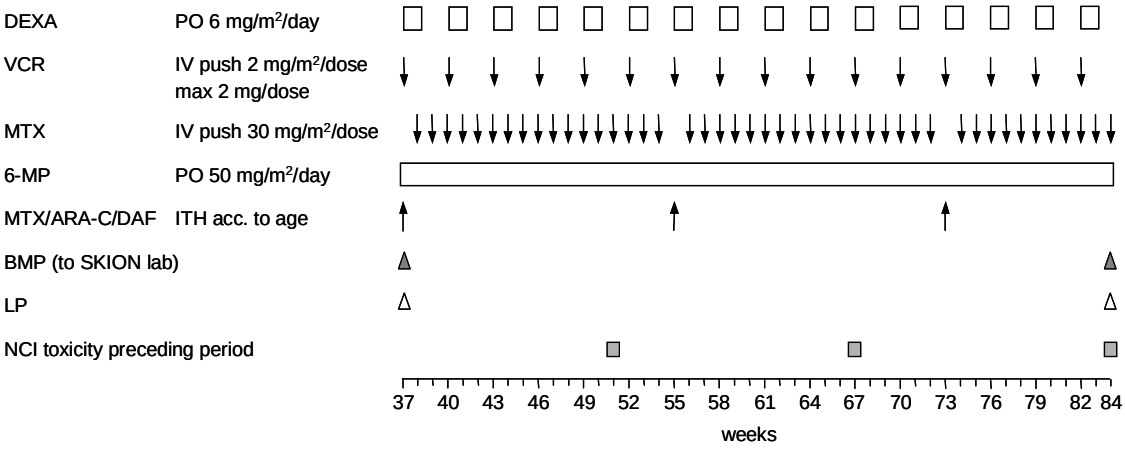
After protocol I and M, MR patients will be treated with the **DCOG intensification/continuation** schedule. Total duration of therapy from day of diagnosis to end of therapy is 104 weeks.

6.3.1 DCOG intensification/continuation for MR patients

DCOG - INTENSIFICATION/CONTINUATION MR PATIENTS part 1



DCOG - INTENSIFICATION/CONTINUATION MR PATIENTS part 2



The intensification/continuation course starts 2 weeks after the start of the last HD-MTX infusion of Protocol M

Requirement to begin the 1st week of each 3-week chemotherapy cycle:

- Granulocytes $\geq$ 1.0 x 10^9/L
- Platelets $\geq$ 50 x 10^9/L
- Mucositis: none or mild
- ASAT/ALAT < 8 x normal upper limit value
- Direct bilirubin ≤ 1.4 mg/ml

If granulocyte and platelet criteria are not met, the course should be adapted as follows:

1. If granulocytes are between 0.5 and 1.0 x 10^9/L, reduce the dose of 6-MP to 50% or delete the first week of 6-MP.
2. If granulocytes are < 0.5 x 10^9/L or platelets < 50 x 10^9/L, delete the first week of 6-MP and postpone the dose of DOX for one week.
3. If after one week granulocytes are still < 0.5 x 10^9/L or platelets still < 50 x 10^9/L, then delete also the second week of 6-MP and postpone DOX to week 19. If Dox has to be postponed again at the next 3-week cycle, then the dose of DOX can be reduced to 50%. Continue DOX to a total cumulative dose of 300 mg/m^2 or until 9 months from the date of CR, whichever comes sooner. In general, if serious dose reductions are necessary, skipping 6-MP in this phase should be preferred above dose reductions or postponement of DOX.

If criteria of mucositis and liver function are not met, chemotherapy should be hold for 3 to 7 days, then recheck liver functions.

Exception: - Asparaginase should be given independent of the above starting criteria.
- Patient needs to have glucose and amylase checked prior to receiving asparaginase.

DEXA **Dexamethasone** 6 mg/m^2/day p.o., divided in three doses (x 5 days), every 3 weeks: week 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 79, 82.

VCR **Vincristine** 2 mg/m^2/dose, i.v., (max. single dose 2 mg), every 3 weeks, at the first day of DEXA application: week 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 79, 82.

DOX **Doxorubicin** 30 mg/m^2/dose, i.v., 1 hour every 3 weeks, 6 times (maximum cumulative dosage 300 mg/m^2), at the first day of DEXA administration: week 1, 4, 7, 10, 13, 16.
Continue doxorubicin to a total cumulative dose of 300 mg/m^2 or until 9 months from the date of CR, whichever comes sooner. After achieving a total cumulative dose of 300 mg/m^2 anthracyclines, begin weekly MTX at the start of the next cycle.

MTX **Methotrexate** 30 mg/m^2/dose, **i.v.**, once a week at the first day of week 20-84.
Hold i.v. MTX on the week MTX i.th. is given.

ASP **PEG Asparaginase**, 2,500 IU/m^2/dose, i.v., 1 hour every 2 weeks, x15 (at the first day of week 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29). The cumulative dose of ASP administered has shown to be very important for a good outcome in the DFCI schedule. PEG Asparaginase should therefore only be discontinued if absolutely necessary. In case of hypersensitivity, use Erwinia Asparaginase (Erwinase) at 20,000 IU/ m^2 i.v. over 1 hour, 3 days per week (e.g. Mo-We-Fri) for 6 doses that replace 1 dose of PEG asparaginase.

6MP **6 Mercaptopurine** 50 mg/m^2/day, p.o.
- week 1 and 2; 4 and 5; 7 and 8; 10 and 11; 13 and 14; 16 and 17;
(6 courses of 2 weeks, with 1 week interval between courses)
- week 19-84: daily, without interruption.
Administration of 6-MP: with empty stomach, in the evening, without milk.

TRIPLE it.h. Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F Aquosum every 18 weeks, at the first day of week 1, 19, 37, 55, 73.

Dose according to age:

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Lowered head position for at least 4 hours after MTX i.th. application is recommended.
- Hold i.v. MTX on the week MTX i.th. is given.

Dose guidelines for MTX and 6MP after week 19,
In case of leucopenia < 2.0 x 10^9/L, first stop administration of cotrimoxazol. If this does not result in recovery of leukocytes, then follow the dose reduction below.

Therapy management according to:	Count reading	% of dose MP/MTX
White cell count	< 1.0 x 10^9/L 1.0 – 2.0 x 10^9/L 2.0 – 3.0 x 10^9/L > 3.0 x 10^9/L	0 50 100 to 150*
Lymphocytes	< 0.3 x 10^9/L	50

*The dose of 6MP/MTX can be increased to a maximum of 200% in case the white cell count remains high after increasing the doses to 150%.

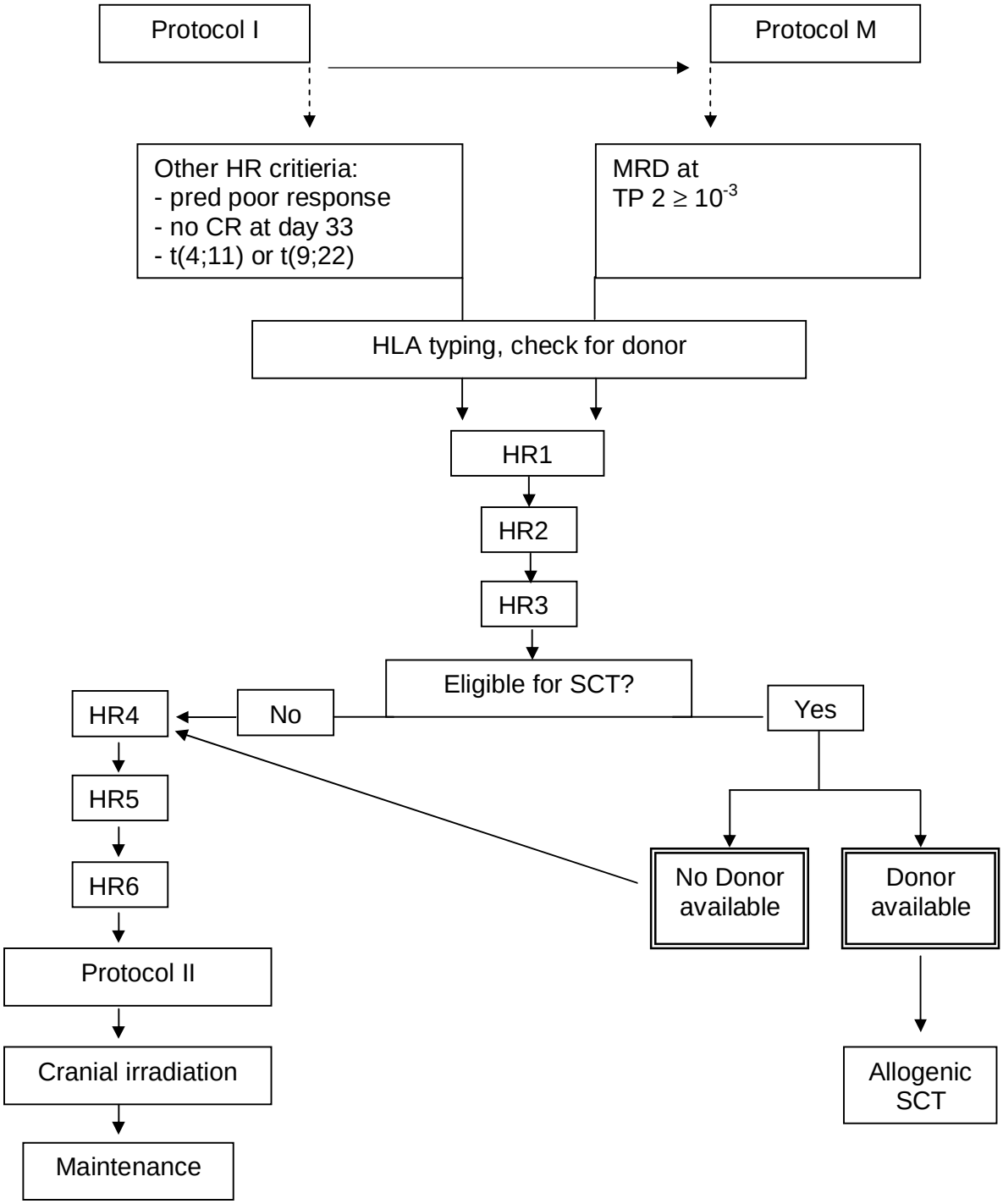
Frequency (minimum) of blood test in continuation therapy

- Full blood count – every 2-3 weeks
- Liver function tests – should only be checked in case of clinical symptoms that may point to disturbed liver functions. In case of these clinical symptoms AND transaminases >10x the upper limit of normal OR bilirubin >5x the upper limit of normal, the doses of 6MP and MTX should be reduced.

6.4 Therapy for HR patients

Depending on the fact by which risk factors patients are identified as HR patients, they have received part of protocol M after protocol I (see also paragraph 6.1).
After protocol I and (part of) protocol M HR patients will be treated according to the HR arm of the ANZCCSG ALL study 8.

THERAPY FOR HIGH RISK PATIENTS



6.4.1 High Risk Blocks

The first block begins after Protocol I, for HR patients identified early.
A small number of SR/MR patients will be identified as having high risk disease based on MRD levels at timepoint 2 (ie. Day 79, at the start of Protocol M). Once identified, they will receive the HR blocks, beginning with HR1 at Day 15 of Protocol M.

Patients who are not in remission on Day 33, will complete Protocol I before proceeding to the High Risk Blocks.

Therapy Management

General Guidelines:
- G-CSF (Filgrastim) is mandatory with each High Risk Block
- Delays to be kept to absolute minimum in first three HR Blocks
- No interruptions in a therapy block once commenced
- No dosage reduction. If necessary, postponement or complete omission of one drug is preferable.

Each HR block is started once there is evidence of bone marrow recovery, and if the patient's general condition is adequate: no active mucositis, no serious infection and no significant organ dysfunction.

Specific Guidelines
- Guidelines for liver and kidney toxicity before the start of each HR block:
  - creatinine/creatinine clearance within age-related limits;
  - ALAT/ASAT $\leq$ 5x normal
- Haematological guidelines for starting each HR block:
  - Day 1 (before each HD-MTX): Neutrophils > 0,2 x 10^9/L (and rising)
    Platelets > 50 x 10^9/L (and rising)
  - Day 15 (before each high dose chemotherapy): Neutrophils $\geq$ 1,0 x 10^9/L
    Platelets $\geq$ 80 x 10^9/L.
- G-CSF (Filgrastim):
  It is mandatory for all high risk patients to receive G-CSF (Filgrastim) with every HR block.
  - G-CSF (Filgrastim) therapy is administered at a dose of 5 µg/kg/day SC and should be started on the day following completion of the high dose chemotherapy.
  - The G-CSF in the first, second, fourth and fifth high risk course is administered whilst patient is receiving therapy with vincristine and asparaginase. This should not affect the quality or timing of bone marrow recovery.
  - G-CSF therapy should be continued until the neutrophil count rises above 5 x 10^9/L, as levels often decline sharply after G-CSF is discontinued.

High Risk Therapy Courses – HR1, HR2, HR3

- All high risk patients will receive 3 high risk courses, in the following sequence: HR1 **à** HR2 **à** HR3

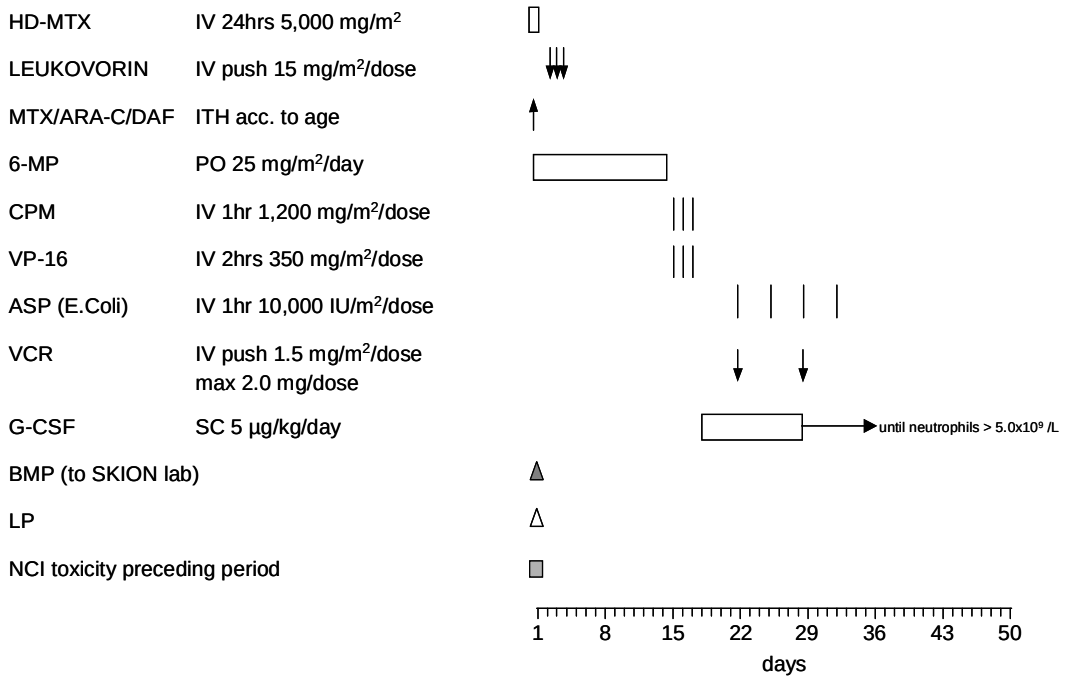
- **DURATION OF EACH HR COURSE SHOULD BE A MINIMUM OF FIVE AND A MAXIMUM OF SEVEN WEEKS**

- After 3 HR courses HR patients with <u>one of the following</u> characteristics **are eligible for SCT**, if a donor is available (**see also chapter 7**):
  - **v** Prednisone Poor Responders (PPR) <u>and</u>:
    - T-ALL, OR
    - Pro-B-ALL, OR
    - M3 bone marrow at day 15, OR
    - WBC > 100.10^9/L
  - **v** no CR on day 33
  - **v** MRD at time point 2 (before the start of protocol M): $\geq 10^{-3}$
  - **v** the presence of t (4;11) (q11;q23) or the corresponding MLL-AF4 transcripts, in the leukemic cells at diagnosis (regardless of prednisone response)
  - **v** the presence of t(9;22) or the corresponding *BCR*-ABL fusion transcript in the leukemic cells at diagnosis, when no informed consent is given for treatment according to the EsPhALL protocol.

All other HR patients will receive another series of 3 high risk courses, followed by Protocol II, cranial irradiation and maintenance therapy to a total duration of therapy from diagnosis up to 104 weeks.

6.4.1.1 High Risk Course 1 (HR 1)

HR COURSE 1 (HR1)



Note: A small number of patients who are initially classified, as SR or MR will subsequently be reclassified as HR on the basis of MRD results at TP2. Such patients start at HR1 course at day 15 (CPM and VP16) since they will have already received the first HD-MTX course of protocol M.

HD-MTX **High dose Methotrexate** 5,000 mg/m^2, i.v., over 24 hours, day 1.

Requirements for the administration of high dose Methotrexate

- No severe infection, no mucositis.
- Renal function within normal limits corrected for age.
- No effusions.
- ASAT/ALAT $\leq$ 5x upper nomal limit for age.
- If transaminases are between 5x and 20x upper limit of normal value, wait 36-48 hours and check to ensure that the levels are decreasing. If ASAT and/or ALAT are $\geq$ 20 times of normal upper limits, contact the protocol chairman for further recommendations.
- Urine alkalinization: urine pH between 7 and 8, before, during and for at least 48 hours after start of MTX-infusion.
- 10% of the total HD-MTX dose should be administered as a loading dose infused over 30 minutes.
- 90% of the dose should be administered as continuous infusion over 23 ½ hours.
- Determination of the MTX serum level: 24 and 48 hours after beginning of the MTX infusion.
- In case of seizures, which may be due to MTX, the next course of MTX can be given according to protocol including i.th. therapy if no neurological symptoms remain. Otherwise contact the protocol chairman.
- It is recommended to start HD-MTX infusion at 8.00 or 14.00 hr, in order to give MTX i.th. and to measure MTX plasma concentrations during regular working hours.

LEUKOVORIN **Folinic Acid** 15 mg/m^2/dose, i.v., 42, 48, 54 hours after start of methotrexate infusion.

TRIPLE i.th. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F**:

Dose according to age.

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
$\geq$3-9	12	30	12	12
$\geq$9	12	30	12	15

- Administer the doses at the start of the HD-MTX.
  If not possible, the triple i.th. must be administered before the end of the MTX infusion.
- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

6MP **6 Mercaptopurine**: 25 mg/m^2/day, p.o., days 1-14.
Give at night, 1 hour after meals, without milk products.

CPM **Cyclophosphamide** 1,200 mg/m^2/dose, i.v. in 1 hour, days 15, 16, 17.

Requirements during administration

- Hydration and cystitis prophylaxis: 3,000 ml/m^2 fluid/24 hr for a minimum of 6 hours
- Mesna (Uromitexan®): 400 mg/m^2 i.v. before and 4 and 8 hours after the start of the CPM-infusion
- In case of (microscopic) hematuria: increase i.v. fluid and Mesna
- Furosemide 0.5 mg/kg i.v., 6 hours and 12 hours after CPM only if required for diuresis

VP-16 **Etoposide** 350 mg/m^2/dose, i.v., over 2 hours, days 15, 16, 17.
Monitor blood pressure throughout infusion.

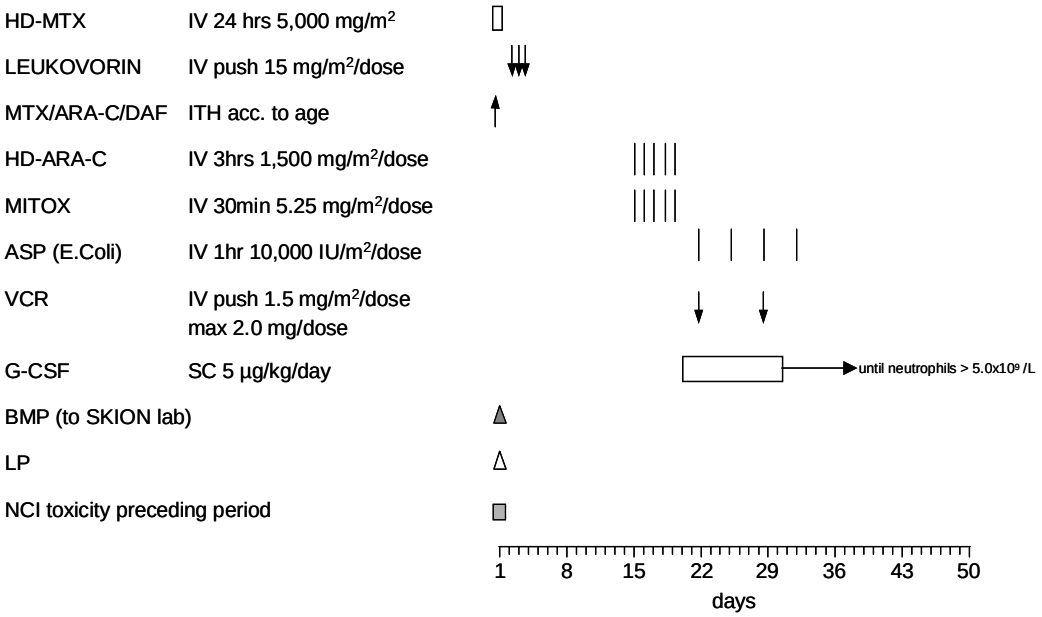
ASP **E.coli Asparaginase** 10,000 IU/m^2/dose, i.v., over 1 hour, days 22, 25, 29 and 32.
If allergic reaction occurs, use either:
- PEG-Asparaginase (ONCASPAR): 2,500 IU/m^2/dose i.v., over one hour, day 22.
- If available: Erwinia Asparaginase at 20,000 IU/m2 i.v over 1 hour, 3 days per week for two weeks (six doses). Days 22, 24, 26, 29, 31 and 33, OR

VCR **Vincristine** 1.5 mg/m^2/dose, i.v., days 22 and 29 (max. 2.0 mg/dose).

G-CSF **Filgrastim** Administration: see above. 5 µg/kg/day s.c., starting day 18, until neutrophils > 5.0. 10/^{9}L

6.4.1.2 High Risk Course 2 (HR 2)

HR COURSE 2 (HR2)



HD-MTX **High Dose Methotrexate** 5,000 mg/m^2, i.v., over 24 hours, day 1.
As per High Risk Course – HR1.

LEUKOVORIN **Folinic acid** 15 mg/m^2/dose, i.v., 42, 48, 54 hours after start of HD-MTX infusion.

TRIPLE i.th. **Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F**:

Dose according to age.

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Administer at the start of the HD-MTX. If not possible, the triple i.th. must be administered before the end of the MTX infusion.

- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

HD-ARA-C **Cytosine arabinoside** 1,500 mg/m^2/dose, i.v., over 3 hours, days 15, 16, 17, 18, 19.
1% Predsol eye drops (every 6 hours) as prophylaxis for chemical conjunctivitis (days 15-21).

MITOX **Mitoxantrone** 5,25 mg/m^2/dose, i.v., over 30 minutes, days 15, 16, 17, 18, 19.
to be given 6 hours after HD-ARA-C.

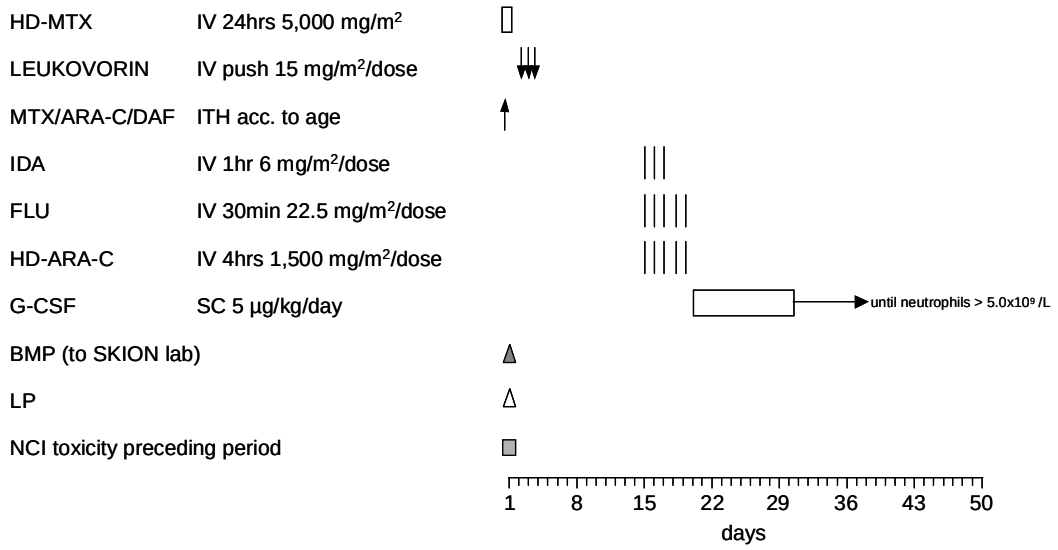
ASP **E.coli Asparaginase** 10,000 IU/m^2/dose i.v., over 2 hours, days 22, 25, 29 and 32.
If allergic reaction occurs, use either:
- PEG-Asparaginase: 2,500 IU/m^2 i.v,. over one hour, day 22, or
- If available: Erwinia Asparaginase at 20,000U/m^2 i.v. over 1 hour, 3 days per week for two weeks (six doses). Days 22, 24, 26, 29, 31 and 33,

VCR **Vicristine** 1.5mg/m^2/day, i.v., days 22 and 29 (max. 2.0 mg/dose).

G-CSF **Filgrastim** 5 µg/kg/day s.c., starting day 20, until neutrophils > 5.0. 10/^{9}L.

6.4.1.3 High Risk Course 3 (HR 3)

HR COURSE 3 (HR3)



HD-MTX **High dose Methotrexate** 5,000 mg/m^2, i.v. over 24 hours, day 1.
As per High Risk Course – HR1.

LEUKOVORIN **Folinic Acid** 15 mg/m^2/dose, i.v. 42, 48 and 54 hours after the start of HD-MTX infusion

TRIPLE I.th. **Methotrexate/Cytosine Arabinoside Diadreson F**:

Dose according to age.

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Administer the doses at the start of the HD-MTX.
  If not possible, the triple i.th. must be administered before the end of the MTX infusion.
- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

IDA **Idarubicin** 6 mg/m^2/dose, i.v. over 1 hour, days 15, 16, 17 .

FLU **Fludarabine** 22,5 mg/m^2/dose,i.v. over 30 minutes, days 15, 16, 17, 18, 19.

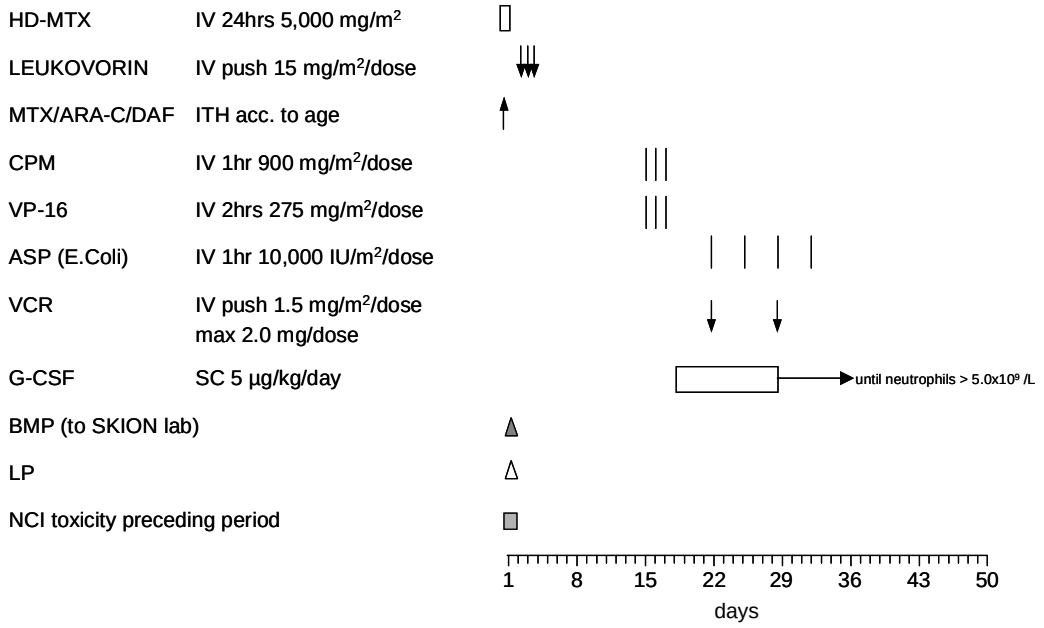
HD-ARA-C **Cytosine Arabinoside** 1,500mg/m^2/dose, i.v. over 4 hours, days 15, 16, 17, 18, 19.
Start four hours after Fludarabine steroid eye drops (four times daily) as prophylaxis for chemical conjunctivitis (days 15-21).
IMPORTANT: Give fludarabine first, followed by idarubicin.
Four hours after START of fludarabine give cytosine arabinoside..

G-CSF **Filgrastim** 5 µg/kg/day SC starting day 20 until neutrophils > 5.0 x 10/^{9}L.

6.4.1.4 High Risk Course 4 (HR 4)

Treatment as per HR Course 1, but no mercaptopurine is administered

HR COURSE 4 (HR4)



HD-MTX **High dose Methotrexate** 5,000 mg/m^2, i.v. over 24 hours, day 1. As per HR Course 1

LEUKOVORIN **Folinic acid** 15mg/m^2/dose, i.v., 42, 48, 54, hours after the start of HD-MTX infusion.

TRIPLE I.th. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F:**

Dose according to age.

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Administer at the start of the HD-MTX.
  If not possible, the triple i.th. must be administered before the end of the MTX infusion.
- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

CPM **Cyclophosphamide** 900 mg/m2/dose, i.v. in 1 hour, days 15, 16, 17.

Requirements during administration
- Hydration and cystitis prophylaxis: 3,000 ml/m^2 fluid/24 hr for a minimum of 6 hours
- Mesna (Uromitexan®): 400 mg/m^2 /dose i.v. before and 4 and 8 hours after the start of the CPM-infusion
- In case of (microscopic) hematuria: increase i.v. fluid and Mesna
- Furosemide 0.5 mg/kg i.v., 6 hours and 12 hours after CPM only if required for diuresis

VP-16 **Etoposide** 275 mg/m^2/dose, i.v., over 2 hours, days 15, 16, 17.
- Monitor blood pressure throughout infusion.

ASP **E.coli Asparaginase** 10,000IU/m^2/dose, i.v., over 1 hour, days 22, 25, 29 and 32.
If allergic reaction occurs, use either:
- PEG-Asparaginase 2,500 IU/m^2/dose, i.v., over one hour, day 22, or
- If available: Erwinia Asparaginase at 20,000 U/m^2/dose, i.v., over 1 hour 3 days per week for two weeks (six doses). Days 22, 24, 26, 29, 31 and 33.

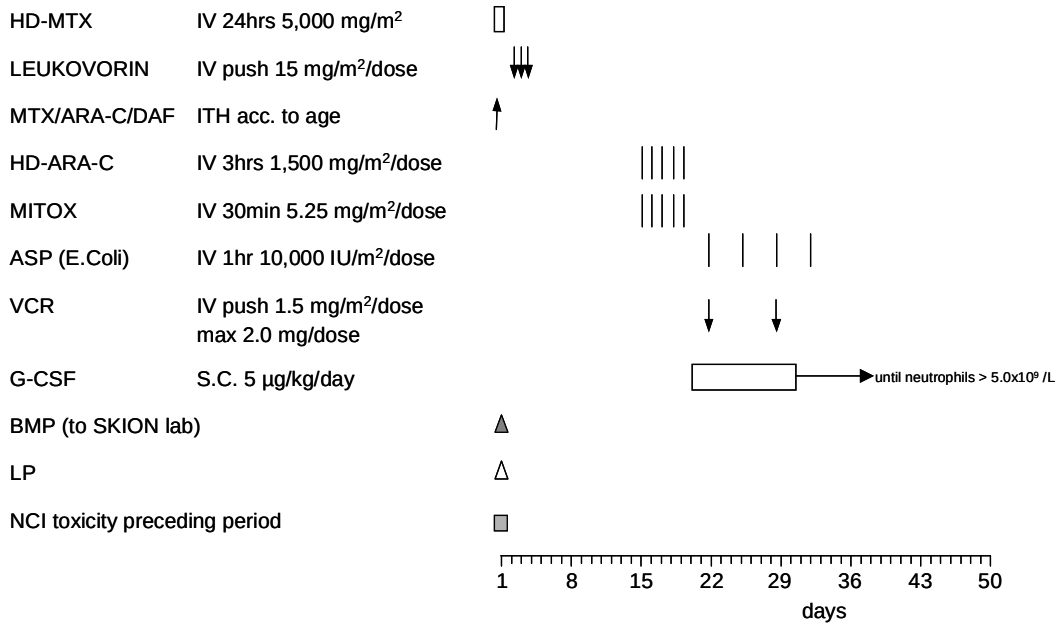
VCR **Vincristine** 1.5 mg/m^2/dose, i.v., days 22 and 29 (max. 2.0 mg/dose).

G-CSF **Filgrastim** 5 µg/kg/day SC starting day 18 until neutrophils > 5.0.10^9/L

6.4.1.5 High Risk Course 5 (HR 5)

Treatment as per High Risk Course 2

HR COURSE 5 (HR5)



HD-MTX **High dose Methotrexate** 5,000 mg/m^2/day, i.v. over 24 hours, day 1.
As per High Risk Course – HR1.

LEUKOVORIN **Folinic acid** 15mg/m^2, i.v., 42, 48, 54, hours after the start of HD-MTX infusion.

TRIPLE I.th. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside Diadreson F:**

Dose according to age.

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Administer at the start of the HD-MTX.
  If not possible, the triple i.th. must be administered before the end of the MTX infusion.
- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

HD-ARA-C **Cytosine arabinoside** 1,500 mg/m^2/dose, i.v., over 3 hours, days 15, 16, 17, 18, 19.
1% Predsol eye drops (2 drops tds) as prophylaxis for chemical conjunctivitis (days 15-21).

MITOX **Mitoxantrone** 5,25 mg/m^2/dose, i.v., over 30 minutes, days 15, 16, 17, 18, 19.
To be given 6 hours after HD-ARA-C.

ASP **E.coli Asparaginase** 10,000 IU/m^2/dose, i.v., over 1 hour, days 22, 25, 29 en 32.
If allergic reaction occurs, use either:
- PEG-Asparaginase 2,500 IU/m^2 i.v., over one hour day 22 or

- If available: Erwinia Asparaginase at 20,000 IU/m^2/dose, i.v. over 1 hour, 3 days per week for two weeks (six doses). Days 22, 24, 26, 29, 31 and 33.

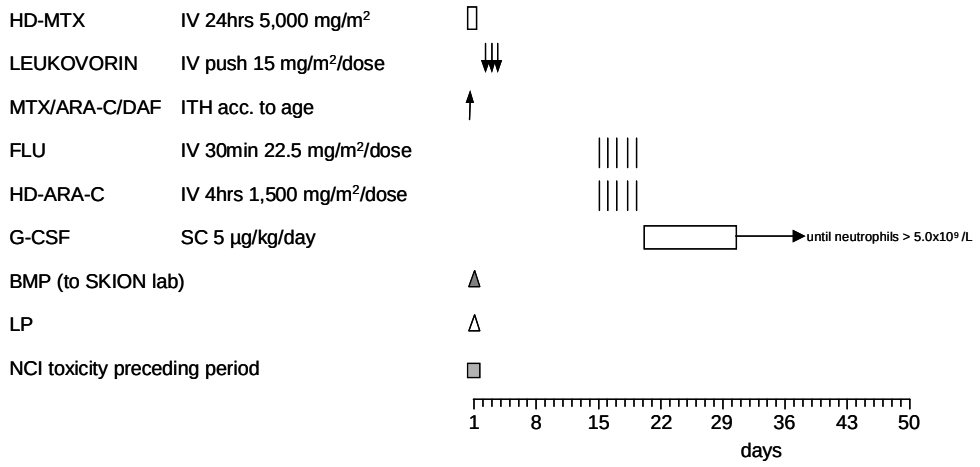
VCR **Vincristine** 1.5 mg/m^2/dose, i.v., days 22 and 29. (max. 2.0 mg/dose).

G-CSF **Filgrastim** 5 µg/kg/dose, S.C., starting day 20, until neutrophils > 5.0 x 10/^{9}L.

6.4.1.6 High Risk Course 6 (HR 6)

Treatment as per HR Course 3, BUT idarubicin is omitted from this block

HR COURSE 6 (HR6)



HD-MTX **High dose Methotrexate** 5,000 mg/m^2, i.v. over 24 hours, day 1. As per High Risk Course – HR1.

LEUKOVORIN **Folinic acid** 15 mg/m^2/dose, i.v., 42, 48, 54, hours after the start of HD-MTX infusion.

TRIPLE I.th. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F:**

Dose according to age.

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Administer the doses at the start of the HD-MTX.
  If not possible, the triple i.th. must be administered before the end of the MTX infusion.
- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

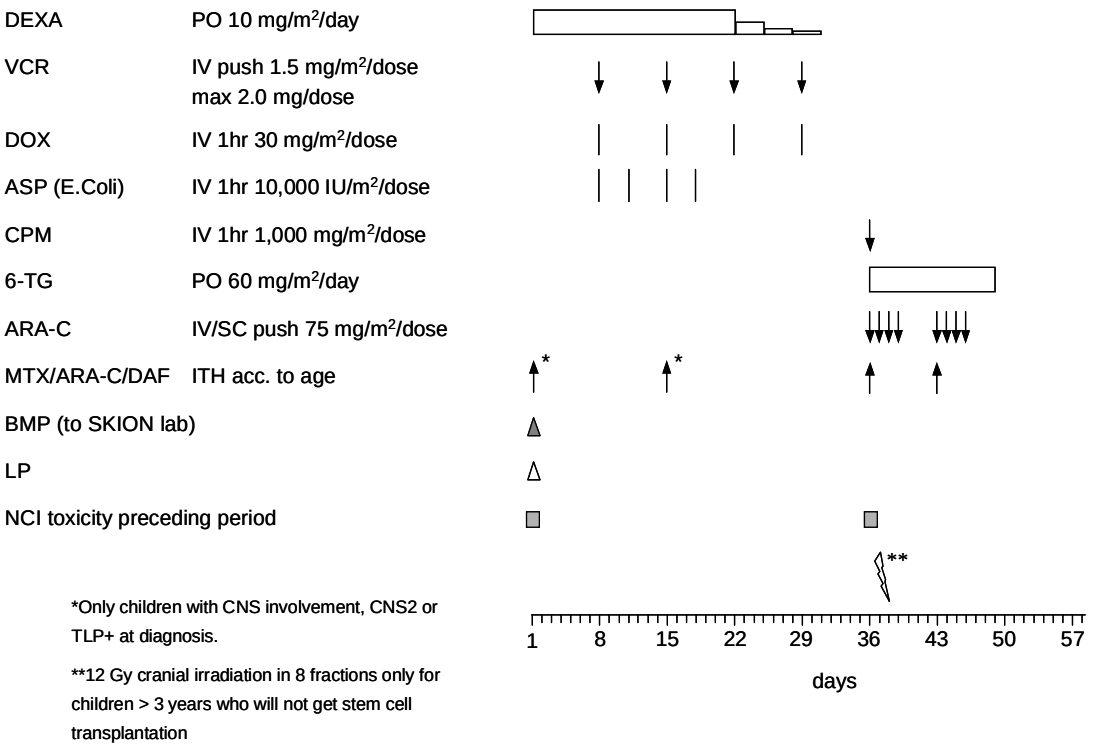
FLU **Fludarabine** 22,5 mg/m^2/dose,i.v. over 30 minutes, days 15, 16, 17, 18, 19.

HD-ARA-C **Cytosine Arabinoside** 1,500mg/m^2/dose i.v. over 4 hours, days 15, 16, 17, 18, 19.
Start 4 hours after Fludarabine steroid eye drops (four times daily) as prophylaxis for chemical conjunctivitis (days 15-21).
IMPORTANT:
Give cytosine arabinoside 4 hours after START of fludarabine.

G-CSF **Filgrastim** 5 µg/kg/day, s.c., starting day 20, until neutrophils > 5.0 x $10/^{9}$L.

6.4.2 Protocol II

PROTOCOL II (A and B)



Protocol II begins about 3 weeks after the end of the 6th High Risk Course (HR 6).

Requirements for beginning Protocol II:

- Good general condition with no severe infections
- Hematological guidelines:
  - WBC > 2.5 x 10^{9}/L
  - Neutrophils > 1.0 x 10^{9}/L
  - Platelets > 100 x 10^{9}/L

Therapy Guidelines Protocol IIA (days 1 – 35)
In the case of myelosuppresion (WBC < 0.5 x 10^{9}/L or neutrophil < 0.2 x 10^{9}/L), the doxorubicin doses may be postponed/omitted.

DEXA **Dexamethasone** 10 mg/m^{2}/day, p.o., in 3 divided doses, days 1-21.
From day 22 on, decrease of 3x3 days, each time with half the dosage.

VCR **Vincristine** 1.5 mg/m^{2}/dose, i.v., push (maximum single dose 2 mg). Days 8, 15, 22, 29.

DOX **Doxurubicin** 30 mg/m^{2}/ddose, i.v., over 1 hour, days 8, 15, 22, 29.

ASP **E.coli-Asparaginase** 10,000 IU/m^{2}/dose, i.v., over 1 hour, days 8, 11, 15, 18.
In the case of hypersensitivity, use alternative preparations:
- PEG – Asparaginase 2,500 IU/m^{2} i.v., over 1 hour on day 8 (single dose), or
- If available: Erwinia Asparaginase 10,000 IU/m^{2}/dose i.v. over 1 hour, 3 days per week for seven doses. Days 8, 10, 12, 15, 17, 19 and 22.

TRIPLE i.th. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F**
Only patients with CNS involvement, CNS2 or TLP+ at initial diagnosis receive triple i.th. on days 1 and 15, in age-adjusted doses

Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

Therapy Guidelines Protocol IIB Days 36-50 (Phase 2):
Requirements for starting IIB:
- Good general condition with no severe infections
- Creatinine within normal limits (age-adapted)
- Hematological guidelines:
  - WBC > 2.0 x 10^9/L
  - Neutrophils > 0.5 x 10^9/L
  - Platelets > 50 x 10^9/L

CPM **Cyclophosphamide** 1,000 mg/m^2, i.v. over 1 hour, day 36.
Requirements during administration
- Hydration and cystitis prophylaxis: 3,000 ml/m^2 fluid/24 hr for a minimum of 6 hours
- Mesna (Uromitexan®): 400 mg/m^2/dose i.v. before and 4 and 8 hours after the start of the CPM-infusion
- In case of (microscopic) hematuria: increase i.v. fluid and Mesna
- Furosemide 0.5 mg/kg i.v., 6 hours and 12 hours after CPM only if required for diuresis

6-TG **6-Thioguanine** 60 mg/m^2/day, orally days 36-49, a total of 14 days. Give at night, at least 1 hour after meals, without milk products.

ARA-C **Cytosine Arabinoside** 75 mg/m^2/dose, i.v. or s.c. push in 2 x 4 days blocks.
Days 36, 37, 38, 39 and
Days 43, 44, 45 and 46
Cut-off values for beginning an ARA-C block are:
- WBC > 0.5 x 10^9/L
- Platelets > 30 x10^9/L

The ARA-C blocks should not be interrupted, if possible. The first ARA-C block may be started early to coincide with day 36 Cyclophosphamide dose. If an ARA-C block is interrupted, then Thioguanine should also be interrupted. Missed Thioguanine doses should be administered until the planned cumulative dose of 840 mg/m^2 is reached.

TRIPLE i.th. **Intrathecal Methotrexate/Cytosine Arabinoside/Diadreson F**:
at the same day as the first dose of Cytosine Arabinoside, in

Block 1 (day 36) and Block 2 (day 43). Dose according to age:

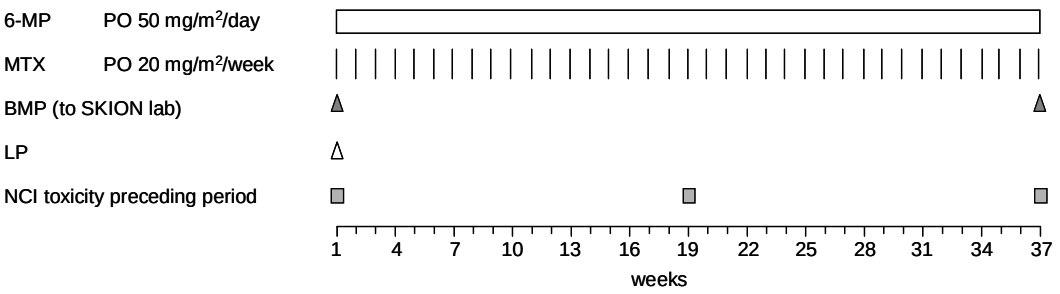
Age (yrs)	MTX (mg)/dose	Ara-C (mg)/dose	DAF mg/dose	Volume (ml)
1	8	20	8	8
2	10	25	10	10
≥3-9	12	30	12	12
≥9	12	30	12	15

- Lowered head position for at least 4 hours after triple i.th. application is recommended.

6.4.3 Cranial irradiation
High risk patients > 3 years of age will receive 12 Gy cranial irradiation (see chapter 8)

6.4.4 Maintenance Therapy HR Patients

HR-MAINTENANCE



Remarks
Maintenance therapy for HR patients begins depending on bone marrow recovery and the patients clinical state, two weeks after the end of Protocol II
The total duration of therapy for all patients is 104 weeks, from day of diagnosis to end of therapy.

Requirements for the start of HR maintenance therapy:
- Good clinical condition without serieus infections
  - WBC > 2.0 x 10^9/L
  - Platelets > 50 x 10^9/L

6-MP **6-Mercaptopurine** 50 mg/m^2/day, orally
Daily in one dose in the late evening (at least 1 hour after meals).
Dose should not be taken with milk products.

MTX **Methotrexate** 20 mg/m^2/week, orally, once a week (at night)

Dose guidelines
In case of leucopenia < 2.0 x 10^9/L, first stop administration of cotrimoxazol. If this does not result in recovery of leukocytes, then follow the dose reduction below.

Therapy management according to:	Count reading	% of dose MP/MTX
White cell count	< 1.0 x 10^9/L 1.0 – 2.0 x 10^9/L 2.0 – 3.0 x 10^9/L > 3.0 x 10^9/L	0 50 100 to 150*
Lymphocytes	< 0.3 x 10^9/L	50

*The dose of 6MP/MTX can be increased to a maximum of 200% in case the white cell count remains high after increasing the doses to 150%.

Frequency (minimum) of blood test in maintenance
- Full blood count – every 2 - 3 weeks
- Liver function tests – should only be checked in case of clinical symptoms that may point to disturbed liver functions. In case of these clinical symptoms AND transaminases >10x the upper limit of normal OR bilirubin >5x the upper limit of normal, the doses of 6MP and MTX should be reduced.

7. STEM CELL TRANSPLANTATION FOR HR PATIENTS

7.1 Aims

- Since stratification in ALL-10 is based on the BFM-2000 Study, the guidelines for stem cell transplantation (SCT) also follow the ALL SZT-BFM 2003 strategy.
- Minimal residual disease (MRD) will be serially evaluated pre- and post SCT. The immediate pre-SCT MRD level will be used to design post-SCT immunotherapy.

7.2 Indications for SCT

Criteria for SCT		SCT groups MSD	MD	MMD
PGR	+ t(9;22)	+	+	-
PGR	+ t(4;11) #	+	-	-
PPR	+ T-ALL*	+	+*	-
PPR	+ pro-B-ALL	+	+	-
PPR	+ M3 BM on day 15	+	+	-
PPR	+ initial WBC > $100x10^9$/L	+	+	-
PPR	+ t(9;22)	+	+	+
PPR	+ t(4;11) #	+	+	-
No CR on day 33		+	+	+
MRD at time point 2 (~d 79) ≥ 10^{-3}		+	+	+

Abbreviations: PGR: prednisone good responder on day 8, PPR: prednisone poor responder on day 8, MRD: minimal residual deisease.
* if MRD at time point 2 (~d 79) negative, MD SCT is not indicated
# Special conditioning regimens for t(4;11)
If MRD inconclusive: contact SCT centre

7.3 HLA typing and choice of donors

If a HR patient is being considered for a SCT, HLA typing of the patient should be started immediately and his family should also be typed as soon as possible. Please consult the relevant SCT centre as soon as the results of the HLA typing are known!
Class I antigens should be determined with medium resolution techniques, while Class II antigens should be determined using high-resolution molecular techniques. The road map for donor selection is shown below.

Donor selection:

HLA typing of the family
Class I: A,B,C – medium resolution
Class II: DR, DQ: high resolution
CMV status, ABO
↓
Sibling HLA-identical: → **SCT with MSD**
↓
If no identical sibling
↓
Start search for MD
↓
Compatible donor: → **SCT with MD**
↓
No compatible donor ® **SCT with MMD**

One should always aim at the best possible match between donor and recipient. A matched sibling donor (MSD) should always be preferred to another matched donor (MD) and a MD in turn should always be preferred to a mis-matched donor (MMD). Further, a 10/10 identical MD is better than a 9/10 donor, an allele mismatch is better than an antigen mismatch. In the class hierarchy a C or B-locus mismatch is better than a Class II mismatch and both are preferable to an A-locus mismatch. The preference hierarchy is as follows:

Donor hierarchy

Preference	HLA match	SCT groups
1	HLA-identical sibling	MSD
2	10/10 identical unrelated or family donor	MD
3	9/10 identical unrelated or family donor	MD
4	Less than 9/10 identical unrelated or family donor	MMD
In case of a mismatch:		
1	Allele-mismatch	MD, MMD
2	Antigen mismatch	MD, MMD
Further:		
1	C-locus mismatch	MD, MMD
2	B-locus mismatch	MD, MMD
3	Class-II mismatch	MD, MMD
4	A-locus mismatch	MD, MMD

In the selection process, further consideration is given to the CMV status of the donor and recipient, to the age and sex of the donor and in certain cases the preference of the donor for bone marrow or peripheral stem cell donation.

On the basis of the above considerations the following **SCT groups** are formed:

MSD **M**atched **S**ibling **D**onor

MD **M**atched **D**onor
Related or unrelated donor, 10/10 or 9/10 match:
matched family donor (MFD) or one locus mismatched family donor (1MMFD),
matched unrelated donor (MUD) or one locus mismatched unrelated donor (1MMUD).

MMD **M**is**M**atched **D**onor
Related or unrelated donor, less than 9/10 match

An overview of the SCT groups is as follows:

Degree of match between donor and recipient	Sibling donor	Related donor	Unrelated donor
10/10	**MSD**	**MFD**	**MUD**
9/10		**1MMFD**	**1MMUD**
Less than 9/10		**MMFD**	**MMUD**

= MSD **= MD** **= MMD**

7.4 Stem cells and harvesting

MSD and MD group:
The source of the stem cells is usually bone marrow (BM) without T-cell depletion. In some countries, even unrelated donors can choose for stimulated peripheral stem cell (PBSC) donation. One should always aim at transplanting a relatively high number of stem cells (>$3x10^6$/kg CD34+ cells).

MMD group:
In this group, stimulated PBSC are used with deep T-cell depletion (either CD34+ selection or CD3+ depletion). One should aim at a stem cell yield of > 10 x 10^6/kg CD34+ cells.

7.5 SCT procedures

The best time for SCT is after the 3rd HR block (~ 5 months from diagnosis). This should give the centres enough time to identify the very high-risk patients and initiate the donor search for those patients who lack an HLA-identical sibling. Furthermore, it is anticipated that the leukemia burden should also be at its nadir at around this time. This is also the time the ANZCCSG has chosen for the SCT and it is about the same time point in the current BFM Protocol.

The **conditioning** regimen will also be carried out according to the guidelines of the ALL BFM 2000 and the ALL SZT-BFM 2003 protocols. Minor deviations from the conditioning regimens should not interfere too much with the evaluation of SCT results. It is expected, however, that the SCT centers will adhere to the following conditioning regimens.

Conditioning regimens for SCT with MSD

	MSD					
	Age < 24 months		> 24 months with TBI		> 24 months without TBI	
Day	Conditioning / Dose		Conditioning / Dose		Conditioning / Dose	
-8	BU	5 mg/kg			BU	4 mg/kg
-7	BU	5 mg/kg			BU	4 mg/kg
-6	BU	5 mg/kg	TBI	2x2 Gy	BU	4 mg/kg
-5	BU	5 mg/kg	TBI	2x2 Gy	BU	4 mg/kg
-4	VP-16	40 mg/kg iv	TBI	2x2 Gy	VP-16	40 mg/kg iv
-3	Cyclo	60 mg/kg iv	VP-16	60 mg/kg iv	Cyclo	60 mg/kg iv
-2	Cyclo	60 mg/kg iv			Cyclo	60 mg/kg iv
-1						
0	SCT		SCT		SCT	

Conditioning regimens for SCT with MD

	MD					
	Age < 24 months			> 24 months with TBI		> 24 months without TBI	
Day	Conditioning / Dose			Conditioning / Dose		Conditioning / Dose	
-8	BU	5 mg/kg				BU 4 mg/kg	
-7	BU	5 mg/kg				BU 4 mg/kg	
-6	BU	5 mg/kg		TBI 2x2 Gy		BU 4 mg/kg	
-5	BU	5 mg/kg		TBI 2x2 Gy		BU 4 mg/kg	
-4	VP16	40 mg/kg		TBI 2x2 Gy		VP-16 40mg/kg	
-3	Cyclo	60mg/kg	ATG 20 mg/kg	VP-16 60 mg/kg	ATG 20 mg/kg	Cyclo 60 mg/kg	ATG 20 mg/kg
-2	Cyclo	60mg/kg	ATG 20 mg/kg		ATG 20 mg/kg	Cyclo 60 mg/kg	ATG 20 mg/kg
-1			ATG 20 mg/kg		ATG 20 mg/kg		ATG 20 mg/kg
0	SCT			SCT		SCT	

Conditioning regimens for SCT with MMD

	MMD						
	Age < 24 months			> 24 months with TBI		> 24 months without TBI	
Day	Conditioning / Dose			Conditioning / Dose		Conditioning / Dose	
-11	BU	5 mg/kg				BU 4 mg/kg	
-10	BU	5 mg/kg		TBI 2x2 Gy		BU 4 mg/kg	
-9	BU	5 mg/kg		TBI 2x2 Gy		BU 4 mg/kg	
-8	BU	5 mg/kg		TBI 2x2 Gy		BU 4 mg/kg	
-7	FLU	40mg/m^2		FLU	40mg/m^2	FLU	40mg/m^2
-6	FLU	40mg/m^2		FLU	40mg/m^2	FLU	40mg/m^2
-5	FLU	40mg/m^2		FLU	40mg/m^2	FLU	40mg/m^2
-4	FLU	40mg/m^2		FLU	40mg/m^2	FLU	40mg/m^2
-3	Cyclo	60mg/kg	ATG 20 mg/kg	VP-16 40 mg/kg	ATG 20 mg/kg	Cyclo 60 mg/kg	ATG 20 mg/kg
-2	Cyclo	60mg/kg	ATG 20 mg/kg		ATG 20 mg/kg	Cyclo 60 mg/kg	ATG 20 mg/kg
-1			ATG 20 mg/kg		ATG 20 mg/kg		ATG 20 mg/kg
0	SCT			SCT		SCT	

Conditioning regimens for SCT with MSD in patients with t(4;11)

MSD – t(4;11)				
	Age < 24 months		Age > 24 months	
Day	Conditioning / Dose		Conditioning / Dose	
-7	BU	5 mg/kg	BU	4 mg/kg
-6	BU	5 mg/kg	BU	4 mg/kg
-5	BU	5 mg/kg	BU	4 mg/kg
-4	BU	5 mg/kg	BU	4 mg/kg
-3	Cyclo	60 mg/kg iv	Cyclo	60 mg/kg iv
-2	Cyclo	60 mg/kg iv	Cyclo	60 mg/kg iv
-1	MEL	140 mg/m^2	MEL	140 mg/m^2
0	SCT		SCT	

BU = Busulfan
Cyclo = Cyclofosfamide
TBI = total body irradiation (dose of TBI is given for fractionated TBI. If fractionated TBI cannot be applied, TBI dose should be given according to the guidelines of the SCT-Centre)
FLU = Fludarabine
MEL = Melphalan
ATG = anti thymocyte globulin (Fresenius rabbit ATG). If another type of ATG is used, the dose should be adapted according to the guidelines of the SCT-Centre

Conditioning regimens for SCT with MD in patients with t(4;11)

MD – t(4;11)						
	Age < 24 months			Age > 24 months		
Day	Conditioning / Dose			Conditioning / Dose		
-7	BU	5 mg/kg		BU	4 mg/kg	
-6	BU	5 mg/kg		BU	4 mg/kg	
-5	BU	5 mg/kg		BU	4 mg/kg	
-4	BU	5 mg/kg		BU	4 mg/kg	
-3	Cyclo	60 mg/kg	ATG 20 mg/kg	Cyclo	60 mg/kg	ATG 20 mg/kg
-2	Cyclo	60 mg/kg	ATG 20 mg/kg	Cyclo	60 mg/kg	ATG 20 mg/kg
-1	MEL	140 mg/m^2	ATG 20 mg/kg	MEL	140 mg/m^2	ATG 20 mg/kg
0	SCT			SCT		

7.6 Immunosuppression and supportive care post SCT

Ciclosporine and methotrexate prophylaxis will be carried out according to currently accepted institutional protocols and/or METC-accepted, ongoing studies.
Institutional supportive care guidelines will be used following SCT.

7.7 Guidelines for Total Body Irradiation (TBI)

- Patients who are less than 24 months old at the start of conditioning will not be given TBI.
- To reduce long-term toxicity, TBI will be administered with hyperfractionation: 2 x 2 Gy for three days, with an interval of at least 6 hours between the fractions (dose of TBI is given for fractionated TBI. If fractionated TBI cannot be applied, TBI dose should be given according to the guidelines of the SCT-Centre)
- To avoid pulmonary toxicity, the lung dose should not exceed 10 Gy.
- Patients with an initial testis infiltration may also be given local radiotherapy just before TBI.

8. CNS THERAPY

8.1 Intrathecal therapy for CNS involvement, CNS2 and TLP+

The definition of CNS involvement and CNS status is given in paragraph 5.1.
The patients with initial CNS involvement receive two additional **triple i.th. on day 8 and 22 in Protocol I** and in case of stratification to the HR group two additional **triple i.th. on day 1 and 15 in protocol II.**

Patients with CNS2 or TLP+ are not defined as having initial CNS involvement but will receive **two additional triple IT** – doses on days 8 and 22 of protocol I, because of the increased risk of relapse.

- SR patients will receive a total of 9 intrathecal triple therapy administrations.
- MR patients will receive a total of 14 intrathecal administrations or 16 in case of CNS involvement, CNS2 or TLP+.
- HR patients will receive 9-12 intrathecal administrations before getting TBI (or 11-14 in case of CNS involvement, CNS2 or TLP+).
- HR patients who will not be transplanted will receive 12-15 intrathecal administrations or 16-19 in case of CNS involvement, CNS2 or TLP+.

8.2 Cranial Irradiation for high-risk patients

HR patients **who are not transplanted** will receive 12 Gy prophylactic cranial radiotherapy. Cranial irradiation is performed using high-voltage equipment with a linear accelerator. The CNS irradiation volume includes the whole neurocranium, with both upper vertebrae (C2), the retrobulbar space and the entire cranial base with its middle cranial groove. This requires the use of individual shielding. During irradiation, every field should be irradiated in every session. The single daily dose is 1.5Gy. Radiotherapy is administered in 5 sessions per week until the total dose is reached. Dexamethasone may be useful to treat irradiation induced headaches (not usually required however).If the patient's clinical condition is satisfactory, the cranial irradiation can begin on day 38 of Protocol II. Cranial irradiation should be withheld if there is a coexistent central nervous system disorder.
Patients for whom a BMT is planned, will receive prophylactic cranial irradiation in conjunction with the conditioning regimen which includes TBI for children $\geq$ 2 years of age.

9. INITIAL TESTICULAR INVOLVEMENT

Risk-group stratification of patients with testicular infiltration to MR or HRG treatment is according to criteria described in 5.2. Therapy for patients follows the assigned protocol regimen, provided the testicle size returns to normal by the end of Protocol M (based on physical examination, ultrasound). If, after Protocol M, a doubtful clinical finding remains, please consult the study chairperson. At that time biopsy will be recommended, and in case of involvement, local therapy (orchidectomy or irradiation) must be administered.

10. STATISTICS

The number of patients in the Netherlands is too low to perform randomized studies to answer the questions in this protocol. Each year about 120 children are diagnosed with ALL. In about 100 of these children, MRD results will be available to stratify patients in SR, MR or HR. From the German BFM-2000 study it appears that from the first 1,300 patients enrolled in the study, 81% could be stratified according to MRD data. The distribution of the patients based upon MRD is 41.5% in the SR group, 50% in the MR group and 8.5% in the HR group. When patients for who no MRD data were available were included and other HR criteria were included the distribution was as follows: 32.7% SR, 51.7% MR and 15.6% HR.

These data implicate that for the DCOG ALL-10 protocol, each year about 100 new ALL patients will be stratified upon MRD data from who 41 cases will be in the SR group, 50 in the MR group and 9 in the HR group. From all 120 new cases each year 39 will be in the SR group, 62 in the MR group and 19 in the HR group. From the ANZSSG group another 9 patients each year will be included in the HR group which results in a total of 28 HR cases each year.

10.1 Statistics for SR

Aim is to study whether therapy reduction in the SR group is feasible without increasing the risk of relapse. Therefore, the equivalence of protocol IV therapy in the SR arm will be compared to protocol II of the historical control group (and in addition compared to protocol II of the control arm of the BFM-2000 SR group).

The monitoring is based on the number of events as defined for event free survival.

The design has the following properties:

- the probability that the protocol will be incorrectly declared to be unsafe at a safe event rate of 0.02 per year is 20%
- the probability that the protocol will be incorrectly declared to be safe at a unsafe event rate of 0.03 per year is 5%

The design is such that every second event the cumulative observation time T (in years) is calculated. The table below gives upper and lower limits. If T is below the lower limit, the protocol is declared unsafe and stopped. If T is above the upper limit, the protocol is declared to be safe. (the study is stopped, the protocol can be continued).

On the average 9 inspections (18 events) are needed in the unsafe case of an annual even rate of 3%. 600 observation years are needed (on the average) to arrive at a conclusion. In the safe case of an event rate of 2% 11 inspections (22 events, 1100 observation years). For the event rate of 2.25 % (4 years EFS of 91% as reported in the BFM-2000 study) the average number of inspections is 13 (26 events, 1150 observation years). The probability that the protocol will be declared safe is 59%, the probability that it will be declared unsafe is 41%.

Table: number of observation years in the SR group

# events	lower limit	upper limit
2	-	307
4	29	388
6	110	469
8	191	550
10	272	631
12	353	712
14	434	793
16	515	875
18	596	956
20	677	1037
22	758	1118
24	840	1199
26	921	1280
28	1002	1361
30	1083	1442
32	1164	1523
34	1245	1604
36	1326	1685
38	1407	1767
40	1488	1848
42	1569	1929
44	1650	2010
46	1732	2091
48	1813	2172
50	1894	2253

10.2 Statistics for MR

Aim is to study whether more intensive therapy according to the modified DFCI-high risk intensification/continuation protocol (DCOG intensification/continuation protocol) will lead to an improved DFS compared to that (78% DFS) of the historical control group treated with protocol II and continuation therapy (and in addition compared to that of the control arm of the BFM-2000 MR group, treated identical as the historical control group). Figure 2 shows the number of patients and the related power of the study at these numbers. When the study will run for 5 years about 250 patients will be enrolled in the MR protocol based upon MRD. This means that the study will have a power of 90% to show a difference of 86% DFS versus 78% DFS of the historical control group and a power of 80% to show a difference of 85% DFS versus 78% DFS of the historical control group.

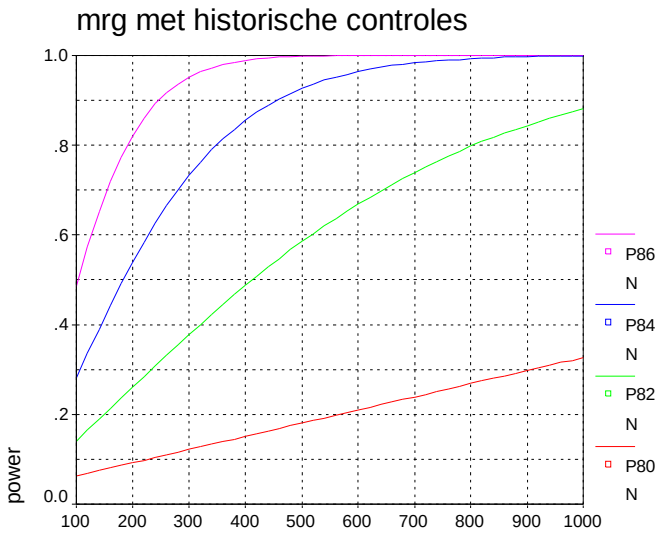


Figure 2

When the ALL-10 MR group will be compared to the control arm of the current BFM-2000 group (expected number of patients in this arm is 440), then the power to detect a difference of 86% DFS versus 78% in the BFM control arm is 70%.

10.3 Statistics for HR

Aim is to study whether a series of intensive sequential courses of chemotherapy, followed by Protocol II, cranial irradiation and continuation therapy or by allogenic stem cell transplantation, will lead to a better outcome compared to the 30% DFS of the historical control group (and in addition compared to that of the BFM-2000 HR control arm, treated identical as the historical control group). For this purpose, a collaboration is performed with the ANZCCSG group who will stratify and treat the HR group identically. Figure 3 shows the number of patients and the related power of the study at these numbers. When the study will run for 5 years about 140 patients will be enrolled in the HR protocol. This means that the study will have a power of 74% to show a difference of 40% DFS versus 30% DFS of the historical control group, a power of about 85% to show a difference of 45% DFS versus 30% DFS of the historical control group and finally a power >90% to show a difference of 50% DFS versus 30% DFS of the historical control group.

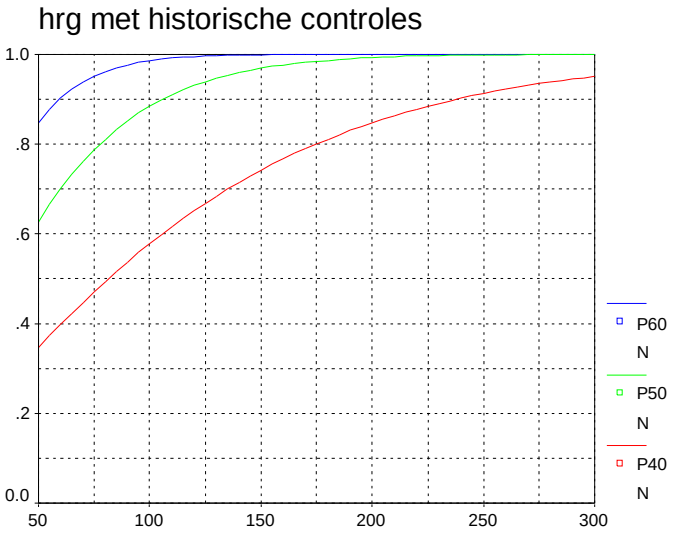


Figure 3
When the ALL-10 HR group will be compared to the control arm of the current BFM-2000 group (expected number of patients in this arm is 126), then the power to detect a difference of 45% DFS versus 30% in the BFM control arm is 75% and the power to show a difference of 50% DFS versus 30% is >90%.

11. REFERENCES

1. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia – current status and future perspectives. Lancet Oncol. 2001;10:597-607.
2. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. N. Engl. J. Med. 1998;339:605-615.
3. Van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. The Lancet 1998;352:1731-1738.
4. Pieters R, Pongers-Willemse MJ, den Boer ML, et al. Chemotherapieresistentie en minimal residual disease: nieuwe mogelijkheden voor therapie op maat voor kinderen met leukemie. Tijdschrft Kindergeneeskunde 1999;67:209-213.
5. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VHJ, et al. Minimal residual disease in leukemia patients. Lancet Oncol 2001;2:409-417.
6.Janka G. Report COALL Study Meeting, 7 February 2003, Hamburg, Germany.
7.Kamps WA, Bokkering JPM, Hahlen K, et al. Intensive treatment of children with acute lymphoblastic leukemia according to ALL-BFM-86 without cranial radiotherapy: Results of Dutch Childhood Leukemia Study Group Protocol ALL-7 (1988-1991).
8. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, et al. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. N. Engl.J. Med. 1998;338:1663-1671.
9.Conter V, Arico M, Valsechhi M et al. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AEIOP) Acute Lymphoblastic leukemia Studies, 1982-1995. Leukemia 2000;14:2196-2204.
10. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981-1995. Leukemia 2000;14:2205-2222.
11. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA et al. Childrens Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. Leukemia 2000;14:2223-2233.
12.Harms DO, Janka-Schaub GE, on behalf of the COALL Study Group. Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia (COALL): long-term follow-up of trials 82, 85, 89, 92. Leukemia 2000; 14: 2234-2239.
13. Kamps WA, Veerman AJP, van Wering ER, et al. Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic luekemia, 1984-1991. Leukemia 2000;14:2240-2246.
14. Silverman LB, Declerck L, Gelber RD et al. Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). Leukemia 2000;14:2247-2256.
15. Vilmer E, Suciu S, Ferster A et al. Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. Leukemia 2000;14:2257-2266.
16. Gustafsson G, Schmiegelow K, Forestier E et al. Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high-dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation. Leukemia 2000;14: 2267-2275.
17. Maloney KW, Shuster JJ, Murphy S et al. Long-term results of treatment studies for childhood acute lymphoblastic leukemia: Pediatric Oncology Group studies from 1986-1994.
18. Pui C-H, Boyett JM, Rivera GK et al. Long-term results of total therapy studies 11,12,and 13A fro childhood acute lymphoblastic leukemia at St.Jude Childrens Research Hospital. Leukemia 2000;14: 2286-2294.
19. Tsuchida M, Ikuta K, Hanada R et al. Long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukemia in Tokyo Childrens Cancer Study Group 1981-1995. Leukemia 2000;14:2295-2306.
20. Eden OB, Harrison G, Richards S et al. Long-term follow-up of the United Kingdom Medical Research Council protocols for childhood acute lymphoblastic leukemia, 1980-1997. Leukemia 2000;14:2307-2320.
21. Bostrom BC, Sensel MR, Sather HN et al. Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. Blood 2003;101:3809-3817.
22. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP et al. A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard risk acute lymphoblastic leukemia: A Childrens Cancer group study. Blood 2002:99:1986-1994.

23. Silverman LB, Gelber RD, Kimball Dalton V. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. Blood 2001;97:1211-1218.
24. Weiss M. Induction therapy of acult acute lymphoblastic leukemia without the use of Vincristine or Prednisone. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2001;15:1-7.
25. Ludwig WD, Rieder H, Bartrans CR et al. Immunophenotypic and gentypic features, clinical characteristics and treatment outcomes of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. Blood 1998;92:1898-1909.
26. Feldman EJ, Albert DS, Arlin Z et al. Phase I clinical and pharmakinetic evaluation of high dose mitoxantrone in combination with Cytosine Arabinoside in patients with acute leukemia. J. Clin Oncol. 1993;11:2002-2009.
27. Arlin ZA, Feldman EJ, FingerLR et al. Short course high dose mitoxantrone with high dose Cytosine Arabinoside is effective therapy for adult lymphoblastic leukemia. Leukemia 1991;5:712-714.
28. Milpied N, Gisselbrecht C, Harousseau JL et al. Successful treatment of adult lymphoblastic leukemia after relapse with prednisone, intermediate dose Cytosine Arabinoside., mitoxantrone and etoposide (PAME) chemotherapy. Cancer 1990;66:627-631.
29. Graham ML, Estrada J, Ragab AH et al. Phase II trial of Mitoxantrone in acute lymphoblastic leukemia of childhood. A Pediatric Oncology Grou Study. Invest. New Drugs 1991;9:263-267.
30. Wells RJ, Odom LF, Gold SH et al. Cytosine arabinoside and mitoxantrone treatment of relapsed and refractory childhood leukemia initial response and relationship to multidrug resistance gene 1. Med. Ped.Onc. 1994;22:244-249.
31. Kern W, Schleyer E, Unterhalt M et al. High antileukemic activity of sequential high dose cytosine arabinoside and mitoxantrone in patients with refractory acute leukemia. Result of a clinical phase II study. Cancer 1997;79:59-68.
32. Carella AM, Pungolino E, Piatti G. Idarubicin in combination with intermediate dose Cytosine Arabinoside. in the treatment of refractory or relapse acute leukemias. Eur J. Hemat. 1989;43:309-313.
33. Paciucci PA, Cuttner J, Holland JF, Mitoxantrone as a single agent and in combinated therapy in patients with refractory acute leukemia seminar . Oncology 1984;11:36-40.

12. LABORATORIUMONDERZOEK ALL10

12.1 Beenmerg- en bloedonderzoek: Cytologisch en immunophenotypisch

Tijdstippen afname:

- diagnose
- overige (MRD) afname punten
- bij recidief (of verdenking recidief)

Diagnostiek voorafgaande aan en tijdens de behandeling is uiterst belangrijk. Mede bepalend hiervoor is het afnemen van voldoende materiaal. Indien onvoldoende diagnostiek mogelijk is op basis van de beenmergpunctie(s), b.v. bij een "dry-tap", dient een botbiopt te worden overwogen.
Tijdens de therapie en 1 jaar na het stoppen van de therapie worden beenmergpuncties gedaan om het effect van de behandeling te beoordelen. Deze afname tijdstippen staan in de therapieschema's aangegeven en in hoofdstuk 14.

12.1.1 Cytologische diagnostiek (uitstrijkpreparaten)

Benodigd materiaal

- Voorafgaande aan de behandeling worden 6 ongekleurde beenmerguitstrijkjes en 3 ongekleurde bloeduitstrijkjes gestuurd naar het laboratorium van de SKION. De uitstrijkjes moeten zijn afgenomen vóór eventuele transfusie van bloed of bloedprodukten.
- Tijdens en na behandeling volstaan 3 ongekleurde beenmergpreparaten en 1 ongekleurd bloedpreparaat. Bij (verdenking) recidief dient dezelfde procedure te worden gevolgd als bij diagnose.

Richtlijnen voor het vervaardigen van bloed- en beenmerguitstrijken

Ter realisatie van de gewenste uniformiteit van bloed- en beenmergpreparaten gaarne aandacht voor de volgende richtlijnen voor bloed- en beenmerguitstrijken:

- het opbrengen van slechts een kleine druppel op het objectglas.
- het uitstrijken met een glaasje dat smaller is dan het objectglas onder een hoek van 45º, langzaam uitstrijken.
- zodanig uitstrijken dat het einde van de film ongeveer halverwege het objectglas komt te liggen.

Pathologische cellen zijn vaak erg kwetsbaar en vallen spoedig uiteen bij snelle verplaatsing.
De hoeveelheid plasma dient gering te zijn. Indien het plasma meer dan enkele seconden nodig heeft om op te drogen, gaan de cellen door osmotische invloed schrompelen. Men gebruike een geslepen dekglaasje van een telkamer of een geslepen objectglas.

Doel

Op de uitstrijkpreparaten wordt standaard een May-Grünwald-Giemsa kleuring gedaan voor het tellen van het percentage blasten. Voor het klassificeren van de leukemie worden tevens een Sudan-Black B, een Peroxidase en gecombineerde naftol AS-D chloroacetaat esterase en α-naftyl-acetaat-esterase verricht. Beoordeling en typering geschiedt volgens de WHO-classificatie (WHO classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by ES Jaffe, NL Harris, H Stein, JW Vardiman. IARC press, Lyon 2001).

Uitslag

De uitslag wordt telefonisch en schriftelijk doorgegeven aan de behandelend kinderarts.

12.1.2 Immunophenotypering en DNA-ploidie (Hemoblok – SKION)

Benodigd materiaal

- heparine beenmerg: 5 ml
- heparine bloed: 20 ml

Werkwijze

Hiervoor zijn in het zgn. **hemoblok** heparinebuizen aanwezig; na afname goed mengen om stolling te voorkomen. Zonodig een tweede beenmergpunctie op een andere plaats uitvoeren, om teveel bloedbijmenging te voorkomen. Het materiaal dient te worden bewaard en getransporteerd op kamertemperatuur.

Doel

- Immunofenotypering geschiedt op het laboratorium van de SKION in meervoudige labeling en volgens de richtlijnen van de SIHON (www.sihon.nl) in een gefaseerde aanpak. De volgende markers worden in elk geval gebruikt:
  - Niet specifiek — CD45, CD34, CD117, TdT en HLA-DR
  - B-cel markers — CD19, CD10, CD20, CD22, CD79a
  - T-cel markers — CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8
  - Myelo-monocytaire marker — CD13.33, CD14, CD15, MPO

- DNA-ploidie (DNA-index) wordt vastgesteld bij diagnose met behulp van de flowcytometer.Tevens wordt het % cellen in S-fase bepaald.

Uitslag
De uitslag wordt schriftelijk aan de behandelend arts meegedeeld.

12.2 Minimal Residual Disease (MRD) onderzoek en prednison respons

Benodigd materiaal

- heparine beenmerg: (minimaal) 2 ml op de in het protocol vastgelegde afnamepunten.
- Heparine bloed: (1-2 ml) op **dag 8** (t.b.v. prednison respons evaluatie)

Werkwijze
Hiervoor zijn in het zgn. **hemoblok** heparinebuizen aanwezig; na afname goed mengen om stolling te voorkomen. Het materiaal dient te worden bewaard en getransporteerd op kamertemperatuur. Afnametijdstippen

- **Therapiestratificatie:**
  Dag 33 en 79 (begin protocol M).

- **Therapie-evaluatie:**
  Op dag 8, 15, 33 en 79 en op circa 5, 7,12, 24 en 36 maanden na diagnose, of bij begin van ieder HR blok zoals aangegeven in de therapieschema's .

Doel
Doel bij diagnose is het vaststellen van PCR targets voor MRD onderzoek, door middel van PCR en sequentie analyse van immunoglobuline (Ig) en/of T-cel receptor (TCR) gen herschikkingen. Voor de aanwezige Ig/TCR genherschikkingen worden patiënt-specifieke PCR testen opgezet om gedurende de therapie de leukemiecellen te vervolgen.

12.3 Liquordiagnostiek (SKION-liquorblok)

Benodigd materiaal

- Bij diagnose en op dag 33 2,5 ml liquor
- Indien tijdens de behandeling door de behandelend kinderarts een celaantal van ≥ 15/3 (of ≥ 5/mm^3) in de liquor gevonden wordt, dient eveneens liquor naar het laboratorium van de SKION te worden gezonden.

Werkwijze
Bij de lumbaalpunctie wordt als 2^e of 3^e afnamemateriaal, het buisje uit het **"liquorblok"** van de SKION gevuld. Dit wordt aangevuld tot aan de aangegeven streep met liquor.
Eventueel is het mogelijk ongekleurde cytospinpreparaten naar het laboratorium te sturen, mits deze van goede kwaliteit zijn.

Doel
Bepaald worden het aantal cellen in de liquor en de cytomorfologie (cytospinpreparaten MGG gekleurd).

Uitslag
De uitslag wordt telefonisch en schriftelijk aan de behandelende kinderarts doorgegeven.

12.4 Cytogenetisch onderzoek

Het chromosomenonderzoek geschiedt in 9 cytogenetische laboratoria in Nederland. Deze zijn hiervoor een gezamenlijk te volgen procedure overeengekomen voor het verkrijgen van materiaal. Voor het doen verrichten van cytogenetisch onderzoek neme men vooraf telefonisch contact op met één van de volgende personen en instituten:

Dr C Mellink
Academisch Medisch Centrum
Afd. Klinische Genetica
Meibergdreef 15
1105 AZ Amsterdam ZO
Tel: 020 - 566 51 69 / 566 52 27
Fax 020-6918626
e-mail: c.h.mellink@amc.uva.nl

Dr. A. Simons
UMC St.Radboud
417 Cytogenetica
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen
Tel: 024-3614939
Fax : 024-3542151
e-mail: A.Simons@antrg.azn.nl

Dr. E. van den Berg-de Ruiter
Vakgroep Medische Genetica
Cytogenetisch Laboratorium
Ant. Deusinglaan 4
9713 AW Groningen
Tel : 050 - 363 29 38
Fax : 050- 363 24 57
e-mail:
E.van.den.Berg-de.Ruiter@medgen.azg.nl

Mevr. Dr. H.B. Beverloo
Erasmus Universiteit
Afd. Celbiologie en Genetica
Postbus 1738
3000 DR Rotterdam
Tel: 010 - 408 83 15
Fax: 010- 408 94 92
e-mail: b.beverloo@erasmusmc.nl

Drs G. Hamers
Acad Ziekenhuis Maastricht
Klin Genetica 3X-gebouw
Cytogenetisch Laboratorium
Postbus 5800
6202 AZ Maastricht
Tel: 043 - 387 58 44
Fax: 043- 387 78 77
e-mail: guus.hamers@gen.unimaas.nl

Drs HF de France
Divisie Medische Genetica UMCU
Huispostnr. KC 04.084.2
Postbus 85090
3508 AB Utrecht
Tel: 030- 250 38 62
Fax: 030- 250 38 01
e-mail: H.F.deFrance@dmg.azu.nl

Mevr. Drs W Kroes
Stg. Klinisch Genetisch Centrum Leiden
Afd. Klinische Cytogenetica
Rijnsburgerweg 10
Poortgebouw Zuid
Begane Grond, 014
2333 AA Leiden
Tel: 071- 526 47 83
Fax: 071-5266920
e-mail: W.G.M.Kroes@lumc.nl

Mw. Ir. M. Blij-Philipsen
Stg. Klinische Genetica Z-O Nederland
Postbus 108
5500 AC VELDHOVEN
Tel. 040- 258 83 00
Fax: 040- 258 83 03
e-mail: marianne.vanderblij@gen.unimaas.nl

Mevr. Drs A.W.M. Nieuwint
VU medisch centrum
Laboratorium voor Cytogenetisch onderzoek
Afdeling Klinische Genetica en Antropogenetica
Postbus 7057
1007 MB Amsterdam
Tel: 020-4440157
Fax: 020-4440744
e-mail: A.Nieuwint@vumc.nl

De uitslagen worden rechtstreeks aan de behandelend kinderarts toegestuurd. De SKION ontvangt eveneens de uitslag van het desbetreffende cytogenetisch laboratorium.

12.5 Checklist SKION bij diagnose en follow-up

Patient telefonisch aanmelden bij de SKION (070-3674545). Hierbij worden naam, geboortedatum en indien van toepassing de (voorlopige) diagnose gemeld, alsmede gegevens over het afgenomen materiaal.

Afnames bij diagnose en follow-up:

Tijdstip	**Preparaten (ongekleurd)**		**Hemoblok**		**Liquorblok**	
	Bm	**Bloed**	**Bm (heparine buis)**	**Bloed (heparine buis)**	**Buis met medium**	**Buis zonder medium**
Diagnose en (verdenking) recidief	6	3	5 ml	10-20 ml	2,5 ml tot aan de streep op de buis	2 ml
Dag 8	3	3		2 ml		
Dag 15	3		5 ml			
Dag 33	3	3	5 ml	10 ml	2,5 ml	
Dag 79	3	3	5 ml	10 ml		
Overige tijdstippen	3	3	2 ml	10 ml		

Verzenden per Fiege (BLS koerier) naar het SKION laboratorium

Instructies voor verzenden

Materiaal naar de SKION:
Hemoblok: Bloed en/of beenmerg kunnen in een, door de SKION verstrekt hemoblok worden verstuurd.
Liquorblok: Voor het verzenden van liquor is een liquorblok beschikbaar. Deze zijn in de regel in het laboratorium van het ziekenhuis van de kinderarts aanwezig (evt. aanvragen bij het laboratorium van de SKION). In de blokken zit een formulier met instructies waarop tevens enkele gegevens van de patiënt moeten worden ingevuld.
Controle preparaten: deze kunnen in de daartoe ontworpen goedgekeurde verpakking maar per gewone post kunnen worden verstuurd.

Telefonisch wordt de verzending vóóraf gemeld aan de SKION:
Op **werkdagen** van 09.00-17.00 uur: telefoon 070 367 45 45 (buiten deze uren kan een boodschap worden ingesproken op het antwoordapparaat).
Op **zaterdag** van 08.30-17.30 uur via telefoon 06 5120 12 97 de dienstdoende analist(e) waarschuwen. Indien de analiste niet reageert via dit telefoonnummer (b.v omdat ze bezig is), dan graag uw boodschap op de voice-mail inspreken, opdat u kan worden teruggebeld.

Verzending hemo-, liquorblokken en diagnosepreparaten via Fiege (BLS-Koerier):
Aanmelding voor vervoer dient te geschieden **per fax 075-650 16 98 of per email (jdewijn@fiege.nl) bij voorkeur vóór 16.00 uur en met een speciaal daarvoor ontworpen opdrachtformulier.**
Eventueel tot 21.00 uur bellen naar nummer: 075-650 16 19; bgg 06-100 30 619.
Formulieren zijn indien nodig aan te vragen bij het SKION laboratorium. U dient ervoor te zorgen, dat het pakket in SKION verpakking, lekdicht en met absorberend materiaal verpakt, **klaar ligt op de met de koeriersdienst afgesproken plaats**.

13. DIAGNOSTIEK/ ONDERZOEK BIJ DIAGNOSE

1. Lichamelijk onderzoek, m.n. aandacht voor:
   Lengte, gewicht, klieren, lever-miltgrootte in cm onder ribbenboog in medioclaviculairlijn, testes, huidafwijkingen, neurologisch onderzoek, gewrichten, botten.
2. Bloed:
   - Bloedbeeld + diff. Reticulocyten
   - Bloedgroep
   - Na, K, Ca, P, Gluc., kreat., Ur, urinezuur, LDH, ASAT, ALAT, IgGAM
   - Stolling: PT, APTT, fibrinogeen
   - Virusserologie, m.n. waterpokken, CMV, hepatitis, EBV
   - HLA-typering indien beenmergtransplantatie nodig is
3. Beenmerg- en bloedonderzoek voor leukemie classificatie:
   - Zie bijlage laboratoriumonderzoek SKION (paragraaf 12.5)
   - Niet meer dan 5 ml op 1 plaats opzuigen bij voorkeur!
   - Morfologie, immunofenotypering, cytogenetische en moleculair-genetisch onderzoek, minimal residual disease
4. Liquor
   - Zie bijlage laboratoriumonderzoek SKION
   - Celaantal, eiwit, glucose, differentiatie
5. Radiologisch onderzoek
   - X-thorax 2R (mediastinum)
   - Echo abdomen (lever, milt, nieren, ovaria, klieren)
   - CT of MRI hersenen op indicatie.
6. Echo hart
7. Kweken: op indicatie en/of volgens SDD schema
8. Consult oogarts op indicatie
9. Testisbiopsie op indicatie

14. DIAGNOSTIEK/ ONDERZOEK NA BEHANDELING

- Anamnese, lichamelijk onderzoek, performance status en bloedbeeld + differentiatie.
  - In 1^{e} jaar: 1 ½, 3, 4 ½, 6, 9 en 12 maanden na einde therapie;
  - In 2^{e} en 3 jaar: elke 3 maanden: 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 en 36 maanden na einde therapie;
  - In 4^{e} en 5^{e} jaar: 42, 48 en 60 maanden na einde therapie.

- Lever- en nierfuncties en immuunglobulines
  - Eenmalig 3 maanden na einde therapie, daarna op indicatie.

- BMP en LP: eenmalig 12 maanden na einde therapie; daarna op indicatie.

15. SUPPORTIVE CARE RICHTLIJNEN; ONDERSTEUNENDE MAATREGELEN

De behandeling van maligniteiten vergt een aantal maatregelen in de ondersteunende behandeling. Deze worden ingegeven door de betreffende medicatie, de toedieningsweg, toedieningsperiode en de dosering. De basale preventieve ondersteunende maatregelen treft u navolgend aan.

Een deel van de maatregelen is niet gerelateerd aan een specifiek toegediend medicament, maar geldt als ondersteunend in algemene zin. Dit is het laatste onderdeel van dit hoofdstuk.

Uiteraard bestaat een breed spectrum aan bijwerkingen en complicaties van elk betreffend medicament. Deze zijn onder andere terug te vinden in het Farmacotherapeutisch Kompas en kinderoncologische handboeken. Overigens wordt verwezen naar het binnenkort te verschijn werkboek “Supportive Care in de Kinderoncologie”, onder redactie van W.A. Kamps, M. Naafs-Wilstra, A.Y.N. Schouten-van Meeteren en W.J.E. Tissing, eindredactie C.M.F. Kneepkens.

Cytostaticum

Potentiële bijwerking	**Preventieve maatregelen**
<u>Dexamethason / Prednison</u>	
gedragsveranderingen	informatieve uitleg aan ouders en evt kind overweeg ondersteuning door kinderpsycholoog overweeg Lorazepam danwel Largactil
metabolisme	ongeremde eetlust waarvoor caloriebeperkende voedingsadviezen specifieke vetverdeling anamnestisch aandacht voor glucosurie, hyperglycemie cave Diabetes Mellitus
hypertensie	bloeddrukcontrole, zo nodig antihypertensiva
gastritis	mn in combinatie met NSAID’s antacida profylaxe overwegen igv klachten: behandelindicatie Omeprazol
hypocortisolisme	hydrocortison substitutie igv koorts of andere vormen van stress

<u>Daunorubicine / Doxorubicine / Idarubicine / Mitoxantrone</u>

cardiotoxiciteit echografie hartcontractiliteit voor aanvang anthracyclines

echocardiografie volgens schema:

Naam	Max. totaal Cumulatieve dosis	Dosis waarboven standaard echocardiografie
Daunorubicine/Doxorubicine (=Adriamycine)	450 mg/m^2	240 mg/m^2
Epirubicine	800 mg/m^2	400 mg/m^2
Idarubicine	125 mg/m^2	60 mg/m^2
Mitoxantrone	160 mg/m^2	60 mg/m^2

shortening fraction < 28% of > 10% reductie overweeg aanpassing / staken van anthracycline toediening

emesis anti-emeticum 5HT$_3$-antagonist

extravasatie ijs applicatie 4 – 6 uur per dag, steeds gedurende ongeveer 15 min. Evt kan DMSO 100 % worden geappliceerd: penselen en laten opdrogen zonder verband: 4 dd gedurende 14 dagen

Asparaginase

overgevoeligheid	controle pols en bloeddruk voor en tijdens infusie i.g.v. allergische reactie: –> onderbreek infusie, hervat bij herstel evt op lagere snelheid –> evt antihistaminicum, hydrocortison, als volgt: - bij lichte allergische reactie: profylactisch Tavegil en Hydrocortison voorafgaand aan volgende gift - bij anafylactische reactie: het alternatieve preparaat in aangepaste dosis en frequentie volgens protocol
hypercoagulabiliteit door tekort stollingseiwitten	vooraf uitsluiten predispositie thrombofilie; indien aanwezig, overweeg Fraxiparine tijdens Asparaginase in geval van trombose kan de Asparaginase later opnieuw toegediend worden indien de symptomen van trombose hersteld zijn. Geadviseerd wordt om low-molecular weight heparin (LMWH) toe te dienen tot tenminste 4 weken na de laatste Oncospar toediening. Bij iedere patiënt dient dit te worden afgewogen tegen het risico van bloeding bij bijvoorbeeld trombopenie.
fibrinogeen tekort	igv bloedingsneiging: controleer fibrinogeen, FFP substitutie bij fibrinogeen< 0.6 gr/l

Cyclophosphamide

emesis	anti-emeticum $5HT_3$-antagonist
nefrotoxiciteit	maatregelen vanaf 500 mg/m^2/kuur - hyperhydratie 3 l/m^2 vanaf 3 uur voor start - evt geforceerde diurese mbv furosemide bij mictie < 3 ml/kg/u
blaasmucosa schade	mesna 33% dosis vooraf; wederom 33% dosis na 4 en 8 uur vanaf Cyclophosphamide OF nadien onderhoudsinfuus 100% dosis tot 24 uur na laatste Cyclophosphamide evt oraal Mesna

Cytosine arabinoside lage dosis < 1000 mg / m^2 / kuur

Geen aanvullende maatregelen

Cytosine Arabinoside hoge dosis > 1000 mg / m^2 / kuur

hydratie	2,5 l/m^2
emesis	anti-emeticum $5HT_3$-antagonist
keratitis/conjunctivitis	oogdruppels corticosteroïden 4 dd tijdens kuur
infektie Streptococ vir	profylaxe Pheniticilline G 50 mg / kg in 3 dd tot na herstel uit neutropenie Igv peni-resistente Streptococ in keelkweek Claritromycine overwegen

Etoposide

matig oplosbaar	maximaal 0,4 mg/ml concentratie
allergeen	controle pols, bloeddruk voor en tijdens infusie cave hypotensie of allergische reactie i.g.v. allergische reactie –> onderbreek infusie –> hervat bij herstel op lagere snelheid –> evt vooraf antihistaminicum, hydrocortison

Ifosfamide

emesis	anti-emeticum $5HT_3$-antagonist
nefrotoxiciteit	- hyperhydratie 3 l / m^2 vanaf 3 uur voor start - evt geforceerde diurese mbv furosemide bij mictie < 3 ml/kg/u
blaasmucosa schade	mesna 33% dosis vooraf; wederom 33% dosis na 4 en 8 uur vanaf Ifosfamide OF nadien onderhoudsinfuus 100% dosis tot 24 uur na laatste ifosfamide evt oraal Mesna

Intrathecale medicatie

pijn / belasting	adequate sedatie en analgesie
emesis	anti-emeticum $5HT_3$-antagonist
postpunctieklachten	4 uur platliggen na toediening
accidentele toediening	gebruik 3-weg kranenblok-toedieningssysteem
onjuiste medicatie	geen vincristine in de behandelruimte voor de lumbaal punctie

6-Mercaptopurine & 6-Thioguanine

individuele gevoeligheid	controleer TPMT deficiëntie igv sterke aplasie
toediening	avonddosis op 1 uur nuchtere maag niet innemen met melkproducten
hepatotoxiciteit	transaminasen stijgingen tot 500 U / l behoeven geen dosisaanpassing
leucopenie	mn voor onderhoudstherapie 6-Mercaptopurine voorkom te hoge / lage leucocytenwaarden: streefwaarden volgens protocol
VOD	bij 6-TG is er een verhoogde kans op het ontstaan van een VOD. (Trias: pijnlijk vergrote lever, vochtretentie en icterus)

Methotrexaat (lage dosis)

Geen speciale maatregelen

Methotrexaat (≥ 2g/m2)

nefrotoxiciteit	- hyperhydratie 3 l / m^2 vanaf 12 uur voor start - evt geforceerde diurese mbv furosemide bij mictie < 3 ml/kg/u - alkalinisatie urine pH > 7.0
toxiciteit huid/ mucosa	- werking MTX couperen op basis van spiegelcontrole (T = 48) - dosis en frequentie Citrovorumfactor bepalen ogv nomogram toediening kan intraveneus en oraal in gelijke doses - richtlijn bij MTX-spiegel > 0.4 µ mol/L op TNS: voortzetten leucovorin rescue iedere 6 uur tot de MTX-spiegel < 0.25 µ mol/L is.

Vincristine & Vindesine

extravasatie	infuusnaaldje < 24 uur oud ivm lokaal toxisch effect op het bloedvat Interventie extravasatie: Hyaluronidase 150 E / ml (in NaCl 0.9% opgelost) lokaal s.c. of intracutaan
obstipatie	defaecatie anamnese profylactisch laxeren, tijd nemen voor stoelgang tijdige oraal laxeren bij moeizame defaecatie
neuralgische (bot)pijn	- Paracetamol - toevoegen Tegretol of Amitriptyline (soms kort na start forse pijn in de kaken)
perifere neuropathie	ptosis, verminderde voetheffers funktie - expectatief beleid evt fysiotherapie
SIADH	mn bij frequent Vincristine cave SIADH, controle natrium en vochtbalans

Fludarabine

lymfopenie	bestraalde bloedproducten

CNS bestraling

Cave een eventueel passagere somnolentie syndroom, optredend 5-7 weken na bestraling
voldoende bescherming van de hoofdhuid bij zon

Algemene maatregelen

Punt 1-5 betreft het advies uit het amendement CU-07/0417 van 13 juni 2007:

1. De behandeling van kinderen in de intensieve fasen van het ALL-10 protocol dient plaats te vinden in een kinderoncologisch centrum. De intensieve fasen betreffen de inductiebehandeling voor alle kinderen, de eerste 34 weken van de intensiveringsfase van de MR groep en de gehele behandeling van de HR groep tot de onderhoudsfase. Doel hiervan is om het ten onrechte continueren van chemotherapie of het niet aanpassen van de chemotherapie doseringen op basis van bloedbeelden en/of klinische toestand te voorkomen. Uitzondering hierop betreffen de zogenaamd enkelvoudige toedieningen van cytostatica of transfusies die wel in de perifere ziekenhuizen gegeven kunnen worden, maar ook dit valt altijd onder verantwoordelijkheid van een centrum. Voorbeeld hiervan is het toedienen van de 2^{e} t/m de 4^{e} dosis van de wekelijkse blokjes ARA-C in protocol IB.
2. Patiënten dienen bij infecties tijdens de intensieve fasen zoals genoemd opgenomen te worden in het kinderoncologisch centrum. Beoordeling van patiënten kan plaatsvinden in een perifeer ziekenhuis waarna overleg plaats dient te vinden met het centrum.
3. Advies voor anitbacteriele en antifungale profylaxe in het ALL-10 schema:
   SR: ciproxin gedurende protocol I
   MR: ciproxin gedurende protocol I, ciproxin / itraconazol gedurende het intensieve deel van de MRG behandeling
   HR: ciproxin gedurende protocol I, ciproxin / itraconazol gedurende de HR blokken.
   Doseringen profylactisch ciproxin 30 mg/kg in 2 dd en itraconazol 6 mg/kg in 1 dd (suspensie in verband met betere resorptie).

   Dit betreft een advies waarvan op basis van argumenten zoals individuele patienten problematiek en of lokale omstandigheden afgeweken kan worden. Te denken valt hierbij aan het weglaten van itraconazol bij neurologische complicaties of het gedurende de gehele MRG onderhoudsfase doorgeven van ciproxin i.v.m. een verhoogd risico op ernstige infecties.

4. Bij het begin van de infectie dient laagdrempelig een stress schema corticosteroïden gegeven te worden en dienen bij te lage immuunglobuline spiegels suppletie met immuunglobulines gegeven te worden zeker bij ernstige infecties.
5. De richtlijnen van chemotherapie reductie op basis van bloedwaarden dienen strict te worden gevolgd. Daarnaast moet op basis van het klinisch beeld van infecties altijd overwogen worden om de chemotherapie te onderbreken inclusief de orale middelen zoals 6-mercaptopurine, los van de bloedwaarden.

emesis	indien 5 HT_3 antagonist ontoereikend is, overweeg Dexamethason 10 mg/m^2 in 3 dd en toevoeging van Lorazepam
preventie pneumocysitis carinii pneumomie	Cotrimoxazol profylaxe vanaf diagnose 3 dagen / week, 3/15 mg / kg / gift
neutropenie en koorts	start breed spectrum antibiotica indien de temperatuur een aantal uur achtereen > 38,5 °C is
hypo-gamma-globulinaemie	in geval van infekties tijdens de onderhoudsbehandeling, overweeg gamma globuline substitutie obv IgG titer
transfusies	bestraalde bloed producten bij lymfopenie < 5 x 10^6/l, of tot 6 maanden na totaal lichaamsbestraling of na Fludarabine
infertiliteit	semenpreservatie igv beenmergtransplantatie, bij voorkeur voor aanvang van de HR blokken
teratogeniciteit	de meeste chemotherapeutica zijn (potentieel) teratogeen. Bij oudere kinderen is het daarom soms zinvol hiervoor te waarschuwen en anticonceptive maatregelen te nemen

<u>Potentiele problemen tijdens de inductie therapie</u>

hyperleucocytose	aangepaste dosering prednison (zie bladzijde 18 van het protocol), ter voorkoming van een tumorlysis syndroom als leucocyten > 50 x 10^9/ l, terughoudend met erythrocyten transfusies (in ieder geval niet als Hb>5) overweeg een wisseltransfusie bij een zeer hoge leucocyten aantal
tumor lysis syndroom	voorzorgen: hyperhydratie en goede controle van de diurese ter voorkoming van uraat nefropathie: Allopurinol (200-500 mg/m^2/dag 2 dd oraal) in combinatie met Natriumbicarbonaat (streef urine pH 6.5 – 7) Rasburicase indien leucocyten > 100 x 10^9/ l urinezuur wordt minstens dagelijks gecontroleerd! cave hyperkaliaemie, hypocalciaemie of hyperfosfataemie
vena cava superior (VCS) syndroom	kan optreden bij een groot mediastinaal proces. Vooral bij een narcose bedacht zijn op compressie van de luchtwegen kliniek: oedeem van de hals en het hoofd therapie: antileukemisch, cave tumor lysis syndroom

INFORMATIE ALL ALGEMEEN

16. INFORMED CONSENT EN PATIËNTENINFORMATIE

Informatie voor ouders en kinderen met Acute Lymfatische leukemie (ALL)

Wat is acute lymfatische leukemie (ALL)?
Leukemie is kanker van bloedcellen. Bloedcellen (en dus ook leukemiecellen) worden in het beenmerg gemaakt wat in alle botten van het lichaam zit. Normaal gesproken ontstaan de bloedcellen eerst als onrijpe cellen en rijpen ze vervolgens uit in het beenmerg waarna ze losgelaten worden in het bloed. Via het bloed kunnen de cellen vervolgens door het hele lichaam vervoerd worden om hun functies uit te voeren. Er bestaan verschillende soorten normale bloedcellen:

- **Rode bloedcellen** (erythrocyten): deze cellen nemen vanuit de longen zuurstof op en transporteren dit naar alle organen in het hele lichaam. De zuurstof wordt gebonden aan een bepaald eiwit, het zogenaamde hemoglobine afgekort als Hb. Een tekort aan rode bloedcellen of een laag Hb wordt bloedarmoede of anemie genoemd. De bijbehorende klachten zijn bleek zien en moeheid.
- **Witte bloedcellen** (leukocyten): deze cellen verzorgen de afweer van ons lichaam tegen infecties door bijvoorbeeld bacteriën en virussen. Leukos betekent wit. Omdat bloedkanker voor het eerst ontdekt werd in de witte bloedcellen (en omdat bloedkanker het meest voorkomt in de witte bloedcellen) wordt bloedkanker ook leukemie genoemd. Er bestaan verschillende soorten normale witte bloedcellen:
  - **Lymfocyten:** deze witte cellen komen in het bloed maar ook in de lymfklieren en milt voor. Van de lymfocyten bestaan weer T-lymfocyten en B-lymfocyten die belangrijk zijn voor het maken van antistoffen tegen ziekteverwekkers. De meest voorkomende vorm van leukemie bij kinderen ontstaat in deze cellen en heet derhalve ook lymfatische leukemie.
  - **Granulocyten:** deze witte bloedcellen spelen ook een belangrijke rol bij de afweer, m.n. voor het opeten van m.n. bacteriën.
  - **Monocyten:** deze grote witte bloedcellen spelen ook een belangrijke rol bij de afweer, m.n. voor het opeten van bacteriën en virussen.

  Te weinig witte bloedcellen leiden tot een verminderde afweer tegen infecties en dus vaak tot het krijgen van infecties met koorts.
- **Bloedplaatjes** (trombocyten): deze zijn belangrijk voor de bloedstolling. Te weinig trombocyten leiden dus tot bloedingen. Dit uit zich in bijvoorbeeld bloedneuzen of spontane of ongewoon grote blauwe plekken op plaatsen waar deze normaal gesproken zelden ontstaan of zeer kleine zogeheten puntbloedingen in de huid of het slijmvlies van de mond.

Per dag worden miljarden bloedcellen aangemaakt doordat onrijpe cellen in het beenmerg, de zogenaamde blasten, zich delen. Ook gaan er per dag gemiddeld evenveel cellen dood zodat het aantal bloedcellen ongeveer constant blijft. Dit proces van aanmaak en afbraak van bloedcellen wordt in het lichaam nauwkeurig gecontroleerd. Indien nu een bepaalde cel in het beenmerg op hol slaat en ongecontroleerd gaat delen ontstaan er veel te veel cellen van hetzelfde soort. Deze ongecontroleerde woekering van bloedcellen van hetzelfde onrijpe soort heet leukemie. Dit kan plaatsvinden in ieder soort bloedcel die hierboven beschreven staat. Meest voorkomend echter is lymfatische leukemie, kanker in de onrijpe voorlopers van de lymfatische cellen, de lymfocyten. Aangezien dit ziektebeeld zich relatief snel, acuut ontwikkeld wordt gesproken van acute lymfatische leukemie, afgekort als ALL.

Welke klachten horen bij ALL?
Bij ALL worden in het beenmerg enorm veel leukemiecellen aangemaakt waardoor er te weinig ruimte is voor de aanmaak van de gezonde bloedcellen. Dit leidt tot een tekort aan rode cellen in het bloed (bloedarmoede) met moeheid, algemene malaise en bleek zien als gevolg. Te weinig gezonde witte cellen in het bloed leidt tot infecties en koorts. Te weinig bloedplaatjes leidt tot grote blauwe plekken of bloeduitstortingen op ongebruikelijke plaatsen of tot puntbloedingen in de huid en de mond. Uiteraard is het zo dat de aanwezigheid van slechts een van de verschijnselen niet past bij leukemie. Echter, bij de combinatie van verschijnselen die passen bij de drie verschillende soorten bloedcellen wordt gedacht aan de mogelijkheid dat er iets mis is op de plaats waar deze bloedcellen gemaakt worden, het beenmerg. Bij leukemie is er ook vaak sprake van botpijn door de druk die de grote hoeveelheid leukemiecellen vanuit het beenmerg op het bot uitoefent. Ook kan bij leukemie sprake zijn van

opgezette lymfeklieren en een vergrote lever en milt doordat de leukemiecellen in deze organen kunnen zitten.

Hoe vaak komt ALL voor?
ALL is de meest voorkomende vorm van kanker bij kinderen. Per jaar wordt ALL bij ongeveer 120 kinderen in Nederland vastgesteld. ALL komt op alle leeftijden voor, op de kinderleeftijd van 0 tot 18 jaar maar het komt ook voor bij volwassenen. Bij volwassenen komen echter vaker andere vormen van leukemie voor, zoals acute-niet lymfatische leukemie en chronische leukemie. Deze vormen zijn bij kinderen zeer zeldzaam.

Waardoor wordt ALL veroorzaakt?
De oorzaken van ALL zijn niet bekend hoewel er “in de volksmond” verschillende (onjuiste) ideeën bestaan over hoe leukemie of kanker in het algemeen bij kinderen ontstaat. Deze ideeën zijn helaas vaak gebaseerd op onjuiste verkeerde interpretaties en zorgen vaak voor grote onrust en ook onterechte schuldgevoelens bij ouders en familieleden. Het is belangrijk om te stellen dat veel wetenschappelijk onderzoek nog niet heeft geleid tot de oorzaken van leukemie. Het is belangrijk om op basis van uitgevoerd onderzoek een aantal dingen vast te stellen:

Er zijn geen zaken bekend die de ziekte veroorzaakt kunnen hebben en die dus door ouders of kind voorkomen hadden kunnen worden. Leukemie is niet besmettelijk en kan niet zoals een virus van de ene persoon op de andere overgaan. Leukemie is niet erfelijk met uitzondering van hele zeldzame op zich zelf staande gevallen. Andere familieleden van een kind met leukemie hebben in het algemeen dus een niet of nauwelijks verhoogde kans om leukemie te krijgen.

Een aantal zaken wordt in de “volksmond” vaak in verband gebracht worden met het ontstaan van leukemie. Hiertoe behoren bijvoorbeeld roken van ouders, drugsgebruik, het wonen op gifgrond, het eten van voedselproducten waar toevoegingen in zitten. Van geen van deze zaken is aangetoond dat dit de kans op het krijgen van leukemie bij een kind verhoogt.

Alles wat er in een cel gebeurt staat onder controle van de chromosomen in die cel. Dit geldt zeker ook voor de celdeling, het uitrijpen van cellen en het uiteindelijk doodgaan van cellen. Bij leukemie is er sprake van ongecontroleerde celdeling in onrijpe bloedcellen doordat er sprake is van afwijkingen in de chromosomen van de leukemiecellen. Deze afwijkingen zitten op stukjes van chromosomen (genen), die normaal gesproken de celdeling, uitrijping en doodgaan van cellen regelen. De oorzaak van leukemie heeft dus te maken met deze afwijking in de chromosomen. Deze chromosoomafwijkingen komen uitsluitend in de kankercellen voor en hebben dus niets met erfelijkheid te maken. Alle andere cellen in het lichaam van het kind hebben normale chromosomen. Waarom deze chromosoomafwijkingen (en dus leukemie) ontstaan is zoals boven gesteld helaas niet bekend.

Hoe wordt de diagnose ALL gesteld?
Bij de verdenking op leukemie zal eerst bloedonderzoek gedaan worden om het aantal bloedcellen van de verschillende soorten te bepalen en om te bepalen hoe de bloedcellen er uit zien onder de microscoop. Daarna wordt een beenmergprik (beenmergpunctie) verricht om vast te stellen of er leukemie is en zo ja, van welk type leukemie sprake is. Om de uitbreiding van de ziekte te beoordelen wordt een ruggenprik (lumbaalpunctie) verricht om te onderzoeken of er leukemiecellen aanwezig zijn in het hersenvocht (liquor). Tevens wordt er een longfoto gemaakt om te kijken of er sprake is van lymfekliervergroting tussen de longen en wordt er soms een echo van de buik gemaakt ter beoordeling van orgaanvergroting in de buik.

Beenmerg, bloed en liquor wordt op verschillende laboratoria geanalyseerd om het precieze type leukemie vast te stellen. Dit is van belang voor het vaststellen van de juiste behandeling. Er bestaan verschillende types ALL. In de eerste plaats wordt dit bepaald door het soort bloedcel waarin de leukemie ontstaat, de T-cel of de B-cel. Gesproken wordt dan van T-cel ALL of B-cel ALL. Binnen de B-cel ALL is het type leukemie afhankelijk van hoe onrijp of uitgerijpt de cel is waarin de leukemie ontstaan is. Meest onrijp is de zogeheten proB ALL, daarna komt de meest voorkomende common-ALL, daarna de preB ALL en uiteindelijk de rijpe B-cel ALL. Ook wordt chromosomenonderzoek van de leukemiecellen gedaan om het type leukemie vast te stellen.

Behandeling van ALL
Voor ieder kind met ALL is behandeling mogelijk. De behandeling bestaat uit chemotherapie met verschillende medicijnen gericht tegen de leukemiecellen. Welke medicijnen precies gebruikt worden, hoe lang en hoe zwaar de chemotherapie is, hangt af van het type leukemie. De medicijnen worden deels toegediend via een infuus maar ook voor een groot deel als tabletten, drank of capsules. De chemotherapie duurt in totaal meestal 2 jaar. In de eerste maanden is de therapie het meest intensief. Het grootste deel van de chemotherapie wordt echter thuis gegeven waarbij kinderen regelmatig op de polikliniek of dagbehandeling moeten komen. Soms is naast chemotherapie ook een beenmergtransplantatie nodig en zeer zelden bestraling. Bijna alle kinderen met ALL worden behandeld volgens een landelijk protocol van de SKION of volgens een internationaal protocol. Een protocol bevat richtlijnen voor onderzoek en de wijze van behandeling.

Kansen op genezing
De laatste 40 jaar is de genezingskans voor kinderen met ALL enorm toegenomen. In 1960 genas minder dan 5% van de kinderen, tegenwoordig geneest ongeveer 80% van alle kinderen met ALL. De precieze genezingskans voor ieder individueel kind is echter moeilijk aan te geven omdat deze afhangt van veel verschillende factoren. Factoren die invloed hebben op de kans op genezing zijn onder andere de volgende: de leeftijd, het geslacht, het aantal leukemiecellen bij diagnose, de eventuele uitbreiding van de leukemie naar het zenuwstelsel of de zaadballen, het type leukemie en het soort chromosoomafwijking in de leukemiecellen.

Zeer belangrijk is ook de eerste reactie van de leukemie op de chemotherapie. Dit wordt bijvoorbeeld bepaald door de afname van de hoeveelheid leukemiecellen te meten in bloed of beenmerg in de eerste weken van de behandeling. Ook kan dit gedaan worden door met nieuwe, hele gevoelige technieken de aanwezigheid van zeer kleine hoeveelheden leukemiecellen in het beenmerg te bepalen. Dit heet minimale restziekte, oftewel in het Engels Minimal Residual Disease (MRD).

Op basis van een combinatie van enkele van deze factoren wordt bepaald of een kind een relatief goede of minder goede kans op genezing heeft. Daar wordt dan weer de zwaarte van de behandeling op afgestemd. Zo bestaan er bijvoorbeeld aparte behandelprotocollen voor zuigelingen met ALL en ook voor kinderen met een bepaald soort chromosoomafwijking (het zogenaamde Philadelphia chromosoom) in de leukemiecellen.

Bijwerkingen
Chemotherapie is zeer effectief in het vernietigen van leukemiecellen, maar kan ook gepaard gaan met bijwerkingen. Omdat de behandeling van een kind met ALL afgestemd is op de genezingskans krijgt niet ieder kind dezelfde chemotherapie. De mogelijke bijwerkingen kunnen dus per kind ook verschillen. Voor meer informatie over de verschillende soorten medicijnen verwijzen we u naar de dagboekagenda van de vereniging ouders, kinderen en kanker (VOKK) die u bij het begin van de behandeling krijgt.

Bij de diagnose zijn er relatief veel leukemiecellen aanwezig. Door de chemotherapie zullen in de eerste dagen dus veel leukemiecellen afgebroken worden. De afvalstoffen hiervan worden door de nieren verwerkt. Om te voorkomen dat de nieren hierdoor beschadigd raken, wordt ondersteunende behandeling gegeven met bepaalde medicijnen en is het belangrijk dat een kind voldoende vocht binnenkrijgt, eventueel via een infuus.

Beenmerg- en ruggenprikken
Tijdens de behandeling en gedurende een aantal jaren na de beëindiging ervan wordt regelmatig beenmerg en hersenvocht voor onderzoek afgenomen. Na de eerste kuur zijn de leukemiecellen niet meer zichtbaar in het lichaam. Vervolgens wordt gecontroleerd of de leukemie cellen niet terugkeren in het beenmerg of het hersenvocht. Als de ziekte terugkomt (recidief ALL), dan zal op een andere, meestal zwaardere behandeling worden overgegaan.

INFORMATIE EN TOESTEMMING OUDERS ALL10 PROTOCOL

Informatie over de behandeling van kinderen met Acute Lymfatische Leukemie (ALL) volgens het SKION ALL 10 Protocol

Officiële titel: Protocol ALL 10, Protocol voor diagnostiek en behandeling van kinderen en adolescenten (1-19 jaar) met Acute Lymfatische Leukemie

Geachte ouders - verzorgers

Inleiding
Bij uw kind is de diagnose Acute Lymfatische Leukemie (ALL) vastgesteld. Leukemie is een vorm van bloedkanker. U heeft samen met uw kind met de behandelend arts een gesprek over de ziekte gehad en een folder met algemene informatie over de ziekte gekregen. De informatie die hier voor u ligt, licht de behandeling die uw kind gaat krijgen nader toe.

Behandeling en wetenschappelijk onderzoek
Kinderen met ALL worden behandeld volgens het SKION ALL 10 protocol. De SKION (Stichting Kinder Oncologie Nederland) heeft een centraal bureau waar gegevens over de ziekte en de behandeling van kinderen met kanker in Nederland worden verzameld en geregistreerd. Het ALL 10 protocol is een handboek voor de behandelend kinderarts met richtlijnen voor behandeling en onderzoek.

De behandeling van kinderen met leukemie volgens het ALL 10 protocol is gebaseerd op de uitkomst van de resultaten van eerdere behandelprotocollen in Nederland en andere landen. Wetenschappelijk onderzoek heeft ons daarbij onder andere geleerd dat de resultaten van de behandeling van leukemie afhankelijk zijn van bepaalde risicofactoren. Risicofactoren zijn factoren die invloed hebben op de uiteindelijke kans op genezing. Een aantal van deze factoren wordt genoemd in de algemene informatie over ALL. Kinderen met een hele hoge genezingskans hebben minder zware therapie nodig dan kinderen met een kleinere genezingskans. De belangrijkste factor om de genezingskans vast te stellen is hoe een kind reageert op de ingestelde chemotherapie. De reactie op chemotherapie wordt bepaald op verschillende manieren:

1. Hoe is de zogenaamde prednison respons? Hierbij wordt na 1 week behandeling met prednison vastgesteld hoeveel leukemiecellen er nog in het bloed aanwezig zijn.
2. Is er sprake van complete remissie na de eerste kuur? Hierbij wordt na de eerste vijf weken van behandeling met standaardmethodes bepaald of er nog leukemiecellen in het lichaam aantoonbaar zijn. Indien de leukemie niet meer aantoonbaar is heet dit complete remissie.
3. Met nieuwe technieken is vast te stellen of er nog zogenaamde minimale restziekte (minimal residual disease = MRD) aanwezig is die niet met het blote oog onder de microscoop zichtbaar is. De hoeveelheid MRD wordt gemeten aan het einde van kuur Ia (dag 33) en bij het begin van kuur M (dag 79).

Aan de hand van deze drie factoren is een indeling gemaakt in zogenaamde risicogroepen: de standaard risicogroep (SR), de medium risico groep (MR) en de hoog risico groep (HR). De behandeling wordt op die manier zo goed mogelijk afgestemd op de voor uw kind specifieke situatie. Heel soms is het zo dat in de leukemiecellen een bepaalde soort chromosoomafwijking zit die samen gaat met een hoog risico dat de leukemie terugkomt. (Zie ook de algemene informatie over leukemie.) In dat geval wordt de behandeling ook hierop aangepast. De totale duur van de behandeling (twee jaar) is voor alle risicogroepen gelijk, behalve in geval van beenmergtransplantatie bij patiënten in de HR groep.

Behandelschema SR groep
Kinderen waarbij sprake is van een hele goede reactie op de eerste therapie worden behandeld volgens het SR schema. Bij kinderen in de SR groep is de uiteindelijke genezingskans meer dan 95%. Het doel van de behandeling van kinderen met leukemie in de SR groep is een effectieve behandeling te geven waarbij de kans op bijwerkingen zo klein mogelijk wordt gehouden. Behandeling van kinderen met ALL in de SR groep bestaat uit verschillende onderdelen. Het eerste deel van de behandeling duurt ongeveer vijf maanden. Hierna volgt een onderhoudsbehandeling. Ten opzichte van vroeger (in protocol ALL 8) is de behandeling minder zwaar gemaakt door aan het einde van het eerste gedeelte van de behandeling minder medicijnen te geven. De behandelend arts zal aan de hand van een schema de behandeling met u en uw kind bespreken.

Behandelschema MR groep
Kinderen waarbij sprake is van een gemiddelde eerste reactie op therapie worden behandeld volgens het MR schema. Bij kinderen met ALL in de MR groep is de uiteindelijke genezingskans 70 à 80%. Het doel van de behandeling van kinderen met leukemie in de MR groep is een effectieve behandeling te geven die er toe leidt dat de genezingspercentages bij deze kinderen hoger worden. Ten opzichte van vroeger (in protocol ALL 8) is de behandeling in de eerste vier maanden precies hetzelfde. Daarna is, op basis van de goede resultaten van een Amerikaans behandelschema, het protocol ALL 10 MR wat zwaarder gemaakt in vergelijking met het vroegere protocol ALL 8. De behandelend arts zal aan de hand van een schema de behandeling met u en uw kind bespreken.

Behandelschema HR groep
Kinderen waarbij sprake is van een matige reactie op de eerste therapie of een ongunstige chromosoom afwijking in de leukemiecellen worden behandeld volgens het HR schema. Bij kinderen in de HR groep is de uiteindelijke genezingskans circa 30%. Het doel van de behandeling van kinderen met leukemie in de HR groep is door middel van intensieve chemotherapie behandeling, gevolgd door stamceltransplantatie de genezingspercentages in deze groep te laten stijgen. Na het eerste deel van de behandeling volgen 3 kuren met intensieve chemotherapie, waarna uw kind in aanmerking kan komen voor stamceltransplantatie waarmee de behandeling afgesloten wordt. Als er geen geschikte donor voor de stamceltransplantatie is gaat uw kind door met nogmaals 4 kuren intensieve chemotherapie. Kinderen boven de 3 jaar krijgen tevens schedelbestraling. De therapie wordt afgesloten met onderhoudsbehandeling.

Bijwerkingen
Alle kinderen met leukemie krijgen een behandeling met chemotherapie. Hierover heeft u ook al kunnen lezen in de algemene informatie over leukemie. Over de bijwerkingen van de verschillende soorten medicijnen die uw kind gedurende de hele behandeling krijgt ontvangt u apart informatie. Deze informatie kunt u lezen in de dagboekagenda die u aan het begin van de behandeling krijgt.

Evaluatie van de behandeling volgens het ALL10 Protocol
Met betrekking tot de behandeling volgens dit protocol wordt gekeken naar de volgende punten.

Verzamelen van gegevens
Alle gegevens over het verloop van de behandeling bij uw kind worden verzameld en gecodeerd opgeslagen in een database. Deze database bevat de gegevens van alle kinderoncologische- en beenmergtransplantatie centra in Nederland die meewerken aan dit onderzoek- en behandelprotocol. De resultaten zullen uiteindelijk wetenschappelijk beoordeeld worden. Er wordt daarbij gekeken naar effectiviteit (werkzaamheid) en verdraagbaarheid (bijwerkingen). Vanaf het begin van de behandeling zal de effectiviteit van de behandeling gecontroleerd worden aan de hand van de uitslagen van aanwezigheid van leukemiecellen in beenmerg, bloed en liquor (hersenvloeistof). De mogelijke bijwerkingen van de behandeling worden ook geregistreerd.

Opslag van bloed, beenmerg en liquor
Overgebleven bloed, beenmerg en liquor dat gedurende de hele behandeling is afgenomen wordt langdurig op het laboratorium bewaard, zo mogelijk kan er in de toekomst aanvullend wetenschappelijk onderzoek naar leukemie bij kinderen mee gebeuren.

Researchprojecten
Bij het behandelprotocol ALL 10 worden naast de behandeling ook enkele wetenschappelijke researchprojecten uitgevoerd. Deze researchprojecten zijn bedoeld om de toekomstige behandeling van kinderen met leukemie weer verder te verbeteren. Het betreft de volgende projecten.

Laboratoriumonderzoek met betrekking tot kinderleukemie
1. Onderzoek naar afwijkingen in het DNA en naar bepaalde biologische eigenschappen van leukemiecellen en naar eiwitten in het bloed en de hersenvloeistof. De kennis hiervan moet leiden tot betere diagnostiek van het soort leukemie, een betere vroegtijdige voorspelling van de genezingskans en ontwikkeling van nieuwe behandelingen speciaal gericht op de afwijkingen in de kankercellen. Er wordt gebruik gemaakt van restmateriaal bloed, beenmerg en liquor dat al afgenomen wordt voor andere bepalingen.

2. Onderzoek naar een eenvoudigere methode om MRD te bepalen. Doel is om na te gaan of de complexe techniek die nu gebruikt wordt om MRD te bepalen in de toekomst vervangen kan worden. Er wordt gebruik gemaakt van restmateriaal bloed en beenmerg dat al is afgenomen voor andere bepalingen.

3. Onderzoek naar DNA afwijkingen in de leukemiecellen bij diagnose en tijdens het begin van de behandeling. Hiervoor dient tijdens de reguliere beenmergafname 2-5 ml extra beenmerg op dag 15 en dag 33 te worden afgenomen. Bij diagnose wordt gebruik gemaakt van restmateriaal bloed of beenmerg dat al is afgenomen voor andere bepalingen.

4. Onderzoek naar oorzaken van resistentie voor prednison en dexamethason. Doel is om manieren te vinden om eventuele resistentie voor deze medicamenten te kunnen beïnvloeden. Er wordt gebruik gemaakt van restmateriaal bloed en beenmerg dat al is afgenomen voor andere bepalingen.

Onderzoek naar bijwerkingen
5. Onderzoek naar de vraag welke patiënten een verhoogde kans op infecties tijdens de chemotherapie hebben en of hier een bepaalde genetische aanleg voor bestaat. Voor dit onderzoek dient bij elke reguliere beenmergpunctie gedurende de hele leukemiebehandeling (8 keer in totaal) tevens 5 ml bloed te worden afgenomen. Dit kan gecombineerd worden met de bloedafname die altijd nodig is voor diagnostiek, in combinatie met de beenmergpunctie. In een aantal gevallen willen we in overleg graag met 5 wattenstaafjes wat wangslijmvlies van uw kind afnemen. Dit extra onderzoek is niet pijnlijk of belastend. Verder willen we u vragen gedurende de hele behandeling een dagboek met betrekking tot koorts en infecties bij te houden.

6. Onderzoek naar de vraag hoe vaak en in welke mate verschillende bijwerkingen van prednison en dexamethason optreden en of hier een bepaalde genetische aanleg voor bestaat. Voor dit onderzoek dient tijdens de reguliere bloedafname op dag 33 extra bloed (5 ml) te worden afgenomen.

Voor- en nadelen
Mogelijk voordeel van deelname aan researchprojecten is vooral de mogelijkheid om de kwaliteit van de behandeling van kinderen met leukemie in de toekomst te verbeteren. Voor het laboratoriumonderzoek is soms een klein beetje extra bloed of beenmerg nodig. Dit kan een nadeel zijn. Uw kind hoeft hier echter nooit extra voor geprikt te worden, deze afnamen gebeuren altijd tijdens de reguliere bloed- of beenmergafname.

Vrijwillige deelname en toestemming
Deelname aan onderzoek is geheel vrijwillig. Als u niet wilt dat uw kind aan één of meerdere van de hier beschreven researchprojecten gaat deelnemen, hoeft u daarvoor geen reden te geven.

Voordat we met de behandeling beginnen vragen we u een toestemmingsformulier te ondertekenen waarin staat dat u weet wat de behandeling en de researchprojecten inhouden.

Als u besluit dat uw kind niet meedoet aan de researchprojecten dan is dat niet van invloed op de behandeling die uw kind krijgt. De behandeling gaat wel volgens het ALL 10 protocol verder, want dat is de standaard behandeling van dit moment. U krijgt voldoende tijd om hierover na te denken en u kunt te allen tijde om extra informatie vragen of op eenmaal genomen beslissingen terugkomen.

Verantwoording en vertrouwelijkheid
Tot uw kind herleidbare onderzoeksgegevens kunnen slechts met uw toestemming door daartoe bevoegde personen worden ingezien. Deze personen zijn medewerkers van het onderzoeksteam, medewerkers van de SKION, medewerkers van de Inspectie voor de Gezondheidszorg of bevoegde inspecteurs van een buitenlandse overheid, en leden van de Medisch Ethische Toetsings Commissie (METC). Inzage kan nodig zijn om de betrouwbaarheid en kwaliteit van het onderzoek na te gaan. Onderzoeksgegevens zullen worden gehanteerd met inachtneming van de Wet Bescherming Persoonsgegevens en het privacyreglement van het Erasmus MC.

Persoonsgegevens die tijdens deze studie worden verzameld zullen worden vervangen door een codenummer. Alleen dat nummer zal gebruikt worden voor studiedocumentatie, in rapporten of publicaties over dit onderzoek. Slechts degene, die de sleutel van de code heeft (de onderzoeker of de behandelend arts) weet wie de persoon achter het codenummer is. De anonimiteit blijft hierbij gewaarborgd. De gegevens worden, indien u daar toestemming voor geeft, langdurig bewaard. Bloed en beenmerg dat in het kader van dit onderzoek is afgenomen wordt anoniem naar het laboratorium van de SKION opgestuurd en langdurig bewaard. De resultaten worden gerapporteerd in medisch-wetenschappelijke literatuur en/of op medische congressen.

Voor dit onderzoek is goedkeuring verkregen van de Raad van Bestuur na een positief oordeel van de Medisch Ethische Toetsing Commissie Erasmus MC Rotterdam. De voor dit onderzoek geldende internationale richtlijnen zullen nauwkeurig in acht worden genomen.

Contactpersonen
Bij vragen of opmerkingen kunt u contact opnemen met Prof. dr. R.Pieters, kinderarts-oncoloog of met de researchverpleegkundigen van de afdeling kinderoncologie, Inekee van der Vaart of Eline Visser, tel. 010-4636681.

Als u twijfelt over deelname van uw kind aan de researchvragen die horen bij dit protocol dan kunt u een onafhankelijke arts raadplegen die zelf niet bij het onderzoek is betrokken maar wel deskundig is op dit gebied: Prof. Dr. J.B. van Goudoever, kinderarts, tel. 010-4636363

Ook indien u voor of tijdens het onderzoek vragen heeft die u liever niet aan de onderzoekers stelt dan kunt u contact opnemen met de onafhankelijke arts.

Indien u niet tevreden bent over het onderzoek of de behandeling dan kunt u terecht bij de onafhankelijke klachtencommissie van het ziekenhuis. U kunt zich daartoe wenden tot:
de secretaris van de klachtencommissie
Postbus 2040
3000 CA Rotterdam
tel. 010-4635474

Met vriendelijke groet,
Prof. Dr. R. Pieters, hoofd afdeling kinderoncologie en voorzitter landelijk SKION commissie protocol ALL 10.

Protocol ALL 10, Protocol voor diagnostiek en behandeling van kinderen en adolescenten (1-19 jaar) met Acute Lymfatische Leukemie

Toestemmingsformulier ouders/voogd

Ik bevestig, dat ik het informatieformulier voor mijn kind heb gelezen. Ik begrijp de informatie. Ik heb de gelegenheid gehad om aanvullende vragen te stellen. Deze vragen zijn naar tevredenheid beantwoord. Ik heb voldoende tijd gehad om over deelname van mijn kind na te denken. Ik weet dat deelname geheel vrijwillig is en dat ik mijn toestemming op ieder moment kan intrekken zonder dat ik daarvoor een reden hoef te geven.

Behandeling en evaluatie protocol ALL 10
Ik geef wel/geen* toestemming voor deelname van mijn kind aan de behandeling volgens het ALL 10 protocol onder de omstandigheden zoals die mij zijn uitgelegd.

Ik geef wel/geen* toestemming voor het verzamelen van de gegevens over het verloop van de behandeling, zoals in deze informatie beschreven is. De gegevens zullen geanonimiseerd worden opgeslagen in een database. De resultaten van het onderzoek zullen voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt waarbij de anonimiteit gewaarborgd wordt.

Ik geef wel/geen* toestemming voor opslag van bloed, beenmerg en liquor

Researchprojecten
Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 1. Er wordt restmateriaal van bloed en beenmerg gebruikt.

Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 2. Er wordt restmateriaal van bloed en beenmerg gebruikt.

Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 3. Afname extra beenmerg (2-5 ml) op dag 15 en dag 33. Tevens het gebruik van restmateriaal van bloed en beenmerg bij diagnose.

Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 4. Er wordt restmateriaal van bloed en beenmerg gebruikt.

Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 5. Afname extra bloed (5ml) bij elke beenmergpunctie (totaal 8 keer). Vijf wattenstaafjes wangslijmvlies en het bijhouden van een dagboek.

Ik geef wel/geen* toestemming voor research project 6. Afname extra bloed (5ml) op dag 33.

Naam kind: Geboortedatum: __ / __ / __

Naam ouder/voogd**:
Handtekening: Datum : __ / __ / __

Naam ouder/voogd**:
Handtekening: Datum : __ / __ / __

Naam onderzoeker/behandelend arts:
Handtekening: Datum : __ / __ / __

* Doorhalen wat niet van toepassing is.** Dit formulier moet worden ondertekend door de ouders die het gezag uitoefenen of de voogd, wanneer het kind jonger dan 18 jaar is. Voor kinderen van 12 t/m 17 jaar, die wilsbekwaam zijn, moet tevens het formulier voor kinderen door het kind worden ondertekend.

INFORMATIE EN TOESTEMMING ALL10 PROTOCOL VOOR KINDEREN VANAF 12 JAAR

Informatie over de behandeling van kinderen met Acute Lymfatische Leukemie (ALL) volgens het SKION ALL 10 Protocol

Officiële titel: Protocol ALL 10, Protocol voor diagnostiek en behandeling van kinderen en adolescenten (1-19 jaar) met Acute Lymfatische Leukemie

Informatie voor kinderen vanaf 12 jaar

Inleiding
Kortgeleden is bij jou de diagnose Acute Lymfatische Leukemie (ALL) gesteld. Leukemie is een vorm van bloedkanker. Je hebt hier samen met je ouders met de behandelend arts een gesprek over gehad en je hebt een folder met algemene informatie gekregen waarin je meer over de ziekte kunt lezen. In de informatie die hier voor je ligt willen we je meer vertellen over de behandeling.

Behandeling en wetenschappelijk onderzoek
Kinderen met leukemie worden behandeld volgens het SKION ALL 10 protocol. De SKION (Stichting Kinder Oncologie Nederland) heeft een centraal bureau waar gegevens over de ziekte en de behandeling van kinderen met kanker in Nederland worden verzameld en geregistreerd. Het ALL 10 protocol is een handboek voor de behandelend kinderarts met richtlijnen voor behandeling en onderzoek.

Het ALL 10 protocol komt voort uit de resultaten van eerdere behandelprotocollen in Nederland en andere landen. We hebben daarvan geleerd dat de resultaten van de behandeling van leukemie afhankelijk zijn van bepaalde risicofactoren. Risicofactoren zijn factoren die invloed hebben op de uiteindelijke kans op genezing. Zo hebben kinderen met een hele hoge genezingskans een minder zware behandeling nodig dan kinderen met een kleinere genezingskans. Over een aantal van deze factoren kun je lezen in de algemene informatie over ALL.

Aan de hand van de risicofactoren is de behandeling volgens het ALL10 protocol verdeeld in drie risicogroepen: de standaard risicogroep (SR), de medium risico groep (MR) en de hoog risico groep (HR). De behandeling wordt op die manier zo goed mogelijk afgestemd op jouw persoonlijke situatie. De behandeling duurt voor alle kinderen in de drie risicogroepen even lang, namelijk twee jaar. Bij kinderen in de HR groep die ook een beenmergtransplantatie krijgen is dat echter anders. De behandelend arts zal je daar alles over vertellen.

Behandelschema SR groep
Kinderen waarbij sprake is van een hele goede reactie op de eerste therapie worden behandeld volgens het SR schema. Bij kinderen in de SR groep is de uiteindelijke genezingskans meer dan 95%. Het doel van de behandeling van kinderen met leukemie in de SR groep is een zo goed mogelijke behandeling te geven met zo min mogelijk bijwerkingen. Behandeling van kinderen met leukemie in de SR groep bestaat uit verschillende onderdelen. Het eerste deel van de behandeling duurt ongeveer vijf maanden. Daarna volgt een onderhoudsbehandeling. Ten opzichte van vroeger (in protocol ALL 8) is de behandeling minder zwaar gemaakt door aan het einde van het eerste gedeelte van de behandeling minder medicijnen te geven. De behandelend arts zal dit aan de hand van een schema met jou en je ouders bespreken.

Behandelschema MR groep
Kinderen waarbij sprake is van een gemiddelde reactie op de eerste therapie worden behandeld volgens het MR schema. Bij kinderen met leukemie in de MR groep is de uiteindelijke genezingskans 70 à 80%. Het doel van de behandeling van kinderen met leukemie in de MR groep is dat de behandeling zodanig is dat de genezingskans bij deze groep kinderen hoger wordt. Ten opzichte van vroeger (in protocol ALL 8) is de behandeling in de eerste vier maanden precies hetzelfde. Daarna is het protocol ALL 10 MR wat zwaarder gemaakt in vergelijking met het vroegere protocol ALL 8. De behandelend arts zal dit aan de hand van een schema met jou en je ouders bespreken.

Behandelschema HR groep
Kinderen waarbij sprake is van een matige reactie op de eerste therapie of een ongunstige chromosoom afwijking in de leukemiecellen worden behandeld volgens het HR schema. Bij kinderen in de HR groep is de uiteindelijke genezingskans circa 30%. Het doel van de behandeling van kinderen met leukemie in de HR groep is door middel van intensieve chemotherapie behandeling,

gevolgd door stamceltransplantatie de genezingskans in deze groep te vergroten. Na het eerste deel van de behandeling volgen 3 kuren met intensieve chemotherapie. Daarna kan je in aanmerking komen voor stamceltransplantatie waarmee de behandeling wordt afgesloten. Als er geen geschikte donor is voor de stamceltransplantatie ga je door met nogmaals 4 kuren intensieve chemotherapie. Kinderen die ouder zijn dan 3 jaar krijgen bovendien schedelbestraling. De therapie wordt afgesloten met onderhoudsbehandeling. De behandelend arts zal dit aan de hand van een schema met jou en je ouders bespreken.

Bijwerkingen
Alle kinderen met leukemie krijgen een behandeling met chemotherapie. Meer hierover kan je lezen in de algemene informatie over ALL. Over de bijwerkingen van de verschillende soorten medicijnen die je krijgt kun je lezen in de dagboekagenda. Deze krijg je aan het begin van de behandeling.

De resultaten van de behandeling
Om meer te weten over de behandeling van kinderen met leukemie willen we de resultaten van de behandeling volgens het ALL10 protocol zo goed mogelijk bijhouden. Het is daarom nodig om gegevens over de behandeling te verzamelen en laboratoriumonderzoek te doen.

Verzamelen van gegevens
Alle gegevens over het verloop van de behandeling bij jou worden verzameld en gecodeerd opgeslagen in een database. In deze database zitten de gegevens van alle kinderen die behandeld worden volgens het ALL10 protocol. Deze gegevens worden wetenschappelijk beoordeeld. We kijken daarbij naar effectiviteit (werkzaamheid) en bijwerkingen. Vanaf het begin van de behandeling zal de effectiviteit van de behandeling gecontroleerd worden aan de hand van de uitslagen van aanwezigheid van leukemiecellen in beenmerg, bloed en liquor (hersenvloeistof). De mogelijke bijwerkingen (van de behandeling worden ook geregistreerd.

Opslag van bloed, beenmerg en liquor
Overgebleven bloed, beenmerg en liquor dat gedurende de hele behandeling is afgenomen wordt langdurig op het laboratorium bewaard, zo mogelijk kan er in de toekomst aanvullend wetenschappelijk onderzoek naar leukemie bij kinderen mee gebeuren.

Researchprojecten
Bij het behandelprotocol ALL 10 worden naast de behandeling ook enkele wetenschappelijke researchprojecten uitgevoerd. Deze researchprojecten zijn bedoeld om de toekomstige behandeling van kinderen met leukemie verder te verbeteren. Het gaat om de volgende projecten.

Laboratoriumonderzoek met betrekking tot kinderleukemie
1. Onderzoek naar afwijkingen in het DNA, naar bepaalde biologische eigenschappen van leukemiecellen en naar eiwitten in het bloed en de hersenvloeistof. Meer kennis hierover geeft ons mogelijkheden tot betere diagnostiek van het soort leukemie, een betere vroegtijdige voorspelling van de genezingskans en ontwikkeling van nieuwe behandelingen speciaal gericht op de afwijkingen in de kankercellen. We gebruiken daarvoor restmateriaal bloed, beenmerg en liquor dat al afgenomen is voor andere bepalingen.

2. Onderzoek naar een eenvoudigere methode om te bepalen of er nog minimale restziekte (MRD) tijdens de behandeling is. Het gaat hierbij om cellen die je niet met het blote oog onder de microscoop kunt zien. We willen na gaan of de ingewikkelde techniek die nu gebruikt wordt om MRD te bepalen in de toekomst vervangen kan worden. We gebruiken daarvoor restmateriaal bloed en beenmerg dat al is afgenomen voor andere bepalingen.

3. Onderzoek naar DNA afwijkingen in de leukemiecellen bij diagnose en tijdens het begin van de behandeling. Hiervoor willen we, als er toch al beenmerg wordt afgenomen, 2-5 ml extra beenmerg op dag 15 en dag 33 te worden afgenomen. Bij diagnose wordt gebruik gemaakt van restmateriaal bloed of beenmerg dat al is afgenomen voor andere bepalingen.

4. Onderzoek naar oorzaken van ongevoeligheid (resistentie) voor de medicijnen prednison en dexamethason. We willen hiermee manieren vinden om eventuele resistentie voor deze medicamenten te kunnen beïnvloeden. We gebruiken daarvoor restmateriaal bloed en beenmerg dat al is afgenomen voor andere bepalingen.

Onderzoek naar bijwerkingen
5. Onderzoek naar de vraag welke kinderen een verhoogde kans op infecties tijdens de chemotherapie hebben en of hier een bepaalde aanleg voor bestaat. Voor dit onderzoek willen we bij elke beenmergpunctie (8 keer in totaal) ook 5 ml bloed extra afnemen. Deze bloedafname combineren we met de bloedafname die altijd nodig is voor diagnostiek, in combinatie met de beenmergpunctie. In een aantal gevallen willen we in overleg graag met 5 wattenstaafjes wat wangslijmvlies afnemen. Dit extra onderzoek is niet pijnlijk of belastend. Verder willen we je vragen om tijdens de hele behandeling een dagboek met betrekking tot koorts en infecties bij te houden.

6. Onderzoek naar de vraag hoe vaak en in welke mate verschillende bijwerkingen van de medicijnen prednison en dexamethason optreden en of hier een bepaalde aanleg voor bestaat. Voor dit onderzoek willen we tijdens de bloedafname op dag 33 extra bloed (5 ml) afnemen.

Voor- en nadelen
Mogelijk voordeel van deelname aan researchprojecten is vooral de mogelijkheid om de kwaliteit van de behandeling van kinderen met leukemie in de toekomst te verbeteren. Voor het laboratoriumonderzoek is soms een klein beetje extra bloed of beenmerg nodig. Dit kan een nadeel zijn. Je hoeft hier echter nooit extra voor geprikt te worden, deze afnamen gebeuren altijd tijdens de bloed- of beenmergafnamen die ter controle nodig zijn .

Vrijwillige deelname en toestemming
Deelname aan onderzoek is vrijwillig. Als je niet aan onderzoek wilt deelnemen dan hoef je daar geen reden voor te geven.
Als je ouder bent dan 12 jaar moeten jij en je ouders - verzorgers samen beslissen of je toestemming geeft voor de behandeling en de researchprojecten. Zowel jij als je ouders - verzorgers moeten een handtekening zetten onder het toestemmingsformulier. In dit formulier staat dat je weet wat de behandeling en de researchprojecten inhouden en wat de mogelijke voor- en nadelen zijn. Wanneer je niet dezelfde mening hebt als je ouders - verzorgers kun je dit bespreken met je behandelend arts.

Als je besluit om niet mee te doen aan de researchprojecten dan is dat niet van invloed op de behandeling die je krijgt. De behandeling gaat wel volgens het ALL 10 protocol verder, want dat is de standaard behandeling van dit moment. Je krijgt voldoende tijd om hierover na te denken en je kunt altijd om extra informatie vragen of op eenmaal genomen beslissingen terugkomen.

Verantwoording en vertrouwelijkheid
De onderzoeksgegevens die we verzamelen kunnen alleen met jouw toestemming door bevoegde personen worden ingezien. Deze personen zijn medewerkers van het onderzoeksteam, medewerkers van de SKION, medewerkers van de Inspectie voor de Gezondheidszorg of bevoegde inspecteurs van een buitenlandse overheid, en leden van de Medisch Ethische Toetsings Commissie (METC). Inzage kan nodig zijn om de betrouwbaarheid en kwaliteit van het onderzoek na te gaan. Onderzoeksgegevens zullen worden gehanteerd met inachtneming van de Wet Bescherming Persoonsgegevens en het privacyreglement van het Erasmus MC.

Persoonsgegevens die worden verzameld, vervangen we door een codenummer. Alleen dat nummer zal gebruikt worden voor studiedocumentatie, in rapporten of publicaties over dit onderzoek. Slechts degene die de sleutel van de code heeft (de onderzoeker of de behandelend arts) weet wie de persoon achter het codenummer is. De anonimiteit blijft hierbij gewaarborgd. De gegevens worden langdurig bewaard. Bloed en beenmerg dat in het kader van dit onderzoek is afgenomen wordt anoniem naar het laboratorium van de SKION opgestuurd en langdurig bewaard. De resultaten komen terug in medisch-wetenschappelijke literatuur en/of op medische congressen.

Voor dit onderzoek is goedkeuring verkregen van de Raad van Bestuur na een positief oordeel van de Medisch Ethische Toetsing Commissie Erasmus MC Rotterdam. De voor dit onderzoek geldende internationale richtlijnen zullen nauwkeurig in acht worden genomen.

Contactpersonen
Bij vragen of opmerkingen kan je contact opnemen met Prof. dr. R.Pieters, kinderarts-oncoloog of met de researchverpleegkundigen van de afdeling kinderoncologie, Inekee van der Vaart of Eline Visser, tel. 010-4636681.

Als je twijfelt over deelname aan de researchvragen die horen bij dit protocol dan kan je een onafhankelijke arts raadplegen die zelf niet bij het onderzoek is betrokken maar wel deskundig is op dit gebied: Prof. Dr. J.B. van Goudoever, kinderarts, tel. 010-4636363

Ook kan je als je voor of tijdens het onderzoek vragen hebt die je liever niet aan de onderzoekers stelt contact opnemen met de onafhankelijke arts.

Als je niet tevreden bent over het onderzoek of de behandeling dan kan je terecht bij de onafhankelijke klachtencommissie van het ziekenhuis:
de secretaris van de klachtencommissie
Postbus 2040
3000 CA Rotterdam
tel. 010-4635474

Met vriendelijke groet,
Prof. Dr. R. Pieters, hoofd afdeling kinderoncologie en voorzitter landelijk SKION commissie protocol ALL 10.

Protocol ALL 10, Protocol voor diagnostiek en behandeling van kinderen en adolescenten (1-19 jaar) met Acute Lymfatische Leukemie

Toestemmingsformulier kinderen vanaf 12 jaar

Ik bevestig, dat ik het informatieformulier heb gelezen. Ik begrijp de informatie. Ik heb de gelegenheid gehad om aanvullende vragen te stellen. Deze vragen zijn naar tevredenheid beantwoord. Ik heb voldoende tijd gehad om hierover na te denken. Ik weet dat deelname geheel vrijwillig is en dat ik mijn toestemming op ieder moment kan intrekken zonder dat ik daarvoor een reden hoef te geven.

Behandeling en evaluatie protocol ALL 10
Ik geef wel/geen* toestemming voor de behandeling volgens het ALL 10 protocol onder de omstandigheden zoals die mij zijn uitgelegd.

Ik geef wel/geen* toestemming voor het verzamelen van de gegevens over het verloop van de behandeling, zoals in deze informatie beschreven is. De gegevens worden anoniem opgeslagen in een database. De resultaten van het onderzoek zullen voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt waarbij de anonimiteit gewaarborgd wordt.

Ik geef wel/geen* toestemming voor opslag van bloed, beenmerg en liquor

Researchprojecten
Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 1. Er wordt restmateriaal van bloed en beenmerg gebruikt.

Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 2. Er wordt restmateriaal van bloed en beenmerg gebruikt.

Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 3. Afname extra beenmerg (2-5 ml) op dag 15 en dag 33. Tevens het gebruik van restmateriaal van bloed en beenmerg bij diagnose.

Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 4. Er wordt restmateriaal van bloed en beenmerg gebruikt.

Ik geef wel/geen* toestemming voor researchproject 5. Afname extra bloed (5ml) bij elke beenmergpunctie (totaal 8 keer). Vijf wattenstaafjes wangslijmvlies en het bijhouden van een dagboek.

Ik geef wel/geen* toestemming voor research project 6. Afname extra bloed (5ml) op dag 33.

Naam kind: Geboortedatum: __ / __ / __

Handtekening: Datum : __ / __ / __

Naam onderzoeker/behandelend arts:
Handtekening: Datum : __ / __ / __

* Doorhalen wat niet van toepassing is.

17. BIJLAGE: RESEARCH PROJECTEN

Titel	Projectleiders	Document ID
Clinical relevance of genomic, proteomic and signalling profiling in childhood ALL: identification of new therapeutic targets and diagnostic markers associated with leukemogenesis and outcome.	Prof. dr. R. Pieters Prof. dr. J.J.M. van Dongen	CI-04/0500; OC-2004-0007
Flow cytometric MRD analysis in childhood ALL treated according to the DCOG-ALL10 protocol	Dr. V.H.J. van der Velden Dr. E.R. van Wering Prof. dr. J.J.M. van Dongen	CI-04/0085; OC-2004-0006
Detection of chromosomal aberrations in childhood acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at residual disease by array-based comparative genomic hybridization (arrayCGH).	Prof. dr. P.M. Hoogerbrugge Prof. dr. A. Geurts van Kessel Dr. B. van der Reijden	CI-04/0084B; OC-2004-0004
Interactions between NFκB- and Glucocorticoid Receptor signaling pathways as molecular control mechanisms of Glucocorticoid Resistance in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at initial diagnosis (and at relapse)	Dr. G.J.L. Kaspers Dr. G. Jansen Dr. J. Cloos	CI-04/0092; OC-2004-0009
The relationship of humoral and innate immunity with infections in children with acute lymphoblastic leukaemia	Dr. M.B. Bierings	CI-04/0484; OC-2004/0001
Genetische polymorfismen in relatie tot bijwerkingen van de therapie en tot *in vivo* en *in vitro* gevoeligheid voor prednison bij kinderen met ALL.	Drs. W.J.E. Tissing Dr. M.M. van den Heuvel-Eibrink	CI-04/0405; OC-2004-0002

17.1 Research study: Clinical relevance of genomic, proteomic and signalling profiling in childhood ALL: identification of new therapeutic targets and diagnostic markers associated with leukemogenesis and outcome: CI-04/0500;OC-2004-0007

Name applicant:	Prof. Dr. R. Pieters Prof. Dr. J.J.M. van Dongen	
In collaboration with:	Department of Pediatric Oncology: Dr. M.L. den Boer Dr. J.P.P. Meijerink Dr. M. van den Heuvel-Eibrink Dr. R. Menezes Department of Immunology: Dr. F.J.T. Staal Dr. A.W. Langerak Dr. V.H.J. Van der Velden Tumorcytogenetic Laboratory, Department of Clinical Genetics Dr. H.B. Beverloo Department of Bio-informatics Prof. Dr. P.J. van de Spek Biomics facility and department of Neurology Dr Th. Luider Department of Informatics, TU Delft: Dr. M.J.T. Reinders	
Position:	Head of Division of Pediatric Oncology/ Hematology (RP) Head of Division of Molecular Immunology (JJMvD)	
Institute	Erasmus MC-Sophia Department of Pediatrics Dr. Molewaterplein 60 NL-3015 GJ, Rotterdam The Netherlands 010-4636691 rob.pieters@erasmusmc.nl	Erasmus MC Department of Immunology Dr. Molewaterplein 50 NL-3015 GE, Rotterdam The Netherlands 010-4088094 j.j.m.vandongen@erasmusmc.nl

Date 31 January 2004

1. Introduction

Current treatment protocols with combination chemotherapy are effective in about 75% of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). However, 25% of these children do not achieve initial complete remission or suffer from a relapse. Over the last decades, distinct cytogenetic and immunophenotypic subtypes of ALL have been identified with prognostic significance. Specific chromosomal translocations, e.g. TEL-AML1 translocation, and hyperdiploidy, are associated with favourable treatment outcome whereas other genetic abnormalities like BCR-ABL translocation and *MLL*-rearrangements are associated with poor therapy response and outcome. Despite the presence of prognostic cytogenetic abnormalities, the outcome within each genetic subtype is still very diverse, indicating that other, yet to be identified genetic factors may be important determinants for treatment outcome.

For acute lymphoblastic leukemia, it is self evident that various steps in the normal differentiation of hematopoietic stem cells to mature T and B-lymphocytes are affected. Thus, signalling pathways that control normal differentiation, such as preBCR and PreTCR signalling, Notch and Wnt signalling and preTCR signalling may be targets of leukemogenetic processes. The major aim of B and T cell development is the controlled production of cells with the appropriate BCR and TCR, capable of recognizing over 10^{12} different specificities. Knowledge of the normal differentiation processes and the normal gene rearrangement processes that generate the TCR and BCR molecules, has been successfully applied to the diagnosis and classification of ALL and to the evaluation of therapy

effectiveness in minimal residual disease (MRD) studies (Van Dongen *et al.*, 1998; Van der Velden *et al.,* 2001; Willemse *et al.,* 2002).

Over the last couple of years, several new genome-wide screening techniques have been developed like array-comparative genomic hybridization for identifying genetic deletions and amplifications at the DNA level (Cai *et al*., 2002; Snijders *et al*., 2001), the micro-array technique for identifying aberrant gene expression (mRNA) profiles (Golub *et al*., 1999) and proteomics for identifying aberrantly expressed proteins (Verma *et al*., 2001 Griffin *et al*., 2001; Smolka *et al*., 2002).

DNA level:
Although many chromosomal translocations were found in distinct pediatric ALL subgroups by conventional karyotyping, the introduction of cytogenetic genome-wide screenings techniques like spectral karyotyping (SKY; Mathew *et al*., 2001; Nordgren *et al*., 2001) and Comparative Genomic Hybridization (CGH; Haas *et al*., 1998; Paszek-Vigier *et al*., 1997, Karhu *et al*., 1997) revealed a number of additional chromosomal aberrations in otherwise normal samples by conventional karyotyping. The recent applicability of the Array-CGH technique (Pinkel *et al*., 1998) with a 10 to 20 fold higher resolution (about 1Mb) than conventional CGH (10-20 Mb) may further lead to the identification of prognostically important chromosomal regions. To this aim, a study has started last year in the Pediatric laboratory in which chromosomal translocations, deletion and amplification areas that are associated with leukemogenesis and clinical outcome in pediatric ALL are studied by Array-CGH (in combination with SKY).

The recent 100K GeneChip HuSNP array covers about 100.000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) scattered over the entire genome. This new SNP chip may lead to the discovery of SNPs that are associated with the development of leukemia and therapy response. Moreover, this SNP-array may be used for the detection of micro-deletions and –amplifications that are smaller than the abnormalities detected with array-CGH. The use of the SNP-array for detection of micro-deletions and amplifications is currently under investigation in our department in collaboration with Prof. Dr. P.J. van de Spek of the Department of Bio-informatics. These studies may shed light which abnormalities at the DNA level are responsible for differences at the RNA and protein level and might be involved in leukemogenesis in childhood ALL.

As a third approach to identify (novel) chromosomal aberrations, split-signal FISH can be applied (Van der Burg *et al*., 1999, 2002; Van Zutven *et al*. 2004, submitted). In addition to its applicability for well-known aberrations in precursor-B-ALL (e.g. *MLL* aberrations, *BCR-ABL, TEL-AML1*, and *TAL1* aberrations), split-signal FISH using probes for the TCR loci (Gesk *et al*., 2003) can especially be useful for identifying (novel) TCR related aberrations in T-ALL. In contrast to precursor-B-ALL that mostly show translocations resulting in fusion genes, T-ALL are renowned for harbouring chromosome aberrations resulting in deregulated gene expression through juxtaposition to TCR elements. In the Immunology laboratory, recently a new type of TCR aberration has been found via TCR split-signal FISH (Przybylski, Dik *et al*., 2004, in preparation).

RNA level:
Gene expression profiling by micro arrays was shown to be useful for classification of pediatric leukemias (Armstrong *et al*, 2002; Yeoh *et al*., 2002; Ross *et al*., 2003; Den Boer *et al*., in preparation). Classification of ALL into the known genetic subclasses is reproducible using previously selected genes identified by the Yeoh and Ross studies although for the *BCR-ABL* subclass refinements seem to be necessary because samples with only *BCR* or *ABL* abnormalities can be misclassified as *BCR-ABL* rearranged cases (den Boer, abstract AACR 2003 and manuscript in preparation). Moreover, using new generation Affymetrix micro arrays substantially improved the accuracy in classification of 190 leukemic patients and resulted into new genes which have not previously been associated with known genetic subtypes (den Boer, manuscript in preparation). Very small retrospective studies suggest prognostic relevance of gene expression profiles for instance in T-ALL (Yeoh *et al*., 2002; Ferrando *et al*, 2002) but it is uncertain whether these prognostic gene signatures are therapy dependent or reproducible. Den Boer *et al.* show that a specific gene expression signature is of high prognostic value in T-ALL (Figure 1); this study is ongoing for the various precursor-B ALL subtypes (manuscript in preparation). Additionally, novel classification schemes for T-ALL can be based on gene expression profiling in relation to well-established key molecules and TCR gene rearrangement patterns during normal T cell development in the thymus as shown in the laboratory of Immunology (Langerak *et al.*, 2001; Asnafi *et al.*, 2003; Dik *et al.*, manuscript in preparation).

Also, recent studies by the Pediatric laboratory in collaboration with the St. Jude Children's Research Hospital identified gene expression profiles associated with cellular resistance to prednisolone, vincristine, L-asparaginase and daunorubicin at initial diagnosis of children with ALL. Moreover, these expression profiles were significantly related to long-term clinical outcome of patients treated according to the Rotterdam-DCOG ALL9 and German COALL92/97 protocols (Figure 2a). Of high interest is that this expression profile of resistance genes was equally discriminative to predict prognosis of patients that were treated with a different treatment protocol in the St. Jude Children's Research Hospital (Figure 2b; Holleman *et al*., 2004). The prognostic relevance was independent from age, sex, WBC or genetic abnormalities (such as Ph+, MLL). The most important issue is whether the currently defined gene expression signatures that are associated with therapy resistance and/or therapy response are valid and reproducible in a prospective study like the new ALL-10 protocol.

Similarly, markers of disease progression that were identified in the first study that compared paired diagnosis and relapse samples of the same ALL patients by microarray (Staal *et al*., 2003) need to be expanded to include many more patients and determine gene expression profiles associated with poor prognosis or progression towards adverse effects.

Protein level:
In addition to "DNA techniques" and gene expression (mRNA) analysis by micro-array, protein expression profiling is an important and valuable tool to screen for abnormal expression of proteins or tumor-related proteins in cellular lysates, cerebrospinal fluid (CSF) and serum of leukemic patients. 2D electrophoresis ans mass spectrometry have already proven to be successful in identifying unique protein expression profiles and aberrantly expressed proteins in various disease enteties (Petricoin *et al.,* 2002; Won *et al., 2003;* Wulfkuhle *et al*., 2001). Protein expression patterns of serum of ovarian cancer patients were found to be very specific, resulting in a highly sensitive and specific identification of cancer and non-cancer patients and a separation of different disease stages (Petricoin *et al.*, 2002; Sorace *et al.*, 2003). Moreover, recent data from the Pediatric laboratory show the presence of specific tumor related proteins (e.g. N-myc and Caldesmon) in the CSF of adults with brain tumors which are absent in normal controls (Zheng *et al*., 2003, Dekker *et al*., 2004 AACR;). Since mRNA is not necessarily linearly translated into protein, protein levels will perhaps better reflect the real activity of specific genes within cell populations. The activity of proteins is frequently regulated by post-translational modification like glycosylation, phosphorylation, methylation, ubiquitination, etc, and these activity moieties can be detected by current protein profiling techniques (Verma *et al*., 2001; Griffin *et al*., 2001, Smolka *et al*., 2002).

Cellular signalling pathways:
In all forms of cancer, aberrant signal transduction in terms of deregulated activation of key signalling molecules is a major step in tumorogenesis. In lymphocytes, a plethora of signalling pathways have been described but only a limited number of these pathways are truly relevant for normal lymphoid differentiation and therefore are likely candidates to be affected in ALL. These include signalling via the immature and mature antigen receptors (BCR, TCR) which leads to activation of protein tyrosine kinases and signalling via the evolutionary conserved Wnt pathway (Staal and Clevers, 2003). These signalling pathways can be studied at the protein level using appropriate antibodies (e.g. directed against activated states of the native protein) in combination with other markers using six-color flow cytometry or by classical Western blotting on flow-sorted purified lymphoid subpopulations and ALL cells (Perez and Nolan, 2003).

2. Aim of the study

Identification of novel genetic factors and mRNA/protein expression profiles may result into a better understanding of leukemogenesis and may be used for new molecular classifications that can be applied to accurately stratify patients into different treatment groups already at diagnosis. These profiling studies may also identify new therapeutic targets which may lead to specific new therapies for specific groups of patients instead of simply intensifying or reducing therapies for different risk groups.
The aim of this prospective study is to identify genomic abnormalities (DNA level), aberrant gene expression (mRNA level), aberrant protein expression profiles, and aberrant signalling profiles in childhood ALL in relation to:

- Outcome and therapy resistance (window response, induction failures, relapse, 2nd malignancies, death)
- Minimal residual disease
- Known cytogenetic and molecular-genetic markers (such as karyotype, *TEL-AML*, *BCR-ABL*, *MLL*-rearrangements and ploidy status)
- Immunophenotypic and immunogenotypic (BCR/TCR genes) subclassification

- Normal lymphoid differentiation, i.e. comparison with normal precursor-B-cell and thymocyte subsets (immunophenotype, gene expression profiles, signalling pathways, Ig and TCR gene rearrangement patterns).

3. Relevance of study for pediatric ALL

This prospective study is aimed to detect new genes and genomic and/or proteomic profiles that can be used for understanding of leukemogenesis as well as for classification and outcome-prediction at the time of primary diagnosis in children with ALL (A) and to improve our knowledge of leukemogenesis (B).

A. Gene expression profiles that are linked with classification and/or prognosis in the ALL-10 study might be used for profile-dependent stratification in future treatment protocols after ALL-10. This way, patients can be stratified almost directly following diagnosis of ALL into different risk categories receiving intensified or reduced treatment regimens. Profile-based patient stratification at diagnosis may be used in combination with MRD-dependent stratification during therapy. In addition, extensive genomic screening (array-CGH, SNP analysis, FISH) and mRNA/protein profiling may identify new prognostic factors and possible drugable targets that may be used for therapeutic intervention for specific risk groups in future studies.

B. Insight in normal differentiation and function of thymocytes and precursor-B-cells is essential for a better understanding of the origin and features of childhood leukemias and the process of leukemogenesis. Despite clear differences, leukemic cells share many immunophenotypic and immunogenotypic features with the normal counterparts they are derived from. Malignant transformation of lymphoid cells might be mediated by aberrant gene rearrangements leading to gene (in)activation, inappropriate apoptosis leading to proliferation, and aberrant signalling leading to activation. Understanding of the regulation of molecular steps during lymphoid differentiation, as well as Ig/TCR recombination, selection, and Ig/TCR related signalling processes, supports understanding of the leukemic transformation process and helps to better evaluate the relevance of determinants associated with outcome.

4. Preliminary results (some results have already been described in section 1; see page 1-4)

Prognostic value of gene expression profiling: see section 1.

Genomic profiling at DNA level and expression profiling studies at mRNA and protein levels may reveal new targets for future therapy. Collaborative studies of the Pediatric laboratory and the laboratory of DFCI in Boston showed for example by micro-array analysis that *MLL*-rearranged infant ALL express high mRNA levels of the tyrosine kinase *FLT-3* gene (Armstrong *et al*., 2002, Stam *et al.,* 2004 in preparation). These cells were shown to be highly sensitive to anti-*FLT-3* treatment by the inhibitor PKC412 *in-vitro* as well as in a xenograft mouse model (Armstrong *et al.*, 2003a; Stam *et al*., 2003 (abstract) and manuscript in preparation). PKC412 may have broader therapeutic applicability given the fact that about 25 percent of hyperdiploid ALL have elevated *FLT-3* levels due to the presence of activating mutations in the *FLT-3* kinase domain (Armstrong *et al.*, 2003b). The profiling studies by Den Boer and co-workers also revealed other new potential therapeutic targets in pediatric ALL. ALL cells resistant to *L*-asparaginase demonstrated increased expression of genes encoding for ribosomal proteins. The translation of these genes is being controlled by mTOR/FRAP, indicating that ALL patients may benefit from mTOR inhibitory therapy (Holleman *et al*., 2004). Resistance to glucocorticoids was strongly associated with expression of genes involved in carbohydrate metabolism. Interference with this metabolism is a possible new therapeutic strategy (Holleman *et al*., 2004). These data showed that, from the 153 genes associated with cellular drug resistance, 150 had never been associated with drug resistance before (Lugthart et al, 2003; Holleman, *et al*., 2004) . Staal et al. (2003) earlier showed that markers differentially expressed between diagnosis and relapse of the same patient are comprised of transcription factors and signalling molecules, but not markers associated with classical cellular resistance genes such as MDR or GSTs.

Another example is that Stam et al. (2004, in preparation) discovered that the tumor suppressor gene *FHIT* is not expressed in *MLL* rearranged cases in contrast to other types of ALL and that this underexpression is caused by methylation of the promoter of this gene in 100% of *MLL* patient samples. These examples make clear that new molecules associated with resistance, outcome or leukemogenesis can be discovered by profiling methods and may lead to new targets and concepts of treatment.

Cloning of translocation breakpoints over the last decades have led to the identification of many different oncogenes and tumor-suppressor genes. For some of these oncogenes, a continuous role for maintenance of the malignancy has been described, indicating that active suppression of these oncogenes or reactivation of inactivated of tumor-suppressor genes may provide new therapeutic approaches leading to tumor-reduction and apoptosis (e.g. XIAP and bcl-2 antisense therapy, phase

I/II studies). In precursor-B-ALL translocations mainly lead to the formation of novel chimeric proteins, whereas in T-ALL deregulated expression of normally tightly regulated proteins (e.g. transcription factors) occurs as a consequence of TCR juxtaposition in chromosome aberrations. Moreover, these genes are not solely responsible but need to collaborate with other, frequently unknown, genetic factors in leukemogenesis. These secondary genetic hits or their signalling pathways may again be valuable drug targets. Using novel genome-wide screening techniques (array-CGH and SNP-array), new genetic (DNA) abnormalities may be discovered that are leukemia subtype-specific (both currently known subtypes and newly defined subtypes) and/or correlated with leukemogenesis and clinical outcome. In addition, genome-wide identification of genetic abnormalities will help us to clarify the nature behind aberrant expression differences at RNA and/or protein level.
Protein profiling of complex protein mixtures in serum, cerebral spinal fluid (CSF) or cellular lysates by mass-spectrometry will lead to the identification of classification markers, new prognostic factors for therapy-stratification as well as potential targets for drug delivery. In recent pilot studies using SELDI protein chip technology (Ciphergen), we observed remarkable differences between CSF protein profiles from children with medulloblastomas and healthy controls as well as between serum protein profiles from children with different subtypes of AML (de Bont, 2004). Figure 3 shows some examples of serum protein expression profiles of pediatric AML patients with t(8;21)-translocation, monosomy 7 or with a normal karyotype. The cytogenetic subgroups could be characterised by specific protein profiles in which certain proteins were present in monosomy 7 patients whereas these proteins were absent in t(8;21) or normal patients and vice versa (see Figure 3). Interestingly, the protein expression profile of a monosomy 7 patients who developed a secondary t(8;21) positive AML, showed a combined protein expression profile of both monosomy 7 and t(8;21) proteins when serum taken at initial diagnosis was analyzed. Identification of the nature and function of the aberrantly expressed proteins is in progress. This technique is currently also being applied on serum, CSF and cellular lysates from ALL patients in order to find new markers for classification and stratification as well as to find new potential targets for drug delivery in pediatric ALL.

Recent advances in flowcytometry allow to combine intracellular staining for protein kinases, phosphatases and signalling molecules with cell surface markers. The Immunology laboratory has used these techniques to study Wnt signalling in the thymus (Weerkamp *et al.*, manuscript in preparation) using an antibody that recognizes the active form of β-catenin (Staal *et al.*, 2002), the key molecule in the canonical Wnt pathway. Similarly, key components of BCR and TCR signaling are studied in detail (e.g. Btk, SLP-65, ZAP70, lck, fyn). Identification of aberrant signaling pathways may not only be used for further classification of ALL, but will also improve our understanding of leukemogenesis and the role of the involved signaling molecules in normal lymphoid development (Jumaa *et al.*, 2003; Goodman *et al.*, 2001; Goodman *et al.*, 2003; Kersseboom *et al.*, 2003).

Profiling strategies combining the data obtained by genome-wide screening using array-CGH, SNP-array, FISH, mRNA microarrays and proteomics may lead to the identification of novel abnormalities that are associated with (new) types of leukemia and therapy response in pediatric ALL.

5. Short description of study-methods

1. DNA level

1a. Genomic profiling by Array-CGH and single-nucleotide polymorphism (SNP)-array (Dr. J.P.P. Meijerink, Dr. H.B. Beverloo)

The Array-CGH technique is a recently developed technique comparing the differences between two genomic DNA samples, allowing identification of amplifications and deletions (Snijders *et al*., 2001; Cai *et al*., 2002). This technique is being used in close collaboration with Dr. A. de Klein and B. Eussen (Dept. of Clinical Genetics) who are implementing this technique for use in postnatal diagnostics. Dr. Meijerink and Dr. Beverloo will perform the array-CGH in leukemia patient samples. Labeled DNA samples are hybridized in an one to one ratio onto a DNA-chip that contains 3,500 precisely mapped human BAC-clones roughly covering the entire human genome with 1 Mb intervals (BAC stands for Bacterial Artificial Chromosomes that contains a human DNA insert of about 30Kb-500Kb). A major advantage of this new and innovative way of molecular cytogenetics is the high resolution (1 Mb), and the requirement of only minimal amount of patient sample DNA.
The human SNP array of Affymetrix (GeneChip HuSNP) will be used for genome-wide detection of SNPs that may be linked with leukemia-subtype and clinical outcome of patients. To this aim, DNA will be hybridized on these arrays and data will be collected and analyzed using bio-informatic tools. In addtion to SNP analysis, the SNP array may also be used for detection of micro deletions and/or amplifications that are smaller than those detected with array-CGH. The additional value of SNP arrays for this purpose is currently being investigated in close collaboration with Prof. Dr. P. van der Spek of the Department of Bio-informatics.
Information from array-CGH and SNP arrays will be combined to identify new genetic abnormalties that are linked with subtype and clinical outcome in pediatric ALL.

1b. Genomic profiling by split-signal FISH (Dr. A.W. Langerak.)

TCR split-signal FISH is an approach that very recently has been developed (Gesk *et al*., 2003) and that has proven to be useful for easy identification of TCR related aberrations (Gesk *et al*., 2003; Przybylski, Dik *et al*., 2004, in preparation). Using fixed nuclear suspensions, interphase FISH will be applied to detect TCR aberrations, after which the involved partner gene will be cloned using ligation-mediated PCR methods.

2. mRNA level

Gene expression profiling by Affymetrix micro-arrays (Dr. M.L. den Boer, Dr. F. Staal)

For gene expression profiling of ALL-10 study patients, well-characterized oligonucleotide microarrays of Affymetrix will be used (Affymetrix U133 Plus 2.0 array containing more than 54.000 probesets representing more than 38.500 genes). During recent years we obtained much experience with the practical use of Affymetrix arrays as well as insight into statistical/bio-informatical analysis of complex data (Armstrong *et al*., 2002, 2003a; Staal *et al*., 2003, 2004; Holleman *et al*., 2004; Den Boer manuscript in preparation; Dik et al., manuscript in preparation). In short, ALL cells will be purified from normal contaminating cells using MACS or cell sorting. Subsequently, total cellular RNA will be extracted from patient samples. RNA integrity will be checked with Agilent's Bio-analyzer. cDNA will be synthesized by reverse transcription using oligo-dT primers. Next, biotinylated cRNA will be synthesized from cDNA and, after fragmentation, hybridized to Affymetrix microarrays. Hybridized cRNA fragments will be visualized by binding of phyco-erythrin labeled streptavidin, and quantified by a special spectrophotometrical scanner. Data-acquisition will be performed using Microarray Suite software and data-analysis will be performed using bio-informatic tools such as successfully used in the past and present studies. Fruitful collaborations exist with the Bioinformatics departments of St Jude Children's Research Hospital, Dana Farber Cancer Institute/MIT, Erasmus MC and TU Delft. Genes found discriminative for classification and therapy responses will be confirmed using real-time quantitative RT-PCR (TaqMan technology).

3. Protein level

Protein profiling by 2D electrophoresis and mass-spectrometry (Dr. M.L. den Boer, Dr. M. van den Heuvel, Dr. Th. Luider)

2D-gel protein profiles using fluorescent dyes (2D Dige system, Amersham Bioscience) will be made of serum and cerebrospinal fluid (CSF). The aberrantly expressed proteins of interest will be characterized by mass-spectrometriy using tryptic digests of 2D-gel-excised proteins. In addition to well-established 2D-gel based profiling, we will use so-called Protein Chips in combination with surface-extended laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS). The choice of Protein Chips leads to the selection of proteins that can bind to specific chip-surfaces (cationic, anionic, metal binding) and consumes considerably less material than *whole kDa-range* 2D gel analysis. The Protein Chips will be used to determine the apparent molecular weight of proteins that are differentially expressed among patients. Subsequent high-resolution separation of proteins by 2D-gel electrophoresis or tandem mass spectrometry in a more *restricted kDa-range* of molecular weights will lead to the identification of these proteins. In our hands Protein Chip technology for CSF and serum using Q10 (cationic binding) and IMAC30 (metal binding) chips have provided the best discrimination and sensitivity in subgroups of leukemia and brain tumor patients. In addition to this new technology, recent developments in mass spectrometry allow for direct characterization of complex protein mixtures without the need for pre-separation by 2D gel-electrophoresis. These new techniques (nano-HPLC separation and online analyses in a Fourier transform-ion cyclotron resonance MS) have become available in our institute but need optimization for our study purposes. If applicable, these new technologies will be used for the extensive analysis of proteins in serum and CSF of ALL-10 patients. Proteins analysis of 2D-gel electrophoresis, Protein Chip analysis and mass-spectrometry are part of ongoing research projects at the Pediatric Oncology Research Laboratory, Sophia Children's Hospital and the Neuro-oncology Laboratory of the Josephine Nefkens Institute, Erasmus Medical Center, Rotterdam. Genes of interest, found in our genomic and proteomic profiling screens, will be further investigated by routine protein techniques including Western blotting.

4. Signalomics

Evaluation of normal and dysregulated cellular signalling pathways (Dr. FJ.T. Staal and Dr. V.H.J. van der Velden)

Six-color flow cytometry has recently been introduced in the Immunology laboratory. Such novel FACS applications are required for the studies proposed above on "signalomics". Antibodies against (active forms of) several protein kinases (e.g. Btk, ZAP70, SLP65, SLP76, lck, fyn, Ras) and signalling molecules (e.g. β-catenin) are available to be used in flow cytometry. In addition, large numbers of ALL samples can be screened by Western blotting using phospho tyrosine specific antibodies and anti-ABC as read outs. Ample experience with such techniques and how to preserve the signalling state of cells is available. The obtained data will be related with immunophenotype and immunogenotype of the ALL samples as well as with characteristics of normal precursor-B-cells and thymocytes.

6. Rationale for requested patient material

1. DNA level:

a. For genomic profiling studies:

50 µg of total DNA from leukemic cells (>90% purity) and 50 µg of total DNA from red blood cell fraction (left-over after lymphoprep isolation) to compare leukemia-related genomic abnormalities togermline-related abnormalities by Array-CGH and SNP-array. 50 ug DNA is obtained out of 10 15x10e6 cells (>90% purity) using TRIZOL reagents. TRIZOL extraction is favored since RNA can be isolated prior to DNA extraction out of the same cell pellet. The RBC pellet left-over after lymphoprep isolation always yields >>50 ug DNA. If present, any RBC pellet of BM or PB sample taken in complete remission of the patient is more favorable than the RBC pellet taken at initial diagnosis since a small fraction (<10%) of malignant cells may still be present in the diagnostic RBC pellet.

b. For split-signal FISH:

Methanol/acetic acid (3:1) fixed nuclear suspensions from 5-10 $x10^6$ from T-ALL patients only (for the TCR loci). 5x106 cells is absolute minimum for preparing nuclear suspensions for slides for FISH analysis of TCR loci and necessary confirmation with partner gene probes

2. RNA level:

For gene expression analysis by micro arrays and validation by real-time quantitative PCR:

15 µg of total RNA isolated from leukemic cells (>90% purity). 15 ug of high quality RNA is obtained out of 20x10e6 (>90% purity) cells using TRIZOL reagents. After RNA extraction, the same samples are used for DNA extraction, so only 20x10e6 cells are needed for both DNA (ad 1) and RNA studies. Cells resuspended in TRIZOL reagents can be stored for 2-3 months (-80C) and therefore, batches of patient's samples can be send to the Rotterdam laboratory for isolation of DNA and RNA using

TRIZOL reagents. Preferrably, two cytospin preparations of the purified mononuclear fraction should be sent together with each sample to identify the type of contaminating cells (monocytes, T-lymphocytes, immature myeloid cells, etc.) for mRNA studies.

3. Protein level

* Serum obtained from peripheral blood (2 ml). Do not use heparin as this complicates protein analysis by mass spectrometry. It is better to use citric acid or EDTA
* 1 ml of supernatant of CSF centrifuged at 1200 RPM/5min at room temperature (use of polypropylene tubes is recommended for protein analysis) without addition of (protein containing) medium
    * Leukemic cells for proteomic analysis of cell lysates and cellular drug resistance will be obtained from patients treated in Erasmus MC-Sophia only; so no cells are needed from the DCOG bank)]

4. Cellular signalling pathways:

* $10x10^6$ cells for Western blotting
* $10x10^6$ cells for studies using advanced flow cytometry (cells for flow cytometry will be obtained in a collaborative study only from Rotterdam patients; so no cells are needed from the DCOG bank)]

Om nieuwe antistoffen te evalueren zijn per labeling circa 1 miljoen cellen nodig, zodat ook de expressie op kleine subsets (myeloide en lymfoide voorlopercellen, stamcellen) kan worden bepaald. Voor onderzoek naar mogelijke defecten in signaleringsroutes door middel van flowcytometrie zullen antistoffen gericht tegen signaaltransductiemoleculen worden gebruikt in combinatie met verschillende antistoffen om de leukemiecellen (en normale cellen) optimaal te karakteriseren. Per labeling zijn bij voorkeur 1 miljoen cellen nodig, zodat analyse in subpopulaties mogelijk is. Circa 5-8 signaleringsmoleculen zullen worden onderzocht. Omdat dit intracellulaire moileculen betreft zijn daarnaast nog een aantal controles nodig, zodat het totaal aantal benodigd cellen 10 miljoen bedraagt.

To answer the questions from this research project different analyses have to be made including a multivariate analysis. These analyses need to include data on clinical parameters and outcome of patients; these data are requested form the DCOG.

TOTAAL benodigd hoeveelheid patiëntenmateriaal:

1. DNA level:
    a. DNA afkomstig uit zelfde samples als uit RNA dus geen extra samples. Wel de afgedraaide ery's die anders weggegooid na een follow up BM voor MRD kunnen gebruikt worden voor "normaal" DNA van de patiënt. (Meijerink, Beverloo)
    b. 5 miljoen cellen van de T-ALL patiënten (Langerak)

2. RNA level:
    a. 20 miljoen cellen cellen (>90% purity) of 30 miljoen om te kunnen opzuiveren tot>90% purity. In dit laatste geval ook twee cytospins meesturen om aard van contaminerende cellen vast te stellen. (den Boer, Staal)
    (tevens gebruikt voor DNA, punt 1a)

3. Protein level (den Boer, vd Heuvel):
    a. 2ml derum, geen cellen
    b. 1ml liquor

4. Cellular signalling (Staal, Langerak):
    a. 10 miljoen cellen

Toelichting benodigde aantallen samples

1. DNA level:

1a. For genomic profiling studies:

The aim of the genomic (DNA) profiling studies is to identify new genetic abnormalities that are linked with (existing or novel) subtypes and clinical outcome in pediatric ALL. Since the incidence and nature of these new genetic abnormalities is unknown, no exact number estimates can be calculated. However, since the genomic profiling data will be linked to the mRNA (gene expression) and protein

profiling data, the same patients can be included in both the DNA, RNA and proteomics profiling studies. DNA and RNA can be obtained from the same cells. For proteomics no cells are required. Another submitted add-on project by the Nijmegen group (Hoogerbrugge et al) also proposes genomic DNA profiling by array-CGH. Results might be combined.

1b. DNA level, split-signal FISH:
Since it concerns analysis of (partly novel and unknown) TCR aberrations, in principle every new T-ALL in the next coming years in ALL-10 is relevant and desired;however at least those T-ALL from which no karyotypic data are present AND those harbouring 7p13-14, 7q34-35, 14q11 aberrations.

ad 2 Gene expression profiling
Het doel van de studie is om de klassificatie en outcome voorspelling van ALL mbv reeds eerder gedefineerde gen expressie profielen in een prospectieve studie te bepalen. Voor deze studie is derhalve een representatieve groep patienten nodig met de volgende verdeling:
T-ALL 15%
precursor B-ALL 85% waarvan:

TEL-AML	27%
Hyperdiploiden	27%
BCRABL	4%
MLL-rearranged	4%
E2A-PBX1	7%
Overigen prec B	31%

Uit een retrospectieve studie van Den Boer et al. is gebleken dat met gen expressie profielen (o.b.v. profielen zoals door Yeoh et al eerder zijn gepubliceerd), alle patienten met T-ALL, TEL/AML1, hyperdiplodie, MLL herschikking, E2A-PBX1 of BCR-ABL rearrangement correct geklassificeerd kunnen worden (sensitiviteit=100%). Daarnaast worden ook een aantal patienten zonder een TEL/AML, hyperdiploidie, MLL-rearrangement, E2A-PBX1 of BCR-ABL rearrangement in deze subgroepen geidentificeerd (specificiteit =90%). Klassificatie van BCR-ABL en MLL-rearranged blijkt het minst specifiek te zijn, dwz alle positieve patienten worden correct gedetecteerd (100% sensitiviteit) maar daarnaast worden ook een aantal patienten met andere afwijkingen, zoals extra kopie BCR of ABL en deletie MLL, als BCR-ABL en MLL-rearranged geklassificeerd (specificiteit 30% en 67% voor BCR-ABL en MLL-groep respectievelijk). Dit zou suggereren dat als men uitgaat van genexpressieprofielen voor classificerende diagnostiek bij ALL, voor deze patienten aanvullend bv een bevestigende FISH gedaan zou moeten worden.
Inmiddels zijn m.b.v. de nieuwste generatie Affymetrix chips (U133A chip) nieuwe gen expressie profielen vastgesteld voor de klassificatie in ALL (Den Boer et al., manuscript in voorbereiding). De gebruikte statistiek is dezelfde als die wij gebruikten voor de prognostische waarde van drug-resistentie geassocieerde gen-expressieprofielen (Holleman, den Boer et al, New Engl J Med 2004, in press). In het kort; voor de selectie van klassificatie-genen zijn genen geselecteerd o.b.v. significantie en lage false-discovery rate (m.b.v. permutatie-analyses). Daarnaast is de klassificerende waarde van deze gen expressie profielen m.b.v. 2/3 training en 1/3 test groepen ge-analyseerd (zgn. accuracy testing). De nauwkeurigheid blijkt dan hetzelfde als voor de studie van Yeoh et al., dwz sensitiviteit 100% en specificiteit 90%.
De voorgestelde ALL-10 add-on studie heeft de volgende doelen: 1) de waarde van klassificatie mbv gen expressieprofielen in een niet-geselecteerde, prospectieve groep te bepalen t.o.v. de huidige diagnostische bepalingen zoals immunofenotypering en (moleculaire) genotypering, 2) de klinische/praktische haalbaarheid om gen expressie profielen te bepalen als diagnose-techniek bij initiele ALL en 3) de prognostische waarde van de gen expressieprofielen met prognostisch belang in onze retrospectieve studie (Den Boer et al., manuscript in voorbereiding) in een prospectieve studie vast te stellen.
Voor het toetsen van de klinische haalbaarheid van het gebruik van gen expressieprofielen voor klassificatie van leukemieen moet er sprake zijn van een representatieve verdeling van de verschillende typen ALL en dient de kleinste subgroep tenminste 10 patienten te bevatten. Dit betekent dat er 296 patienten met evalueerbare gen expressie profielen geincludeerd moeten worden leidend tot 10 patienten in de minst voorkomende groepen (BCRABL en MLL-rearranged) en een representatieve verdeling van de andere typen: 44 T-ALL, 68 TELAML, 68 hyperdiploiden, 18 E2A-PBX1 en 78 normaal/overigen precursor B-ALL. Dezelfde patienten zullen gebruikt worden om de gen expressie profielen die geassocieerd zijn met recidief-voorspelling in een onafhankelijke groep te bevestigen. Aangezien met Trizol tegelijkertijd DNA en RNA wordt geisoleerd, kunnen dezelfde patienten gebruikt worden voor de genomic DNA studies genoemd onder 1.

Ad 3. Protein level
Omdat voor de proteomic studies geen cellen nodig zijn en er geen competitief andere add-on studie is ingediend voor serum en liquor, wordt verzocht om van dezelfde patienten waar RNA en DNA voor beschikbaar gesteld kan worden eveneens serum en liquor beschikbaar te stellen om een goede vergelijking te kunnen maken tussen DNA, RNA en eiwit niveau.

4. cellular signalling pathways:
Voor de 'signalomics' is een statistische onderbouwing niet eenvoudig, maar 80-100 patienten zullen nodig zijn om een goede analyse te kunnen maken en om data te kunnen correleren aan immunofenotype / immunogenotype.

To answer the questions from this research project different analyses have to be made including a multivariate analysis. These analyses need to include data on clinical parameters and outcome of patients; these data are requested form the DCOG.

7. References

Armstrong, S.A., et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile, distinguishing a unique leukemia. **Nature Genetics** 2002; 30: p. 41-47.

Armstrong, S.A., et al. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. **Cancer Cell** 2003a;3: p. 173-83.

Armstrong, S.A., et al. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 2003b Dec 11 [Epub ahead of print].

Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, Comba B, Le Tutour P, Estienne MH, Davi F, Landman-Parker J, Quartier P, Buzyn A, Delabesse E, Valensi F, Macintyre E. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. **Blood** 2003;101:2693-2703.

Boer den, M.L. et al. Gene expression profiling in pediatric acute lymphoblastic leukemia; subtype classification using Affymetrix U133A oligonucleotide microarrays. Abstract Annual Meeting **American Association for Cancer Research**, 2003 and manuscript in preparation.

Boer den, M.L. et al. Prognostic value of gene expression profiles associated with cellular drug resistance in children with acute lymphoblastic leukemia. Abstract Annual Meeting **American Association for Cancer Research**, 2004 and manuscript in preparation.

Bont de, J., et al. Unique protein expression profiles in cytogenetic subtypes of pediatric acute myeloid leukemia (AML) Abstract 4th biennial Hannover symposium on childhood leukemia.

Cai, W.W., et al. Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. **Nat Biotechnol** 2002;20(4): p. 393-396.

Ferrando, A.A., et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell** 2002;1: p. 75-87.

Gesk S, Martin-Subero JI, Harder L, Luhmann B, Schlegelberger B, Calasanz MJ, Grote W, Siebert R. Molecular cytogenetic detection of chromosomal breakpoints in T-cell receptor gene loci. **Leukemia** 2003;17:738-745.

Golub, T.R., et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. **Science** 1999;286: p. 531-537.

Goodman PA, Wood CM, Vassilev AO, Mao C, Uckun FM. Defective expression of Bruton's tyrosine kinase in acute lymphoblastic leukemia. **Lymphoma.** 2003; 44: 1011-1018.

Goodman PA, Wood CM, Vassilev A, Mao C, Uckun FM. Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. **Oncogene.** 2001; 20): 3969-3978.

Griffin. T.J., et al . Advances in proteome analysis by mass spectrometry. **Curr Opin Biotechnol** 2001;12(6): p. 607-12.

Haas, O., et al. Comparative genomic hybridization as part of a new diagnostic strategy in childhood hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** 1998;12(4): p. 474-81. Harris, H. Putting on the brakes. **Nature** 2004; 427:201

Harris, H. Putting on the brakes. **Nature** 2004; 427:201

Holleman, A., et al. Gene-expression patterns in drugresistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. **NEJM** 2004, 351; 533-542.

Jumaa H, Bossaller L, Portugal K, Storch B, Lotz M, Flemming A, Schrappe M, Postila V, Riikonen P, Pelkonen J, Niemeyer CM, Reth M. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Nature.** 2003; 423: 452-456.

Karhu, R., et al., Genetic aberrations in pediatric acute lymphoblastic leukemia by comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet**, 1997. 95(2): p. 123-9.

Kersseboom R, Middendorp S, Dingjan GM, Dahlenborg K, Reth M, Jumaa H, Hendriks RW. Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. **J Exp Med.** 2003; 198: 91-98.

Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, van Gastel-Mol EJ, Oud ME, van Dongen JJM. Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. **Blood** 2001;98:2456-2465.

Lugthart, S., et al. Identification of new genes associated with multiple drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 2003;102:p. 137a.

Mathew, S., et al. Multicolor spectral karyotyping identifies novel translocations in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** 2001;15(3): p. 468-72.

Nordgren, A., et al. Interphase fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping reveals hidden genetic aberrations in children with acute lymphoblastic leukaemia and a normal banded karyotype. **Br J Haematol** 2001;114(4): p. 786-93.

Paszek-Vigier, M., et al. Comparative genomic hybridization is a powerful tool, complementary to cytogenetics, to identify chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol** 1997:99(3): p. 589-96.

Perez OD, Nolan GP. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. **Nat Biotechnol.** 2002;20:155-162.

Petricoin, E.F., et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarium cancer. **The Lancet** 2002;359:572-577.

Pinkel, D., et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. **Nat Genet** 1998;20(2): p. 207-11

Ross, M.E., et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. **Blood** 2003;10: p. 2951-2959.

Smolka, M., et al. Profiling Using Two-dimensional Gel Electrophoresis, Isotope-coded Affinity Tag Labeling, and Mass Spectrometry. **Mol Cell Proteomics** 2002;1(1): p. 19-29

Staal FJ, Noort Mv M, Strous GJ, Clevers HC. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. **EMBO Rep.** 2002; 3: 63-68.

Staal, FJT, van der Burg M, Wessels LF, Barendregt BH, Baert MR, van den Burg CM, van Huffel C, Langerak AW, van der Velden VH, Reinders MJ, van Dongen JJM. DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. **Leukemia**. 2003,17:1324-1332.

Staal FJ, Weerkamp F, Baert MR, van den Burg CM, van Noort M, de Haas EF, van Dongen JJ. Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion**. J Immunol.** 2004;172:1099-1108.

Stam, R.W., et al. Differential mRNA expression of Ara-C metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL gene rearranged infant Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). **Blood** 2003;101:p. 1270-1276.

Stam, R.W., et al. Targeting FLT3 in MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Blood** 2003;102:p. 224a.

Stams, W.A., et al. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. **Blood** 2003;101:p. 2743-2747.

Van der Burg M, Beverloo HB, Langerak AW, Wijsman J, van Drunen E, Slater R, van Dongen JJM. Rapid and sensitive detection of all types of MLL gene translocations with a single FISH probe set. **Leukemia** 1999;13:2107-2013.

Van der Burg M, Smit B, Brinkhof B, Barendregt BH, Verschuren MC, Dib M, Beverloo HB, van Dongen JJ, Langerak AW. A single split-signal FISH probe set allows detection of TAL1 translocations as well as SIL-TAL1 fusion genes in a single test. **Leukemia** 2002;16:755-761

Van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, Hoogerbrugge PM. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia**. Leukemia**. 2001;15: 1485-1487

Van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, Van Wering ER, Ludwig W-D, Basso G, De Bruijn MAC, Cazzaniga G, Hettinger K, Van der Does-van den Berg A, Hop WCJ, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. **Lancet** 1998;352:1731-1738.

Verma M, et al., Proteomic approaches within the NCI early detection research network for the discovery and identification of cancer biomarkers. **Ann N Y Acad Sci**. 2001;945: p. 103-15.

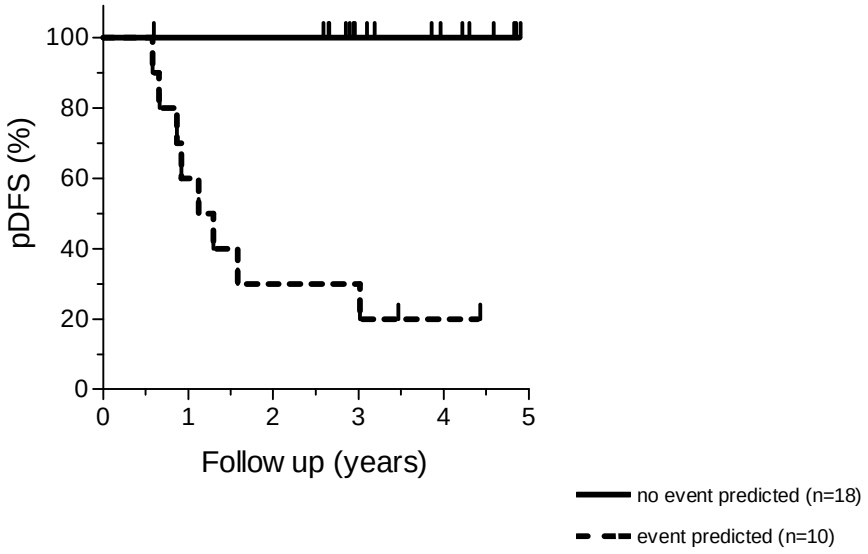
Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Schrappe M,Kamps WA, Masera G, Gadner H, Riehm H, Bartram CR, Van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. **Blood** 2002;99:4386-4393.

Won, Y., et al. Pattern analysis of serum proteome distinguishes renal cell carcinoma from other urologic diseases and healthy persons. **Proteomics** 2003;3:p. 2310-2316.

Wulfkuhle, J.D., et al. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. **Proteomics** 2001;1:p.1205-1215.

Zheng, P., et al. Identification of tumor-related proteins by proteomic analysis of cerebral fluid from patients with primary brain tumors. **J Neuropathol Exp Neurol** 2003;62:p. 855-8627.

Figure 1: Prognostic relevance of gene expression profiling in T-ALL (den Boer et al 2004, in preparation). Disease free survival of patients is 100% for T-ALL patients with a favourable gene expression profile at initial diagnosis vs 20% for those with an unfavourable profile.



Follow up

Figure 2: Kaplan-Meier analysis of treatment outcome among patients with gene expression patterns associated with cellular resistance or sensitivity to the four antileukemic agents (PVAD). (Holleman et al, 2004, submitted)

a. Disease-free survival (DFS) of patients treated on Dutch and COALL protocols. Patients are sub-grouped based on combined gene expression scores of 172 gene probe sets for anti-leukemic agents (prednisolone, vincristine, L-asparaginase and daunorubicin). The 33 persent with the highest score (Sensitive), intermediate score (Intermediate) and lowest score (Resistant) are shown.

b. DFS of patients treated on St. Jude Children's Reseach Hospital protocols. Patients were assigned tot the Sensitive, Intermediate or Resistant categories using the combined gene expression score (172 gene probe sets for four drugs) used to categorize the Dutch and German patients in panel a.

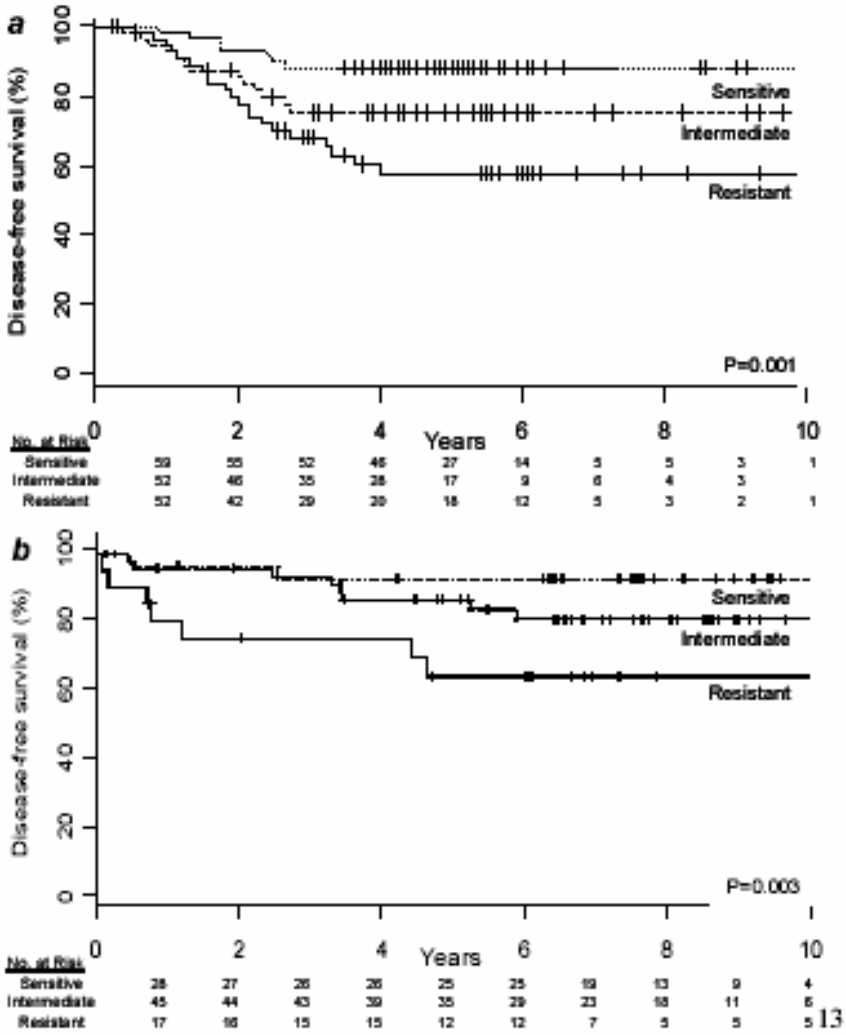
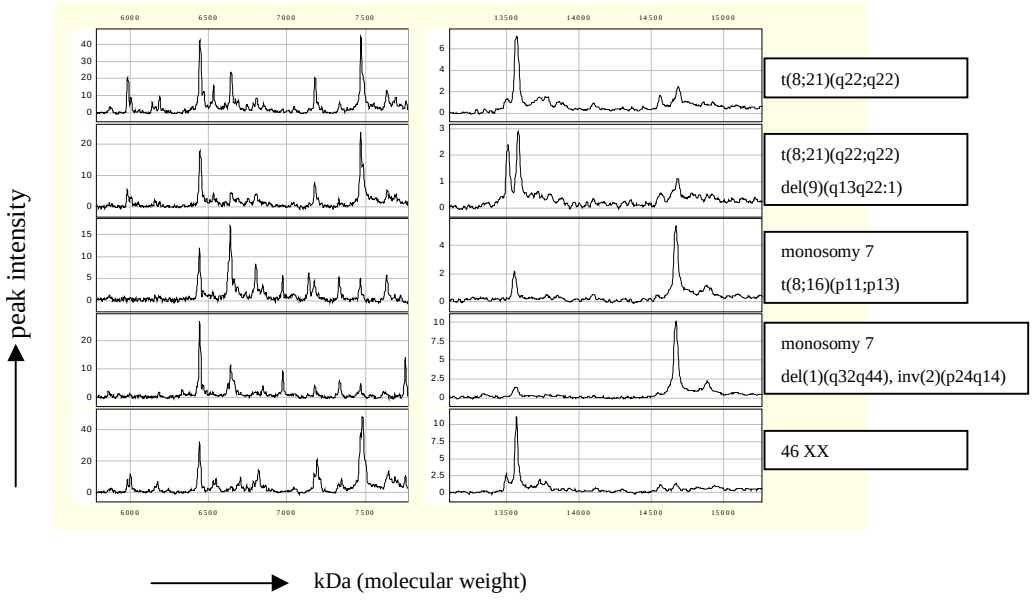


Figure 3: Protein expression profiles obtained by SELDI-tof mass spectrometrical analysis of IMAC30 Protein Chipsof 5 pediatric AML serum samples. Protein expression profiles are clearly different between 2 AML patients with t(8;21), 2 patients with monosomy 7 and one patient with a normal karyotype (de Bont, 2004, abstract).



17.2 Research study: Flow cytometric MRD analysis in childhood ALL treated according to the DCOG-ALL10 protocol: CI-04/0085;OC-2004-0006

Naam aanvragers : **1. dr. Vincent H.J. van der Velden**
2. dr. Elisabeth R. van Wering
3. prof. dr. Jacques J.M. van Dongen

Functies : 1. Werkgroepleider "Acute leukemie en MRD", Immunologie, Erasmus MC
2. Hoofd laboratorium SKION, Den Haag
3. Unithoofd "Moleculaire Immunologie", Immunologie, Erasmus MC

Instituten : Afdeling Immunologie, Erasmus MC
SKION

Datum : 30 januari 2004

Titel onderzoek : **Flow cytometric MRD analysis in childhood ALL treated according to the DCOG-ALL10 protocol**

1. Introduction

Several studies have shown that detection of minimal residual disease (MRD) in childhood and adult ALL is clinically relevant. [1-8] Detection of MRD can be used to evaluate the early treatment response, and thereby allows the identification of low-risk and high-risk patients who may profit from therapy reduction or therapy intensification, respectively. [1-4, 9] Furthermore, detection of MRD just prior to stem cell transplantation has been shown to be an important prognostic factor. [5, 6, 10, 11] Therefore, MRD is currently being incorporated into stratification of treatment protocols. [12-14]

Three main techniques are used for detection of MRD in childhood ALL: 1. PCR analysis of fusion gene transcripts associated with chromosomal abnormalities; 2. PCR analysis of immunoglobulin (Ig) and/or T cell receptor (TCR) gene rearrangements as a DNA fingerprint of the leukemic cell; and 3. flow cytometric immunophenotyping, using aberrantly expressed protein molecules as markers for the leukemic cell. [7] The first method can only be applied in about 30% of childhood ALL patients and therefore is not suitable for general ALL treatment protocols which include MRD-based risk group stratification. [7] Ig/TCR gene rearrangements can be identified in over 95% of childhood ALL patients [9, 15] and generally reach sensitivities of at least 10^{-4} (i.e. one leukemic cell within 10,000 normal cells), [16-20] which is required for recognition of low-risk patients. [3, 21] The applicability of this approach was proven in the DCOG-ALL8 protocol [3] and also appears to be successful in the DCOG-ALL9 protocol (unpublished results). Therefore, analysis of MRD via PCR analysis of Ig/TCR gene rearrangements has been included as a diagnostic tool in the DCOG-ALL10 protocol and will be used for the stratification of patients. However, PCR analysis of Ig/TCR gene rearrangements is time and labor consuming and is also expensive. MRD analysis by flow cytometric immunophenotyping is much faster and cheaper, but the applicability of this method so far has been hampered by the fact that sensitivities of at least 10^{-4} are not consistently reached. Nevertheless, the potency of flow cytometric MRD analysis in childhood ALL has been demonstrated. [2, 22-27]

Flow cytometric immunophenotyping not only has the advantage of being fast and cheap, it also has the advantage of analysis at the single cell level. This is particularly important in childhood ALL, because the ALL cells may be heterogeneous and different subpopulations may respond to therapy differently. [28, 29] Better definition of leukemic cells and more precise recognition of leukemic subsets at diagnosis can probably be achieved by usage of new antibodies directed against novel markers identified in the recently published micro-array studies of ALL cells at diagnosis [30-35] and our own comparative diagnosis-relapse studies. [36] Application of such novel markers will not only support the better recognition of leukemic cells, but will also improve the sensitivity of flow cytometric MRD detection. In addition, such studies will give more insight in the immunophenotypic characteristics of the leukemic subsets that survive *in vivo* during the initial and later phases of therapy in patients who ultimately relapse. This will particularly be of relevance for the most immature ALL subpopulation which potentially represent the (pre-)leukemic stem cell. [37]

Logically, the above described improvements in flow cytometric MRD detection needs the development of new antibodies as well as the usage of the newest generation of high-speed six-color flow cytometers.

2. Aims

The aims of this DCOG-ALL10 add-on study are:

- Development of six-color flow cytometric immunophenotyping protocols with precursor-B-ALL/T-ALL-specific inclusion and exclusion strategies that aim for maximal accuracy in the detection of ALL cells with a sensitivity of at least 10^{-4}. Introduction of novel markers (e.g. selected via DNA microarray studies) will be part of the new six-color immunostainings.
- Can flow cytometric immunophenotyping replace PCR analysis of Ig/TCR gene rearrangements for MRD diagnostics in childhood ALL? This will require the ability to detect an aberrant immunophenotype in over 95% of patients and the ability to reach sensitivities of at least 10^{-4}. The challenge is to simplify the flow cytometric MRD method, while increasing the reliability and sensitivity.
- To obtain insight in the characteristics of the leukemic cell subsets that survive therapy in patients who ultimately relapse. Special attention will be given to the most immature ALL subpopulation which potentially represents the (pre-)leukemic stem cell.

3. Relevance for childhood acute leukemia

Detection of MRD is a strong and independent prognostic factor in childhood ALL. Based on previous results, detection of MRD via PCR analysis of Ig/TCR gene rearrangements will be used in the DCOG-ALL10 protocol to stratify patients. Improvement of MRD diagnostics with respect to applicability, sensitivity, reliability, speed, and costs, will improve risk-group stratification, and consequently will contribute to better individualization of therapy in children with ALL.

We anticipate that novel flow cytometric techniques will not only result in faster and cheaper MRD diagnostics but also allow precise “single cell” studies, implying that ALL subpopulations at diagnosis and during follow-up can be characterized precisely. This is particularly important for the most immature subpopulation, which may represent the (pre-)leukemic stem cell.

Several unique circumstances greatly facilitate the implementation of the here proposed flow cytometric MRD study:

- The *logistics for cell sample collection* at diagnosis and during follow-up is very well organized, both within the DCOG-ALL10 treatment protocol and within the laboratories of the DCOG and department of Immunology, Erasmus MC. During the DCOG-ALL8 and particularly the current DCOG-ALL9 study, logistics have been improved and both laboratories have now broad experience in efficient cell sample processing.
- Recently, *new flow cytometers* have become available. Whereas the currently used flow cytometers can detect up to 4 colors, the new generation of flow cytometers can detect at least 6 colors. This true multiparametric method allows an even more detailed characterization of the leukemic cells, which should increase the sensitivity for MRD analysis and which should allow the recognition of relevant leukemic subsets which may respond differently to therapy.
- *New antibodies* are now becoming available. These new antibodies include (a) antibodies directed against molecules (often intracellularly localized) that have been identified as markers for different ALL subtypes in DNA micro-array analyses and (b) antibodies directed against molecules derived from the most common fusion genes. Such antibodies are currently becoming available via a spin-off company linked to the department of Immunology, Erasmus MC. Inclusion of these new antibodies will contribute to a better characterization of the leukemic cells.
- The new ALL treatment protocol (DCOG-ALL10) officially includes *MRD-based stratification*. Consequently, follow-up cell samples for MRD analysis are obtained at diagnosis and during follow-up and are processed at the two participating laboratories (DCOG laboratory and department of Immunology, Erasmus MC).
- *MRD diagnostics by PCR analysis of Ig/TCR gene rearrangements* will be performed in virtually all childhood ALL patients treated within the DCOG-ALL10 protocol. This implies that all flow cytometric MRD data can ultimately be compared with the molecular data, obtained from exactly the same cell sample.

4. Preliminary data

The laboratories of the DCOG and department of Immunology, Erasmus MC, have a longstanding collaboration and experience in flow cytometric analysis of both normal and malignant hematopoiesis. [38-42] Both laboratories participated in the European BIOMED-1 network [43-45] and have standardized their immunophenotyping protocols during the last five years. Using the current immunophenotyping protocols, sensitivities of 10^{-3}- 10^{-4} are consistently reached (Figure 1).

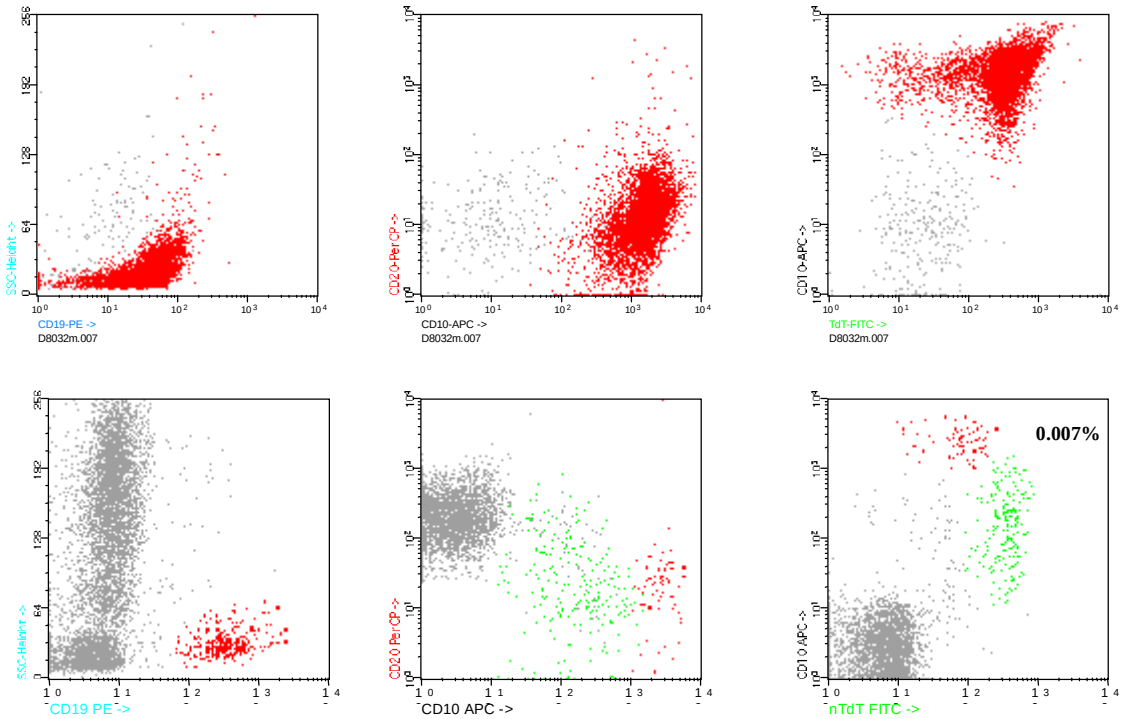
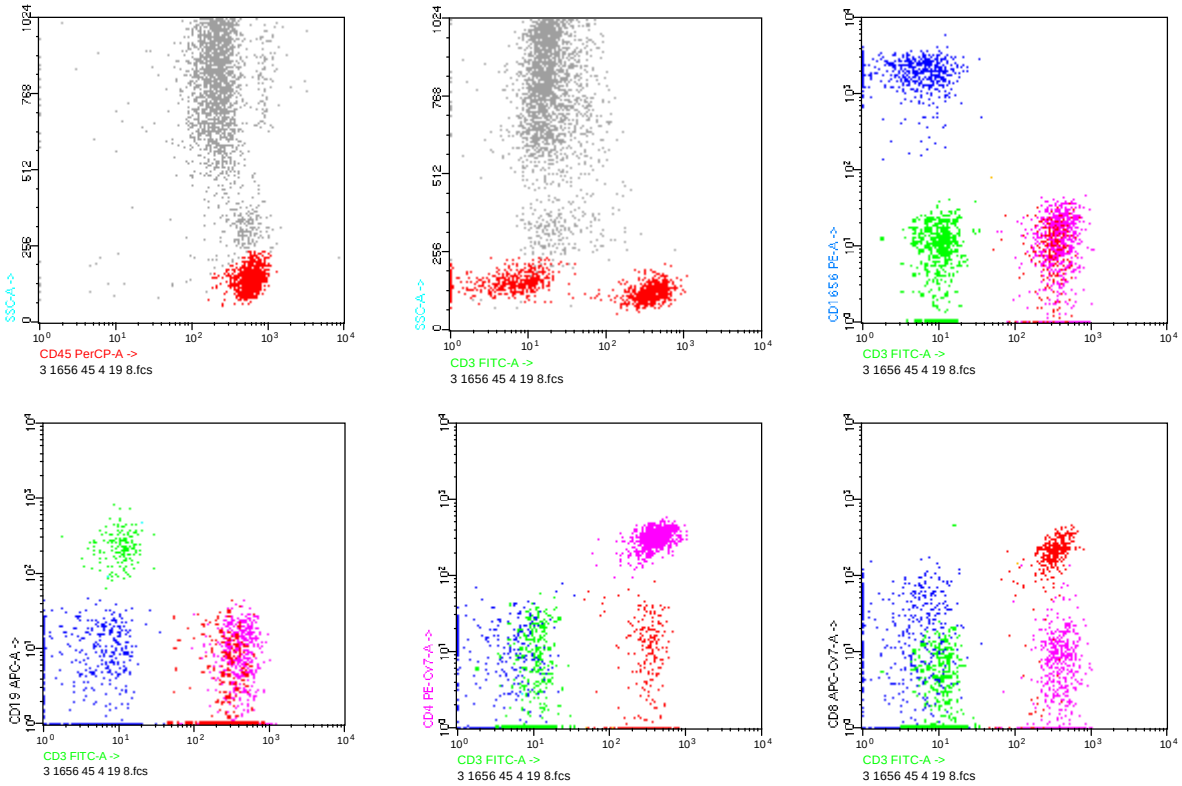


Figure 1. Flow cytometric immunophenotyping of a precursor-B-ALL patient at diagnosis (upper row) and during follow-up (bottom row). Using the aberrant immunophenotype as detected at diagnosis (CD10 overexpression), a small population of leukemic cells (0.007%) could be detected during follow-up.

Recently, the LSRII 6-color flow cytometer was introduced at the department of Immunology, Erasmus MC. In initial experiments, the set-up of the flow cytometer has been established and the LSRII is now routinely used with good results (Figure 2). Several directly conjugated antibodies are already commercially available. In addition, new antibodies (e.g. directed against TEL, AML1, and BCR) are currently being developed at the department of Immunology and will soon be introduced in the immunophenotyping procedures.



Within leucocytes:

4,53 %	CD3+.8+
2,20 %	CD19+
7,30 %	CD3-.1656+
10,20 %	CD3+.4+

Within lymphocyytes:

18,61 %	CD3+.8+
8,99 %	CD19+
29,94 %	CD3-.1656+
42,33 %	CD3+.4+

Figure 2. Flow cytometric immunophenotyping of a normal peripheral blood sample using the LSRII 6-color flow cytomter. Using the single labeling CD3/CD16.56/CD45/CD19/CD4/CD8 a complete lymphocyte subset analysis (B cells, NK cells, CD4 T cells, CD8 T cells) can be performed. Such advanced six-color immunostainings allow precise definition of the total leukocyte population but also of minor subpopulations.

5. Short description of study methods

For the flow cytometric MRD studies, the LSRII (or a comparable six-color flow cytometer) will be used. Six-color immunostaining protocols will be applied both at diagnosis and during follow-up. New antibodies against novel markers will be included in the protocols as soon as they become available. The immunophenotyping protocols and procedures will be standardized between the two participating laboratories and regular meetings will be organized to discuss progress, problems, pitfalls, and protocols. In addition, regular quality control rounds (focused on technical aspects as well as on data analysis and interpretation) will be organized during the study in order to ensure fully comparable results between the two laboratories.

6. Rationale for requested patient material

Immunophenotyping at diagnosis is routinely being performed in both participating laboratories. Approximately 2-3 x10^6 cells will be needed for the additional six-color stainings at diagnosis in this study. During follow-up, preferably 5-10 x10^6 cells are required. Because PCR-based MRD diagnostics has priority, sufficient cells for MRD-PCR analysis (5-10 x10^6 cells after Ficoll density centrifugation) will be separated first. As both laboratories participate in the PCR-based PCR study, division of cell material between the two MRD studies is logistically easy and straight-forward.

7. Financial support

A grant application will be submitted to the Dutch Cancer Society (NKB/KWF) before April 1, 2004.

8. References

1. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 591-598.
2. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 2691-2696.
3. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; 352: 1731-1738.
4. Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95: 790-794.
5. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VL, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Rowbottom AW, Hunt LP, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 92: 4072-4079.
6. van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, Hoogerbrugge PM. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 1485-1487.
7. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001; 2: 409-417.
8. Foroni L and Hoffbrand AV. Molecular analysis of minimal residual disease in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15: 71-90.
9. Szczepanski T, Flohr T, van der Velden VH, Bartram CR, van Dongen JJ. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15: 37-57.
10. Goulden N, Bader P, Van Der Velden V, Moppett J, Schilham M, Masden HO, Krejci O, Kreyenberg H, Lankester A, Revesz T, Klingebiel T, Van Dongen J. Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122: 24-29.
11. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, Steward CG, Handgretinger R, Beck JF, Klingebiel T. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* 2002; 16: 1668-1672.
12. Schrappe M. Risk-adapted therapy: lessons from childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol J* 2002; 3: 127-132.
13. Pui CH and Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 783-785.
14. Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, van Dongen JJ, Szczepanski T. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002; 162-192.
15. Van Der Velden VH, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WC, Van Wering ER, Van Dongen JJ. Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 2003; 17: 1834-1844.
16. van der Velden VH, Wijkhuijs JM, Jacobs DC, van Wering ER, van Dongen JJ. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia* 2002; 16: 1372-1380.
17. van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2002; 16: 928-936.
18. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17: 1013-1034.
19. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA, van Wering ER, van Dongen JJ, van der Schoot CE. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 1426-1435.
20. Bruggemann M, van der Velden VHJ, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, Wijkhuijs A, Goekbuget N, Hoelzer D, van Wering ER, van Dongen JJM, Kneba M. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease (MRD) in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2003; in press:
21. Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Schrappe M, Kamps WA, Masera G, Gadner H, Riehm H, Bartram CR, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002; 99: 4386-4393.
22. Campana D and Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15: 1-19.
23. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998; 351: 550-554.
24. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100: 52-58.
25. Bjorklund E, Mazur J, Soderhall S, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 138-148.

26. Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, Viswanatha D, Montgomery K, Willman CL, Camitta B. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2003; 17: 1566-1572.
27. Malec M, Bjorklund E, Soderhall S, Mazur J, Sjogren AM, Pisa P, Bjorkholm M, Porwit-MacDonald A. Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 2001; 15: 716-727.
28. de Haas V, Verhagen OJ, von dem Borne AE, Kroes W, van den Berg H, van der Schoot CE. Quantification of minimal residual disease in children with oligoclonal B-precursor acute lymphoblastic leukemia indicates that the clones that grow out during relapse already have the slowest rate of reduction during induction therapy. *Leukemia* 2001; 15: 134-140.
29. Konrad M, Metzler M, Panzer S, Ostreicher I, Peham M, Repp R, Haas OA, Gadner H, Panzer-Grumayer ER. Late relapses evolve from slow-responding subclones in t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: evidence for the persistence of a preleukemic clone. *Blood* 2003; 101: 3635-3640.
30. Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K, Ge X, Taki T, Sugita K, Ishii E, Hanada R, Ohki M, Aburatani H, Hayashi Y. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer Res* 2003; 63: 4882-4887.
31. Ferrando AA and Look AT. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2003; 40: 274-280.
32. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, Liu HC, Mahfouz R, Raimondi SC, Lenny N, Patel A, Downing JR. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003; 102: 2951-2959.
33. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1: 75-87.
34. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, Zhou X, Li J, Liu H, Pui CH, Evans WE, Naeve C, Wong L, Downing JR. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1: 133-143.
35. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, Campana D. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 97: 2115-2120.
36. Staal FJ, van der Burg M, Wessels LF, Barendregt BH, Baert MR, van den Burg CM, van Huffel C, Langerak AW, van der Velden VH, Reinders MJ, van Dongen JJ. DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia* 2003; 17: 1324-1332.
37. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 895-902.
38. van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia* 1992; 6 Suppl 1: 47-59.
39. van Dongen JJ, Adriaansen HJ, Hooijkaas H. Immunophenotyping of leukaemias and non-Hodgkin's lymphomas. Immunological markers and their CD codes. *Neth J Med* 1988; 33: 298-314.
40. van Lochem EG, Wiegers YM, van den Beemd R, Hahlen K, van Dongen JJ, Hooijkaas H. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. *Leukemia* 2000; 14: 688-695.
41. van Wering ER, van der Linden-Schrever BE, Szczepanski T, Willemse MJ, Baars EA, van Wijngaarde-Schmitz HM, Kamps WA, van Dongen JJ. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol* 2000; 110: 139-146.
42. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind H, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry* 2004; in press:
43. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJ, San Miguel JF. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; 13: 419-427.
44. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T, Bjorklund E, Biondi A, van den Beemd MW, Baars E, Vidriales B, Parreira A, van Dongen JJ, San Miguel JF, Orfao A. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 2001; 15: 1185-1192.
45. Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A, van den Beemd MW, van Wering ER, Baars E, Gaipa G, Biondi A, Ciudad J, van Dongen JJ, San Miguel JF, Orfao A. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000; 14: 816-825.

17.3 Research study: Detection of chromosomal aberrations in childhood acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at residual disease by array-based comparative genomic hybridization (arrayCGH): CI-04/0084B;OC-2004-0004

Naam aanvrager: (1e onderzoeker)	Prof. Dr. P.M. Hoogerbrugge (UMCN, Kinderoncologie), in samenwerking **met de afdeling Anthropogenetica (Prof. Dr. A. Geurts van Kessel) en de afdeling hematologie (Dr. B. van der Reijden).**
Functie:	Kinderoncoloog
Instituut:	Afdeling Kinderoncologie, UMC Nijmegen
Datum:	28 januari 2004

1. Introductie en rationale

Acute lymphoblastic leukemia is the most common malignancy in childhood. Cytogenetic aberrations in ALL are of prognostic importance (most notably t(9;22), t(4;11) and t(12;21)), are being used for risk classification and may provide clues to the pathways critical in leukemogenesis. Over the past decades, comparative genomic hybridization (CGH) has been applied to identify chromosomal aberrations in childhood ALL, and very recently, Kristensen et al (2003) detected, using 'high-resolution CGH', 405 aberrations in 92 children with ALL. The resolution of their technique was 3-5 Mb. Kristensen et al. only reported data of leukemic cells at diagnosis, no data on 'minimal' residual disease were reported.

Array-based comparative genomic hybridization (arrayCGH) is a new, powerful technology to identify genes involved in leukemogenesis more rapidly and accurately than the above mentioned techniques. In the past years, we and others have developed this whole-genome microarray technology that allows the identification of genomic alterations at a very high resolution (50-100Kb) in a single step procedure. We propose to analyze the genomic alterations in the blasts of children with ALL using arrayCGH. In addition, we plan to investigate the genomic alterations in the leukemic clones that slowly disappear during induction treatment, and that are candidate clones for giving rise to future relapses.

2. Doel / vraagstelling van het onderzoek

In the proposed investigations, we want to study in detail and at high-resolution, the genomic alterations that are related to tumor initiation in childhood ALL (both precursor B and T) using arrayCGH. This high-resolution assay will facilitate the identification of novel genes involved in the leukemogenesis of childhood ALL. In addition, we want to study the genomic alterations in the leukemic cells that are still present in the bone marrow at 15 and 33 days of treatment (so called 'minimal' residual disease), as it is generally accepted that an eventual relapse originates from this 'minimal' residual disease. Analysis of the genomic alterations (either amplifications or deletions) present in these resistant clones will be used to identify candidate genes related to *in vivo* resistant disease. Publicly available data bases (Human Genome Project) will be used to identify the genes located in the genomic regions affected. Additionally, the clinical relevance of the detected genomic alterations will be investigated.

3. De relevantie van het onderzoek voor leukemie op de kinderleeftijd

It is expected that new genomic alterations will be detected that are related to the pathogenesis of childhood ALL. The correlation of these findings to the outcome of treatment can be investigated, and may give clues to good- and bad prognostic signs. In addition, identification of the genes detected by the arrayCGH may provide clues to the development of new drugs.

4. Eventuele preliminaire resultaten

Comparative genomic hybridization (CGH) has been used successfully for the detection of chromosomal anomalies in tumor material (Kallioniemi et al., 1992). Microarray-based high resolution comparative genomic hybridization builds upon existing CGH procedures but, instead of metaphase chromosomes, uses cloned genomic fragments as chromosome-specific hybridization targets in a miniaturized (arrayed) format on a chip. By doing so, the resolving power of the CGH technology has become virtually unlimited (e.g. Snijders et al., 2001).

We have successfully applied this arrayCGH technology to a variety of cancers, including bladder cancer, renal cell cancer, germ cell cancer, prostate cancer and pancreatic cancer (Veltman et al., 2003; Wilhelm et al., 2002; Zafarana et al., 2003; Hermans et al., 2004; Heidenblad et al. 2004). We have been able to differentially diagnose a cohort of renal cell cancers according to their arrayCGH profiles and have detected high-level amplifications (192 genomic clones) and deletions (51 genomic clones) in 41 patients with bladder cancer. In addition, we have defined genomic regions harboring congenital disease genes (Veltman et al., 2002, 2003) and have detected novel microdeletions and microduplications, which were not visible by routine chromosome analysis, in patients with various disorders including 20 patients with severe mental retardation (Vissers et al., 2003).

5. Een (korte) beschrijving van de te gebruiken onderzoekmethoden

The Microarray Group of the Department of Human Genetics (www.microarraynijmegen.nl) has developed the tools and protocols to identify small genomic deletions/duplications by means of arrayCGH. Microarrays containing over 3600 FISH-verified BAC clones (3.6K array) covering the complete human genome with a resolution of at least one clone per megabase were developed and microarrays containing 32.000 BAC clones (32K array) will be implemented in the near future. These clones are integrated in the draft sequence of the human genome. In addition, dedicated statistic and bio-informatic tools have been developed and implemented allowing comprehensive microarray data normalisation and analysis. By using these tools, genomic anomalies as small as 50-100 kb can readily be identified. For such analyses we require approximately 5 ug of total genomic DNA, which corresponds to approximately 10^6 cells (one cell contains ~6 pg of genomic DNA). After purification, 500 ng of genomic DNA from each sample will be used for labelling and hybridisation.
Leukemic blasts will be purified from the marrow obtained at day 15 and 33 (if ‘M’RD is still present) by immunomagnetic beads or FACS sorting. Both technologies are available at the UMCN.

6. Kwantificering van het gevraagde materiaal/gegevens.

For analysis of the leukemic cells at diagnosis, 1 ampoule with 5 million cells will be sufficient to extract enough genomic DNA.
For the analysis of the marrow at days 15 and 33 after the start of treatment, only marrow of patients with >1-5% blasts (‘M’RD) will be eligible. 20-30 million cells are needed for the arrayCGH analysis of this marrow with ‘minimal’ residual disease. Marrow from patients with less than 1% blasts at days 15 and 33 currently cannot be used for the proposed investigations.
As it is not yet known what the incidence of the chromosomal aberrations will be, and which clones will be frequently aberrantly present, we propose to start with 200 patients. It is expected that >1-5% blasts will be present in 40% of the patients at day 15 (Panzer, 2000, approximately half of these having >5% blasts) and 15% of the patients at day 33 (van Dongen, 1998), indicating that in the 200 patients, data on genomic aberrations in ‘M’RD will be present in 80 and 30 patients at days 15 and 33 respectively. Based on an interim-analysis after 200 patients, it can be decided how to proceed.
For the correlation of the detected chromosomal aberration to the clinical outcome, clinically relevant parameters (e.g. age, WBC at diagnosis, phenotype, CNS involvement, outcome of treatment) are requested.

7. Financiering

Adequate finances are available at the UMCN.

8. Literatuurlijst van het onderzoekveld

Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN, Waldman FM. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. Cancer Res. 63: 2872-2880 (2003).

Wilhelm M, Veltman JA, Olshen A, Jain A, Moore D, Presti J, Kovacs G and Waldman F. Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. Cancer Res. 62: 957-960 (2002).

Zafarana G, Grygalewicz B, Gillis AJM, Vissers LELM, Vliet Wvd, Gurp RJHLMv, Stoop H, Debiec-Rychter M, Oosterhuis JW, Geurts van Kessel A, Schoenmakers EFPM, Looijenga LHJ and Veltman JA. 12p-Amplicon structure analysis in testicular germ cell tumours of adolescents and adults by arrayCGH. Oncogene 22: 7695-7701 (2003).

Dongen JJMv, Seriu T, Panzer R et al. Prognostic value of minimal residual disease in ALL in childhood. Lancet, 1998; 352:1731-8.

Hermans KG, Alewijk DCv, Veltman JA, Weerden Wv, Geurts van Kessel A, Trapman J. Chromosome 10 alterations in prostate cancer xenografts and cell lines. Genes Chrom. Cancer 39: 171-184 (2004).

Panzer-Grumayer R, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood ALL. Blood, 2000; 95:790-4.

Heidenblad M, Schoenmakers EFPM, Jonson T, Veltman JA, Geurts van Kessel A, Hoglund M. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization reveals multiple amplification targets and novel homozygous deletions in pancreatic carcinomas. Cancer Res. (2004, in press).

Veltman JA, Schoenmakers EFPM, Eussen BH, Janssen I, Merkx G, Cleef Bv, Ravenswaaij CMv, Brunner H, Smeets D, Geurts van Kessel A. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. Am. J. Hum. Genet. 70: 1269-1276 (2002).

Veltman JA, Jonkers Y, Nuijten Y, Janssen I, Vliet Wvd, Huys E, Vermeesch J, Buggenhout Gv, Admiraal R, Terhal P, Lacombe D, Geurts van Kessel A, Smeets D, Schoenmakers E, Ravenswaaij-Arts Cv. Definition of a critical region on chromosome 18 for congenital aural atresia by arrayCGH. Am. J. Hum. Genet. 72: 1578-1584 (2003).

Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, Geurts van Kessel A, Schoenmakers EF, Veltman JA. Array-based comparative genomic hybridization for the genome-wide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. Am J Hum Genet. 73: 1261-70 (2003).

Kristensen TD, Wesenberg F, Jonsson OG, Carlsen NT, Forestier E, Kirchhoff M, Lundsteen C, Schmiegelow K. High-resolution comparative genomic hybridisation yields a high detection rate of chromosomal aberrations in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Eur J Haematol. 70: 363-372 (2003).

Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. Nat Genet. 29: 263-264 (2001).

Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. Hum Mol Genet. 12: 145-152 (2003).

Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. Nature Genet. 25: 144-146 (2000).

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 258: 818-821 (1992).

17.4 Research study: Interactions between NFκB- and Glucocorticoid Receptor signaling pathways as molecular control mechanisms of Glucocorticoid Resistance in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at initial diagnosis (and at relapse): CI-04/0092;OC-2004-0009

Naam aanvrager (1e onderzoeker)	:	G.J.L. Kaspers, G. Jansen en J. Cloos
Functie	:	kinderarts-oncoloog/hematoloog
Instituut	:	VU medisch centrum
Datum	:	31-01-2004
Titel onderzoek	:	**Interactions between NFκB- and Glucocorticoid Receptor signaling pathways as molecular control mechanisms of Glucocorticoid Resistance in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at initial diagnosis (and at relapse)** (an add-on study to SKION-ALL-10)

1. Algemeen overzicht van het onderzoeksveld

Glucocorticoid (GC) resistance is a major adverse prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), either when determined in vitro using a total cell-kill assay (Hongo 1997, Kaspers 1998, Pieters 1991) as well as in vivo based on the decrease of peripheral blood ALL cells after a one week systemic monotherapy with prednisone (Schrappe 2000). The incidence of clinically relevant GC resistance is about 20% in newly diagnosed ALL (Kaspers 1997, Tissing 2003). We and others have shown that at relapse, ALL cells are significantly more resistant to both prednisolone and dexamethasone than ALL cells obtained at initial diagnosis (Hongo 1991, Klumper 1995). In agreement with this, clinical GC resistance occurs in more than 50% of relapsed ALL patients (Kaspers 1997). In addition, acute myeloid leukemia cells are highly insensitive to the cytolytic activity of GCs (Zwaan 2000), and remarkably this type of leukemia also has a relatively poor prognosis like relapsed ALL and GC-resistant initial ALL. In other malignancies in which GCs are also being used, such as lymphomas and multiple myeloma, GC resistance is a clinical problem as well. Except for a very low expression of GC receptor, the mechanism(s) of GC resistance is (are) largely unclear. Such knowledge might reveal possibilities to modulate GC resistance by pharmacological intervention. We have previously suggested that the inhibition of NFκB activation is such a possibility (Haarman 2003).
The activated NFκB pathway is associated with cell survival, partly by the activation of antiapoptotic proteins such as bcl-2 and inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). The transcription factor NFκB can also bind activated GC receptor, thereby preventing binding to GC responsive elements. This might also contribute to prevention of GC-induced apoptosis. Proteasomes can bind and degradate ubiquitinated IκB. Since IκB is an inhibitor of NFκB, proteasome inhibition will result in maintaining NFκB in an inactive state. Similarly, other inhibitors of NFκB activation will also theoretically result in apoptosis and may also increase the cytotoxicity of anticancer agents including GCs towards cancer cells (Jeremias 1998; Hideshima 2001; Pahler 2003). Proteasome inhibitors were indeed shown to induce apoptosis in GC-resistant chronic lymphocytic leukemic lymphocytes (Chandra 1998). We (unpublished) and others (Kordes 2000) have found NFκB to be expressed and constitutively activated in ALL cells. It has also been reported that tumor cells are more sensitive to these effects of proteasome inhibitors than normal cells, which is important in view of the selectivity of this approach (Soligo 2001).

Several proteasome inhibitors have been described, including bortezomib (Velcade®), formerly called PS-341 (Adams 2002), as well as other inhibitors of NFκB activation, such as sulphasalazine (Kang 1999). Modulation of GC resistance in childhood ALL by inhibition of NFκB activation is a potentially clinically useful approach. Studies on this have not been reported yet in the literature. We therefore propose to study NFκB and GC receptor signaling pathways in relation to GC resistance and to the possibilities to modulate GC resistance by inhibition of NFκB activation in childhood ALL.

2. Doel / vraagstelling van het onderzoek

The overall aim of this project is to improve antileukemic treatment, not only by investigating new drugs but also by sensitizing cells for currently important drugs (i.e., GCs).
More specifically we aim to:

1) Determine the value of inhibitors of NFκB activity (sulphasalazine and bortezomib) as antileukemic agents itself, but also in modulation studies in combination with GC exposure. This will be done by in vitro cytotoxicity testing of initial ALL patient samples using the MTT assay.
2) Identify the genes involved in the signal transduction pathway(s) that link an inhibition of NFκB activation to an upregulation of the GC receptor. This will reveal how cells can be sensitized for GCa, and may be relevant in understanding the antileukemic activity of the drugs itself.

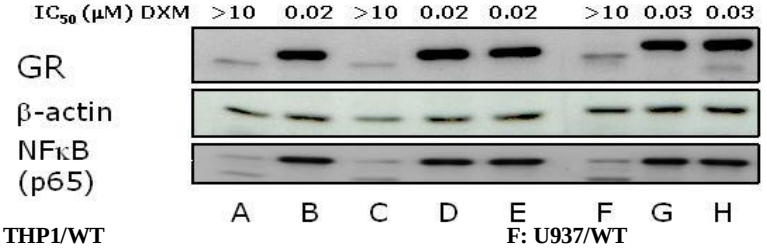
3. De relevantie van het onderzoek voor leukemie op de kinderleeftijd

GCs are the backbone of chemotherapy in ALL. GC resistance is an adverse prognostic factor, and occurs in a significant part of newly diagnosed ALL patients, is more frequent in relapsed ALL, and is seen in the majority of AML patients. The explanation(s) for GC resistance in patients is (are) essentially unknown. This study may help in unraveling the causes of GC resistance in leukemia.

At least as important is that this study may provide evidence to support clinical trials with inhibitors of NFκB activation (such as with the clinically available drugs sulphasalazine and/or bortezomib) in childhood leukemia. In such clinical studies, both single agent antileukemic activity and GC resistance modulating activity should then be addressed.

4. Eventuele preliminaire resultaten

We observed that inhibition of NFκB activation correlated with an increased sensitivity to dexamethasone. The highly resistant (myeloid leukemia) cell lines THP1 and U937 became (>300-fold more) sensitive and the relatively sensitive (lymphoblastic leukaemia) cell line CEM-C7 became even more (10-fold) sensitive to dexamethasone after exposure to sulphasalazine. Using Western blotting it was shown that NFκB p65 protein expression was upregulated together with an increase in GC receptor expression. This might indicate that this NFκB is kept in an inactive state. In the cell line U937, this was a permanent change also found after withdrawal of the NFκB inhibitor, in the THP1 cell line the observed phenomena were reversible (see figure 1). Similar experiments with the CEM-C7 and GC-resistant lymphoblastic leukemia cell lines are ongoing. These results suggest a specific signal transduction pathway between NFκB and GC receptor that will render new insight in possibilities to sensitize leukemic cells for GCs.



A: THP1/WT
B: THP1/SSZ
C: THP1/SSZ (-300 days SSZ)
D: THP1/SSZ (-300 days SSZ® + 12 days SSZ)
E: THP1/SSZ (-300 days SSZ® + 30 days SSZ)
F: U937/WT
G: U937/SSZ
H: U937/SSZ (-300 days SSZ)

Figure 1: Western blot of two leukemic cell lines, both wild type and exposed to 0.6 µM sulphasalazine (SSZ). The experiments are without additonal GC exposure. GR=GC receptor.

5. Een (korte) beschrijving van de te gebruiken onderzoekmethoden

- For cytotoxicity testing we will use the MTT assay according to the method described in detail previously (Bresters 2003). With this method we will test ALL samples and non-malignant bone marrow samples from children, and several leukemic cell lines. The normal bone marrow samples are included to be able to – at least partly - predict the therapeutic index of the drugs and its combinations.
- Using Western blotting the protein expression changes of NFκB, IκB and the GC receptor will be determined before and after exposure to sulphasalazine, bortezomib and GC, in addition to studies on gene expression. This will be done mainly to confirm a relation between gene and protein expression. Protein expression levels will always be related to beta-actin expression.
- Since it is still unknown which genes are involved in the link between inhibition of NFκB and upregulation of GC receptor, we will perform microarray analyses in a selected panel of cell lines and patient samples both exposed and unexposed to the drugs. For this purpose the 15K 60-mer oligo glass arrays will be used from the VUmc microarray facility. On the slides each gene is printed in duplicate rendering 30K data points. The genes that show to be interesting in this analysis will be further studied by means of real-time quantitative PCR (Taqman analysis).
- Leukemic cell lines with inducible expression (up/down) of NFκB, IκB and the GC receptor are currently being developed in order to study the signal transduction pathway in more detail. After cloning of the gene, transfections are performed using the electroporation method of Amaxa (Nucleofector). Earlier studies have shown that a stably transfected CEM-C7 ALL cell line can be obtained using this method. It is evident that new interesting genes that become available during this study will be included in this part of the study.

6. Kwantificering van het gevraagde materiaal/gegevens

(based on previous experience and after consulting Hans Berkhof, statistician at the VUmc)

- Number of samples:
    - To determine the antileukemic activity of sulphasalazine, bortezomib and GC in the MTT assay, we need 30 B-cell precursor and 10 T-cell precursor ALL samples tested *successfully*. This number will give an idea about the interindividual differences in cytotoxicity of the drugs, and will be enough to identify marked differences in response to the inhibitors of NFκB activation between the GC-sensitive B-cell precursor and the more GC-resistant T-cell ALL samples. These samples will also be used for baseline (and post-exopsure) protein expression measurements.
    - For the investigation of the sensitizing effect of sulphasalazine and bortezomib to GC, the same samples can be used. However, it might be that some samples will turn out to have too few cells to perform all tests; in that case, some additional samples may be necessary. Moreover, the success-rate of the MTT assay should be taken into account, 80-85% for fresh samples. Therefore, at least 50 samples should be tested.
    - To elucidate the signaling pathway that links NFκB to GC receptor expression, we need material both at initial diagnosis and after 24 hours exposure to predniso(lo)ne in vivo. The use of “ex-vivo” cells was shown to be feasible in several other studies, and may prevent several in-vitro artifacts. This part of the study will require 15-30 samples tested successfully (15 initially, followed by an interim-analysis). In order to be able to compare clinically good and poor prednisone responders as well, material of at least 8 poor responders should have been tested succesfully. Theoretically, these studies can be done on the samples mentioned above, if enough cells will be available. However, this question may require some additional samples to be sent to Amsterdam since theoretically only 10% (n=4) will have a poor prednisone response. On the other hand, poor responders may be overrepresented in this type of studies. The interim-analysis will be useful in this respect as well.

- Number of cells:
    - For MTT assays we need per sample 8 million cells to test the single agents and an extra 10 million cells for the modulation studies. For additional Western blotting experiments, another approx. 12 million cells are needed to determine the expression of NFκB, IκB and the GC receptor.
    - To study the signal transduction pathways:
        - 20 million cells per sample are required for gene expression at baseline and post-drug [3 drugs] exposure as measured with real time PCR
        - 10 million cells are required for gene expression profiling
        - After we have identified relevant genes a Western blot experiment would be warranted for a small number of samples (n=5). This will require however at least 40 million cells per sample, because of the baseline and dynamic measurements after exposure to different drugs.
- Minimum number of viable leukemic cells: 10 million (initially, that would enable determining the cytotoxicity of the different agents; later-on, it would be enough to determine modulation of GC resistance; once this has been done, the minimum number of cells would be 20 million cells.
- Fresh or frozen: because of the significantly higher success-rate of all assays when done on fresh samples, and because of the possible artefacts induced by the freezing-thawing procedure, fresh material is requested.
- The above studies require fresh bone marrow (or peripheral blood in case of >60% blasts) samples from ALL patients obtained at initial diagnosis (see below).
- Additional patient information that will be needed includes age, sex, immunophenotype, cytogenetics, response to the prednisone window treatment and risk group.

Note: Ideally, these studies should also be done on relapsed ALL and AML samples. However, it is assumed that this requires a separate proposal.

Flowchart:

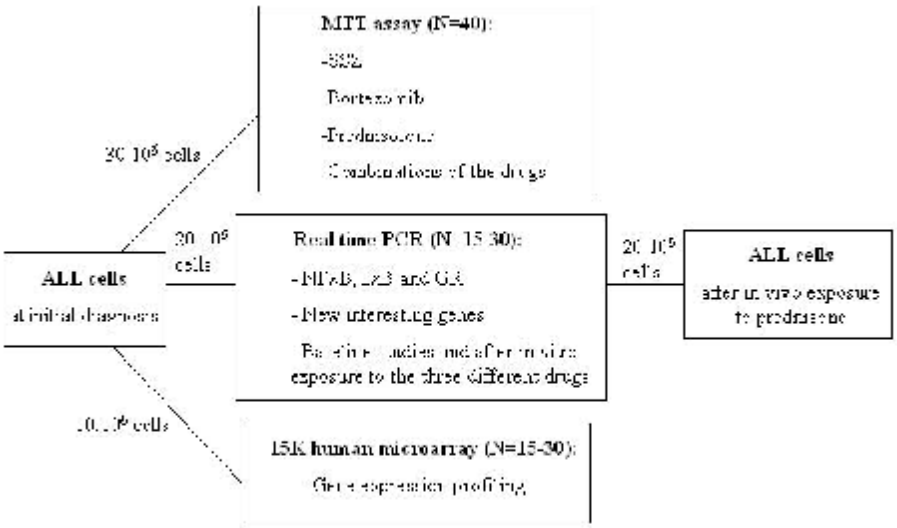


Figure 2. Flowchart for the use of the material. SSZ=sulphasalazine.

7. Literatuurlijst van het onderzoekveld

- Adams J. Proteasome inhibitors as new anticancer drugs. Curr Opin Oncol 2002, 14: 628-634
- Bresters D, Broekhuizen AJF, Kaaijk P, Faircloth GT, Jimeno J, Kaspers GJL. In vitro cytotoxicity of Aplidine and cross-resistance with other cytotoxic drugs in childhood leukemic and normal bone marrow and blood samples; a rational basis for clinical development. Leukemia 2003, 17: 1338-1343
- Chandra J, Niemer I, Gilbreath J, et al. Proteasome inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. Blood 1998, 92: 4220-4229
- Haarman EG, Kaspers GJL, Veerman AJP. Glucocorticoid resistance in childhood leukaemia: mechanisms and modulation. Br J Haematol 2003, 120: 919-929
- Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. Cancer Res 2001, 61: 3071-3076
- Hongo T, Fujii Y. In vitro chemosensitivity of lymphoblasts at relapse in childhood leukemia using the MTT assay. Int J Hematol 1991, 54: 219-230
- Hongo T, Yajima S, Sakurai M, Horikoshi Y, Hanada R. In vitro drug sensitivity testing can predict induction failure and early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1997, 89: 2959-2965
- Jeremias I, Kupatt C, Baumann B, et al. Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. Blood 1998, 91: 4624-4631
- Kang BY, Chung SW, Im SY, Choe YK, Kim TS. Sulfasalazine prevents T-helper 1 immune response by suppressing interleukin-12 production in macrophages. Immunology 1999, 98: 98-103
- Kaspers GJL, Pieters R, Veerman AJP. Glucocorticoid resistance in childhood leukemia. Int J Pediatr Hematol Oncol 1997, 4: 583-596
- Kaspers GJL, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Van Der Does-Van Den Berg A, Veerman AJP. Prednisolone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: vitro-vivo correlations and cross-resistance to other drugs. Blood 1998, 92: 259-266
- Klumper E, Pieters R, Veerman AJP, Huismans DR, Loonen AH, Hählen K, Kaspers GJL, Van Wering ER, Hartmann R, Henze G. Cellular drug resistance in children with relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia. Blood 1995a, 86: 3861-3868
- Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheidereit C. Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. Leukemia 2000, 14: 399-402
- Pahler JC, Ruiz S, Niemer I, et al. Effects of the proteasome inhibitor, bortezomib, on apoptosis in isolated lymphocytes obtained from patients with chronic lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res 2003, 9: 4570-4577
- Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, Van Der Does-Van Den Berg A, Van Wering ER, Veerman AJP. Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 1991, 338: 399-403
- Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, Gadner H, Odenwald E, Riehm H. Long-term follow-up of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Leukemia 2000, 14: 2205-2222
- Soligo D, Servida F, Delia D, et al. The apoptogenic response of human myeloid leukaemia cell lines and of normal and malignant haematopoietic progenitor cells to the proteasome inhibitor PSI. Br J Haematol 2001, 113: 126-135
- Tissing WJ, Meijeringk JP, Den Boer ML, Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2003, 17: 17-25
- Zwaan ChM, Kaspers GJL, Pieters R, Ramakers-Van Woerden NL, Den Boer ML, Wünsche R, Rottier MMA, Hählen K, Van Wering ER, Janka-Schaub GE, Creutzig U, Veerman AJP. Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000, 96: 2879-2886

17.5 Research study: The relationship of humoral and innate immunity with infections in children with acute lymphoblastic leukaemia: CI-04/0484;OC-2004/0001

Naam aanvrager (1e onderzoeker) : Dr M Bierings

Functie :Kinderhemato-oncoloog

Instituut :Wilhelmina Kinderziekenhuis – UMC Utrecht

Datum :29 mei 2004

Titel onderzoek :**The relationship of humoral and innate immunity with infections in children with acute lymphoblastic leukemia**

1. Algemeen overzicht van het onderzoeksveld

Infecties zijn een belangrijke bron van morbiditeit en mortaliteit bij kinderen die met chemotherapie worden behandeld voor acute lymfatische leukemie. Naast directe morbiditeit en mortaliteit kunnen (ernstige) infecties ook de leukemiebehandeling zelf hinderen door uitstel van behandeling of dosisreductie. Hoewel veel ernstige infecties gerelateerd zijn aan het bestaan van neutropenie en de aanwezigheid van intraveneuze catheters kunnen ook aangeboren en verworven immuundeficiënties bijdragen aan het risico op infecties. Het is bekend dat veel kinderen in de loop van de behandeling voor acute lymfatische leukemie een B-lymfopenie en hypogammaglobulinaemie ontwikkelen en er zijn aanwijzingen dat deze kinderen een slechtere prognose hebben dan kinderen in een vergelijkbare risicogroep zonder B-lymfopenie en hypogammaglobulinaemie. Deze gegevens komen echter grotendeels uit oudere studies met kleine patiëntengroepen en deze studies zijn veelal retrospectief uitgevoerd.
Recente literatuur suggereert dat het mannose binding lectin (MBL) een zeer belangrijk eiwit is in het afweersysteem van kinderen met een immuundeficiëntie. Zo zijn mutaties in het MBL o.a. geassocieerd met een verhoogde kans op ernstige infecties na een stamceltransplantatie. Daarnaast zouden kinderen met een mutatie in het MBL gevoeliger zijn om leukemie te ontwikkelen omdat MBL één van de mogelijke stappen is in de leukemogenese. Ook andere factoren in het aangeboren immuunsysteem, zoals polymorfismen in de Toll-like receptor, het CRP gen en diverse cytokine genen zouden volgens recente literatuur geassocieerd zijn met meer en ernstigere infecties.

2. Doel/vraagstelling van het onderzoek

Er zal een prospectieve analyse worden gedaan van de aard, ernst en frequentie van infecties die kinderen doormaken die met chemotherapie worden behandeld voor acute lymfatische leukemie volgens het ALL-10 protocol. Getracht zal worden een relatie te leggen tussen de aard, ernst en frequentie van infecties en neutropenie, hypogammaglobulinaemie en enkele andere eigenschappen van het adaptieve en het aangeboren humorale immuunsysteem (o.a. mannose binding lectin, Toll-like receptor, CRP polymorfismen en cytokine-gen polymorfismen).

3. De relevantie van het onderzoek voor leukemie op de kinderleeftijd

Infecties hebben een belangrijk aandeel in de totale morbiditeit en mortaliteit bij kinderen die worden behandeld voor acute lymfatische leukemie. Mogelijk bestaat er een relatie tussen de gevoeligheid voor infecties en o.a. deficiënties in de aangeboren immuniteit (mannose binding lectin, Toll-like receptor, CRP polymorfismen en cytokine gen polymorfismen), primaire of secundaire hypogammaglobulinaemie en neutropenie. Door deze relaties prospectief te onderzoeken kunnen patiënten met een verhoogd infectierisico geïdentificeerd worden.

4. Eventuele preliminaire resultaten

In 2000 en 2001 werd in het Wilhelmina Kinderziekenhuis een pilotstudie verricht onder 22 kinderen die werden behandeld volgens het ALL-9 protocol. Voorafgaand aan een beenmergpunctie werden bij een routine bloedonderzoek naast een volledig bloedbeeld ook de immuunglobulinen bepaald. Daarnaast werd gekeken naar de aard, ernst en frequentie van infecties in de 3 maanden voorafgaand aan deze metingen.
Van de 22 kinderen hadden 10 een hypogammaglobulinaemie (<-2SD) en 9 van de 22 kinderen hadden één of meer infecties. Van de 12 patiënten met normale immuunglobulinen hadden 3 kinderen één of meer infecties maar van de 10 patiënten met hypogammaglobulinaemie hadden 6 kinderen één of meer infecties. Hoewel de groep te klein was om statistische analyses op te doen lijkt een verband

tussen hypogammaglobulinaemie en gevoeligheid voor infecties aannemelijk. Dit zal in een groter cohort prospectief moeten worden onderzocht.

5. Een (korte) beschrijving van de te gebruiken onderzoeksmethoden

Alle kinderen die worden behandeld volgens protocol ALL-10 en van wie informed consent wordt verkregen voor het onderzoek zullen geïncludeerd worden. Van hen worden gegevens verzameld met betrekking tot aard, ernst en frequentie van infecties en van de frequentie en duur van neutropene episodes. De gegevens worden enerzijds verzameld via een dagboek dat door de ouders zal worden bijgehouden en anderzijds via gegevens die door de SKION worden geregistreerd. Zo nodig zal de hoofdonderzoeker of een research nurse contact zoeken met het behandelend centrum om toestemming te vragen voor het verkrijgen van aanvullende klinische gegevens.
Immuunglobulinen, mannose-binding lectin en antistoftiters tegen polio, Hib, BMR en MenC zullen bij diagnose en vervolgens met reguliere intervallen worden bepaald, parallel aan beenmergafnames voor MRD onderzoek. Tevens worden op deze momenten flow-cytometrische studies gedaan om aantal en rijpingsstadium te bepalen van B- en T- lymfocyten, monocytaire en myeloïde cellen.
Mannose binding lectin genotype, Toll-like receptor polymorfismen, CRP gen polymorfismen en cytokine gen polymorfismen zullen van elke patiënt worden bepaald uit genomisch DNA dat wordt geïsoleerd uit één extra bloedmonster dat zal worden afgenomen bij een routine bloedafname ten tijde van het beenmergonderzoek 3 maanden na de start van de behandeling.
Uitgaande van de incidentie van acute lymfatische leukemie bij kinderen in Nederland kunnen naar verwachting 120 kinderen per jaar worden geïncludeerd. Na 2 jaar zal een interim-analyse verricht worden. Dit zal een correlatie-analyse zijn naar de parameters van aangeboren en adaptieve immuniteit en infecties met als doel risicofactoren te identificeren die predisponeren voor ernstige infecties.

6. Kwantificering van het gevraagde materiaal/gegevens

Gevraagde gegevens: infectie parameters via SKION registratie
Gevraagd materiaal: 5 ml plasma of serum bij de diagnose en bij elke beenmergpunktie (BMP) voor MRD en één keer 5 ml extra heparine bloed (bij BMP 3 maanden na diagnose) voor genomisch DNA (MBL, cytokine polymorfismen etc). Tevens 5 wattenstaafjes met wangslijmvliescellen in een aantal gevallen voor genomisch DNA (in overleg).

17.6 Research study: Genetische polymorfismen in relatie tot bijwerkingen van de therapie en tot *in vivo* en *in vitro* gevoeligheid voor prednison bij kinderen met ALL: CI-04/0405;OC-2004/0002

Naam aanvrager (1e onderzoeker) : W.J.E. Tissing, M.M. van den Heuvel-Eibrink

Functie : Kinderoncoloog / hematoloog

Instituut : Erasmus MC / Sophia Kinderziekenhuis

Datum : 30-1-04

Titel onderzoek : Genetische polymorfismen in relatie tot bijwerkingen van de therapie en tot *in vivo* en *in vitro* gevoeligheid voor prednison bij kinderen met ALL.

1. Algemeen overzicht van het onderzoeksveld

Glucocorticoiden (GC) zoals dexamethason en prednison vormen een belangrijk onderdeel van de behandeling van kinderen met acute lymfatische leukemie (ALL). De *in vivo* en *in vitro* respons op prednison zijn belangrijke prognostische factoren voor het uiteindelijke effect van de behandeling.
De behandeling met GC leidt bij bepaalde patiënten tot (ernstige) bijwerkingen zoals Cushingoid gezicht, acne, striae, groeivertraging, een veranderde lichaamssamenstelling zoals adipositas, een verlaagde botdichtheid, psychische klachten, diabetes mellitus, hypertensie, maagulcera en avasculaire botnecrose. Er zijn geen studies bekend waarbij naar het optreden van het gehele scala aan bijwerkingen van GC is gekeken bij kinderen behandeld voor een ALL. In een retrospectieve analyse werd het optreden van hyperglycemieen geanalyseerd bij 130 kinderen behandeld volgens ALL9 in ons ziekenhuis. 8 Kinderen (6.2%) kregen een (periode met) hyperglycemie, 3 (2.3%) werden behandeld met insuline. Een leeftijd boven de 9 jaar, adipositas en down syndroom waren gerelateerd aan een hoger risico.(1) Bij andere ziekten dan ALL zijn enkele studies verricht naar het hele scala aan bijwerkingen, hoewel slechts een marginale rapportage plaatsvond. Het voorkomen van een of meerdere genoemde bijwerkingen werd gerapporteerd bij 60 – 80% van de patiënten.(2, 3) In een kleine studie naar psychologische bijwerkingen van prednison bij 10 kinderen met een nefrotisch syndroom werd bij 7 kinderen een aanzienlijke toename gezien vwb angstig / depressief gedrag en / of agressief gedrag. (4)

Een van de bijwerkingen die wat uitgebreider is geanalyseerd is de botdichtheid. In een eerdere studie lieten we al zien dat de botdichtheid reeds bij de diagnose ALL verlaagd is, verder afneemt tijdens therapie en niet eerder herstelt dan een jaar na het staken van de therapie (tot normale waarden).(5) Opvallend is het verschil in (de afname van) de botdichtheid tussen verschillende patiënten. Dit suggereert een genetische variatie. Bij volwassen postmenopauzale vrouwen en gezonde kinderen is gebleken dat genetische polymorfismen in bv het vitamine D receptor gen (VDR) en het collageen type I(COLIa1) receptor gen gecorreleerd zijn met de botdichtheid(6-11). Bij kinderen met ALL vonden wij een correlatie van VDR gen polymorfismen met een 6-voudig verhoogd fractuur risico (tot 25%), waarbij een verhoogd fractuur risico geassocieerd was met de mate van afname van botdichtheid in de eerste 32 weken van de therapie. (12) Ook andere groepen hebben recentelijk preliminaire resultaten laten zien die een correlatie suggereren tussen osteoporose bij kinderen en VDR gen polymorfismen, daarnaast met polymorfismen van het 5,10-methyltetrahydrofolaat reductase (MTHR) gen, en het oestrogeen receptor gen.
Een andere osteogene bijwerking die voorkomt bij kinderen met ALL is avasculaire botnecrose (AVN).(13) Dit is een complicatie die wordt veroorzaakt door de gecompromitteerde microvascularisatie van gewichtsdragende gewrichten, door de leukemie zelf en door het gebruik van steroiden en mogelijk methotrexaat. Necrose van de gewrichtsdelen leidt bij een deel van de patiënten tot blijvende invaliditeit. De individuele gevoeligheid van patiënten voor deze complicatie suggereert dat polymorfismen in bovenstaande en andere genen, zoals lipoproteinen (zoals aangetoond bij niet-ALL patiënten met familiaire AVN) betrokken zouden kunnen zijn bij het ontstaan van AVN. (14, 15)

GC induceren apoptose in GC gevoelige ALL cellen na binding aan de intracellulaire GC receptor (hGR). In de literatuur zijn een aantal mutaties van het hGR gen beschreven bij niet-leukemie patiënten, geassocieerd met glucocorticoid-ongevoeligheids syndromen. (16-20) Daarnaast zijn er van het hGR gen een aantal polymorfismen bekend met een verhoogde of verlaagde gevoeligheid

voorGC.(21, 22) Het ER22/23EK polymorfisme is geassocieerd met een verlaagde gevoeligheid voor GC. (23). De N363S en *BCL*I polymorfismen zijn geassocieerd met een verhoogde gevoeligheid voor GC met een hogere body mass index (BMI), een hoger percentage totaal lichaams vet en een hogere systolische en diastolische bloeddruk. (12, 24, 25).
De hypothese van deze studie is dat er een relatie is tussen bovengenoemde polymorfismen en het optreden van bijwerkingen tijdens de behandeling van kinderen met ALL danwel het effect van de therapie op de leukemische cellen.

Doel/vraagstelling van het onderzoek

1. Wat is de frequentie van optreden van de diverse bijwerkingen van GC bij de behandeling van kinderen met ALL.
2. Is er een relatie tussen polymorphismen van de hGR en van andere genen en
   a- het optreden van bijwerkingen van de behandeling
   b- de *in vivo* respons na 1 week behandeling met prednison en 1 intrathecale gift MTX
   c- de *in vitro* sensitiviteit voor prednisolon.
3. Is er een relatie tussen het optreden van bijwerkingen en de *in vivo* respons en/of *in vitro* gevoeligheid voor prednison bij kinderen met ALL.

3. De relevantie van het onderzoek voor leukemie op de kinderleeftijd

Door voorgesteld onderzoek zal meer inzicht verkregen worden in het optreden van bijwerkingen van glucocorticoiden bij de behandeling van kinderen met ALL. Tevens zullen mogelijk voor (ernstige) bijwerkingen predisponerende polymorfismen worden gevonden en zal mogelijk een oorzaak gevonden worden voor een verminderde gevoeligheid voor GC bij een deel van de kinderen met ALL.
Indien er risico factoren voor bijwerkingen gevonden worden, dan kan bij deze risico patiënten in de toekomst een betere surveillance worden betracht, waarbij bijvoorbeeld hypertensie, diabetes mellitus, botbreuken en AVN of psychische problemen sneller worden opgespoord en wellicht gerichte preventie of interventie kan plaatsvinden.

Eventuele preliminaire resultaten

In een pilotstudie bij 49 patiënten behandeld volgens het ALL9 protocol in ons instituut werd een ruim 6 keer verhoogde fractuur incidentie gevonden t.ov. normaal gezonde kinderen Dit fractuur risico bleek gecorreleerd aan de mate van afname van botdichtheid in de eerste 32 weken van de behandeling (5, 12). Tevens werd bij deze 49 kinderen genetische analyses uitgevoerd. Hieruit blijkt dat het fractuurrisico gerelateerd is aan het haplotype van VDR. Bij VDR en ER wordt gebruik gemaakt van een combinatie van polymorfismen, die samengevoegd worden tot een haplotype. Bij VDR worden de 3' polymorfismen *BsmI, ApaI* en *TaqI* samengevoegd tot verschillende haplotypes: 1 = baT (50%), 2 = BAt (35%), 3 = bAT (15%), 4 = BAT (<1%) en 5 = bAt (0%). De getallen tussen haakjes geven de frequentie aan van de haplotypes weer in een caucasische bevolking. Kinderen die drager zijn van één of twee allelen van het VDR haplotype 3 (bAT), de zogenaamde risico allelen, hebben een significant hoger fractuurrisico ten opzichte van niet-dragers(5). Dragers van een of twee T-allelen van het Sp1-polymorphisme van het collageen type I gen hadden een kleinere lengte, zowel bij diagnose als tijdens follow-up. Het *BclI* polymorphisme van de hGR bleek gerelateerd te zijn met percentage lichaamsvet.(12) Resultaten zijn onderdeel van onderzoeken naar genetische variatie in relatie tot osteoporose, fractuur risico en osteonecrose bij kinderen met ALL in ons instituut.
In een pilot studie bij 58 kinderen met ALL werd gezocht naar het optreden van mutaties of polymorfismen van het hGR gen in relatie tot *in vivo* of *in vitro* respons op GC. Dmv SSCP werden alle exonen van het hGR gen gescreend op mutaties. In geval van een afwijkend SSCP patroon werd de mutatie aangetoond dmv sequencing. Bij patiënten waarbij een mutatie werd gevonden in leukemisch materiaal, werd deze mutatie ook gevonden in normale bloedcellen tijdens CR van dezelfde patiënt daarmee bewijzend dat het inderdaad een polymorfisme betreft en geen mutatie in de leukemische cel. De reeds beschreven polymorfismen ER22/23EK, N363S, *BCL*I, G/T mutatie in intron 4 - 16 nucleotides upstream van exon 5, H588H en N766N werden gevonden. Het aantal patiënten in deze pilot studie is te klein om een conclusie te kunnen trekken betreffende een mogelijke relatie tussen de polymorfismen en *in vivo* of *in vitro* gevoeligheid voor cytostatica. De frequentie van optreden van de polymorfismen bedroeg resp 3%, 14%, 54%, 41%, 1.7% en 20%. Dit is vergelijkbaar met de percentages zoals gevonden in de literatuur in de gezonde populatie, behalve voor N363S, dat in een 2-4 x hoger percentage voorkomt. Het aantal patiënten is te klein om de gevonden polymorfismen te relateren aan de *in vivo* en *in vitro* gevoeligheid voor GC.

Een (korte) beschrijving van de te gebruiken onderzoeksmethoden

1. De bijwerking worden geregistreerd volgens WHO criteria en SD scores voor lineaire parameters
2. *In vivo* prednison response bepaald als aantal blasten in het perifere bloed na 7 dagen monotherapie prednison en 1 intrathecale gift MTX. PGR: <1000 blasten / ul, PPR: >= 1000 blasten / ul (26)
3. *In vitro* prednisolone response als bepaald met de MTT test(27)
4. Taqman analyse en sequencing: Genetische polymorfismen en mutaties (oa ER22/23EK, N363S, *BCL*I) dmv , bepaald op initieel leukemische cellen en normale perifere bloedcellen ten tijde van complete remissie (dag 33). De perifere bloedcellen ten tijde van CR worden tevens gebruikt voor:
5. PCR-RLFP(restriction length polymorphism analysis) voor ER en COLLIa1 polymorfismen
6. Semi-automated SnaPshot SBE voor VDR gen polymorfismen
7. Serum-analyse van eiwitten betrokken bij botstofwisseling (calcium, alkalische fosfatase, procollageen, telepeptide).

6. Kwantificering van het gevraagde materiaal/gegevens (zo nodig met statistische onderbouwing)

a) Bijwerkingen zullen worden geïnventariseerd op 4 a 5 vaste tijdspunten:
- bij diagnose
- dag 33

SR: a- bij start SR protocol - voor start blok IV
b- start onderhouds behandeling
c- einde therapie

MR: a- bij start MR protocol - voor start intensificatie protocol
b- bij start MTX / 6MP onderhoud
c- einde therapie

HR: a- bij start HR protocol
b- einde therapie

b) Registratie bijwerkingen volgens WHO criteria (tabel 1), anthropometrische gegevens (lengte, gewicht, leeftijd, geslacht), bloeddruk, Tanner score en dieetlijst (gevalideerd, (28)) op de tijdpunten zoals genoemd bij (5). SD scores worden berekend (zie tabel 1) voor de analyse

c) Uitslagen prednison respons

d) Patiënten materiaal:

Bij diagnose: per patiënt 5 x 10^6 leukemische cellen voor het verrichten van de MTT test en 10 x 10^6voor de extractie van DNA voor het bepalen van mutaties / polymorfismen.
3 ml Serum (kan verkregen worden uit heparinebloed) voor analyse eiwitten betrokken bij botstofwisseling (calcium, alkalische fosfatase, procollageen, telopeptide).

Dag 33: 10 x 10^6 PBMCs voor DNA extractie om te kunnen differentieren tussen polymorfismen en mutaties

Statistische analyse
Relaties tussen polymorfismen bijwerkingen, en *in vivo* en *in vitro* gevoeligheid voor GC van de ALL cellen zal worden geanalyseerd dmv een Chi-square test.

Bepalingen in de tijd:

Vragenlijst	I		I	I	I	I
Serum	I					
Predn response		I				
heparine bloed (DNA)			I			
BM aspiraat	I					
Dag	0	8	33			
Week	0	1		28	start OH	stop Rx

Tabel I, WHO criteria bijwerkingen

	Graad 0	Graad 1	Graad 2	Graad 3	Graad 4
1- skelet toxiciteit					
Avasculaire botnecrose[$]	geen	Asymptomatisch, ontdekt met beeldvorming	Symptomatisch, zonder invloed op ADL activiteiten	Symptomatisch, invloed op activiteiten ADL	Symptomatisch en invaliderend
2- Neurologische toxiciteit					
Stemmings verandering – depressie	normaal	milde stemmings veranderingen niet interferend met normaal functioneren	milde stemmings veranderingen interferend met normaal functioneren, maar niet met ADL activiteiten	Ernstige stemmings veranderingen interferend met ADL activiteiten	Suicidaal of gevaar voor zichzelf
Stemmings verandering – euforie	normaal	milde stemmings veranderingen niet interferend met normaal functioneren	milde stemmings veranderingen interferend met normaal functioneren, maar niet met ADL activiteiten	Ernstige stemmings veranderingen interferend met ADL activiteiten	Suicidaal of gevaar voor zichzelf
Slaap problemen	geen	Soms slaapproblemen, geen invloed op algemeen functioneren	Slaapproblemen, interfererend met algemeen functioneren, maar niet met ADL	Frequent slaapproblemen, interfererend met ADL	invaliderend
3- Gastro-intestinaal					
Maagulcus	Geen/ profylactische medicatie		Medicamenteuse behandeling obv symptomen	Bloeding zonder perforatie, onvoldoende onder controle met poliklinische medicamenteuse behandeling, opname noodzakelijk	Perforatie / bloeding waarvoor spoed operatie noodzakelijke
Bilirubine	Normaal (N)	> N – 1.5 x N	> 1.5 x N – 3 x N	> 3 x N – 10 x N	> 10 x N
GOT / GPT	Normaal (N)	> N – 2.5 x N	> 2.5 x N – 5 x N	> 5 x N – 20 x N	> 20 x N

[$)] = aanhoudende pijnklachten in gewrichten/extremiteiten die niet in verband kunnen worden gebracht met de toediening van vincristine. In dat geval wordt een MRI (dus geen röntgen foto) geadviseerd om de AVN vast te leggen

Bijwerkingen registratie - 2

1- Uiterlijke kenmerken		
Cushingoid gezicht	nee	Ja
Acne	nee	Ja
Striae	nee	Ja
2- Lichaamssamenstelling / groeigegevens		
Botbreuken	geen	>0
3- Overige		
Opportunistische infecties	nee	Ja
Diabetes Mellitus	Glucose < 11	Glucose > 11 of insuline behoefte
4- Lineaire gegevens		
Hypertensie	normaal	> + 2SD(leeftijd en geslacht)
gewicht	normaal	>+2SD gewicht naar lengte (leeftijd en geslac
Groeisnelheid	normaal	< +2SD (leeftijd en geslacht)
BMI	normaal	> +2SD (leeftijd en geslacht)
Hypertensie	normaal	> + 2SD(leeftijd en geslacht)

7. Literatuurlijst van het onderzoeksveld

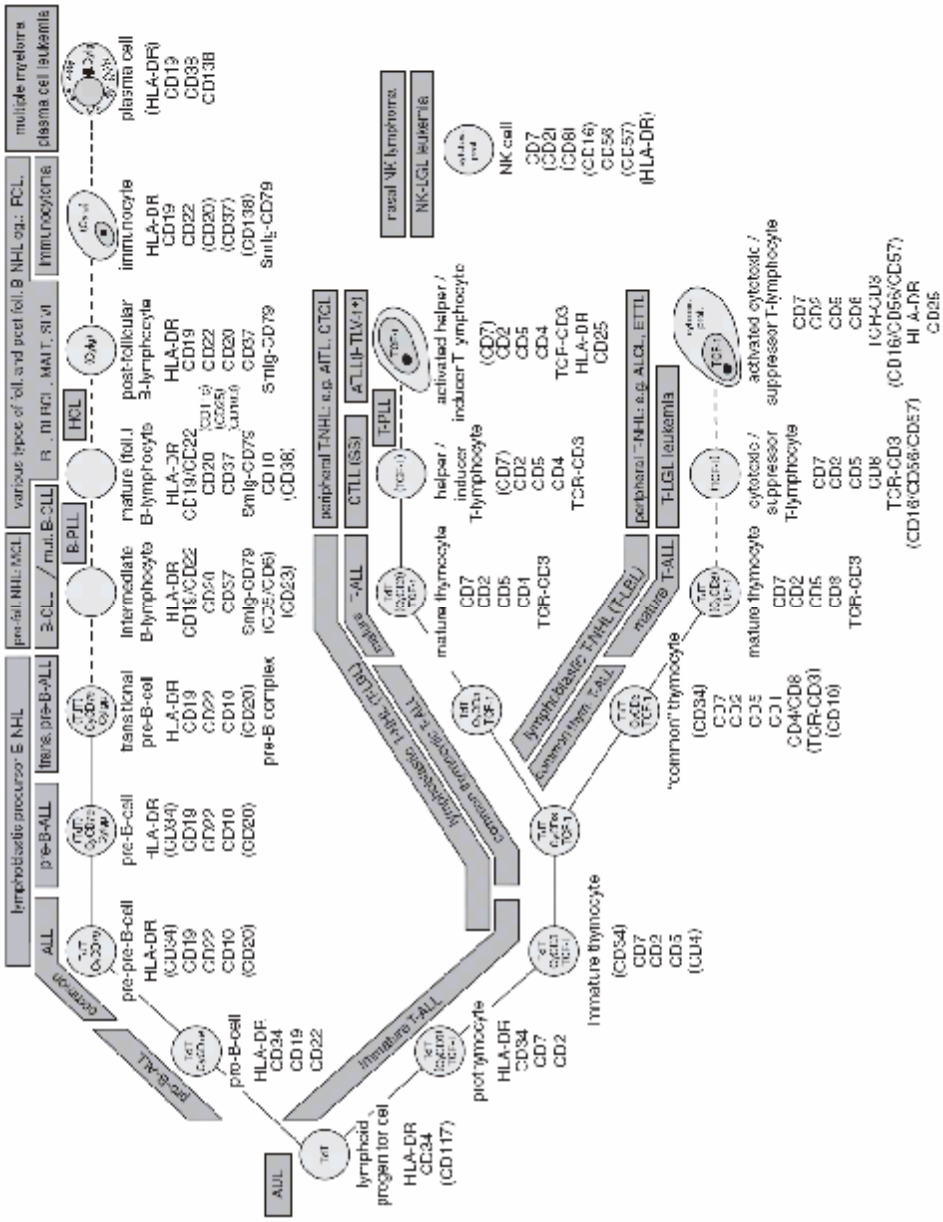
1. Jansen AGSC, Hakvoort-Cammel FGAJ, Hahlen K, Bruining GJ. Hyperglycemia during treatment of acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study (submitted).
2. Lozada F, Silverman S, Jr., Migliorati C. Adverse side effects associated with prednisone in the treatment of patients with oral inflammatory ulcerative diseases. J Am Dent Assoc 1984;109(2):269-70.
3. Marcocci C, Bartalena L, Tanda ML, Manetti L, Dell'Unto E, Rocchi R, et al. Comparison of the effectiveness and tolerability of intravenous or oral glucocorticoids associated with orbital radiotherapy in the management of severe Graves' ophthalmopathy: results of a prospective, single-blind, randomized study. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(8):3562-7.
4. Soliday E, Grey S, Lande MB. Behavioral effects of corticosteroids in steroid-sensitive nephrotic syndrome. Pediatrics 1999;104(4):e51.
5. van der Sluis IM, van den Heuvel-Eibrink MM, Hahlen K, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM. Altered bone mineral density and body composition, and increased fracture risk in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr 2002;141(2):204-10.
6. Sainz J, Van Tornout JM, Loro ML, Sayre J, Roe TF, Gilsanz V. Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. N Engl J Med 1997;337(2):77-82.
7. Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. Nat Genet 1996;14(2):203-5.
8. Boot AM, van der Sluis IM, de Muinck Keizer-Schrama SM, van Meurs JBJ, Krenning EP, Pols HA, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphism and bone mineral density in healthy children and young adults. Calcif Tissue Int (in press) 2004.
9. Sainz J, Van Tornout JM, Sayre J, Kaufman F, Gilsanz V. Association of collagen type 1 alpha1 gene polymorphism with bone density in early childhood. J Clin Endocrinol Metab 1999;84(3):853-5.
10. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FE, Grant SF, et al. Relation of alleles of the collagen type Ialpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. N Engl J Med 1998;338(15):1016-21.
11. Uitterlinden AG, Pols HA, Burger H, Huang Q, Van Daele PL, Van Duijn CM, et al. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. J Bone Miner Res 1996;11(9):1241-8.
12. Beek RDv, Heuvel-Eibrink MMvd, muinck Keizer-Schrama SMPFd, Rossum EFCv, Uitterlinden AG, Pieters R. Influence of genetic polymorphisms of the glucocorticoid receptor, estrogen receptor, vitamin D receptor and collagen type 1 genes on bone mineral density, body composition and fracture risk in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Blood 2003;102(11):383a.
13. Mattano LA, Jr., Sather HN, Trigg ME, Nachman JB. Osteonecrosis as a complication of treating acute lymphoblastic leukemia in children: a report from the Children's Cancer Group. J Clin Oncol 2000;18(18):3262-72.
14. Berger CE, Kluger R, Urban M, Kowalski J, Haas OA, Engel A. Elevated levels of lipoprotein(a) in familial bone marrow edema syndrome of the hip. Clin Orthop 2000(377):126-31.
15. Lackner C, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). Hum Mol Genet 1993;2(7):933-40.
16. Karl M, Lamberts SWJ, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, et al. Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. journal of clinical endocrinology and metabolism 1993;76(3):683-9.
17. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, et al. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. J Clin Invest 1991;87(2):680-6.
18. Karl M, Lamberts SW, Koper JW, Katz DA, Huizenga NE, Kino T, et al. Cushing's disease preceded by generalized glucocorticoid resistance: clinical consequences of a novel, dominant-negative glucocorticoid receptor mutation. Proc Assoc Am Physicians 1996;108(4):296-307.
19. Malchoff DM, Brufsky A, Reardon G, McDermott P, Javier EC, Bergh CH, et al. A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. J Clin Invest 1993;91(5):1918-25.
20. Ruiz M, Lind U, Gafvels M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, et al. Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. Clin Endocrinol 2001;55(3):363-71.
21. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, et al. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. Hum Genet 1997;99(5):663-8.

22. Feng J, Zheng J, Bennett WP, Heston LL, Jones IR, Craddock N, et al. Five missense variants in the amino-terminal domain of the glucocorticoid receptor: No association with puerperal psychosis or schizophrenia. Am J Med Genet 2000;96(3):412-7.
23. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. Diabetes 2002;51(10):3128-34.
24. Van Rossum EF, Koper JW, Van Den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, et al. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. Clin Endocrinol (Oxf) 2003;59(5):585-92.
25. Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, et al. The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. Clin Endocrinol (Oxf) 2003;59(1):68-74.
26. Lauten M, Stanulla M, Zimmermann M, Welte K, Riehm H, Schrappe M. Clinical outcome of patients with childhood acute lymphoblastic leukaemia and an initial leukaemic blood blast count of less than 1000 per microliter. Klin Padiatr 2001;213(4):169-74.
27. Pieters R, Loonen AH, Huismans DR, Broekema GJ, Dirven MW, Heyenbrok MW, et al. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. Blood 1990;76(11):2327-36.
28. Boot AM, de Ridder MA, Pols HA, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM. Bone mineral density in children and adolescents: relation to puberty, calcium intake, and physical activity. J Clin Endocrinol Metab 1997;82(1):57-62.

18. BEREKENING LICHAAMSOPPERVLAK (VOLGENS GEHAN AND GEORGE)

Height (cm)	Weight (kg)																							
	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	44	48	52	56	60
50	0,25	0,31	0,36	0,40	0,44	0,48	0,51	0,54	0,57	0,6	0,63	0,66	0,68	0,71	0,73	0,75	0,78	0,8	0,82	0,86	0,9	0,94	0,97	1,01
55	0,26	0,32	0,37	0,42	0,46	0,50	0,53	0,57	0,60	0,63	0,66	0,68	0,71	0,74	0,76	0,78	0,81	0,83	0,85	0,9	0,94	0,98	1,01	1,05
60	0,27	0,33	0,39	0,43	0,48	0,52	0,55	0,59	0,62	0,65	0,68	0,71	0,74	0,76	0,79	0,81	0,84	0,86	0,88	0,93	0,97	1,01	1,05	1,09
65	0,28	0,34	0,40	0,45	0,49	0,53	0,57	0,61	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,79	0,82	0,84	0,87	0,89	0,91	0,96	1,00	1,05	1,09	1,13
70	0,29	0,36	0,41	0,46	0,51	0,55	0,59	0,63	0,66	0,69	0,73	0,76	0,79	0,81	0,84	0,87	0,89	0,92	0,94	0,99	1,04	1,08	1,12	1,16
75	0,30	0,37	0,42	0,48	0,52	0,57	0,61	0,64	0,68	0,71	0,75	0,78	0,81	0,84	0,87	0,89	0,92	0,95	0,97	1,02	1,07	1,11	1,16	1,20
80	0,31	0,38	0,44	0,49	0,54	0,58	0,62	0,66	0,70	0,73	0,77	0,80	0,83	0,86	0,89	0,92	0,95	0,97	1,00	1,05	1,10	1,14	1,19	1,23
85	0,31	0,39	0,45	0,50	0,55	0,60	0,64	0,68	0,72	0,75	0,79	0,82	0,85	0,88	0,91	0,94	0,97	1,00	1,02	1,08	1,13	1,17	1,22	1,26
90	0,32	0,40	0,46	0,51	0,56	0,61	0,65	0,70	0,73	0,77	0,81	0,84	0,87	0,91	0,94	0,97	0,99	1,02	1,05	1,10	1,15	1,20	1,25	1,29
95	0,33	0,40	0,47	0,53	0,58	0,63	0,67	0,71	0,75	0,79	0,83	0,86	0,89	0,93	0,96	0,99	1,02	1,05	1,07	1,13	1,18	1,23	1,28	1,32
	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	48	52	56	60	64	68	72
100	0,59	0,64	0,68	0,73	0,77	0,81	0,84	0,88	0,91	0,95	0,98	1,01	1,04	1,07	1,10	1,13	1,15	1,21	1,26	1,30	1,35	1,40	1,44	1,48
105	0,60	0,65	0,70	0,74	0,78	0,82	0,86	0,90	0,93	0,97	1,00	1,03	1,06	1,09	1,12	1,15	1,18	1,23	1,28	1,33	1,38	1,43	1,47	1,52
110	0,61	0,67	0,71	0,76	0,80	0,84	0,88	0,92	0,95	0,99	1,02	1,05	1,08	1,11	1,14	1,17	1,20	1,25	1,31	1,36	1,41	1,45	1,50	1,55
115	0,63	0,68	0,73	0,77	0,81	0,86	0,89	0,93	0,97	1,00	1,04	1,07	1,10	1,13	1,16	1,19	1,22	1,28	1,33	1,38	1,43	1,48	1,53	1,58
120	0,64	0,69	0,74	0,79	0,83	0,87	0,91	0,95	0,99	1,02	1,06	1,09	1,12	1,15	1,19	1,22	1,24	1,30	1,36	1,41	1,46	1,51	1,56	1,60
125	0,65	0,70	0,75	0,80	0,84	0,89	0,93	0,97	1,00	1,04	1,07	1,11	1,14	1,17	1,21	1,24	1,27	1,32	1,38	1,43	1,49	1,54	1,58	1,63
130	0,66	0,71	0,77	0,81	0,86	0,90	0,94	0,98	1,02	1,06	1,09	1,13	1,16	1,19	1,23	1,26	1,29	1,35	1,40	1,46	1,51	1,56	1,61	1,66
135	0,67	0,73	0,78	0,83	0,87	0,92	0,96	1,00	1,04	1,07	1,11	1,15	1,18	1,21	1,25	1,28	1,31	1,37	1,43	1,48	1,53	1,59	1,64	1,69
140	0,68	0,74	0,79	0,84	0,89	0,93	0,97	1,01	1,05	1,09	1,13	1,16	1,20	1,23	1,26	1,30	1,33	1,39	1,45	1,50	1,56	1,61	1,66	1,71
145	0,69	0,75	0,80	0,85	0,90	0,94	0,99	1,03	1,07	1,11	1,14	1,18	1,22	1,25	1,28	1,32	1,35	1,41	1,47	1,53	1,58	1,64	1,69	1,74
	30	34	38	42	46	50	54	58	62	66	70	74	78	82	86	90	94	98	102	106	110	114	118	122
150	1,12	1,20	1,27	1,34	1,40	1,46	1,52	1,58	1,63	1,69	1,74	1,79	1,84	1,88	1,93	1,98	2,02	2,07	2,11	2,15	2,19	2,23	2,27	2,31
155	1,14	1,21	1,29	1,35	1,42	1,48	1,54	1,60	1,65	1,71	1,76	1,81	1,86	1,91	1,96	2,00	2,05	2,09	2,14	2,18	2,22	2,26	2,30	2,34
160	1,15	1,23	1,30	1,37	1,44	1,50	1,56	1,62	1,68	1,73	1,78	1,84	1,89	1,94	1,98	2,03	2,08	2,12	2,17	2,21	2,25	2,29	2,34	2,38
165	1,17	1,25	1,32	1,39	1,46	1,52	1,58	1,64	1,70	1,75	1,81	1,86	1,91	1,96	2,01	2,06	2,10	2,15	2,19	2,24	2,28	2,32	2,37	2,41
170	1,18	1,26	1,34	1,41	1,48	1,54	1,60	1,66	1,72	1,78	1,83	1,88	1,94	1,99	2,04	2,08	2,13	2,18	2,22	2,27	2,31	2,35	2,40	2,44
175	1,20	1,28	1,35	1,43	1,49	1,56	1,62	1,68	1,74	1,80	1,85	1,91	1,96	2,01	2,06	2,11	2,16	2,20	2,25	2,30	2,34	2,38	2,43	2,47
180	1,21	1,29	1,37	1,44	1,51	1,58	1,64	1,70	1,76	1,82	1,88	1,93	1,98	2,04	2,09	2,13	2,18	2,23	2,28	2,32	2,37	2,41	2,45	2,50
	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100	104	108	112	116	120	124	128	132
185	1,42	1,49	1,56	1,63	1,69	1,75	1,81	1,87	1,93	1,98	2,03	2,08	2,13	2,18	2,23	2,28	2,33	2,37	2,42	2,46	2,50	2,55	2,59	2,63
190	1,44	1,51	1,58	1,65	1,71	1,77	1,83	1,89	1,95	2,00	2,06	2,11	2,16	2,21	2,26	2,31	2,35	2,40	2,44	2,49	2,53	2,58	2,62	2,66
195	1,45	1,53	1,60	1,67	1,73	1,79	1,85	1,91	1,97	2,02	2,08	2,13	2,18	2,23	2,28	2,33	2,38	2,43	2,47	2,52	2,56	2,60	2,65	2,69
200	1,47	1,54	1,62	1,68	1,75	1,81	1,87	1,93	1,99	2,05	2,10	2,15	2,21	2,26	2,31	2,36	2,40	2,45	2,50	2,54	2,59	2,63	2,68	2,72
205	1,49	1,56	1,63	1,70	1,77	1,83	1,89	1,95	2,01	2,07	2,12	2,18	2,23	2,28	2,33	2,38	2,43	2,48	2,52	2,57	2,62	2,66	2,70	2,75
210	1,50	1,58	1,65	1,72	1,79	1,85	1,91	1,97	2,03	2,09	2,14	2,20	2,25	2,30	2,36	2,41	2,45	2,50	2,55	2,60	2,64	2,69	2,73	2,77
215	1,52	1,59	1,67	1,74	1,80	1,87	1,93	1,99	2,05	2,11	2,17	2,22	2,27	2,33	2,38	2,43	2,48	2,53	2,58	2,62	2,67	2,71	2,76	2,80
220	1,53	1,61	1,68	1,75	1,82	1,89	1,95	2,01	2,07	2,13	2,19	2,24	2,30	2,35	2,40	2,45	2,50	2,55	2,60	2,65	2,69	2,74	2,79	2,83

19. HYPOTHETISCH SCHEMA LYMFATISCHE DIFFERENTIATIE



20. PERFORMANCE STATUS

LANSKY Score – for children aged to 9 years

Lansky Score	Performance Status
100	Fully active, normal
90	Minor restrictions in physically strenous activity
80	Active, but tires more quickly
70	Both greater restriction of and less time spent in play activity
60	Up and around, but minimal active play; keeps busy with quieter activities
50	Gets dressed but lies around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities
40	Mostly in bed; participates in quiet activities
30	In bed; needs assistance even for quiet play
20	Often sleeping; play entirely limited to very passsive activities
10	No play; does not get out of bed
0	Unresponsive

KARNOFSKY Score – for children aged 10 years and older

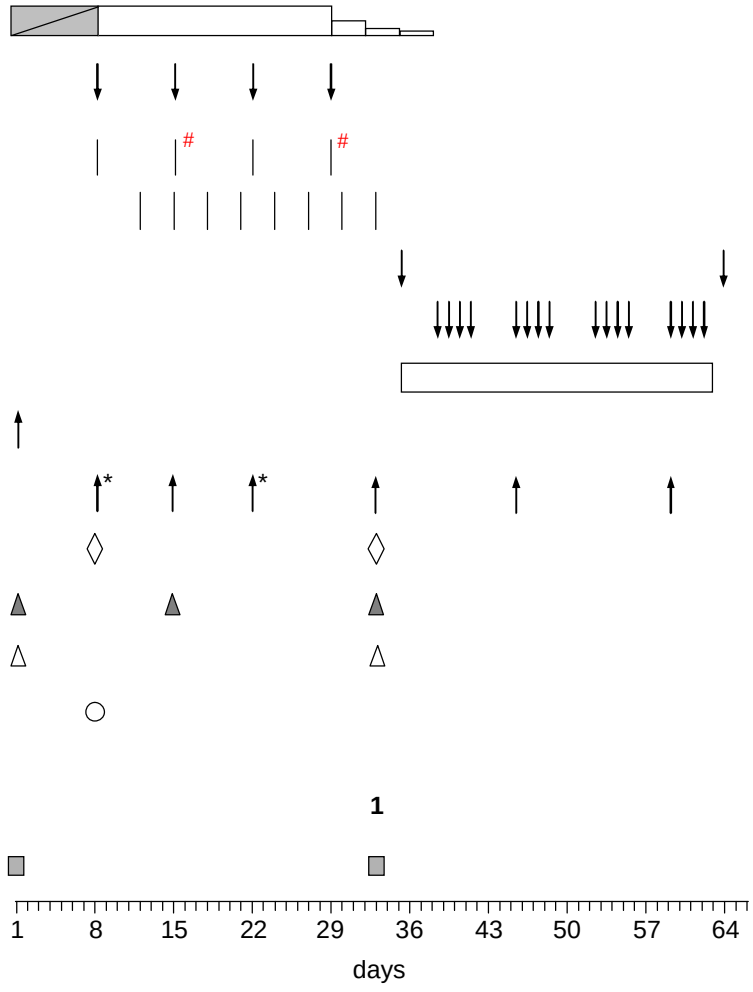
Karnofsky Score	General Category	Performance Status
100	Able to carry on normal activity, no special care needed	Normal, no complaints, no evidence of disease
90	Able to carry on normal activity, no special care needed	Able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease
80	Able to carry on normal activity, no special care needed	Normal actviity with effort, some signs or symptoms of disease
70	Unable to work, able to live at home and care for most personal needs, varying amount of assistance needed	Cares for self, unable to carry on normal activity or to do work
60	Unable to work, able to live at home and care for most personal needs, varying amount of assistance needed	Requires occasional assitance from others but able to care for most needs
50	Unable to work, able to live at home and care for most personal needs, varying amount of assistance needed	Requires considerable assistance from others; frequent medical care
40	Unable to care for self, requires institutional or hospital care or equivalent, disease may be rapidly progressing	Disabled, requires special care and assistance
30	Unable to care for self, requires institutional or hospital care or equivalent, disease may be rapidly progressing	Severly disabled, hospitalization indicated; death not imminent
20	Unable to care for self, requires institutional or hospital care or equivalent, disease may be rapidly progressing	Very sick, hospitalization necesary, active supportive treatment necessary
10	Unable to care for self, requires institutional or hospital care or equivalent, disease may be rapidly progressing	Moribund
0		Dead

21. THERAPIESCHEMA'S

a. protocol I
b. protocol M
c. protocol IV
d. maintenance SR patienten
e. protocol DCOG intensification/continuation MR patients week 1-36
f. protocol DCOG intensification/continuation MR patients week 37-84
g. overzichtsschema HR patients
h. HR 1
i. HR 2
j. HR 3
k. HR 4
l. HR 5
m. HR 6
n. protocol II
o. maintenance HR patients
p. overzichtsschema

PROTOCOL I (A and B)

PRED	PO 60 mg/m^2/day
VCR	IV push 1.5 mg/m^2/dose max 2.0 mg/dose
DNR	IV 1hr 30 mg/m^2/dose
ASP (E.Coli)	IV 1hr 5,000 IU/m^2/dose
CPM	IV 1hr 1,000 mg/m^2/dose
ARA-C	IV push 75 mg/m^2/dose
6-MP	PO 60 mg/m^2/day
MTX	ITH acc. to age
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
Peripheral blood (to SKION lab)	
BMP (to SKION lab)	
LP (to SKION lab)	
Prednisone response (WBC + diff.count) (to SKION lab)	
MRD time point	
NCI toxicity preceding period	



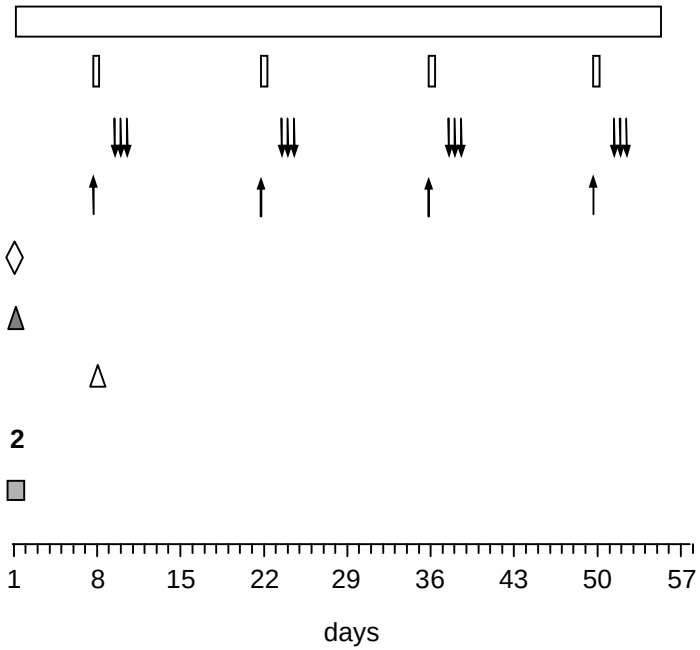
*Only children with CNS involvement, CNS2, or TLP+ at diagnosis.

not in children with Down Syndrome

PROTOCOL M

6-MP	PO 25 mg/m^2/day
HD-MTX	IV 24hrs 5,000 mg/m^2/dose#
LEUKOVORIN	IV push 15 mg/m^2/dose
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
Peripheral blood (to SKION lab)	
BMP (to SKION lab)	
LP	
MRD time point	**2**
NCI toxicity preceding period	

1000 mg/m^2/dose in children with DOWN Syndrome



PROTOCOL IV

DEXA PO 10 mg/m^2/day

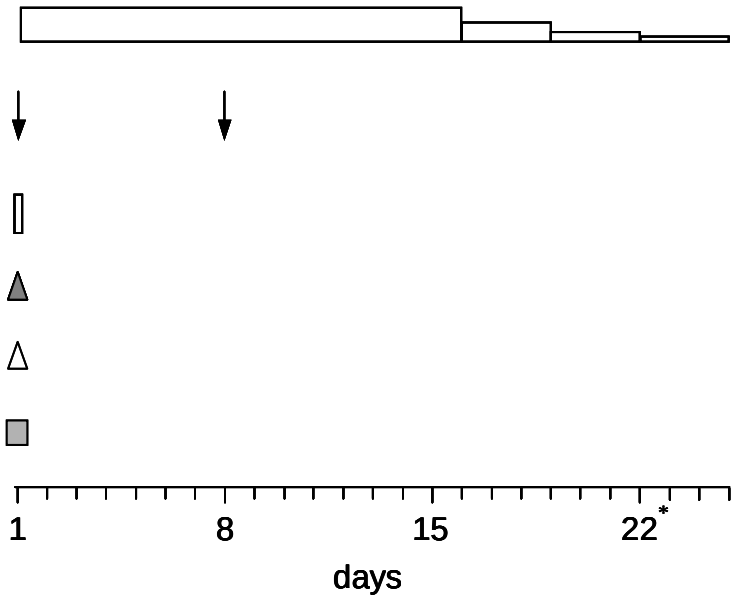
VCR IV push 1.5 mg/m^2/dose
max 2.0 mg/dose

PEG-ASP IV 1hr 2,500 IU/m^2/dose

BMP (to SKION lab)

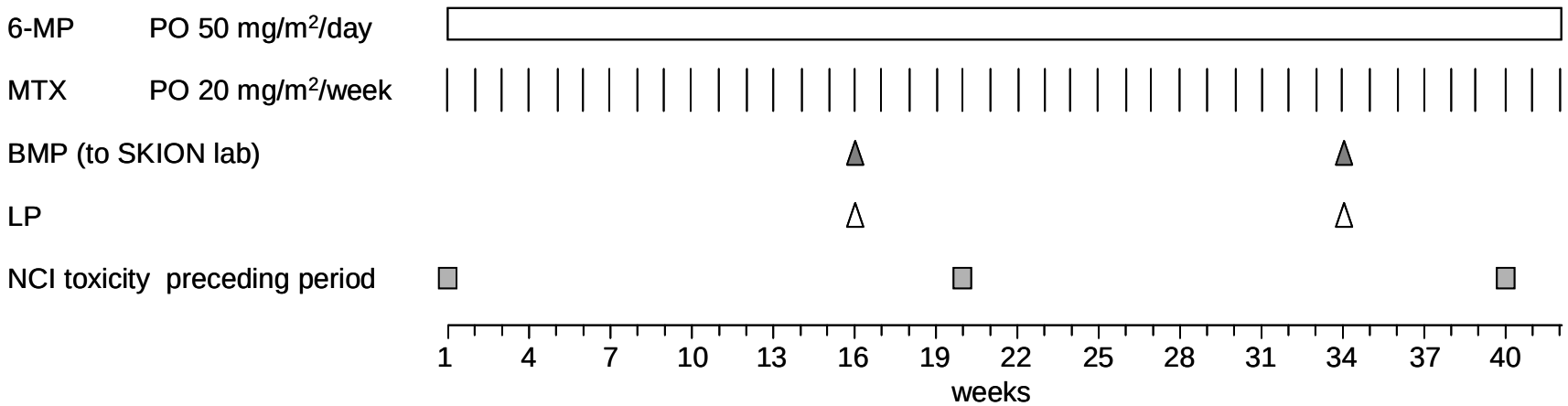
LP

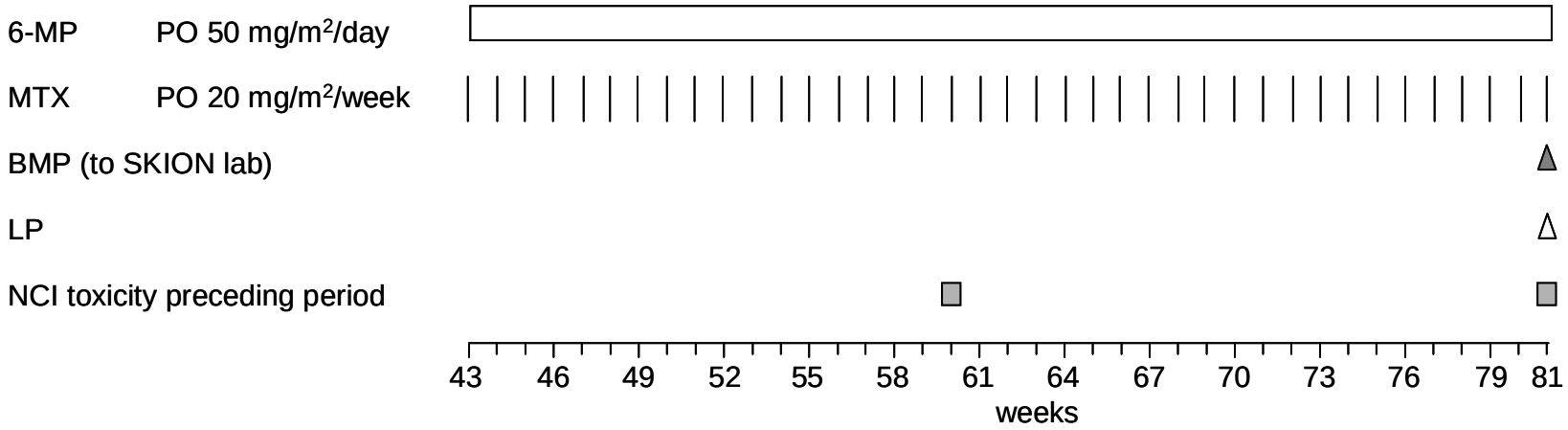
NCI toxicity preceding period



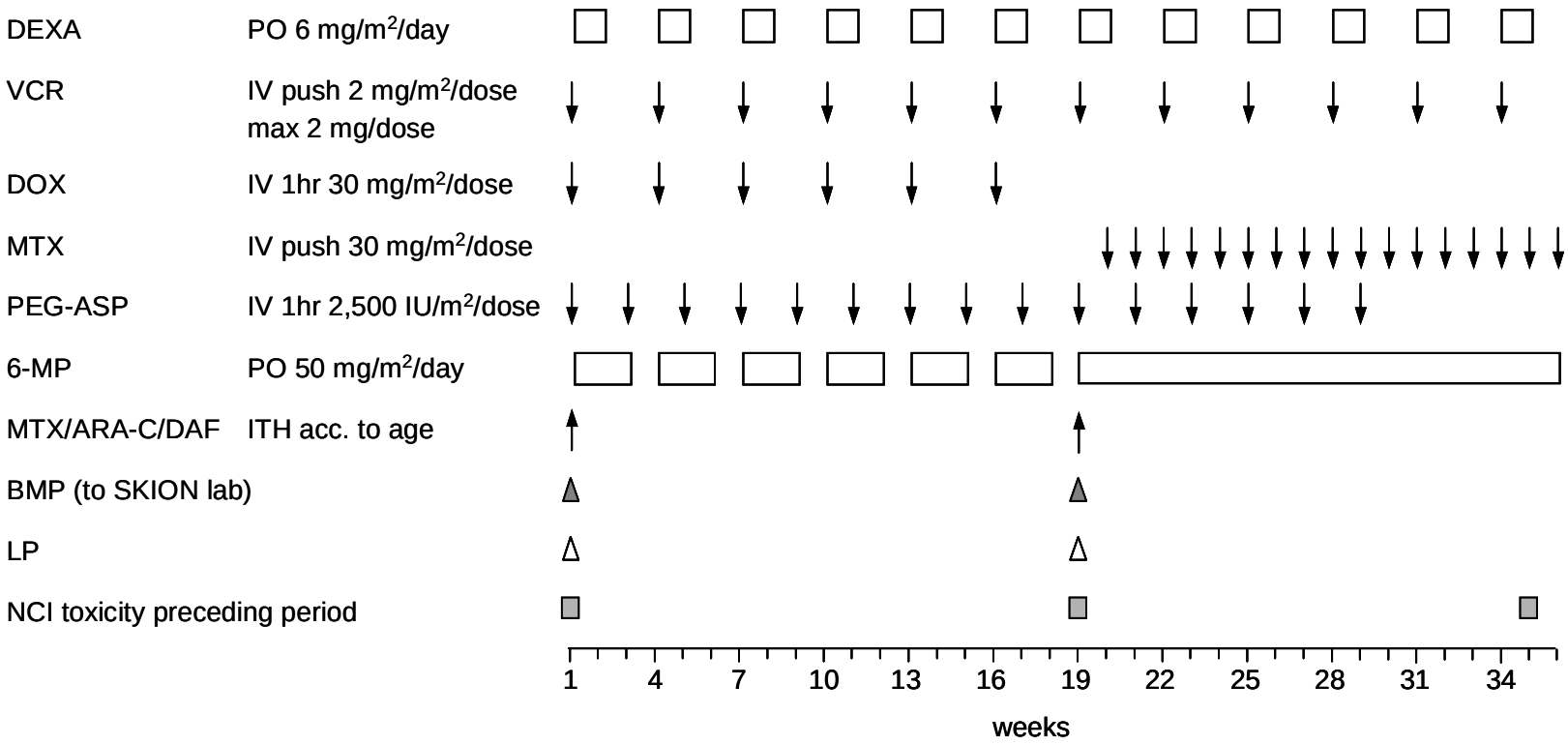
* Start maintenance treatment at day 22

SR-MAINTENANCE

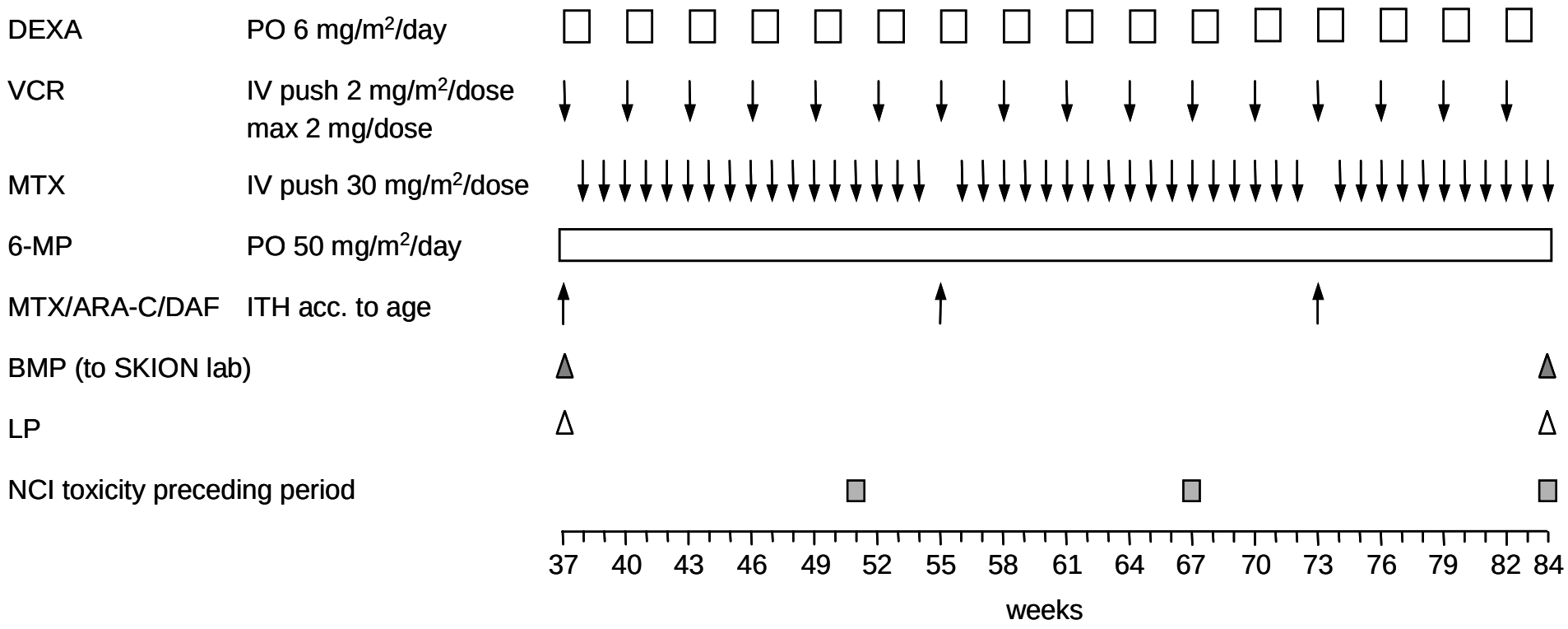




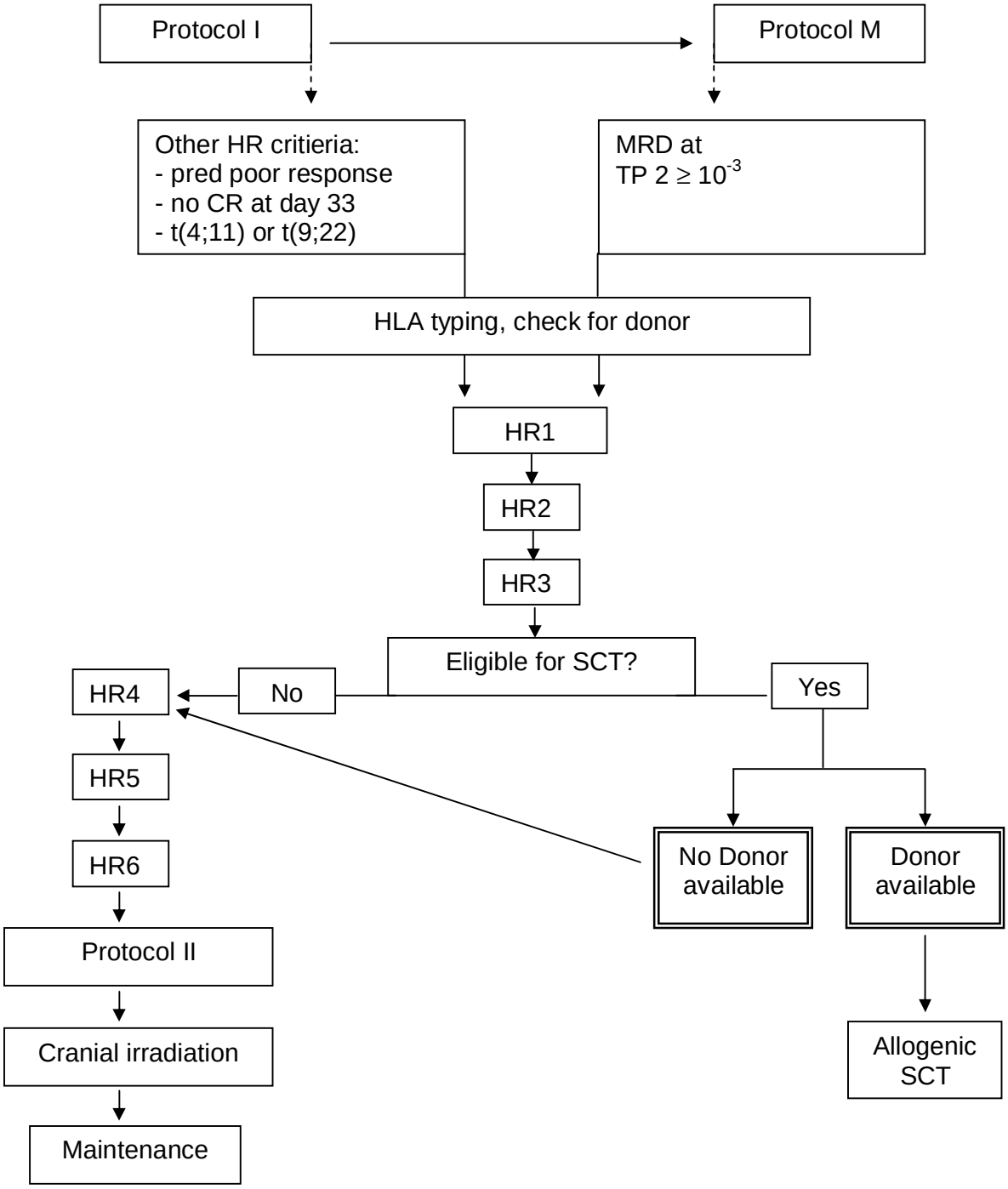
DCOG - INTENSIFICATION/CONTINUATION MR PATIENTS part 1



DCOG - INTENSIFICATION/CONTINUATION MR PATIENTS part 2

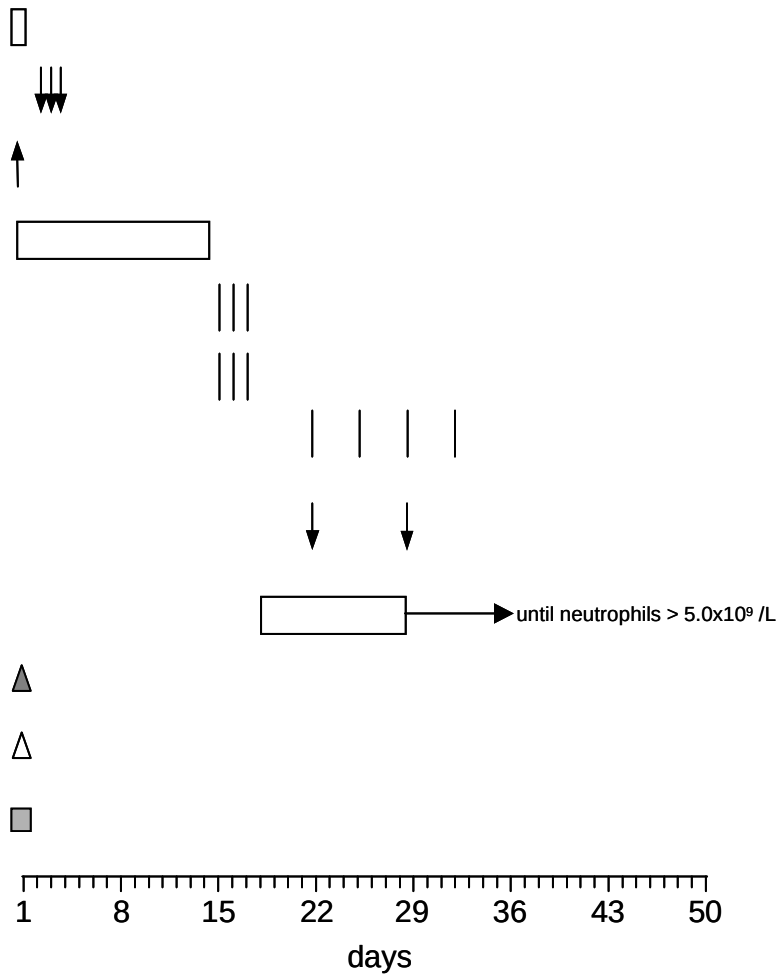


THERAPY FOR HIGH RISK PATIENTS



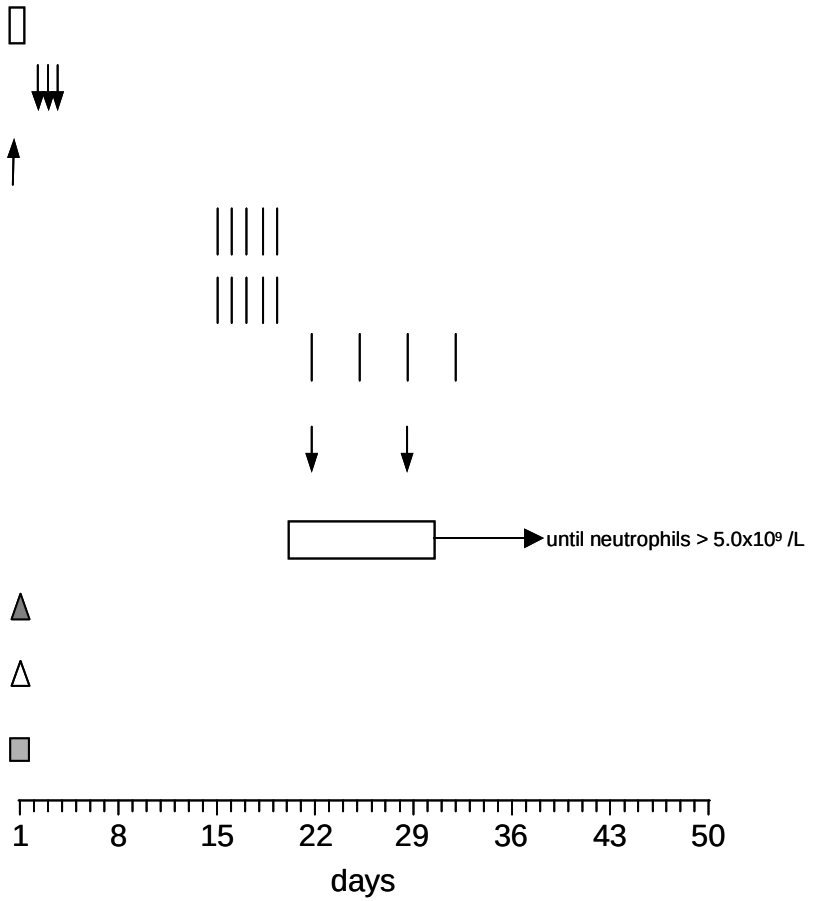
HR COURSE 1 (HR1)

HD-MTX	IV 24hrs 5,000 mg/m^2
LEUKOVORIN	IV push 15 mg/m^2/dose
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
6-MP	PO 25 mg/m^2/day
CPM	IV 1hr 1,200 mg/m^2/dose
VP-16	IV 2hrs 350 mg/m^2/dose
ASP (E.Coli)	IV 1hr 10,000 IU/m^2/dose
VCR	IV push 1.5 mg/m^2/dose max 2.0 mg/dose
G-CSF	SC 5 µg/kg/day
BMP (to SKION lab)	
LP	
NCI toxicity preceding period	



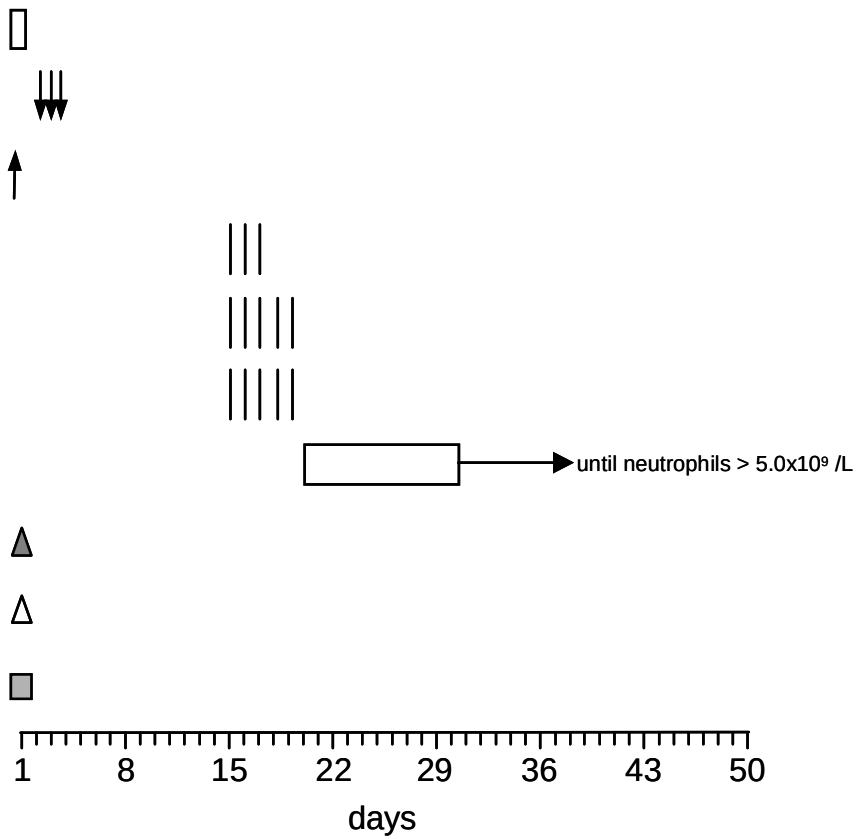
HR COURSE 2 (HR2)

HD-MTX	IV 24 hrs 5,000 mg/m^2
LEUKOVORIN	IV push 15 mg/m^2/dose
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
HD-ARA-C	IV 3hrs 1,500 mg/m^2/dose
MITOX	IV 30min 5.25 mg/m^2/dose
ASP (E.Coli)	IV 1hr 10,000 IU/m^2/dose
VCR	IV push 1.5 mg/m^2/dose max 2.0 mg/dose
G-CSF	SC 5 µg/kg/day
BMP (to SKION lab)	
LP	
NCI toxicity preceding period	



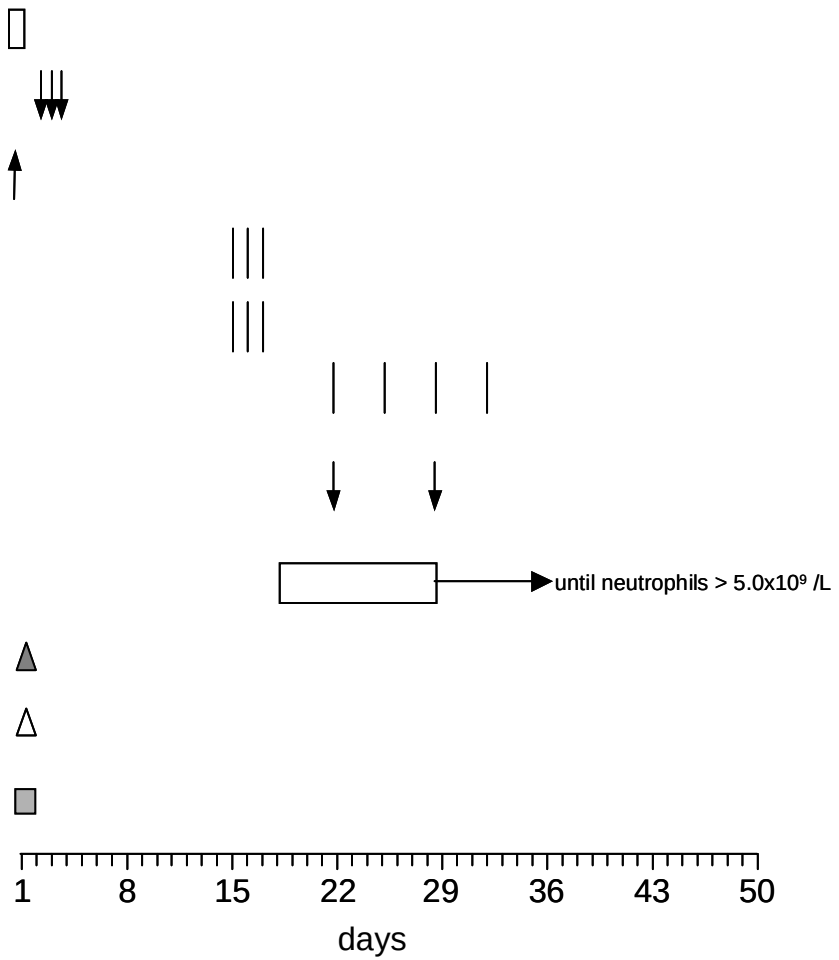
HR COURSE 3 (HR3)

HD-MTX	IV 24hrs 5,000 mg/m^2
LEUKOVORIN	IV push 15 mg/m^2/dose
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
IDA	IV 1hr 6 mg/m^2/dose
FLU	IV 30min 22.5 mg/m^2/dose
HD-ARA-C	IV 4hrs 1,500 mg/m^2/dose
G-CSF	SC 5 µg/kg/day
BMP (to SKION lab)	
LP	
NCI toxicity preceding period	



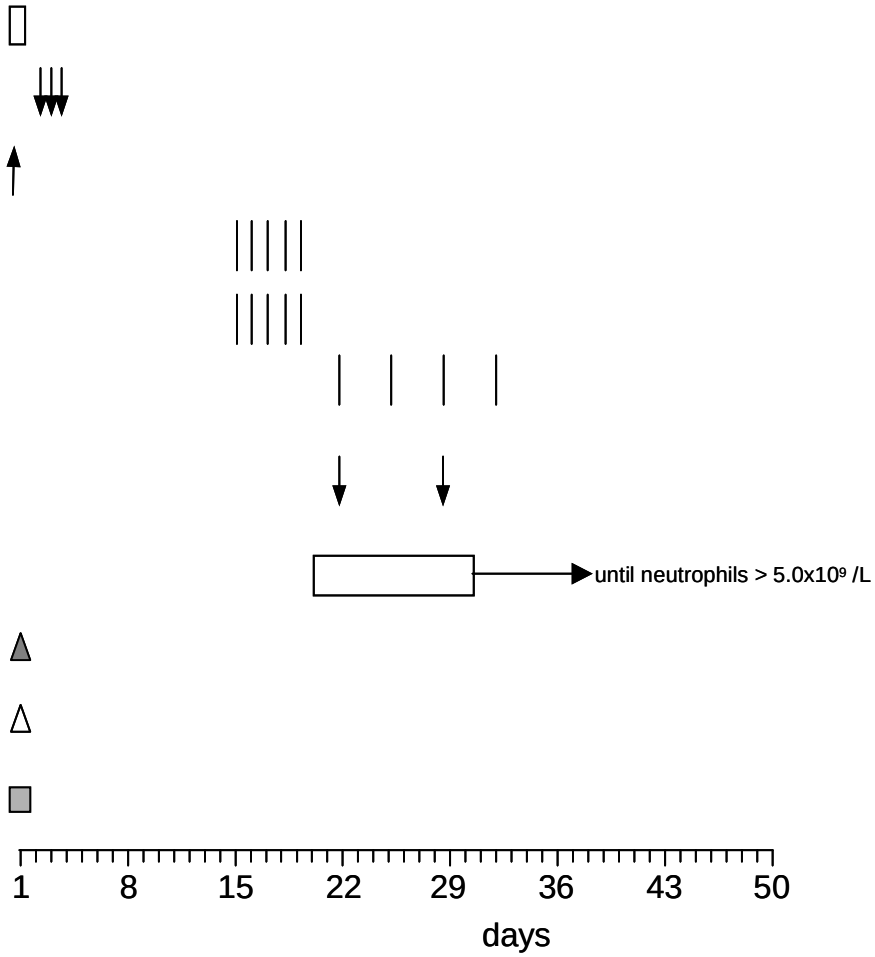
HR COURSE 4 (HR4)

HD-MTX	IV 24hrs 5,000 mg/m^2
LEUKOVORIN	IV push 15 mg/m^2/dose
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
CPM	IV 1hr 900 mg/m^2/dose
VP-16	IV 2hrs 275 mg/m^2/dose
ASP (E.Coli)	IV 1hr 10,000 IU/m^2/dose
VCR	IV push 1.5 mg/m^2/dose max 2.0 mg/dose
G-CSF	SC 5 µg/kg/day
BMP (to SKION lab)	
LP	
NCI toxicity preceding period	



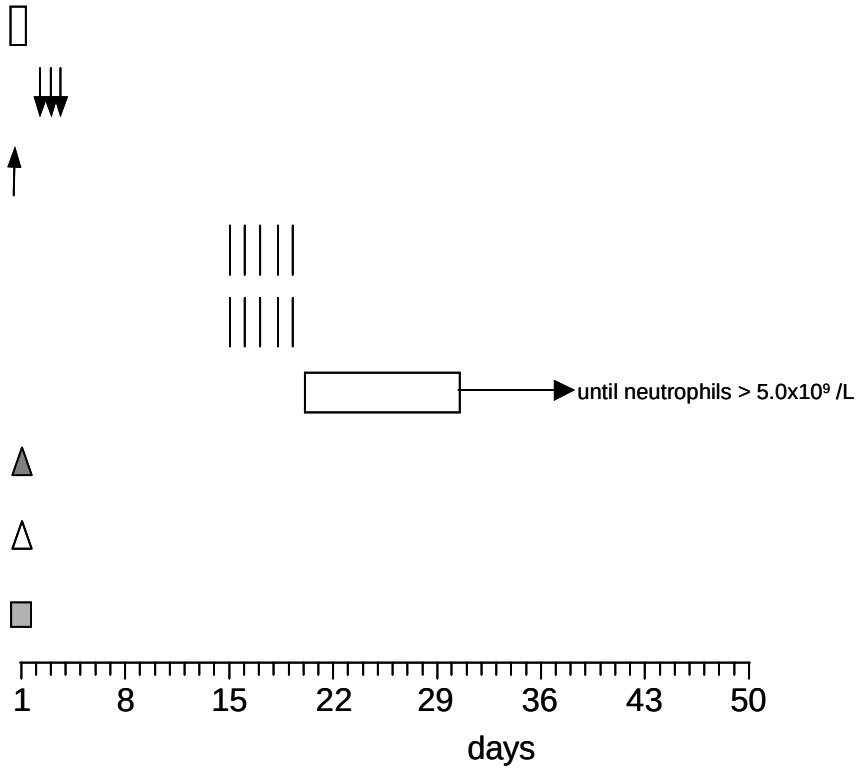
HR COURSE 5 (HR5)

HD-MTX	IV 24hrs 5,000 mg/m^2
LEUKOVORIN	IV push 15 mg/m^2/dose
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
HD-ARA-C	IV 3hrs 1,500 mg/m^2/dose
MITOX	IV 30min 5.25 mg/m^2/dose
ASP (E.Coli)	IV 1hr 10,000 IU/m^2/dose
VCR	IV push 1.5 mg/m^2/dose max 2.0 mg/dose
G-CSF	S.C. 5 µg/kg/day
BMP (to SKION lab)	
LP	
NCI toxicity preceding period	



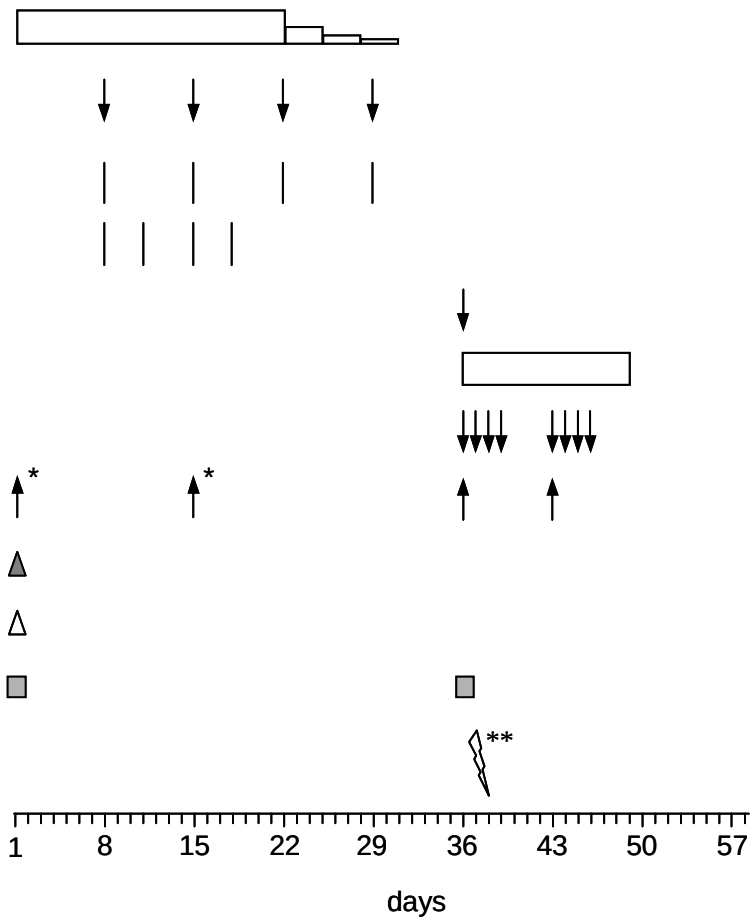
HR COURSE 6 (HR6)

HD-MTX	IV 24hrs 5,000 mg/m^2
LEUKOVORIN	IV push 15 mg/m^2/dose
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
FLU	IV 30min 22.5 mg/m^2/dose
HD-ARA-C	IV 4hrs 1,500 mg/m^2/dose
G-CSF	SC 5 µg/kg/day
BMP (to SKION lab)	
LP	
NCI toxicity preceding period	



PROTOCOL II (A and B)

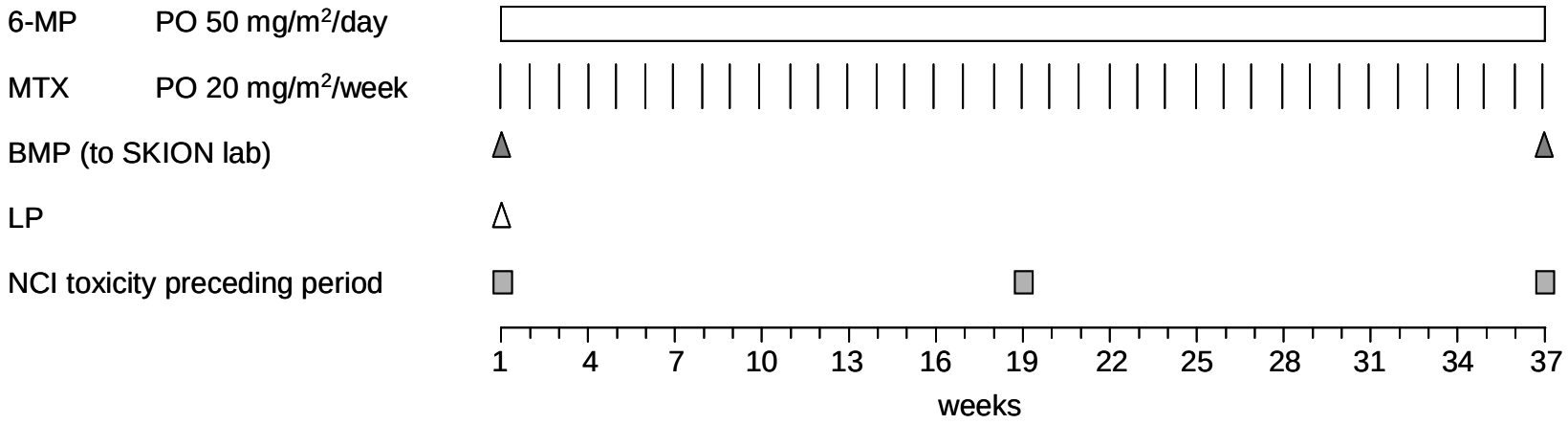
DEXA	PO 10 mg/m^2/day
VCR	IV push 1.5 mg/m^2/dose max 2.0 mg/dose
DOX	IV 1hr 30 mg/m^2/dose
ASP (E.Coli)	IV 1hr 10,000 IU/m^2/dose
CPM	IV 1hr 1,000 mg/m^2/dose
6-TG	PO 60 mg/m^2/day
ARA-C	IV/SC push 75 mg/m^2/dose
MTX/ARA-C/DAF	ITH acc. to age
BMP (to SKION lab)	
LP	
NCI toxicity preceding period	



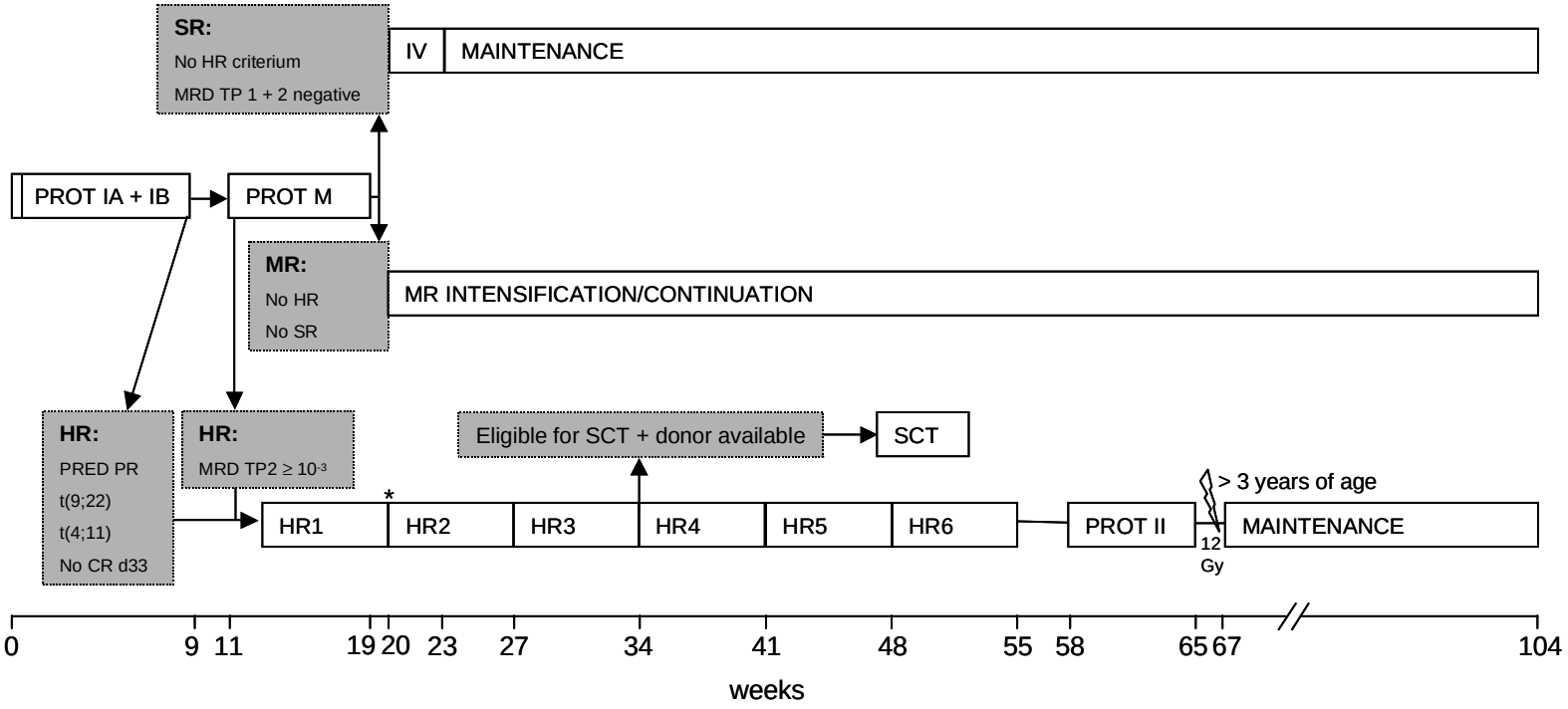
*Only children with CNS involvement, CNS2 or TLP+ at diagnosis.

**12 Gy cranial irradiation in 8 fractions only for children > 3 years who will not get stem cell transplantation

HR-MAINTENANCE



ALL-10 OVERVIEW



* duration of HR1-HR6 depends on neutrophil recovery

22. TOXICITEITSREGISTRATIE

De toxiciteit van een bepaald blok van de therapie dient bij start van ieder volgend blok van de therapie ingevuld te worden. Bijvoorbeeld de toxiciteit van protocol Ib wordt ingevuld bij de start van protocol M. Hiervoor worden de NCI-common toxicity criteria gebruikt. Aangegeven dient te worden over welke voorgaande fase het ingevulde toxiciteitsformulier handelt.

Therapy phase

- ☐ Start therapy
- ☐ Protocol Ia
- ☐ Protocol Ib
- ☐ Protocol M
- ☐ Protocol IV
- ☐ Protocol SR-maint wk 20
- ☐ Protocol SR-maint wk 40
- ☐ Protocol SR-maint wk 60
- ☐ Protocol SR-maint wk 81 (end)

- ☐ Protocol Intens/Contin MR wk 1
- ☐ Protocol Intens/Contin MR wk 19
- ☐ Protocol Intens/Contin MR wk 35
- ☐ Protocol Intens/Contin MR wk 51
- ☐ Protocol Intens/Contin MR wk 67
- ☐ Protocol Intens/Contin MR wk 84 (end)

- ☐ Protocol HR 1
- ☐ Protocol HR 2
- ☐ Protocol HR 3
- ☐ Protocol HR 4
- ☐ Protocol HR 5
- ☐ Protocol HR 6
- ☐ Protocol IIa

- ☐ Protocol IIb
- ☐ Protocol HR-maint wk 1 or before SCT
- ☐ Protocol HR-maint wk 19
- ☐ Protocol HR-maint wk 37 (end)
- ☐ Protocol SCT

Please check the appropriate field in each parameter
(Classification according to NCI Common-Toxicity-Criteria, slightly modified)

Grade	**Not done**	**0 (normal)**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
general condition			mild impairment	age-related activities strongly decreased	bedridden, in need of care	intensive care, very sick	Death
Toxicity: Hematology							
hemoglobin (mmol/l)			Normal – 6.2	< 6.2-4.9	< 4.9-4.0	< 4.0	Death
WBC (x 10^9 /l)			Normal – 3.0	< 3.0-2.0	< 2.0-1.0	< 1.0	Death
granulocytes (x 10^9 /l)			Normal – 1.5	< 1.5-1.0	< 1.0-0.5	< 0.5	Death
lymphocytes (x 10^9 /l)			Normal – 0.8	< 0.8-0.5	< 0.5-0.2	< 0.2	Death
thrombocytes (x 10^9 /l)			Normal – 75	< 75-50	< 50-25	< 25	Death
Infections							
Febrile neutropenia#					present	Life threatening consequences (like septic shock etc)	death
Infection without neutropenia#				Localised, local therapy indicated	I.V. antibiotic, antifungal or antiviral intervention indicated	Life threatening consequences (like septic shock etc)	Death
Opportunistic infection#				Localised, local therapy indicated	I.V. antibiotic, antifungal or antiviral intervention indicated	Life threatening consequences (like septic shock etc)	Death
Gastro-intestinal							
stomatitis			painless ulcer, erythema	painful erythema or ulceration, can still eat	painful erythema or ulceration, cannot eat	TPN required, due to stomatitis	Death
nausea			adequate food intake	can eat, decreased intake	almost no food intake	TPN necessary	Death
vomiting			1 episode in 24 hrs	2 – 5 episodes in 24 hrs; iv fluids indicated < 24 hrs	≥ 6 episodes in 24 hrs, iv fluids, or TPN indicated ≥ 24 hrs	Life threatening consequences	Death
Gastric ulcer				Drug treatment of symptoms	Bleeding without perforation, not controlled by drug treatment: hospital admission	Perforation/bleeding; operative intervention indicated	Death
Constipation			Occasional or intermittent symptoms; occasional use of stool softners, laxatives, dietary modification, or enema	Persistent symptoms with regular use of laxatives or enemas indicated	Symptoms interfering with ADL	Life threatening consequences (e.g. obstruction, toxic megacolon)	Death

diarrhea			Increase of <4 stools per day over baseline	Increase of 4-6 stools per day over baseline; iv fluids indicated < 24 hrs, not interfering with ADL	Increase of ≥ 7 stools per day over baseline or incontinence, interferering with ADL	Life threatening consequences	Death
pancreatitis			Asymptomatic, enzyme elevation and/or radiographic findings	Symptomatic, medical intervention indicated	Interventional radiology or operative intervention indicated	Life threatening consequences	Death
Bilirubine			> N – 1.5 x N	> 1.5 x N – 3 x N	> 3 x N – 10 x N	> 10 x N	
GOT / GPT			> N – 2.5 x N	> 2.5 x N – 5 x N	> 5 x N – 20 x N	> 20 x N	
amylase			N – 1.5 x N	1.5 – 2.0 x N	2.0 x 5.0 x N	> 5.0 x N	
Lipase			N – 1.5 x N	1.5 – 2.0 x N	2.0 x 5.0 x N	> 5.0 x N	
Kidney-toxicity							
creatinine			< 1.5 x N	1.5. - 3.0 x N	3.1 - 6.0 x N	> 6.0 x N	Death
proteinuria (g/l)			+ or < 3	++/+++ or 3 - 10	++++ or > 10	nephrotic syndrome	Death
hematuria			microscopic	macroscopic, no clots	macroscopic, clots	transfusion required	Death
GFR			<75 – 50% N	< 50-25% N	<25% N, chronic dialysis not indicated	<25% N, chronic dialysis or renal transplant indicated	Death
Cardiac toxicity							
arrhythmia			asymptomatic, no therapy	recurrent/persistent, no therapy	Therapy required	hypotension, ventricular arrhythmia, defibrillation	Death
Left ventricular diastolic function			Asymptomatic finding, no intervention	Asymptomatic, intervention indicated	Symptomatic CHF, responsive to intervention	Refractory CHF, poorly controlled, intervention like ventr assist device	Death
echocardio.: LV-SF			<30 - 24%	< 24 - 15 %	< 15%	Refractory CHF or poorly controlled, intervention such as ventr assist device	Death
Hypertension			Asymptomatic, transient (<24hr) RR > N, intervention not indicated	Recurrent or persistent (>24hr) RR>N, monotherapy may be indicated	Requiring more than one drug or more intensive therapy than previously	Life threatening	Death
Hypotension			Changes, intervention not indicated	Brief (<24 hrs) fluid replacement or other therapy; no physiologic consequences	Sustained (>24 hrs) therapy, resolves without persisting physiologic consequences	Shock	Death
Neurological toxicity							
central neurotoxicity			mild somnolence, or agitation; drowsiness	somnolence < 50% of the time, moderate disorientation	somnolence > 50% of the time, severe disorient., hallucinations	coma, seizures	Death
peripheral neurotoxicity			paresthesias, mild subjective weakness	severe paresthesias and/or mild weakness	unbearable paresthesias, deficits in motor funct.	paralysis	
Mood alteration depression			Mild mood alteration not interfering with function	Moderate mood alteration interfering with function, but not interfering with ADL;	Severe mood alteration interfering with ADL	Suicidal ideation; danger to self or others	Death

				medication indicated			
Mood alteration euphoria			Mild mood alteration not interfering with function	Moderate mood alteration interfering with function, but not interfering with ADL; medication indicated	Severe mood alteration interfering with ADL	Suicidal ideation; danger to self or others	Death
Hematology							
Thrombosis			Mild, intervention not indicated		anticoagulation	Severe thrombosis, causing organ dysfunction	Death
Hemorrhage			Mild, intervention not indicated		Transfusion, interventional radiology, endoscopic, or operative intervention indicated	Life threatening consequences; major urgent intervention indicated	Death
PT			>1 – 1.5 x N	>1.5 – 2.0 x N	>2.0 x N		
fibrinogen			<1.0 – 0.75 x N or < 25% ↓	<0.75 – 0.5 x N or 25 - <50% ↓	<0.5-0.25 x N or 50 - <75% ↓	< 0.25 x N or 75% ↓ or < 0.5 g/l	Death
ATIII			<1.0 – 0.75 x N	<0.75 – 0.5 x N	<0.5-0.25 x N	< 0.25 x N	Death
Skin toxicity							
Changes in the skin			Erythema	dry desquamation, vasculitis, pruritus	moist desquamation, ulcerations	Exfoliative dermatitis, necrosis	
Hair loss			Thinning or patchy	Complete			
Hyperpigmentation			Slight or localized	Marked or generalized			
Hypopigmentation			Slight or localized	Marked or generalized			
Acne			Intervention not indicated	Intervention indicated	Associated with pain, disfigurement, ulceration, or desquamation		
striae			Mild	Cosmetically significant			
Other							
Tumorlysis syndrome					Yes		
Allergic reaction			Transient flushing or rash, drug fever < 38°C	Rash, flushing, urticaria, dyspnea, drug fever ≥38°C	Symptomatic bronchospasm, with or without urticaria, parenteral medication(s) indicated, allergy-related angioedema,hypotension	Anaphylaxis	Death
Cushing				Present			
Osteonecrosis Avascular necrosis			Asymptomatc, radiographic findings only	Symptomatic, not interfering with ADL	Symptomatic, interfering with ADL	Symptomatic and disabling	
Fracture			Asymptomatic, radiographic findings only	Symptomatic but non-displaced, imobilization indicated	Symptomatic and displaced or open wound with bone exposure, operative intervention	Disabling, amutation indicated	death
Insomnia			Occasional difficulty sleeping,	Difficulty sleeping, interfering	Frequent difficulty sleeping,	Disabling	

			not interfering with function	with function but not interfering with ADL	interfering with ADL		
Weight gain			5 - <10% of baseline	10 - <20% of baseline	≥20% of baseline		
Weight loss			5 - <10% frombaseline, intervention not indicated	10 - <20% from baseline, nutritional support indicated	≥20% from baseline, tube feeding or TPN indicated		
Glucose (mmol/l)			Normaal – 8.9	8.9 – 13.9	13.9 – 27.8	>27.8 of acidose	Death

Other severe toxicity (describe): _____

Overig:
Indien botbreuk:
dd. _____, als gevolg van trauma: heftig / mild / geen
Indien avasculaire botnecrose: MRI dd _____

Ad glucose: insuline behoefte?

Febrile neutropenia: microbiological documented infection: agent _____, no positive culture

Tanner stadium: G….M……V…….

23 METC Erasmus MC: Verklaring van geen bezwaar MEC-2004-203

Erasmus MC
Universitair Medisch Centrum Rotterdam

Medisch Ethische Toetsings Commissie
Erasmus MC

SKION

Nr. CI- 04/0661	Kopie in:
Datum ontvangst: 06-08-04	Kopie aan: Bestuurs
	Te beantwoorden: ja / nee
	Paraaf:

Prof.dr. R. Pieters
Afd. Kindergeneeskunde /
Kinderoncologie-haematologie
Kamer Sb 2672
Erasmus mc - Sophia

Doorkiesnummer +31 10 463 4428
Faxnummer +31 10 4633634
Kamernummer Z 562
E-mail c.p.bron@erasmusmc.nl
Ons kenmerk CPB/c/003122
Uw kenmerk PP/hcV
Datum 2 augustus 2004

Betreft Verklaring van geen bezwaar MEC-2004-203

Gelieve bij alle correspondentie m.b.t. dit onderzoek bovenstaand MEC nummer vermelden.

Geachte heer Pieters,

De Medisch Ethische Toetsings Commissie Erasmus MC heeft op 2 juli 2004 kennisgenomen van het door u ingediende protocol, getiteld: 'Protocol ALL 10: Protocol voor diagnostiek en behandeling van kinderen en adolescenten (0 - 18 jaar) met Acute Lymfatische Leukemie (ALL)', MEC-2004-203, inclusief bijlagen.

Het protocol en de bijlagen zijn besproken in het overleg van het dagelijks bestuur van de commissie d.d. 5 en 27 juli 2004. Naar aanleiding daarvan bericht ik u als volgt.

Het behandelprotocol ALL 10 is een vervolg op het protocol, getiteld: 'Protocol ALL 9: Onderzoek en behandeling van kinderen met acute lymfatische leukemie (ALL)', MEC 114.720/1991/62. Het ALL 10 protocol is een behandelprotocol met als belangrijkste peiler stratificatie in drie risicogroepen volgens MRD (Minimal Residual Disease) bepaling en kent geen randomisatie. De resultaten zullen vergeleken worden met historische controlegroepen en met de resultaten van de behandeling van de Duitse BFM groep.

De behandeling op basis van bovengenoemd behandelprotocol valt onder de reikwijdte van de Wet op de geneeskundige behandelingsovereenkomst (WGBO) en niet onder de reikwijdte van de Wet Medisch-wetenschappelijk Onderzoek met mensen (WMO). De commissie heeft het protocol en de bijlagen dan ook slechts getoetst in het kader van de zorgvuldigheid. Een dergelijke toetsing wordt uitgevoerd ter verstrekking van een verklaring van geen bezwaar. De zorgvuldigheidstoets heeft geleid tot het volgende.

Op grond van de door u verstrekte informatie, heeft de commissie geen bezwaar tegen de geprotocolleerde behandeling van de kinderen met Acute Lymfatische Leukemie (ALL) volgens het ALL 10 protocol, versie 30 juni 2004.

Wellicht ten overvloede merkt de commissie op, dat een toetsing in het kader van de zorgvuldigheid niet gezien mag worden als een oordeel in de zin van de WMO.

De commissie wenst u succes bij de uitvoering van het protocol.

Postadres
Postbus 2040
3000 CA Rotterdam

Bezoekadres
Dr. Molewaterplein 40
3015 GD Rotterdam

Bereikbaar met tram 8, bus 44 of metro Calandlijn (halte Dijkzigt).

Voorzitters
Prof.dr. H.W. Tilanus
Prof.dr. J.W. Wladimiroff

Vice voorzitters
Dr. A. Beishuizen
Dr. F.A.L.M. Eskens

Secretarissen
Mw. mr. C.P. Bron-van Vliet
Mw. mr. H.J. Kennkamp-Moathus

Secretaressen
Mw. G. Slag
Mw. S. Sneevliet

Het secretariaat is geopend van maandag tot en met donderdag van 08.30 tot 17.00 uur

www.erasmusmc.nl

Pagina 2/2
Ons kenmerk CPB/c/003122
Datum 2 augustus 2004

Erasmus MC

Met vriendelijke groet,
namens de Medisch Ethische Toetsings Commissie Erasmus MC,

Mw.mr. C.P. Bron-van Vliet
Secretaris

Deze verklaring van geen bezwaar is gebaseerd op de volgende documenten:

- Aanbiedingsbrief met toelichting betreffende het ALL 10 protocol;
- Protocol ALL 10, versie d.d. 30 juni 2004;
- Interim report over protocol ALL 9, d.d. 28 april 2004;
- Samenvatting ALL behandeling in 2004: het ALL-10 protocol;
- Informatie voor ouders en kinderen met Acute Lymfatische Leukemie (ALL), versie Informatie ALL algemeen zoals ontvangen bij brief van 30 juni 2004;
- Informatie over de behandeling van kinderen met Acute Lymfatische Leukemie (ALL) volgens het SKION ALL 10 protocol, versie info kinderen > 12 jaar ALL 10, 29 juni 2004 RP/IV; en
- Informatie over de behandeling van kinderen met Acute Lymfatische Leukemie (ALL) volgens het SKION ALL 10 protocol, versie info ouders ALL 10, 29 juni 2004 versie 3 RP/IV.
- Advies professor dr. W.A. Helbing d.d. 28 juni 2004; en
- Goedkeuring Onderzoekscommissie, Afdelingshoofd en Directeur Onderzoek.

Cc. Mw. K. van der Vaart
Prof.dr. H. Büller
Mw. A. Roldaan-Zonneveld, Cluster 10, Kamer Sp 2468
Raad van Bestuur
Mw. M.L. Rodgers, Kennistransfer
Mw.drs. L.E. Visser, Apotheek