

Symposium a workshop – aktuální výzvy a uplatnění nových technologií v léčbě chronické myeloidní leukemie

Symposium and workshop – actual challenges and implementation of new technologies in the treatment of chronic myeloid leukaemia

Čuřík N.^{1,2}

¹ Ústav hematologie a krevní transfuze, Oddělení molekulární genetiky, Praha

² Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK, Praha

Ve dnech 11. a 12. listopadu 2022 se po tříleté pauze vynucené pandemií COVID-19 konalo v brněnském hotelu Maximus Resort symposium a pracovní setkání zaměřené na aktuální výzvy a uplatnění nových technologií v precizní medicíně pacientů s chronickou myeloidní leukemií (CML) v České republice a na Slovensku.

Program prvního dne odborné akce garantovali a moderovali **doc. Daniela Žáčková** z Interní hematologické a onkologické kliniky (IHOK) LF MU a FN Brno a **doc. Peter Rohoň** z Kliniky hematologie a transfúziologie LF UK a UN Bratislava. Cílem bylo v několika sděleních shrnout vývoj a současný stav terapeutického managementu CML se snahou definovat hlavní přetrvávající problémy a nastínit jejich možná řešení.

Úvodní přednášku celého setkání pronesl **prof. Thomas Lion** ze St. Anna Kinderkrebsforschung ve Vídni. Byla věnována problematice vzniku rezistence na léčbu spojené s mutacemi v kinázové doméně *BCR::ABL1*. Prof. Lion vyzdvihl význam pravidelného a citlivého testování pomocí sekvenování nové generace (*new generation sequencing* – NGS) schopného tyto mutace včas zachytit a případně rozpoznávat mutace kompozitní (přítomné na stejné mole-

kule *BCR::ABL1*). V této souvislosti zmínil i možný přínos nových technologií a platform, jako je PacBio umožňující vysoce přesné sekvenování dlouhých úseků, nebo Oxford Nanopore využívající při čtení sekvence jednotlivých molekul nukleových kyselin změny iontového proudění při jejich průchodu proteinovým nanopórem. Pro úspěšné uplatnění nanopórového sekvenování bude nicméně zapotřebí dále snížit jeho míru chybovosti. Jedním z nadějných přístupů je inovace bioinformatického postupu zpracování surových dat, na kterém pracuje tým prof. Liona. Komplementárně k úspěšné detekci příslušné mutace je třeba volit správný typ a dávku inhibitoru *BCR::ABL1* kinázy. Oříškem zde mohou být již zmíněné kompozitní mutace, z nichž některé odolávají všem dnes používaným inhibitorům. V samotné terapii pacientů, u kterých již došlo k expanzi leukemických klonů s mutacemi nesoucími rezistenci, byl proto diskutován jak přínos inhibitorů *BCR::ABL1* kinázy 3. generace (ponatinib, vodobatinib, olverematinib) a STAMP inhibitoru *BCR::ABL1* (asciminib), tak i jejich případných kombinací s dalšími léky, např. ibrutinibem (inhibitor Brutonovy tyrozinkinázy), hydroxy-

ureou resp. palbociclibem (inhibitory cyklin-dependentních kináz 4 a 6), nebo venetoclaxem (inhibitor BCL2).

V následující přednášce doc. Žáčkové s názvem „Chronická myeloidní leukemie a její léčba – je ještě co zlepšovat?“, byly přehledně shrnuty hlavní klinické a vědecké výzvy CML z pohledu domácí hematologie. Přes vynikající léčebné výsledky, vycházející mimo jiné z přínosu centralizované péče o pacienty s CML, je třeba reflektovat přetrvávání některých problémů, mezi něž patří rezistence a perzistence leukemických kmenových buněk bránící některým jinak dobře odpovídajícím pacientům dosažení dlouhodobé remise bez nutnosti léčby (*treatment-free remission* – TFR) a na druhou stranu vágní doporučení a neuspokojivé výsledky panující v léčbě pacientů s CML v třetí a následujících liniích nebo v pokročilých fázích onemocnění vč. neujasněného prognostického významu přídatných chromozomových aberací. Dále byl rámcově diskutován management nežádoucích účinků léčby a její toxicity – zejména kardiovaskulární a plicní přítomné u pacientů léčených 2. a 3. generací inhibitorů *BCR::ABL1*, a také úskalí při léčbě těhotných pacientek, kterým musí být léčba vynechávána

z důvodů teratogenních účinků na plod. K těmto tématům pak směřovala jednotlivá, již konkrétnější sdělení dalších přednášejících.

Doc. Rohoň se ve svém příspěvku zaměřil na současný pohled na ukončení léčby CML, v němž má ústřední místo koncept TFR. Dosažení TFR je spojeno mimo jiné s úspěšnou rekonstitucí a reaktivací imunitního systému pacientů s CML (zvýšená hladina cytotoxických T lymfocytů a NK buněk, snížené zastoupení regulačních T lymfocytů a myeloidních supresorových buněk, snížená exprese proteinů regulujících imunitní reakce). TFR má pozitivní přínos z hlediska zlepšení kvality života pacientů, snížení nežádoucích účinků spojených s léčbou inhibitory BCR::ABL1 kinázy, umožnění bezpečné gravidity, ale i v oblasti ekonomických úspor léčby CML. Bohužel, v současnosti je i jen samotná možnost zvážení bezpečného vysazení léčby dosažitelná pouze pro menší část pacientů. Další problém navíc představují časné relapsy vycházející z perzistujících leukemických kmenových buněk. Specifickým, dosud nevyřešeným úskalím TFR je pak tzv. syndrom z vysazení tyrozinkinázových inhibitorů, který je spojen s dočasnými, ale ne zřídka urputnými muskuloskeletárními bolestmi až u jedné třetiny všech pacientů v TFR.

Management toxicity tyrozinkinázových inhibitorů u pacientů s CML byl tématem přednášky **dr. Zuzany Sninské** z Kliniky hematologie a transfuziologie LFUK, SZU a UN Bratislava. Toxické účinky inhibitorů BCR::ABL1 často souvisí s *off-target* působením na další molekuly s kinázovou funkcí (c-KIT, SRC, PDGFR, VEGFR, DDR1, aj.). Zatímco imatinib vykazuje poměrně nespecifické vedlejší účinky nízkého stupně, jako jsou únava, křeče, svalové bolesti, průjemy a edémy, bohužel platí, že léčbu účinnějšími inhibitory vyšších generací často doprovázejí závažnější nežádoucí účinky 3. a 4. stupně. U nilotinibu tak hrozí hyperglykémie a hyperlipidemie s možným rozvojem diabetes, resp. aterosklerózy, a rovněž pankreatitida

a cévní komplikace. U dasatinibu představují největší problém pleurální výpotky a plicní arteriální hypertenze, u bosutinibu jsou časté průjemy, z toho u 10 % pacientů vážné. Nejzávažnější vedlejší účinky v podobě kardiovaskulární toxicity pak může přinášet léčba ponatinibem. Mimo to vykazují všechny klinicky schválené inhibitory BCR::ABL1 kinázy také nežádoucí hematologické účinky, především neutropenii a trombocytopenii. Vedle symptomatické léčby nežádoucích účinků je třeba při výskytu závažných komplikací zvážit také možnost vynechání nebo ukončení léčby příslušným inhibitorem.

Na tuto přednášku navázalo detailnějším rozбором problematiky kardiovaskulární toxicity u pacientů s CML sdělení **dr. Kataríny Slezákové** z téhož pracoviště. Negativní dopad na kardiovaskulární systém může doprovázet zejména léčbu nilotinibem a ponatinibem, což úzce souvisí s *off-target* působením těchto přípravků na receptorové tyrozinkinázy PDGFR a VEGFR2. U ponatinibu v dávce 45 mg/denně hrozí vedle rozvoje arteriální hypertenze také mimořádně závažné tepenné okluze nebo žilní tromboembolické stavy. Možností, jak jim předcházet, je redukce dávky ze 45, eventuálně 30 mg na 15 mg/denně po dosažení léčebné odpovědi – snížení hladiny BCR::ABL1 v IS pod 1 %, jak ukázaly nedávno publikované výsledky klinické studie dávkování ponatinibu v chronické fázi CML (Cortes et al., Blood 2021).

Dr. Hana Klamová z Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHK) v Praze se ve svém příspěvku dotkla problematiky léčby CML a těhotenství. Ačkoli CML postihuje nejčastěji lidi staršího věku, 40 % pacientů je mladších 50 let. Léčba inhibitory BCR::ABL1 přitom představuje rizika pro plod, a to z důvodu možného vzniku kongenitálních malformací, fetálních hydropsů nebo spontánních potratů. U pacientek v graviditě je třeba léčbu inhibitory přerušit, přičemž doporučená není ani léčba pegylovaným interferonem alfa, hydroxyureou a dalšími léčebnými modalitami, což platí

i pro kojící ženy. Bezpečnou eventualitou v době gravidity může být nasazení nepegylovaného interferonu, případně depleční leukocytaferéza.

Prof. Lion, jehož aktivní účast představovala bezesporu jeden z vrcholů celé odborné akce, se ve své druhé přednášce zaměřil na prognostický význam přidatných chromozomových abnormalit u pacientů s CML. Tyto abnormality byly systematicky popsány v polovině 70. let v éře před nástupem inhibitorů BCR::ABL1, kdy byly podle frekvence svého výskytu klasifikovány na aberace tzv. hlavní dráhy (+8, +19, i[17q], +Ph) a tzv. minoritní dráhy (všechny ostatní), přičemž negativní prognostický význam pro rozvoj CML byl přisuzován pouze prvně uvedené skupině. Tento pohled byl v éře tyrozinkinázových inhibitorů postupně přehodnocen, kdy byla nejprve část aberací minoritní dráhy (např. 3q26.2 přestavby a -7/7q) přiřazena k změnám hlavní dráhy do tzv. skupiny vysokého rizika. Následně byl re-evaluován prognostický status jednotlivých aberací, např. ztráty chromozomu 8, přičemž různí autoři navrhli různé prognostické systémy vč. zavedení skupin středního rizika. Jasná shoda v tomto směru nepanuje dosud, což se promítlo i do poněkud subjektivního výběru vysoce rizikových aberací v nejnovějším vydání Doporučení Evropské leukemické sítě (ELN) z roku 2020. Mezi jednotlivé „bezesporné“ vysoce rizikové abnormality nicméně v současnosti všichni autoři řadí přestavby 3q26, -7/7q a i[17q]. Tyto jsou bez ohledu na to, zda jsou detekovány v době diagnózy, nebo se objeví až v průběhu léčby, považovány za časné markery progresu a fatálního vyústění CML, což vyžaduje okamžitou úpravu léčby.

S tím úzce souvisí téma blastického zvratu/fáze (BF) CML, kterému se ve svém příspěvku z klinického hlediska věnoval **prof. Edgar Faber** z Univerzity Palackého v Olomouci. V první části prezentace zmínil doposud existující rozdílné definice BF CML podle kritérií WHO a ELN. Popsal příčiny, které k rozdílu vedly, a také uvedl, že nejnovější studie ELN (zejména analýzy nedávno založeného největšího re-

gistru pacientů s BF CML) svědčí pro adekvátnost 20% hranice zastoupení blastů ve dřeni nebo periférii (dle WHO) jako kritéria pro stanovení diagnózy BF CML. Po menší exkurzi do patogeneze BF CML se už věnoval léčebným možnostem této prognosticky velmi závažné diagnózy. Komentoval místo alogenní transplantace krvetvorných buněk a inhibitorů BCR::ABL1 (vč. molekul 3. generace) v léčbě. Své vystoupení ukončil prezentací kazuistiky pacienta s lymfoblastickým zvratem CML, u něhož nebylo možné provést transplantaci a byl úspěšně léčen kombinací tyrozinkinázových inhibitorů a interferonu alfa.

Na téma mutací spojených s rezistencí vůči léčbě CML navázal druhého dne program workshopu, který byl zaměřen na představení, diskuzi a sdílení praktických zkušeností s detekcí a monitorováním mutací v BCR::ABL1 a dalších genech asociovaných s hematologickými malignitami. **Doc. Kateřina Machová Poláková** z ÚHKT představila přínosy standardizované detekce mutací pomocí NGS a alelově specifické kapkové digitální PCR (ASO-ddPCR). NGS využívající masivní paralelní sekvenování transkriptu kinázové domény BCR::ABL1 umožňuje o řád citlivější detekci mutací než dosud standardní Sangerovo sekvenování, které stále více nedostačuje požadavkům precizní medicíny. Nedávné prospektivní klinické studie, např. italská NEXT-in-CML, jasně ukázaly, že pro správný management léčby CML je třeba detekovat již mutace na tzv. nízkých hladinách (při relativně nízkém zastoupení mutovaného klonu). Doc. Machová rovněž poukázala na fakt, že ztráta iniciální hluboké molekulární odpovědi a následná nestabilní velká molekulární odpověď u pacientů s CML pravděpodobně představuje významný predikační marker vývoje klinicky relevantních mutací a měla by sloužit jako ukazatel pro jejich pravidelné testování. Na ÚHKT byla metoda detekce mutací kinázové domény BCR::ABL1 pomocí NGS akreditována a zavedena do praxe jako standardní operační postup v roce

2019. Dostupnost tohoto vyšetření je pro všechny pacienty v ČR do značné míry zajištěna centralizovaným vyšetřením, které ÚHKT provádí pro pracoviště VFN Praha, FN Královské Vinohrady, FN Ostrava a FN Plzeň. FN Brno metodu akredituje a využívá v praxi a FN Olomouc plánuje využívat ddPCR. Na Slovensku se pro analýzu mutací v kinázové doméně BCR::ABL1 využívá panelové sekvenování na bázi NGS, které nicméně sekvenuje i nefúzovaný a nemutovaný gen ABL1, což poněkud snižuje citlivost detekce (laboratoře Medirex).

Dr. Adéla Benešová z téhož pracoviště následně představila výhody nově testovaného multiplex kitu ASO-ddPCR, který umožňuje detekci všech mutací BCR::ABL1 způsobujících rezistenci k jednotlivým inhibitorům 2. generace vč. panrezistentní mutace T315I. Tento kit by mohl v blízké budoucnosti sloužit jako rychlý screening před plánovanou změnou inhibitorů BCR::ABL1. Metoda ASO-ddPCR na úrovni DNA nabízí možnost rychlé analýzy konkrétního typu BCR::ABL1 mutace, v některých případech s ještě vyšší citlivostí detekce než pomocí NGS. Místem budoucího uplatnění ASO-ddPCR by mohlo být monitorování klonální evoluce mutovaných klonů a detekování klinicky nejdůležitějších mutací v pokročilých fázích CML, kde je rychlost znalosti mutačního stavu mimořádně důležitá.

Dr. Ivana Ježíšková z IHOK a Fakultní nemocnice Brno seznámila účastníky workshopu se zkušenostmi z optimalizace detekce mutací kinázové domény BCR::ABL1 pomocí NGS na svém pracovišti a také s výsledky použití panelového NGS – panely Variplex Core Myeloid a LYNX pro detekci mutací v genech asociovaných s myeloidními, resp. lymfoidními malignitami, z nichž řada hraje významnou roli také u pacientů s CML (např. RUNX1, ASXL1, IKZF1). Mezi vyšetření prováděná na brněnském pracovišti patří i detekce fúzí genu EVI1 (MECOM) a kvantifikace jeho exprese pomocí RT-qPCR, kde zvýšená exprese asociuje s poruchou myeloidní diferenciací a progresí CML do blastického zvratu.

V závěrečné moderované a neformální pojeté diskuzi byl probrán stav zavádění NGS a ASO-ddPCR na dalších pracovištích v České republice a na Slovensku. Byla deklarována vůle sdílet veškeré zkušenosti a konkrétně dosažené výsledky na poli NGS ve formě protokolů, metodických a bioinformačních postupů, provádět výměnu vzorků pro testování, společné kontroly výsledků apod. Jedním z konkrétních výstupů workshopu byla dohoda na zřízení registru nově zjištěných mutací a nukleotidových variant pro CML podle vzoru Národního programu studia mutací a klonality leukemických buněk u pacientů s akutní myeloidní leukémií. Pro budoucí rozvoj uplatnění NGS v precizní medicíně CML může hrát výraznou roli ekonomizace mutačního screeningu např. pomocí nové technologie nanopórového sekvenování nevyžadující nákladných počátečních investic do přístrojového vybavení, kde se aktuálně pracuje na snížení chybovosti tohoto typu detekce. V diskuzi rovněž padaly dotazy na možnosti využití *single-cell* analýz, které zásadním způsobem přispívají k porozumění klonální hierarchie a evoluce CML (což je jedním z cílů výzkumných projektů HARMONY PLUS), ale jejich rutinní využití v klinické praxi se dnes jeví hubdou vzdálené budoucnosti.

Celkově lze říct, že dvoudenní odborná akce upoutala zájem desítek lékařů, vědců a laboratorních pracovníků z Brna, Prahy, Olomouce, Plzně, Bratislavy, Košic a Vídně. Velké poděkování za její zdárný průběh patří všem přednášejícím a aktivním účastníkům diskuzí a v neposlední řadě také firmě Angelini Pharma Česká republika, a konkrétně **Dr. Martině Dávidové**, která celou akci organizovala.

Doručeno do redakce dne: 2. 12. 2022.

Přijato do tisku po recenzi dne: 19. 12. 2022.

RNDr. Nikola Čuřík, Ph.D.

Oddělení molekulární genetiky

Ústav hematologie a krevní transfuze

U Nemocnice 1

128 00 Praha

e-mail: nikola.curik@uhkt.cz