

**MUNI**  
**LÉKAŘSKÁ**  
**FAKULTA**

Masarykova univerzita

Lékařská fakulta

**CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE: OD DLOUHODOBÉ LÉČBY K JEJÍMU  
ÚPLNÉMU VYSAZENÍ**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

MUDr. Daniela Žáčková, Ph. D.

Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno

Brno 2020

## *Poděkování*

Úvodem si dovolím poděkovat přednostovi Interní hematologické a onkologické kliniky prof. MUDr. Jiřímu Mayerovi, CSc. za dlouholeté odborné vedení, mimořádnou podporu a řadu vizionářských podnětů, bez kterých by tato práce nevznikla. Děkuji také primáři MUDr. Zdeňku Královi, CSc. za jeho laskavost a pochopení, díky nimž se mi podařilo skloubit činnost léčebně-preventivní s prací vědecko-výzkumnou. Nemohu opomenout zakládajícího přednostu kliniky, pana prof. MUDr. Jiřího Vorlíčka, CSc., který mě učil pacienty nejen léčit, ale také je milovat, chápat a správně a dostatečně s nimi komunikovat. Za vedení a pomoc v mých lékařských začátcích, ale i setrvalé povzbuzování ve výzkumné činnosti vděčím nejen jemu, ale také přednostovi Oddělení klinické hematologie, panu prof. MUDr. Miroslavu Penkovi, CSc., a své první vedoucí oddělení a přítelkyni MUDr. Ingrid Vášové.

Předkládaná práce a výsledky v ní obsažené by nevznikly bez spolupráce s mými milými kolegyněmi a kolegy jak z kliniky, tak z center napříč Českou republikou. Je jich celá řada, ale dovolím si jmenovat alespoň prof. MUDr. Zdeňka Ráčila, Ph. D., Mgr. Tomáše Jurčeka, Ph. D., Mgr. Pavla Krejčího, Ph. D., MUDr. Hanu Klamovou, CSc., doc. Mgr. Kateřinu Machovou Polákovou, Ph. D., Mgr. Jana Mužíka, Ph. D. a Bc. Jiřinu Procházkovou. Za cenné rady a přátelské vedení děkuji i vedoucímu Leukemické skupiny na klinice prof. MUDr. Michaelu Doubkovi, Ph. D. Za léta úžasné a obohacující spolupráce s patientskou podpůrnou organizací Diagnóza leukemie děkuji její předsedkyni paní Janě Pelouchové. Mé díky směřují i do zahraničí; za spolupráci na mezinárodních projektech děkuji prof. Andreasi Hochhausovi, prof. Peterovi Valentovi, prof. Susanne Saussele a mnoha dalším; za podporu a cenné rady pak prof. Giantoniovi Rostimu.

V neposlední řadě děkuji našim pacientům, za jejich spolupráci na projektech, ale i sílu a statečnost.

Největší poděkování patří celé mé rodině, zejména pak mému muži Petrovi. Jejich trpělivost a láskyplná podpora byly a jsou pro mě neocenitelné. Práci věnuji svému zesnulému tatínkovi Albertu Staffovi.

## Komentář

**Úvod.** Zavedení inhibitorů tyrozinkinázy (TKI) do léčby chronické myeloidní leukemie (CML) dramaticky zlepšilo prognózu pacientů a vedlo k prodloužení celkového přežití až téměř na roveň celkové populace. I přes kontrolované a úspěšné pokusy o vysazení ve snaze o dosažení remise bez nutnosti užívání léčby (treatment-free remission, TFR) je naprostá většina pacientů odkázána k celoživotně podávané terapii, která s sebou nese nejednu výzvu. Data o účinnosti a snášenlivosti léčby pocházejí většinou z klinických studií a jejich extrapolace do klinické praxe je komplikována nejen selekčním bias, ale i velkou variabilitou a často i nepřiléhavostí parametrů pro hodnocení zejména účinnosti terapie. U nezanedbatelného podílu pacientů je léčba provázena rezistencí a/nebo nesnášenlivostí, jejichž dopad je umocněn a rovněž snahy o ovlivnění komplikovány častou absencí znalosti jejich etiopatogeneze a variabilitou jejich klinického významu. Jedním z prokázaných faktorů vedoucích k rezistenci na léčbu je non-adherence, která je umocněna nedostatečnou informovaností pacientů ze strany lékařů a suboptimálním managementem nežádoucích účinků. Klíčová role interakce mezi lékařem a pacientem byla potvrzena i ve vztahu k TFR.

**Cíle.** Habilitační práce je rozčleněna do 4 tématických okruhů či cílů, které odrážejí výzvy na poli optimalizace léčby pacientů s CML nastíněné výše. Cíl 1 – vytvořit detailní a kvalitní databázi pacientů s CML léčených TKI v podmínkách každodenní praxe. Cíl 2 – systematicky analyzovat data z této databáze a výsledky z praxe porovnat s výsledky z klinických studií. Cíl 3 – pokusit se odhalit mechanismy, které vedou k rezistenci na léčbu TKI či jejich nesnášenlivosti ve snaze o následné účinné léčebné ovlivnění. Cíl 4 – edukací a osvětou zameřenou na pacienty a jejich blízké posílit jejich informovanost a také adherenci coby významného faktoru účinnosti léčby.

**Metody.** Předkládaná habilitační práce využívá možnosti dané Lékařskou fakultou Masarykovy univerzity a je koncipována jako komentovaný soubor publikací aspirantky.

**Výsledky.** V rámci plnění cíle 1 byla vytvořena jedna z největších nekomerčních a parametricky nejbohatších databází pacientů s CML celosvětově, zapojená krátce po svém vzniku také do Evropského CML registru. Získaná data tak posloužila jednak mezinárodním analýzám, jednak vlastním projektům s výsledky publikovanými prakticky pouze v impaktovaných časopisech. Analýza dat pacientů léčených TKI v rámci plnění cíle 2 přinesla důkazy o výborné účinnosti a snášenlivosti terapie v podmínkách centralizované specializované hematologické péče, současně však odhalila nedostatečnost a velkou variabilitu zavedených parametrů hodnocení zejména účinnosti TKI. Námi nově navržený parametr, tzv. alternative treatment-free survival (ATFS), který byl akcetován panelem expertů v oficiálních mezinárodních doporučeních pro statistické hodnocení výsledků studií na poli CML, a modifikace tv. current leukemia-free survival (CLFS) se ukázaly být vhodnější pro skutečnou reflexi pozice daného léku v klinické praxi. V oblasti studia mechanismů rezistence na TKI či jejich nesnášenlivosti (cíl 3) jsme poukázali na analytické i interpretační nesrovnalosti,

kteře znemožňují užití některých do té doby uznávaných parametrů, jako např. hOCT, ABCB-1 či plazmatické a intracelulární koncentrace imatinibu, jako spolehlivých prediktorů dalšího osudu pacientů. Potvrzením markeru CD26 jako vhodného prostředku k odlišení leukemických od fyziologických kmenových buněk a objasněním struktury a dynamiky Bcr-Abl1 interaktomu jsme posunuli úroveň poznání o krůček blíže k ambicióznímu cíli úplného vyléčení z leukemie. Náš tým jako první odhalil mechanismus poruchy glukóзовé tolerance při léčbě nilotinibem v podobě rychle se rozvíjející postreceptorové inzulinové rezistence a kompenzatorní hyperinzulinémie, což alespoň částečně vysvětluje i rychlý rozvoj dyslipidémie a zřejmě i vznik periferních arteriálních uzávěrů coby závažného projevu intolerance terapie nilotinibem. Systematickou edukační a osvětovou činností zacílenou nejen na pacienty a jejich blízké, ale i na širokou zdravotnickou veřejnost, a realizovanou mnoha způsoby na národní i mezinárodní půdě (cíl 4), uchazečka přispěla k posílení informovanosti, motivace a adherence všech zúčastněných jako jedněch ze zásadních předpokladů úspěšnosti nejen terapie samotné, ale i jejího kontrolovaného vysazování.

**Závěr.** Vlastními výsledky publikovanými v zahraničních impaktovaných časopisech s vydatnou citační odezvou byly naplněny všechny vytyčené cíle. Náš příspěvek k optimalizaci terapie pacientů s CML je nadále rozvíjen v rámci akademické multicentrické studie HALF (NCT04147533), testující bezpečnost a účinnost vysazení TKI po předchozí dvoustupňové redukci jejich dávky, organizované z domovské kliniky uchazečky, která figuruje v roli spoluautorky konceptu studie, hlavní investigátorky a národní koordinátorky.

#### **Klíčová slova:**

Chronická myeloidní leukemie – inhibitory tyrozinkináz – imatinib – dasatinib – nilotinib – každodenní klinická praxe – databáze – analýzy přežití – rezistence – intolerance – adherence – remise bez nutnosti terapie

## Commentary

**Background.** Tyrosine kinase inhibitors (TKI) introduction into chronic myeloid leukemia (CML) therapy dramatically improved patients' prognosis with overall survival becoming similar to that of global population. Despite controlled and successful treatment discontinuation attempts with the aim of treatment-free remission (TFR) achievement, life-long TKI therapy is inevitable and thus challenging for vast majority of patients. Treatment efficacy and safety data are usually derived from clinical trials; however, their extrapolation into every-day clinical practice has been complicated not only due to selection bias but also following the fact that particularly long-term efficacy measurements are often inadequate. Resistance to and/or intolerance of TKI therapy has been an issue for nonnegligible patients group, and is further hampered by unknown etiopathogenesis as well as uncertain clinical significance. Non-adherence, a confirmed factor leading to TKI treatment resistance, has been potentiated by the lack of relevant information provided by physicians as well as insufficient management of side effects. Crucial role of physician-patient interaction has been acknowledged also in the context of TFR.

**Aims.** This habilitation thesis has been divided into four themes or objectives reflecting CML therapy optimization challenges outlined above. Objective 1 – to create detailed and comprehensive database of CML patients treated with TKI in every-day clinical practice. Objective 2 – to systematically perform data-analyses and compare our results to those obtained from clinical trials. Objective 3 – to investigate possible mechanisms of resistance to TKI or their intolerance with the aim to manage them successfully eventually. Objective 4 – to empower patients awareness and adherence since they have a significant impact on treatment efficacy.

**Methods.** In this habilitation thesis, an applicant took an opportunity given by the Medical Faculty of Masaryk University to collect previously published works and completed them with commentary.

**Results.** As an objective No. 1 fulfilment, one of the largest non-commercial and parametrically plentiful database worldwide was created and also implemented into the European CML Registry shortly after its development. Collected data were used both for analyses in the frame of international cooperation and for our own projects with results published in virtually only impacted journals. Regarding objective No. 2, we confirmed TKI treatment very good efficacy and acceptable toxicity in the frame of centralised specialized haematological care, however at the same time we found established efficacy assessment tools insufficient and heterogenous among published analyses. Our newly proposed parameter called alternative treatment-free survival (ATFS) was accepted by the panel of experts as a part of official international guidelines for clinical trials results statistical assessment, and our modification of current leukemia-free survival (CLFS) reflected particular drug position in clinical practice more properly than conventional survival analyses. During TKI

resistance possible mechanisms research (Objective No. 3) we revealed some analytic and interpretation inconsistency eliminating use of established parameters such as hOCT1, ABCB-1 or plasmatic and intracellular imatinib concentrations for treatment outcome prediction. By confirmation of CD26 marker as a reliable tool for leukemia stem cells identification, and thanks to the Bcr-Abl interactom structure and dynamics elucidation we moved a step forward to an ambitious goal to cure from leukemia completely. Our group for the first time clarified the mechanism of impaired glucose tolerance caused by rapidly evolving tissue insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia, which at least partially explain also promptly developing dyslipidemia and probably also peripheral arterial occlusions emergence as a serious adverse effect of nilotinib treatment. Thanks to extensive educational activity targeted not only to the patients and their relatives but also to broader health care community, which has been realised by multiple ways with both national and international coverage (Objective No. 4), an applicant significantly contributed to all participants' awareness, motivation and adherence as a crucial prerequisite both for therapy and its instructed discontinuation.

**Summary.** In summary, we fulfilled all the objectives set up previously, as was documented by our own results published in fairly cited articles in impacted journals. Our contribution to CML patient therapy optimization has been further amplified with our academic multicentre trial HALF (NCT04147533), evaluating efficacy and safety of TKI withdrawal after previous two-step dose reduction, led by our Department where an applicant plays a role of study concept co-author, principal investigator and national coordinator.

**Key words:**

Chronic myeloid leukemia – tyrosine kinase inhibitors – imatinib – dasatinib – nilotinib – daily clinical practice – database – survival analyses – resistance – intolerance – adherence – treatment-free remission

## Obsah

Komentář.....	3
Commentary.....	5
1. Úvod .....	9
1.1. Přílohy k úvodu.....	15
1.1.1. Příloha 1.....	15
1.1.2. Příloha 2.....	20
1.1.3. Příloha 3.....	26
1.1.4. Příloha 4.....	38
1.1.5. Příloha 5.....	43
2. Cíle habilitační práce .....	54
3. Vytvoření databáze pacientů s chronickou myeloidní leukemií.....	58
3.1. Cíle a charakteristika databáze .....	58
3.2. Struktura databáze a sledované parametry.....	61
3.3. Technické zajištění databáze a kontrola kvality dat.....	62
3.4. Analytické výstupy z databáze .....	64
3.5. Mezinárodní začlenění databáze .....	65
3.6. Přílohy ke kapitole 3.....	68
3.6.1. Příloha 6.....	68
3.6.2. Příloha 7.....	78
4. Analýza dat pacientů s chronickou myeloidní leukemií léčených v každodenní klinické praxi.....	88
4.1. Účinnost a snášenlivost léčby imatinibem v první linii v každodenní klinické praxi .....	89
4.2. Zavedení nových způsobů statistického hodnocení výsledků léčby TKI u pacientů s CML....	92
4.3. Dasatinib ve druhé linii po selhání a/nebo intoleranci imatinibu v každodenní praxi .....	95
4.4. Přílohy ke kapitole 4.....	102
4.4.1. Příloha 8.....	102
4.4.2. Příloha 9.....	108
4.4.3. Příloha 10.....	117
4.4.4. Příloha 11.....	122
5. Výzkum mechanismů rezistence k inhibitorům tyrozinkináz a jejich intolerance .....	132
5.1. Mechanismy rezistence k TKI .....	132
5.2. Problematika plazmatické a intracelulární dostupnosti imatinibu v klinické praxi .....	138
5.3. Detekce a monitorování mutací Bcr-Abl1 kinázové domény v klinické praxi .....	140

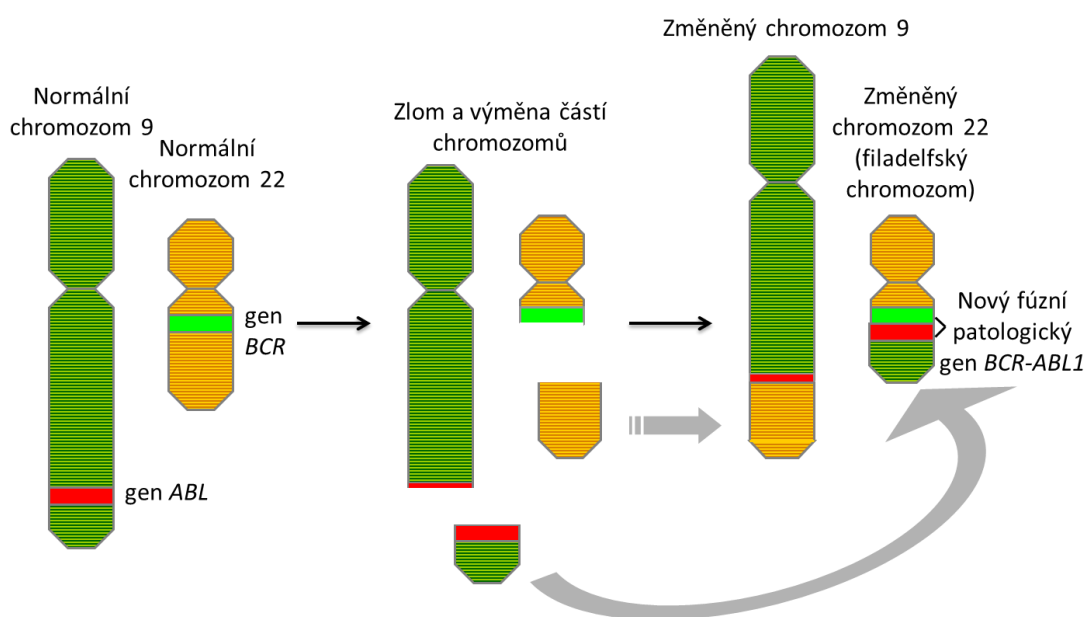
5.4. Další mechanismy rezistence a jejich výzkum .....	143
5.5. Intolerance TKI .....	145
5.6. Poruchy metabolismu glukózy a lipidů při léčbě nilotinibem .....	146
5.7. Přílohy ke kapitole 5 .....	150
5.7.1. Příloha 12 .....	150
5.7.2. Příloha 13 .....	155
5.7.3. Příloha 14 .....	160
5.7.4. Příloha 15 .....	168
5.7.5. Příloha 16 .....	175
5.7.6. Příloha 17 .....	185
5.7.7. Příloha 18 .....	205
5.7.8. Příloha 19 .....	209
5.7.9. Příloha 20 .....	214
6. Edukační činnost a osvěta nad rámec odborné veřejnosti.....	218
6.1. Spolupráce s organizací Diagnóza leukemie .....	219
6.2. Mezinárodní osvětová činnost .....	222
6.3. Přílohy ke kapitole 6 .....	227
6.3.1. Příloha 21 .....	227
6.3.2. Příloha 22 .....	269
6.3.3. Příloha 23 .....	274
7. Závěr a perspektivy do budoucna .....	280
8. Seznam použité literatury .....	281
9. Seznam zkratk.....	291
10. Seznam obrázků, tabulek a příloh .....	293
10.1. Seznam obrázků .....	293
10.2. Seznam tabulek .....	293
10.3. Seznam příloh.....	293



## 1. Úvod

Chronická myeloidní leukemie (CML) a její terapie pomocí specifických inhibitorů tyrozinkináz (tyrosine kinase inhibitors, TKI) představují jeden z nejúspěšnějších příběhů, které se kdy nejen v kontextu léčby hematologických malignit, ale v rámci onkologie a medicíny jako takové odehrály.

Prvenství mezi ostatními nádorovými chorobami si CML připsala již v roce 1960, kdy američtí vědci Peter Novell a David Hungerford popsali u pacientů s CML abnormálně zkrácený chromozom 22 [1]. Patologický chromozom, dle místa svého objevu nazvaný filadelfským chromozomem (chromosome Philadelphia, Ph1), byl vůbec první specifickou genetickou změnou identifikovanou u nádorového onemocnění. V následujících letech byla postupně rozkryta jeho cytogenetická podstata v podobě reciproké translokace mezi chromozomy 9 a 22 [2], a posléze byl odhalen i v důsledku translokace nově vzniklý patologický fúzní gen *BCR-ABL1* [3] (Obrázek 1).



**Obrázek 1.** Schéma reciproké translokace  $t(9;22)(q34;q11)$ , dávající vznik filadelfskému chromozomu a fúznímu genu *BCR-ABL1*.

Zjištění, že konstitutivně aktivovaná tyrozinkináza Bcr-Abl1, která je genem *BCR-ABL1* kódována, je zodpovědná za nekontrolované množení krvetvorných buněk a z toho vyplývající

projevy onemocnění, se stalo hybným motorem pro výzkum a vývoj specifické léčby cílené přímo na molekulární podstatu nemoci. První zástupce z řad TKI, imatinib mesylát, byl do klinické praxe uveden v roce 2001 jako vůbec nejrychleji schválený protinádorový lék v historii [4]. Na základě jeho jednoznačně vyšší účinnosti oproti dosavadnímu standardu konzervativní léčby, kombinaci interferonu- $\alpha$  a nízkodávkovaného cytosinarabinosidu, prokázané ve stěžejní studii „The International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS)“ se imatinib stal novou jasnou volbou pro léčbu první linie u pacientů s nově zjištěným onemocněním [5]. Doslova revoluční obrat v prognóze pacientů s CML byl potvrzen při poslední aktualizaci závěrů studie IRIS, kdy bylo u pacientů léčených imatinibem dosaženo 10leté celkové přežití 83,3 % [6]. V současnosti, kdy kromě imatinibu disponujeme čtyřmi dalšími, ještě účinnějšími přípravky z řady vyšších generací TKI – nilotinibem, dasatinibem a bosutinibem coby představiteli 2. generace a vysoce účinným zástupcem 3. generace TKI ponatinibem – můžeme říci, že hlavní cíl terapie nádorového onemocnění byl naplněn: očekávaná délka života pacientů s nově zjištěným onemocněním v chronické fázi se prakticky neliší od očekávané délky života celkové populace [7]. CML a její léčba pomocí TKI se tak staly paradigmatem úspěšné terapie pro celou onkologii.

O epidemiologii, diagnostice, léčbě a prognóze CML blíže pojednávají následující časopisecké publikace a knižní kapitoly uchazečky v roli autorky či spoluautorky, včetně doporučených postupů České hematologické společnosti České lékařské společnosti J. E. Purkyně (ČLS JEP) (řazeno chronologicky vzestupně). Pět vybraných publikací je součástí kapitoly 1.1. Přílohy k úvodu (řazeno tématicky):

- Mayer J., Žáčková D., Klamová H. Léčba chronické myeloidní leukémie – méně běžný pohled na moderní postupy. *Časopis lékařů českých*. 2008;147:206-210.
- Rohoň P., Žáčková D. Chronická myelocytová leukémie – od molekulovej patogenézy k cielenej liečbe. *Onkologie*. 2008;2(3):150-155. ISSN 1802-4475.
- Žáčková D., Mayer J. Nilotinib v první linii léčby pacientů s chronickou myeloidní leukémií v chronické fázi. *Farmakoterapie*. 2011;7(3): 261-268. ISSN 1801-1209.
- Žáčková D. Dasatinib v první linii léčby chronické myeloidní leukémie v chronické fázi. *Acta medicae*. 2012;1(7):27-32. ISSN 1805-398X.

- Žáčková D. Ponatinib, tyrosinkinázový inhibitor třetí generace, v léčbě pacientů s chronickou myeloidní leukemií. *Farmakoterapie*. 2015;11(5):563-571. ISSN 1801-1209.
- Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie v roce 2015. *Onkologie*. 2015;9(3):119-122. (viz Přílohu 1 v podkapitole 1.1.1.)
- Žáčková D. Tyrozinkinázové inhibitory v léčbě starších pacientů s chronickou myeloidní leukemií. *Vnitřní lékařství*. 2015;61(9):760-761. ISSN 0042-773X.
- Žáčková D. Problematika chronické myeloidní leukemie u seniorů. In Matějovská Kubešová H. a Kiss I. *Geriatrická onkologie*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2015, s. 257–265. ISBN 978-80-204-3738-9. (viz Přílohu 2 v podkapitole 1.1.2.)
- Rohoň P., Žáčková D. a Faber E. Chronická myeloidní leukemie. In: Rohoň P. *Nové možnosti v léčbě vybraných hematologických onemocnění*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2016, Edice postgraduální medicíny, s. 87–108. ISBN 978-80-204-4220-8.
- Žáčková D., Faber E., Indrák K., Rohoň P., Klamová H., Machová Poláková K., Karas M., Černá O., Skoumalová I., Bělohávková P., Žák P., Ráčil Z. a Mayer J. Chronická myeloidní leukemie. In: Mayer J., ed. *Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 1. vyd. Praha: Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně, 2016, s. 79–99. ISBN 978-80-260-9718-1. (viz Přílohu 3 v podkapitole 1.1.3.)
- Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie. In: Büchler T. *Speciální onkologie: pro přípravu ke zkouškám i pro každodenní praxi*. Praha: Maxdorf, 2017, s. 172–177. ISBN 978-80-7345-539-2.
- Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie – je možné léčbu ukončit? *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2020;22(1):36-45. ISSN 1212-4184. (viz Přílohu 5 v podkapitole 1.1.5.)
- Žáčková D. Léčba pacientů s chronickou myeloidní leukemií – nečekaný nebo očekávaný průnik onkologie a vnitřního lékařství? *Vnitřní lékařství*. 2020;66(4):e5-e6. ISSN 0042-773X.

- Čičátková P., Žáčková D.\* Vysazování inhibitorů tyrozinkináz u pacientů s chronickou myeloidní leukemií ve studiích a klinické praxi. *Transfuze a Hematologie Dnes*. 2020;26(4):279-291. (\**uchazečka je korespondujícím autorem publikace*).
- Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie. In: Büchler T. *Speciální onkologie*. Vydal Maxdorf s. r. o. v Praze, 2020. 2. aktual. a dopl. vyd. Praha: Maxdorf, 2020, s. 185–191. ISBN 978-80-7345-651-1. (viz Přílohu 4 v podkapitole 1.1.4.)
- Faber E., Žáčková D., Bělohávková P., Karas M., Klamová H., Machová Poláková K., Rohoň P., Skoumalová I., Ráčil Z. a Mayer J. Chronická myeloidní leukemie. In: Mayer J. a Doubek M., ed. *Léčebné postupy v hematologii 2020: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 1. vyd. Praha: Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně, 2020, s. 88–103. ISBN 978-80-260-9718-1.

Jako každá mince má dvě strany, tak i zdánlivě idylická situace kolem léčby CML má své limity. Například fakt, že celkové přežití (overall survival, OS) pacientů s CML je téměř analogické jako v nemoci nezatížené populaci *de facto* znemožňuje užití tohoto jinak tradičního parametru pro posouzení a porovnání účinnosti léčby. Užití jiných tzv. „time-to-event“ analýz rovněž není ideální, a to zejména z důvodu značné variability zohledňovaných parametrů v různých studiích [8]. Interpretačně zavádějící výsledky byly dokonce reportovány i v rámci jedné studie, již zmíněné IRIS, kdy byl termín „progression-free survival“ použit ve dvou po sobě následujících stěžejních publikacích, ale vždy pro jiný typ analýzy [5,9]. Nejen z těchto důvodů je obtížné výsledky léčby jednotlivými TKI ve studiích porovnávat, ale také je extrapolovat do každodenní klinické praxe, kde kromě nesouladu v definicích hodnocených parametrů přistupuje známý fakt, že pacienti léčení ve studiích jsou většinou významně mladší, méně komorbidní a mají lepší celkový stav [10-12]. Kvalitních dat z reálné klinické praxe, která by potvrdila či naopak rozporovala validitu doporučených léčebných postupů derivovaných povětšinou z výsledků klinických studií, navíc stále není dostatek.

Příkladem nepřesné interpretace či nadhodnocení výsledků dosažených v klinické studii může být i na první pohled veskrze uspokojivý dojem z křivky celkového přežití pacientů léčených imatinibem v rámci studie IRIS. Je ale třeba mít na paměti, že během desetiletého sledování

téměř polovina (49,2 %) pacientů z různých důvodů účast ve studii, resp. léčbu imatinibem ukončila [6]. Dominujícím důvodem byla rezistence na léčbu imatinibem, ať již v podobě ztráty léčebné odpovědi či jejího nedosažení. I přesto, že novější preparáty z řady vyšších generací TKI vykazují účinnost i proti většině imatinib-rezistentních mutací coby hlavnímu a nejlépe prostudovanému mechanismu rezistence, jejich reálná účinnost ve studiích co do podílu dosažených kompletích cytogenetických odpovědí (complete cytogenetic response, CCyR) je ve druhé linii pouze přibližně 50 % a v liniích dalších ještě nižší [13-17]. Mutace a některé další identifikovatelné mechanismy navíc zodpovídají jen zhruba za 50 % případů rezistence, v ostatních případech se většinou mechanismus nepodaří rozkrýt. Ukázalo se dále, že univerzálně rezistentní vůči působení všech TKI jsou leukemické kmenové buňky, které tak představují potenciální zdroj návratu onemocnění i po dosažení kvalitní léčebné odpovědi [18].

Rezistence nebyla jediným důvodem ukončování terapie ve studii IRIS. Imatinib sice v dlouhodobém horizontu jeví poměrně doboru snášenlivost a není spojen s výskytem život ohrožujících nežádoucích účinků (NÚ), přesto však je některými svými projevy intolerance (např. bolestmi a křečemi svalů, únavou či otoky) obtěžující a prokazatelně snižuje kvalitu života [19]. Změna na TKI vyšší generace sice většinou přináší úlevu v každodenním užívání, ale tyto přípravky jsou zase spojeny s rizikem závažných až život ohrožujících NÚ (např. pleurálními výpotky či plicní arteriální hypertenzí při terapii dasatinibem či cévními uzávěry při terapii nilotinibem či ponatinibem) [20-22]. Snahu o optimální management projevů nesnášenlivosti TKI ještě dále komplikuje fakt, že etiopatogeneze většiny NÚ dosud nebyla objasněna.

Právě zátěž nežádoucími účinky léčby byla jedním z hlavních impulsů pro úvahy o možném vysazení dlouhodobé terapie, jejíž prakticky celoživotní podávání, odůvodněné obavou z návratu nemoci při již zmíněné perzistenci leukemických kmenových buněk, nemá v onkologii obdoby. Kromě rizika NÚ a snížené kvality života je silným faktorem podporujícím vysazení také ekonomická náročnost léčby při narůstající prevalenci úspěšně zvládaného onemocnění [23], potřeba zajištění bezpečných gravidit [24] a také přání samotných pacientů [25]. V situaci, kdy díky účinné léčbě dosahuje stále více pacientů výborné léčebné odpovědi na molekulární úrovni, často až na hranici limitu detekce zbytkové choroby, se cíl léčby CML

posunul od dlouhodobého přežití na léčbě směrem k jejímu vysazení a dosažení stavu tzv. remise bez nutnosti terapie (treatment-free remission, TFR). Celá řada studií a již i zkušeností z každodenní klinické praxe prokázala proveditelnost a relativní bezpečnost tohoto postupu, kdy se dosažení setrvalé TFR po vysazení TKI daří u zhruba 50 % pacientů v hluboké molekulární remisi [26-32]. Je však třeba současně zdůraznit, že koncept TFR zdaleka není ideální: u zbývajících 50 % pacientů se pro vzestup hladiny zbytkové choroby musí léčba TKI obnovit, stále nevíme, co udělá vysazení po mnoha letech ve smyslu neznámého rizika pozdního relapsu, a i u úspěšně vysazených pacientů v TFR narážíme na problémy, např. v podobě nečekaných NÚ v rámci tzv. syndromu z vysazení [33]. Když navíc přičteme fakt, že řada pacientů má z vysazení TKI obavy a nepřeje si je a že pro vysazení je nutná setrvalá hluboká molekulární odpověď, kterou dosahuje v závislosti na zvoleném TKI jen asi 20 - 40 % všech pacientů s nově zjištěným onemocněním, je jasné, že naprostá většina pacientů s CML je stále odkázaná na celoživotní terapii.

Skutečnost, že prognóza pacientů s CML diagnostikovanou v chronické fázi (chronic phase, CP) je vynikající a že onemocnění samotné nezkracuje přirozenou délku života, je sice pro pacienty velmi povzbudivou informací, ale sama o sobě neznamená, že pacient již nemá další otázky a problémy k řešení. Právě naopak, chronický charakter onemocnění, které je mnohdy zjištěno náhodně a pacient nemá v úvodu žádné nebo jen velmi mírné symptomy, a dále nutnost prakticky celoživotní terapie, která naopak je nežádoucími a mnohdy nepříjemnými symptomy zatížena, kladou na řádnou informovanost pacienta a na interakci lékař-pacient jako takovou velký důraz. Případná nespolečná práce pacienta ve smyslu vynechávání pravidelně užívané medikace se překvapivě ukázala jako významný mechanismus rezistence na terapii s možným důsledkem ve ztrátě nabyté léčebné odpovědi a zhoršení pacientovy prognózy [34,35].

Všechny výše uvedené aspekty představují jednoznačné výzvy k řešení za účelem optimalizace péče o pacienty s CML a logicky se tak staly východisky a cíli předkládané habilitační práce. Bližší specifikace jednotlivých tématických okruhů a vytyčených cílů, a zejména pak jejich plnění je náplní následujících kapitol.

## **1.1. Přílohy k úvodu**

### **1.1.1. Příloha 1**

Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie v roce 2015. *Onkologie*. 2015;9(3):119-122.

## Chronická myeloidní leukemie v roce 2015

Daniela Žáčková

Interní hematologická a onkologická klinika, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice Brno

Přirozený průběh a zejména pak prognóza pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) doznaly za posledních čtrnáct let zcela zásadní změny k lepšímu díky zavedení cílené léčby tyrozinkinázovými inhibitory (TKI). V současné době jsou k dispozici tři přípravky do první linie (imatinib, nilotinib a dasatinib) a pro případ selhání či intolerance v úvodu zvolených léků je nabídka obohacena o další dva účinné preparáty, bosutinib a ponatinib. Velký důraz je kladen na pravidelné a standardizované monitorování léčebného efektu, kdy je v případě nedosažení kýžené léčebné odpovědi v daném časovém horizontu indikována změna za účinnější přípravek. Význam časné změny terapie při nedosažení tzv. časné molekulární odpovědi je diskutován a dosud nepotvrzen. Rovněž možnost a proveditelnost úplného vysazení TKI u pacientů s trvajícím hlubokou molekulární odpovědí je sice příslibem potenciálního vyléčení z CML, nicméně zatím zůstává aktem přísně kontrovaným v rámci klinických studií, který ještě nelze spolehlivě přenést do klinické praxe. V situacích, kdy selžou dva a více TKI, či je přítomna mutace T315I, anebo jsme svědky progresu do pokročilých stadií CML, nelze opomenout variantu alogenní transplantace krvetvorných buněk, která je i v éře TKI jedinou léčebnou metodou s prokázaným kurativním potenciálem.

**Klíčová slova:** chronická myeloidní leukemie, *BCR-ABL1*, tyrozinkinázové inhibitory, alogenní transplantace krvetvorných buněk.

### Chronic myeloid leukemia in 2015

Natural course and particularly prognosis of the patients with chronic myeloid leukemia (CML) improved fundamentally during last fourteen years thanks to tyrosine kinase inhibitors (TKI) targeted therapy introduction. Currently, three TKI (imatinib, nilotinib, and dasatinib) are available for the first line treatment, and two other efficient drugs (bosutinib and ponatinib) can be used in the case of failure or intolerance of previously administered TKI. Regular and standardized treatment efficacy monitoring is crucial for appropriate and timely change of therapy when required responses are not met in given time points. Prognostic significance of early treatment switch in case of failure to achieve an early molecular response has not been established yet. Similarly, even if the data suggest possibility and feasibility of stopping TKI therapy in patients with durable deep molecular response, at present, stopping TKI should only be done in the context of clinical trials and cannot be routinely recommended into clinical practice. Allogeneic stem cells transplantation is still the only curative treatment option even in the TKI era, and should be used in the following situations: patients who fail at least 2 TKI, patients with presence of T315I mutation and patients who progress into advanced stages of the disease.

**Key words:** chronic myeloid leukemia, *BCR-ABL1*, tyrosine kinase inhibitors, allogeneic stem cells transplantation.

Onkologie 2015; 9(3): ???

### Úvod

Chronická myeloidní leukemie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění s incidencí 1,2 případů na 100 000 obyvatel, představující asi 15 % nově diagnostikovaných leukemií v dospělém věku (1). Je charakterizovaná přítomností tzv. Filadelfského chromozomu (Ph), vzniklého reciprokou translokací mezi chromozomy 9 a 22, a fúzního genu *BCR-ABL1* z translokace rezultujícího. Konstitutivně aktivovaná tyrozinkináza Bcr-Abl, která je genem *BCR-ABL1* kódována, je zodpovědná za nekontrolované množení krvetvorných buněk a z toho vyplývající projevy onemocnění (2). Přítomnost unikátní genetické abnormality se silným patogenetickým potenciálem umožnila vývoj specifických inhibitorů patologické tyrozinkinázy, jejichž uvedení do klinické praxe a zejména pak vynikající účinnost doslova revolučním způsobem změnily dosavadní léčebný management a prognózu tohoto onemocnění. Do doby zavedení prototypu tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) imatinibu do klinické praxe v roce 2001

byl zlatým standardem konzervativní terapie pacientů s CML interferon- $\alpha$ , často v kombinaci s cytosinarabosidem, a pro vhodné kandidáty s dostupným dárce byla léčbou volby alogenní transplantace krvetvorných buněk (alo-TKB). Předpokládáné 10leté celkové přežití pacientů s CML v chronické fázi se díky novému cílenému léčebnému přístupu navýšilo z původních cca 20 % na 80–90 % (3). Jinými slovy, léčbou dobře kontrolované onemocnění nezkracuje přirozenou délku života jeho nositelů. CML a terapie TKI se tak staly paradigmatem úspěšné protinádorové léčby, a to nejen v kontextu ostatních hematologických malignit, ale v rámci onkologie jako takové.

### Klinický obraz a diagnostika

Přibližně 30–50 % pacientů s nově diagnostikovanou CML nemá žádné příznaky a onemocnění je u nich zjištěno náhodně při vyšetření krevního obrazu (KO) např. v rámci preventivní prohlídky či předoperačního vyšetření. U CML rozlišujeme 3 fáze: chronickou (*chronic phase*, CP), akcelerova-

nou (*accelerated phase*, AP) a blastickou fází (*blast phase*, BP), přičemž 95 % všech pacientů je diagnostikováno ve fázi chronické. V KO dominuje leukocytóza (20–500 × 10<sup>9</sup>/l), často i trombocytémie (400–1 000 × 10<sup>9</sup>/l). V diferenciálním rozpočtu leukocytů nacházíme všechna vývojová stadia neutrofilních granulocytů, často je přítomna eozinofilie a bazofilie. V kostní dřeni (KD) jsme svědky zvýšené buněčnosti se zvýšením podílu bílé složky na úkor červené. Opět dominují granulocyty různého stupně zralosti, je přítomna eozinofilie a bazofilie. Výše popsaný nález přísluší nejčastěji chronické fázi; obraz v AP a BP je modifikován dominantně ve smyslu nárůstu podílu blastických elementů na úkor vyzrálých buněk. Příznaky onemocnění u symptomatických nemocných jsou často mírné a nespecifické, rezultující ze zvýšeného metabolismu, splenomegalie a anémie. Zahrnují únavu, pocení, váhový úbytek, sub- až febrilie, bolesti v levém podžebří, pocit plnosti po jídle. Vzácněji jsme svědky krvácení, trombózy či projevů leukostázy: dušnosti až dechové tísně, neurologických příznaků či priapizmu, tedy trvalé



**Tabulka 1.** Definice odpovědí na léčbu kterýmkoliv schváleným TKI v první linii (platí pro všechny fáze CML a rovněž pro 2. linii léčby v případě změny pro intoleranci prvního TKI) (10)

Doba hodnocení	Optimální odpověď	Varování	Selhání
V době diagnózy	NA	Vysoké riziko dle Sokala, Hasforda či EUTOS nebo CCA/Ph+	NA
3 měsíce	$BCR-ABL1 \leq 10\%$ a/nebo Ph+ $\leq 35\%$	$BCR-ABL1 > 10\%$ a/nebo Ph+ 36–95 %	< CHR a/nebo Ph+ > 95 %
6 měsíců	$BCR-ABL1 < 1\%$ a/nebo Ph+ 0	$BCR-ABL1 1-10\%$ a/nebo Ph+ 1–35 %	$BCR-ABL1 > 10\%$ a/nebo Ph+ > 35 %
12 měsíců	$BCR-ABL1 \leq 0,1\%$	$BCR-ABL1 > 0,1-1\%$	$BCR-ABL1 > 1\%$ a/nebo Ph+ > 0
Posléze a kdykoliv	$BCR-ABL1 \leq 0,1\%$	CCA/Ph- (-7 nebo 7q-)	Ztráta CHR Ztráta CCyR, Potvrzená ztráta MMR? Mutace CCA/Ph+

Zkratky: NA, nelze použít (*not applicable*); CCA/Ph+, klonální cytogenetické abnormality v Ph pozitivních buňkách (clonal chromosomal abnormalities in Ph positive cells); EUTOS (*The European Treatment and Outcome Study for CML*); CHR, kompletní hematologická odpověď (complete hematologic response); CCyR, kompletní cytogenetická odpověď (complete cytogenetic response); PCyR, parciální cytogenetická odpověď (partial cytogenetic response); MMR, velká molekulární odpověď (major molecular response);  $BCR-ABL1 \leq 0,1\%$  = MR3.0 nebo lepší; CCA/Ph-, klonální cytogenetické abnormality v Ph negativních buňkách (clonal chromosomal abnormalities in Ph negative cells)

<sup>1</sup>Hladina transkriptů  $BCR-ABL1$  v mezinárodním měřítku IS

<sup>2</sup>Ve 2 po sobě následujících testech, z nichž v jednom je hladina transkriptů  $BCR-ABL1 \geq 1\%$ .

a bolestivé erekce. Fyzikální vyšetření odhalí zejména různě velkou splenomegálii u necelých 50 % nemocných, méně často i hepatomegálii. Obecně platí, že s pokročilostí fáze narůstá i intenzita symptomů (4).

Zásadním pro potvrzení diagnózy CML je průkaz Ph-chromozomu cytogenetickým vyšetřením KD. U asi 5 % pacientů nelze Ph-chromozom detekovat; v tom případě je možno prokázat gen  $BCR-ABL1$  pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) buněk KD nebo periferní krve (PK) nebo transkript  $BCR-ABL1$  pomocí kvalitativní polymerázové řetězcové reakce s využitím reverzní transkriptázy (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR) (5).

### Léčba v chronické fázi v první linii

Pro úvodní léčbu pacientů s nově diagnostikovanou CML jsou v klinické praxi dostupné tři preparáty z řady TKI: imatinib mesylát (Glivec), nilotinib (Tasigna) a dasatinib (Sprycel). První jmenovaný preparát byl poprvé podán pacientům v rámci klinických studií v roce 1999 a již v roce 2001 byl díky své vynikající účinnosti a dobrému bezpečnostnímu profilu, kterými se prezentoval v klíčové studii IRIS (*The International Randomized Study of Interferon and ST1571*), schválen v dávce 400 mg/den per orálně jako nový zlatý standard úvodní léčby pacientů s nově diagnostikovanou CML v CP (6). Po 8 letech sledování pacientů léčených imatinibem ve studii IRIS setrvává 81 % bez události progresu a celkové přežití (overall survival, OS) se započtením jen úmrtí vztažených

k CML je 93%. Nicméně, po 8 letech zůstává z různých důvodů na léčbě imatinibem jen 55 % pacientů (3). Navíc existují data o účinnosti imatinibu v každodenní klinické praxi, tedy mimo rámec klinických studií, s poněkud přílehavěji definovanými událostmi v analýzách přežití, než jako tomu bylo ve studii IRIS, která též poukazuje na nezanedbatelný podíl pacientů, u nichž musí být léčba imatinibem ukončena z důvodu nedostatečné léčebné odpovědi či intolerance (7).

Nilotinib a dasatinib jsou představiteli TKI 2. generace, původně vyvinutými právě pro případy, kdy léčba imatinibem v první linii selhává. A právě jejich vyšší účinnost oproti imatinibu v *in vitro* testech a úspěch v klinickém užití v případě selhání terapie imatinibem vedly k jejich porovnání vůči imatinibu i u nově diagnostikovaných pacientů. Obě stěžejní studie prokázaly, že jak nilotinib tak dasatinib byly v randomizovaném srovnání s imatinibem účinnější ve všech sledovaných parametrech, zejména pak v rychlosti a hloubce dosažených léčebných odpovědí a v ochraně před progresí do pokročilých fází onemocnění. Zdali se lepší časné výsledky promítnou i do výraznějšího posunu v parametrech celkového přežití ukáže delší doba sledování (8, 9).

Současná platná mezinárodní doporučení umožňují zvolit pro úvod léčby kterýkoliv z nabídky tří výše jmenovaných preparátů (10). Ve vlastní volbě přípravku hraje roli hned několik faktorů. Jednak je to dostupnost a potažmo i cena přípravku. Například v ČR mají v době vzniku tohoto textu stanovenou úhradu jen ima-

tinib a nilotinib, zatímco dasatinib v první linii v našich podmínkách předepsat nelze. Obecně vysoká cena TKI a blížící se či již aktuální vypršení patentu pro Glivec a následný pokles ceny generického imatinibu v řadě zemí mohou též výběr přípravku ovlivnit. Svou roli hraje i rozdílný profil nežádoucích účinků (NÚ) jednotlivých preparátů. V případě imatinibu jsou to dominantně svalové kloubové projevy (křeče, bolesti), trávicí potíže (průjem, nevolnost, zvracení), retence tekutin, únava. Nilotinib pak kromě podobných potíží, jaké způsobuje imatinib, může vést k rozvoji kožní vyrážky a má řadu metabolických efektů, jakými je vzestup glykémie, bilirubinu, hladiny amylázy a lipázy v séru či rozvoj hyperlipidémie. V poslední době se množí informace o vyšší incidenci cévních NÚ při léčbě nilotinibem. Nežádoucím projevům při léčbě dasatinibem zase vévodí etiopatogeneticky dosud nejasné pleurální, popřípadě perikardiální výpotky. S ohledem na individuální profil komorbidit daného pacienta a profil toxicity každého přípravku je třeba zvolit co nejméně rizikový preparát. V neposlední řadě je třeba zvážit sice nízké, ale přesto možné a obávané riziko progresu do pokročilých fází choroby a v případě přítomnosti některých varovných signálů již při stanovení diagnózy (viz dále) se přiklonit k podání účinnějšího přípravku z nabídky TKI 2. generace (11).

### Monitorování léčebného efektu

Nehledě na volbu konkrétního přípravku pro úvodní léčbu je zcela zásadním pro dosažení optimálního výsledku řádné, pravidelné a standardizované monitorování efektu léčby. Cytogenetické vyšetření KD je doporučeno provést jednak při diagnóze, jednak ve 3., 6. a 12. měsíci od zahájení terapie TKI do dosažení kompletní cytogenetické odpovědi (*complete cytogenetic response*, CCyR), po té až 12 měsíců. Současně je doporučeno provádět kvantitativní molekulárně-genetickou analýzu pomocí RQ RT-PCR (*real-time quantitative reverse transcriptase PCR*; RQ RT-PCR) z PK až 3 měsíce, která může po dosažení CCyR zcela nahradit cytogenetickou analýzu. V případě selhání či progresu je indikována i mutační analýza, v případě podezření na BP též imunofenotypizace. Jsou-li přítomny varovné známky, je vhodné provádět kvantitativní analýzu častěji.

Dosažení určité hloubky léčebné odpovědi na úrovni hematologické, ale zejména cytogenetické a molekulární v určitém časovém intervalu od zahájení terapie TKI se ukázalo být nejvýznamnějším prognostickým faktorem s ohledem na další osud nemocných. Jako „op-

timální odpověď“ je označována ideální situace, kdy pokračování v zavedené léčbě je příslibem dosažení dlouhodobých výborných výsledků. Je-li léčebná odpověď vyhodnocena jako „selhání“, je jednoznačně indikována změna doposud podávané terapie s cílem snížit riziko progresse do pokročilých fází onemocnění až případného úmrtí. Mezi těmito dvěma kategoriemi figurují tzv. „varovné znaky“, které představují takové charakteristiky onemocnění samotného či léčebnou odpověď, které samy o sobě nejsou výzvou ke změně terapie, ale spíše k bedlivějšímu monitorování (10). Definice odpovědí na léčbu kterýmkoliv schváleným TKI v první linii u nově diagnostikovaných pacientů v kterékoliv fázi onemocnění jsou uvedeny v tabulce 1.

Obzvláště diskutovaným tématem poslední doby je dosažení tzv. časné molekulární odpovědi ( $BCR-ABL1 \leq 10\%$  ve 3. měsíci). Třebaže její prognostický význam z hlediska dlouhodobých výsledků prokázala řada autorských týmů, význam a dopad případné změny léčby v této situaci doposud čeká na potvrzení (12, 13). Podobně je diskutována nezbytnost dosažení a udržení velké molekulární odpovědi (*major molecular response*, MMR, tj. hladina transkriptů  $BCR-ABL1$ /kontrolní gen  $\leq 0,1\%$  mezinárodní škály) u pacientů, kteří dosáhli CCyR. Zatímco dosažení CCyR je spojeno s jasným benefitem z hlediska dlouhodobých výsledků (přežití celkové a bez progresse), přídavek v podobě MMR další významné zlepšení výsledků nepřináší (14). Naopak, nedosažení či ztráta CCyR či jiná varianta selhání léčby (viz tabulka 1) jsou indikací ke změně doposud podávané terapie.

### Léčba v případě selhání či intolerance první linie

Příčinou nedosažení kýžené léčebné odpovědi v daném časovém bodě (tzv. primární rezistence) nebo ztráty léčebné odpovědi již dosažené (tzv. sekundární rezistence) může být vznik bodových mutací  $Bcr-Abl$  kinázové domény (KD), znemožňujících účinnost TKI, dále neadekvátní aktivita proteinů zajišťujících transport TKI z a do cílových buněk, klonální evoluce, snížená dostupnost TKI v důsledku poruchy vstřebávání při onemocněních trávicího traktu či v důsledku lékových interakcí na úrovni metabolismu léků v játrech a konečně non-compliance samotných pacientů. V přibližně 50% případů nejme schopni příčinu rezistence odhalit (15). Problémem vynucujícím si změnu doposud podávané léčby může být i intolerance původně podávaného preparátu.

Nabídka možností pro druhou a další linie léčby pacientů se selháním a/nebo intolerancí

primárně užitého preparátu se v současné době rozšířila oproti původně jediným dostupným, nilotinibu a dasatinibu, o další účinné přípravky – bosutinib (Bosulif) a ponatinib (Iclusig). Ani jeden z těchto nových TKI 2., resp. 3. generace však nemají toho času v ČR schválenou úhradu pro 2. ani další linie léčby. Vzhledem k faktu, že ponatinib je jediným TKI, který je účinný vůči polyrezistentní mutaci T315I, je vynaloženo úsilí ke zvýšení dostupnosti přípravku pro potřebné pacienty. Toho času lze v ČR požádat revizního lékaře o souhlas s mimořádnou úhradou obou zmíněných nových TKI v situaci, kdy se jedná o jedinou léčebnou možnost pro pacienta, a to na základě §16 Zákona o veřejném zdravotním pojištění. Oba léky byly též testovány v první linii v randomizovaném srovnání s imatinibem, přičemž obě studie byly komplikovány NÚ přípravků. V případě studie s bosutinibem významné procento pacientů vyvinulo během léčby průjem (84%) a studie s ponatinibem byla dokonce předčasně uzavřena pro alarmující výskyt závažných kardiovaskulárních NÚ ve skupině léčené ponatinibem. Nicméně v dalších liniích léčby a s adjustací dávky léku je předpoklad převahy benefitu nad negativy obou přípravků (11, 16).

Účinnost všech 4 TKI připadajících v úvahu do druhé léčebné linie lze na základě dostupných dat shrnout následovně: 40–50% pacientů dosahuje CCyR a 25–35% MMR, přičemž 70–80% pacientů udrží nabytou odpověď dlouhodobě (2–5 let) (17–20). Žádná studie, která by porovnála přípravky navzájem, neexistuje. Při volbě mezi jednotlivými preparáty tak, podobně jako bylo uvedeno u první linie léčby, rozhodují opět komorbidity pacienta a k nim vztažený profil toxicit toho kterého přípravku, a rovněž znalost přítomnosti případné mutace  $Bcr-Abl$  KD a její citlivosti k jednotlivým TKI.

V situaci, kdy léčba dvěma či více TKI selhává, přípravky nejsou dostupné nebo je přítomna mutace T315I, nesmíme zapomenout na variantu alo-TKB, která si i v éře TKI zachovává jako jediná léčebná metoda kurativní potenciál (10). Zcela nezastupitelná je pak v léčbě pokročilých fází CML (viz dále).

### Léčba pokročilých fází CML

CML může být v pokročilé fázi již diagnostikována (do 5% všech nově diagnostikovaných případů CML) nebo dojde k progresi z CP buď vývojem přes AP do BP, nebo přímo do BP.

Úvodní terapii pokročilých fází je možno opřít o TKI (v první linii imatinib, v případě progresse z CP pak dasatinib či ponatinib) ideálně

v kombinaci s intenzivní chemoterapií, kopírující indukční chemoterapeutické režimy užívané v léčbě akutní myeloblastické a akutní lymfoblastické leukemie. Podíl léčebných odpovědí a medián OS dosahované touto kombinací se pohybují kolem 40% a mezi 6–12 měsíci u non-lymfoidních BP a mezi 70–80% a 12–24 měsíci u lymfoidních BP (21, 22). Obecně lze říci, že progresse CML do AP či BP během terapie TKI v CP je spojena s obzvláště špatnou prognózou a léčba samotnou chemoterapií s/či bez přidání TKI zatím nepřináší větší šanci na dlouhodobé přežití. Z toho důvodu je alo-TKB indikována u všech pacientů vhodných pro tuto proceduru. Celkové přežití pacientů podstupujících alo-TKB pro non-lymfoidní a lymfoidní BP se pohybuje v rozmezí 15–40% a 5–20%, respektive. Z hlediska volby přípravného režimu před transplantací pro BP je preferován myeloablativní přípravný režim. Význam užití TKI jako sekundární profylaxe či udržovací terapie po úspěšně provedené alo-TKB není sice jednoznačně prokázán, ale podání TKI v této indikaci se nabízí jako poměrně logický krok ochrany pacienta před život limitující situací v podobě relapsu choroby. V případě molekulárního relapsu onemocnění či přetrvávající zbytkové nemoci na molekulárně-genetické úrovni má léčba TKI své pevně zakotvené místo spolu s podáním infuze dárčkových lymfocytů (*donor lymphocyte infusion*, DL) (10).

### Délka trvání terapie a možnost jejího ukončení

Současná doporučení pro léčbu pacientů s CML pomocí TKI vyznívají ve smyslu jejich dlouhodobého podávání v případě, že trvá jejich klinický přínos (ať již jde o optimálně odpovídající pacienty či případy, kdy není dosaženo optimální odpovědi, ale pacientům nelze z různých důvodů nabídnout jinou alternativu a z podávané terapie jednoznačně profitují) (10).

Ve snaze docílit stav, kdy bude optimální léčebná odpověď zachována i bez nutnosti celoživotního podávání léků, jsou v současné době prováděny kontrolované pokusy s vysazováním TKI u pacientů se setrvalou hlubokou molekulární odpovědí v rámci klinických studií. Dosavadní výsledky, získané v rámci francouzské studie STIM (*STop Imatinib Trial*), vyznívají ve smyslu reálné a bezpečné varianty setrvání v hluboké molekulární odpovědi i po vysazení TKI přibližně pro 40% pacientů s mediánem sledování 50 měsíců od ukončení terapie (23). Rovněž další „vysazovací“ studie došly k podobným závěrům. Téměř u všech pacientů s molekulárním relapsem onemocnění se opětovným nasazením

TKI podařilo hlubokou molekulární odpověď obnovit (24). Nezanedbatelným aspektem je i finanční úspora, kterou vysazení nákladné léčby zdravotnickému systému přináší. Nicméně, data jsou stále ještě nedostatečná jak co do délky sledování tak i velikosti souboru, aby bylo možno vyslovit jasné doporučení pro vysazení terapie mimo kontrolované klinické studie. Vysazení je možno zvážit pouze v individuálních případech; například v souvislosti s plánovaným mateřstvím či u pacientů s významnou intolerancí TKI při trvající hluboké molekulární odpovědi. Nutnou podmínkou vysazení jakékoliv podávané medikace je frekventní a vysoce kvalitní monitorování molekulární odpovědi (10).

### Závěr a perspektivy do budoucna

Osud pacientů s CML se za posledních 14 let zásadně změnil k lepšímu díky zavedení TKI do klinické praxe. V situaci, kdy se přežití pacientů s CML v CP téměř neliší od přežití populace nezatížené touto chorobou, je zdánlivě obtížné hledat prostor pro další zlepšení výsledků léčby. Absence úkolů do budoucna je však opravdu jen zdánlivá. Další výzkumné úsilí je třeba věnovat variantě „molekulárního“ vyléčení pacientů, tj. dosažení hluboké a trvalé molekulární odpovědi až nedetekovatelných transkriptů bez nutnosti trvalého užívání TKI. Tento cíl nabývá na významu s trvale se zvyšující prevalencí CML, kdy je nutno čelit zátěži pacientů i zdravotnického systému ve smyslu dlouhodobé medikace s nezanedbatelnými a potenciálně rizikovými nežádoucími účinky, ovlivněním kvality života a rizikem non-compliance, dále pak ve smyslu dostupnosti léčby a její ekonomické náročnosti. Cesta k dosažení vytyčeného cíle může vést přes výzkum a vývoj ještě účinnějších TKI nebo jejich kombinací s některými reaktivizovanými přípravky (interferon- $\alpha$ , decitabin) či pokus o ovlivnění dalších drah v přenosu signálu či přímo leukemických kmenových buněk, které vykazují rezistenci ke všem doposud dostupným TKI.

I s připuštěním všech výzev do budoucna je možné CML a její terapii pomocí TKI v roce 2015 označit jako vzor úspěšné protinádorové léčby, přinášející inspiraci pro vědeckovýzkumné úsilí napříč celou onkologií.

### Literatura

- Jemal A, Siegel R, Xu L, et al. Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277–300.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007; 370: 342–350.
- Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, et al. International randomized study of interferon vs. ST1571 (IRIS) 8-year follow-up: sustained survival and low risk for progression of events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. *Blood* 2009; 114: Abs. No. 1126.
- Faber E, Indrák K. Chronická myeloidní leukémie. *Praha: Galén* 2010: 234.
- Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukaemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6041–6051.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 994–1004.
- Zackova D, Klamova H, Dusek L, et al. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials? *Am J Hematol* 2011; 86(3): 318–321.
- Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362(24): 2260–2270.
- Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al. ENESTnd Investigators. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362(24): 2251–2259.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122(6): 872–884.
- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol* 2014; 89: 548–556.
- Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and ST1571 (IRIS). *Blood* 2010; 116(19): 3758–3765.
- Hanfstein B, Müller MC, Hehlmann R, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia* 2012; 26(9): 2096–2102.
- Kantarjian HM, Shan J, Jones D, et al. Significance of increasing levels of minimal residual disease in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous

leukemia in complete cytogenetic response. *J Clin Oncol* 2009; 27(22): 3659–3663.

- Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Palandri F, Rosti G. Definition and treatment of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* 2014; 7(3): 397–406.
- Kantarjian HM, Cortes JE, Kim DW, et al. Bosutinib safety and management of toxicity in leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2014; 123(9): 1309–1318.
- Shah NP, Kim DW, Kantarjian H, et al. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica* 2010; 95 (2): 232–240.
- Kantarjian HM, Giles FJ, Balla KN. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood* 2011; 117(4): 1141–1145.
- Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2013; 369(19): 1783–1796.
- Cortes JE, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 2011; 118(17): 4567–4576.
- Thomas DA, Faderl S, Cortes J, et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood* 2004; 103(12): 4396–4407.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Garcia-Manero G, et al. A pilot study of imatinib, low-dose cytarabine and idarubicin for patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast phase. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(2): 283–289.
- Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(11): 1029–1035.
- Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 2013; 122(4): 515–522.

Článek přijat redakcí: 16. 2. 2015

Článek přijat k publikaci: 2. 3. 2015

**MUDr. Daniela Žáčková, Ph. D.**

Interní hematologická a onkologická klinika

LF MU a FN Brno

Jihlavská 20, 625 00 Brno

dzackova@fnbrno.cz

### 1.1.2. Příloha 2

Žáčková D. Problematika chronické myeloidní leukemie u seniorů. In Matějovská Kubešová H. a Kiss I. *Geriatrická onkologie*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2015, s. 257–265. ISBN 978-80-204-3738-9.

## 16 Problematika chronické myeloidní leukemie u seniorů

Daniela Žáčková

### Charakteristika a epidemiologie

Chronická myeloidní leukemie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění charakterizované přítomností tzv. filadelfského chromosomu (Ph chromosomu), vzniklého reciprokou translokací mezi chromosomy 9 a 22 a fúzí genu BCR-ABL1 z translokace rezultujícího. Konstitutivně aktivovaná tyrozinkináza Bcr-Abl, která je genem BCR-ABL1 kódována, je zodpovědná za nekontrolované množení krevetvorných buněk a z toho vyplývající projevy onemocnění. Příčina vzniku této genetické abnormality není známa. Vývoj specifických inhibitorů patologické tyrozinkinázy (tyrosine kinase inhibitors - TKI) a jejich uvedení do klinické praxe v roce 2000 vedly k doslova revolučnímu zlepšení výsledků léčby a prognózy pacientů s CML, zejména diagnostikovaných v chronické fázi.

Incidence CML v ČR je 1,2/100 tisíc obyvatel/rok, celosvětově se udává rozptýlené 0,6-2 případy na 100 tisíc obyvatel za rok. Incidence onemocnění s věkem narůstá a věkový medián v době diagnózy onemocnění se podle údajů z epidemiologických registrů pohybuje v rozmezí 60-65 let. V klinických studiích však není výjimkou medián věku nižší i o více než 10 let. Díky úspěšné léčbě pomocí TKI dochází trvalému nárůstu prevalence onemocnění s předpokladem dosažení hodnoty 1/1 000 obyvatel za 20 let.

### Klinický obraz a diagnostika

V klinickém průběhu CML rozlišujeme tři fáze: chronickou fázi (CP – chronická fáze), ve které je v současně době diagnostikováno téměř 95 % pacientů, akcelerovanou fázi (AP – accelerated phase) a blastickou krizi (BP – blastická fáze), označované jako tzv. pokročilá fáze choroby. Kritéria sloužící k odlišení jednotlivých stadií onemocnění jsou uvedena v tabulce 16.1. Příznaky CML jsou mírné a nespecifické, nebo dokonce žádné (ve 30-50 % případů) a onemocnění je tak zjištěno náhodně, například při vyšetření krevního obrazu v rámci preventivní prohlídky. U symptomatických nemocných zahrnují únavu, zvýšené pocení, váhový úbytek, sub- až febrilie, bolesti v levém podžebří, pocíty plnosti po jídle. Vzácněji jsme svědky krvácení, trombozy či projevů leukostázy: dušnosti až dechové tísně, neurologických příznaků či přápisumu, tedy trvalé a bolestivé erekce. Fyzikální vyšetření odhalí zejména různé velkou splenomegalii u necelých 50 % nemocných, méně často i hepatomegalii. S pokročilostí fáze narůstá i intenzita symptomů, existují však i výjimky z tohoto pravidla. Obecně není rozdíl mezi projevy onemocnění u pacientů starších a mladších.

Základním diagnostickým postupem je vyšetření krevního obrazu (KO), diferenciálního rozpočtu leukocytů a vzorku kostní dřeně (KD) odebraného sternální punkcí. V KO dominuje leukocytóza (20-500 × 10<sup>9</sup>/l), často i trombocytémie (400-1 000 × 10<sup>9</sup>/l), vzácněji pak trombocytopenie, erytrocytóza či anémie. V diferenciálním rozpočtu leukocytů nacházíme tzv. posun doleva s vyplavením všech

vývojových stadií gramulocytů. Typická je eozinofilie a bazofilie. Vyšetření aspirátu KD odhalí hypercelularitu se zvýšením podílu bílé složky na úkor červené. Opět dominují gramulocyty různého stupně zralosti, je přítomna eozinofilie a bazofilie. V pokročilých fázích je nález v PK a KD modifikován dominantně ve smyslu nárůstu podílu blastických elementů na úkor vyzrávajících buněk, jak je patrné z tabulky 16.1. V séru bývá zvýšená hodnota laktátdehydrogenázy a hladiny kyseliny močové.

Tab. 16.1 Definice klinických fází chronické myeloidní leukemie (akcelerované a blastické) podle WHO kritérií

Akcelerovaná fáze (AP) – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:
- blastů 10–19 % v KD nebo PK
- bazofilů ≥ 20 % v PK
- perzistující trombocytopenie (< 100 × 10 <sup>9</sup> /l) nezpůsobená léčbou nebo perzistující trombocytóza (> 1 000 × 10 <sup>9</sup> /l) nereagující na terapii
- zvětšující se slezina a narůstající počet leukocytů nereagující na léčbu
Blastická fáze (BP) – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:
- klonální evoluce (tj. přítádné cytogenetické změny)
- blastů > 20 % v KD nebo PK
- extramedulární blastická infiltrace
- velká ložiska nebo sličky blastů (CD34+, IdT+) v biopsii KD

KD – kostní dřeň, PK – periferní krev

Zasadním pro potvrzení diagnózy CML je průkaz Ph chromosomu konvenčním cytogenetickým vyšetřením KD. U asi 5 % pacientů nelze Ph chromosom detekovat; v tom případě je možno prokázat gen BCR-ABL1 pomocí molekulárnegenetické metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH) buněk KD nebo PK, nebo pak transkript BCR-ABL1 pomocí molekulárnemolekulárního vyšetření metodou kvalitativní polymerázové řetězové reakce s využitím reverzní transkriptázy (RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction). V pokročilých fázích onemocnění je nutno vzorek KD podrobit i imunofenotypizačnímu vyšetření k určení fenotypu blastických elementů.

### Diferenční diagnostika

Diferenční diagnostika CML je zásadně vymezena nutností průkazu pozitivní Ph chromosomu a/nebo BCR-ABL1 genu. Ostatní případy leukocytózy Ph/BCR-ABL1 negativní mohou zahrnovat atypickou CML, chronickou myelomonocytární leukemii, pravou polyctemii, esenciální trombocytémii, primární myelofibrózu, chronickou neutrofilní leukemii, ale i tzv. leukemoidní reakci při infekcích či zánětech. Ph/BCR-ABL1 pozitivita je přítomna u některých typů akutních lymfoblastických leukemií.

### Léčba

#### Význam vyššího věku pro prognózu pacientů s CML

Před zavedením TKI do klinické praxe figuroval vyšší věk pacientů coby nepřiznivý prognostický faktor nezávisle na zvolené terapeutické strategii; při léčbě cyto-

statiky (busulfan, hydroxyurea), interferonem  $\alpha$  či alogenní transplantací krvetvorných buněk (alo-TKB). Po zavedení prvního TKI, imatinibu, do klinické praxe se ukázalo, že jeho účinnost je srovnatelná u pacientů vyššího věku i u pacientů mladších, a to jak co do podílu dosažených léčebných odpovědí, tak ve smyslu parametrů celkového přežití i přežití bez progresse, zejména jsou-li započítána jen úmrtí související s progresí CML. Analýza 2 060 pacientů léčených imatinibem v první linii, která vedla ke konstituci nového prognostického indexu zvaného EUTOS skóre, prokázala, že vyšší věk v odhadu prognózy nehráje roli. Podobné závěry vyplývají i z omezených dat, která jsou k dispozici pro léčbu starších pacientů pomocí TKI 2. generace, nilotinibu a dasatinibu.

#### Cíle léčby

V souladu s výše uvedenými daty v současnosti neexistuje žádná věková omezení pro léčbu pacientů s CML pomocí TKI a tato se řídí stejnými pravidly jako u mladších nemocných.

Cílem léčby CML je normalizace patologických nálezů v kostní dřeni a krevním obraze a současně úleva od příznaků nemoci včetně normalizace velikosti sleziny, dále pak úbytek až úplné vymizení buněk nesoucích Ph chromosom nejprve na úrovni cytogenetické a posléze i molekulární, kdy je možno pomocí vysoce citlivé metody, real time kvantitativní RT-PCR (RQ RT-PCR) detekovat i jen minimální populaci buněk nesoucích patologický fúzní gen. Dosažení trvajících kompletní cytogenetické odpovědi je spojeno s velmi dobrou prognózou z hlediska celkové přežití i přežití bez progresse a dosažení minimální zbytkové choroby na molekulární úrovni přináší navíc příslib možnosti úplného ukončení podávané léčby. V neposlední řadě a ve vyšším věku často i prioritně je terapeutickým cílem plnohodnotný a kvalitní život pacienta.

#### Doporučení léčby

Léčba všech pacientů s CML bez věkového omezení je v ČR soustředěna do několika málo center specializované hematologické péče, která zaručují vysokou úroveň erudice svých odborníků a disponují všemi potřebnými laboratorními metodami a přístroji.

Po stanovení diagnózy je možno docílit redukcce výrazné leukocytózy a/nebo trombocytémie cytoreducční léčbou hydroxyureou, trombooreduktivem, případně leukaferézou a/nebo trombocytferézou na separátorech krevních částic. Až do normalizace počtu leukocytů je vhodné podání alopurinolu k prevenci hyperurikémie a je nutno dbát na dostatečnou hydrataci. Při hodnotách leukocytů kolem  $20-30 \times 10^9/l$  je možno zahájit specifickou terapii TKI. V současnosti je k dispozici pět komerčně dostupných TKI: imatinib, nilotinib a dasatinib pro první linii léčby a pro případy jejich selhání či nesnášenlivosti kromě posledních dvou zmíněných ještě ponatinib a bosutinib. Přehled jednotlivých TKI včetně indikací, dávkování, profilu nežádoucích účinků a dostupnosti v ČR je uveden v tabulce 16.2. Kritéria pro hodnocení léčebné odpovědi a identifikaci případného selhání léčby podle současných platných doporučení jsou uvedena v tabulce 16.3.

Ve výběru mezi jednotlivými preparáty jak v první linii, tak při selhání či nesnášenlivosti původně zvolených se při více méně srovnatelné účinnosti z hlediska parametrů dlouhodobého efektu řídíme dominantně kritériem bezpečnosti a tolerance, dále pak i některými charakteristikami onemocnění, jako je např. vysoké

Název a síla léku	Účinná látka	Indicace a dávkování* (vše p.o.)	Nežádoucí účinky
Glivec tbl. 400 mg a 100 mg	imatinib mesylát	první linie: 400 mg 1x denně v CP, 600–800 mg/den rozděleno do dvou dávek v AP a BP	reference tekutin (perforní otoky, otoky vřek, vztstup hmotnosti), muskuloskeletální bolesti (svažové křeče a bolesti, bolesti kloubů), nauzea, zvracení, průjem, exantém, svědění, bolesti hlavy, nevolnost, bolesti se, hepatotoxicita, hypofosfátemie
Tasigna cps. 150 mg a 200 mg	nilotinib	první linie: 600 mg/den rozděleno do dvou denních dávek v CP a AP druhá linie: 800 mg/den ve dvou denních dávkách a 12 hodin v CP a AP	exantém, svědění, bolesti hlavy, nevolnost, bolesti břicha, iritace pankreatu, červní NI (Gerfentri obskurní arteriální chorooba, srdeční a mozkové červní schemické příhody), myelosuprese, elevace bilirubinu, transamináz, amylyázy, hypoglykemie, dyslipidemie, prodloužení QT intervalu
Sprycel tbl. 20 mg, 50 mg a 70 mg**	dasatinib	první i druhá linie: 100 mg 1x denně v CP, 140 mg/den v jedné či dvou dávkách u AP a BP (u BP možno v kombinaci s chemoterapií)	důšnost, puerální a perikardální výpotky, kašel, průjem, nevolnost, zvracení, bolesti břicha, bolesti hlavy, vyrážka, infekce, plicní arteriální hypertenze, krvácení do GIT, myelosuprese, hepatotoxicita
lcusig tbl. 15 mg a 45 mg***	ponatinib	druhá a další linie, přitomnost mutace T315I, všechny fáze: 45 mg 1x denně	hypertenze, bolesti hlavy, bolesti břicha, pankreatitida, nevolnost, zvracení, exantém, bolesti svalů a kloubů, kardiovaskulární NI (infarkt myokardu, cévní mozkové příhody, srdeční arytmie, arteriální glykemie, amylyázy, lipázy, hypofosfátemie
Bosulfil tbl. 100 mg a 500 mg****	bosutinib	druhá a další linie, všechny fáze: 500 mg/den v jedné denní dávce	průjem, nevolnost, bolesti břicha, zvracení, exantém, febrilie, bolesti hlavy, bolesti svalů a kloubů, puerální a perikardální výpotky, reference tekutin, myelosuprese, hepatotoxicita

Tab. 16.2. Přehled tyrozinkinzových inhibitorů v léčbě CML

CP – chronická fáze, AP – akcelerovaná fáze, BP – blastová fáze, NI – nežádoucí účinky, GIT – gastrointestinální trakt  
\*Uvedené standardní dávky (je možno v případě hoší snášenlivosti redukovat podle potřeby) v SP (jednotlivých lék)  
\*\*Sprycel K1 a 2015 nemá v ČR stanovenu úhradu pro 1. linii léčby  
\*\*\*Bosulfil K1 i 2015 nemá v ČR stanovenu úhradu pro druhou a další linii léčby  
\*\*\*\*Bosulfil K1 i 2015 nemá v ČR stanovenu úhradu pro pacienta, na základě 9. 16 zákona o veřejném zdravotním pojištění

**Tab. 16.3** Definicce odpovědi na léčbu kterýmkoliv schváleným TKI v první linii (patří pro všechny fáze CML a rovněž pro 2. linii léčby v případě změny pro intoleranci prvního TKI) podle doporučení Evropské leukemias/cml/eutos sítě (European LeukemiaNet, ELN) z roku 2013

Doba hodnocení	Optimální odpověď	Varování	Selhání
v době diagnózy	NA	vysoké riziko podle Sokala, Hasforda či EUTOS nebo CCA/Ph+ BCR-ABL1 > 10 % a/nebo Ph+ > 95 %	NA
3 měsíce	BCR-ABL1 ≤ 10 % a/nebo Ph+ ≤ 35 %	BCR-ABL1 > 10 % a/nebo Ph+ 36-95 %	< CHR a/nebo Ph+ > 95 %
6 měsíců	BCR-ABL1 < 1 % a/nebo Ph+ 0	BCR-ABL1 1-10 % a/nebo Ph+ 1-35 %	BCR-ABL1 > 10 % a/nebo Ph+ > 35 %
12 měsíců	BCR-ABL1 ≤ 0,1 %	BCR-ABL1 > 0,1-1 %	BCR-ABL1 > 1% a/nebo Ph+ > 0
posléze a kdykoliv	BCR-ABL1 ≤ 0,1 %	CCA/Ph- (-7 nebo 7q-)	Ztráta CHR Ztráta CCYR potvrzená ztráta MMR? mutace CCA/Ph+

NA - nebyl použit (not applicable). CCA/Ph+ - kvantitativní cytogenetické abnormality v Ph pozitivních buňkách (číslová chromosomální abnormalita v Ph pozitivní buňce). EUTOS - The European Treatment and Outcome Study for CML. CHR - kompletní hematologická odpověď (complete hematologic response). CCYR - kompletní cytogenetická odpověď (complete cytogenetic response). MMR - velká molekulární odpověď (major molecular response). BCR-ABL1 ≤ 0,1 % = MMR nebo lepší. CCA/Ph- - kvantitativní cytogenetické abnormality v Ph negativních buňkách (číslová chromosomální abnormality in Ph negative cells).

Hladina transkriptů BCR-ABL1 v mezinárodním měřítku IS (International Scale)

\*Ne 2 po sobě následujících testech, z nichž v jednom je hladina transkriptů BCR-ABL1 ≥ 1 %.

vstupní rizikové skóre podle Sokala, Hasforda či EUTOS ([http://www.leukemianet.org/content/leukemias/cml/cml\\_score/](http://www.leukemianet.org/content/leukemias/cml/cml_score/) a [http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos\\_score/](http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score/)) a ve druhé z dalších liniích může volbě napomoci přítomnost specifické mutace se známou in vitro citivostí k jednotlivým TKI.

Vyšší věk s sebou nese vyšší pravděpodobnost výskytu přidružených onemocnění a užívání dalších léků, tedy faktorů, které je jednak zapotřebí zvážit s ohledem na rozdílný profil nežádoucích účinků (NU) jednotlivých TKI (tab. 16.2) a možnost lékových interakcí (riziko souběžného užívání léků interferujících se systémem izoenzymu CYP3A4 a léků prodlužujících interval QT) a které podle recentních publikací mají tendenci negativně ovlivnit parametry přežití celkového a bez progresse. Vzhledem k faktu, že léčba TKI je perorální a plně ambulantní, je také třeba zohlednit fyzický, mentální a sociální status coby základní bezpečnosti je klíčovou praxí nejdříve prověřeným přípravkem imatinib, jehož podání sice není spojeno s rizikem závažných či život ohrožujících NU, ale i mírně dlouhotrvající obtíže (bolesti svalů, otoky, únava) mohou značně ovlivnit kvalitu života. Nilotinib s dasatinibem jsou zase dobře snášeny v každodenním užívání, ale cévní NU, respektive pleurální výpotky mohou znamenat závažnou komplikaci léčby. Zmíněnému riziku nežádoucích interakcí TKI s jinými léky lze předejít ověřením, že se konkomitantní medikace nenachází na seznamech rizikových přípravků (<http://www.medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>

a <http://www.drugs.org/>) a též vzájemnou komunikací hematologa s dalšími lékaři, v jejichž péči se pacienti nacházejí.

Nehledě na finální volbu příslušného přípravku je pak velký důraz kladen na pravidelné a kvalitní monitorování léčebného efektu s adekvátní změnou postupu při selhání či nesnášenlivosti.

Co do délky podávání je léčba TKI dlouhodobá, trvající po dobu jejího klinického přínosu. Kontrolované vysazení TKI je v současnosti možné jen v rámci klinických studií či ve výjimečných individuálních případech.

V případě, že léčba žádným z TKI není tolerována či TKI nelze vůbec použít, je možné podání hydroxyurey či interferonu  $\alpha$ , který je však staršími pacienty hůře snášen. Léčebnou variantou, zejména v pokročilých fázích onemocnění, je i alo-TKB, ale u pacientů starších 60 let je i přes použití přípravných režimů s redukcí vanou a intenzitou rezervována pouze pro vybrané pacienty ve výborné kondici, nezátížené komorbiditami a s dostupným dárcem.

#### Monitorování efektu léčby

Shrnutí doporučení pro sledování léčebné odpovědi na TKI je uvedeno v tabulce 16.4. Za téměř automatické je možno považovat paralelní vyšetřování KO a diferenciálního rozpočtu leukocytů s každým odběrem periferní krve na molekulárněbiologické vyšetření, v úvodní léčbě pak ještě častěji (a týden až 14 dní) do stabilizace krvního obrazu či zvládnutí zejména v úvodu časté hematologické toxicity TKI.

#### Prognóza

Jak již bylo uvedeno, vyšší věk nepředstavuje v éře TKI prognostickou zátěž pro své nositele. Léčbou dobře kontrolované onemocnění, diagnostikované v CP, de facto nezkracuje život pacientů ve srovnání s chorobou nezátíženou populací. Prognóza v případě pokročilé fáze onemocnění však zůstává i v éře TKI závažná – median

**Tab. 16.4** Doporučení pro cytogenetické a molekulární sledování efektu léčby TKI u CML

V době diagnózy	<ul style="list-style-type: none"> <li>- konvenční cytogenetické vyšetření KD</li> <li>- FISH v případě negativity Ph chromosomu k odhalení variantní kryptické translokace</li> <li>- kvantitativní PCR analýza (k identifikaci typu transkriptu)</li> </ul>
Během léčby	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kvantitativní PCR a 3 měsíce do dosažení MMR, následně a 3-6 měsíců a/nebo</li> <li>- konvenční cytogenetická analýza KD ve 3., 6. a 12. měsíci od zahájení léčby TKI, do dosažení CCyR, poté a 12 měsíců; po dosažení CCyR je možno provádět i FISH z PK; pokud je zajištěno kvalitní molekulární monitorování, je možné cytogenetickou analýzu vynechat</li> </ul>
Při selhání či progresi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kvantitativní PCR, mutační analýza a konvenční cytogenetika KD; v případě BP též imunofenotypizace</li> </ul>
Při varovných známkách	<ul style="list-style-type: none"> <li>- molekulární i cytogenetické vyšetření je nutno provádět častěji</li> <li>- cytogenetická analýza dopoučena v případě myelodysplazie či klonálních cytogenetických abnormalit v Ph negativních buňkách zahrnujících chromosom 7</li> </ul>

KD - krevní dělá; PK - periferní krev; FISH - fluorescenční in situ hybridizace; PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction); CCyR - kompletní cytogenetická odpověď (complete cytogenetic response); MMR - velká molekulární odpověď (major molecular response)

celkového přežití pacientů v myeloidní BP se v souvislosti se zavedením imatinibu prodloužil pouze na necelých 8 měsících.

### Kazuistika

Pacient J. A., narozen v roce 1920, navštívil v 2/2012 svého praktického lékaře pro bolesti v podbřišku. Na základě vyšetření KO a diferenciálního rozpočtu leukocytů bylo vysloveno podezření na CML a zahájena terapie hydroxyureou. Pacient následně odeslán na IHOK FN Brno, kde byla vyšetřením KD a zjištěním pozitivivity Ph chromosomu diagnóza CML potvrzena. Pacient, v době diagnózy 92letý, vykazoval výborný mentální i fyzický stav (ECOG 0), byl ve velmi dobré kondici a plně soběstačný. Dossud se léčil jen s hypertenzí chorobou, ischemickou chorobou dolních končetin a před lety prodělal operaci prostaticy a náhradu pravého kyčelního kloubu pro koxartrózu. Pacient souhlasil s léčbou pomocí TKI a s tím spojeným dojížděním do centra specializované hematologické péče, vzdáleného od jeho bydliště 69 km.

V 4/2012 byla zahájena terapie imatinibem v dávce 400 mg 1x denně p. o. Pro bolesti pravé dolní končetiny až stupně 3 podle CTCAEv.4 byl po 14 dnech užívání imatinibu na týden vysazen a po odeznění obtíží navrácen v redukované dávce 300 mg 1x denně, která již byla tolerována bez obtíží a na které pacient setrvává až dosud, tj. do 5/2015. Léčebná odpověď byla hodnocena podle platných doporučení ELN. Pacient již po třech měsících léčby imatinibem dosáhl CCyR a v šesti měsících dokonce i MMR, tedy tzv. optimální léčebné odpovědi. V dalším průbě-

hu sice došlo ve 33. měsíci terapie ke ztrátě MMR, ale pacient nadále setrvává v CCyR, která je s ohledem na věk a dobrou toleranci léku naprosto adekvátní a dostatečně úrovní poklesu míry zbytkové choroby.

Zatím poslední ambulantní návštěva pana J. A. se odehrála těsně po oslavě jeho 95. narozenin. Dobrý klinický stav pacienta, jeho vůle, ochota a schopnost dojíždět ve tříměsíčních intervalech na kontroly, dobrá tolerance redukované dávky léku a trvajících uspokojivá léčebná odpověď jsou důkazem, že i ve značně pokročilém věku lze moderní léčbu TKI podat a profitovat z ní.

### Shrnutí pro klinickou praxi

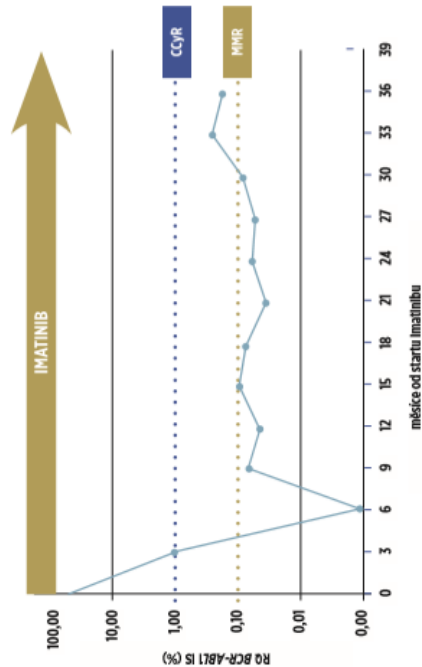
Vyšší věk u pacientů s CML již v éře tyrozinkinázových inhibitorů nepředstavuje negativní prognostický faktor.

Věk není limitací pro léčbu TKI u starších pacientů s CML, která se tak řídí analogickými pravidly jako léčba nižších věkových kategorií.

Při rozhodování o volbě přípravku z řady TKI či zřídli jako takové je třeba spíše než věk zohlednit celkový stav pacienta, jeho mentální status a předpoklad spolupráce a adherence k léčbě, spektrum a tíži přidružených onemocnění.

### Literatura

- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-884.
- Breccia M, Latagliata R, Stagno F, et al. Charlson comorbidity index and adult comorbidity evaluation-27 scores might predict treatment compliance and development of pleural effusions in elderly patients with chronic myeloid leukemia treated with second-line dasatinib. *Haematologica*. 2011;96(10):1457-1461.
- Breccia M, Luciano L, Latagliata R, et al. Age influences initial dose and compliance to imatinib in chronic myeloid leukemia elderly patients but concomitant comorbidities appear to influence overall and event-free survival. *Leuk Res*. 2014;38(10):1173-1176.
- Breccia M, Tiribelli M, Alimena G. Tyrosine kinase inhibitors for elderly chronic myeloid leukemia patients: a systematic review of efficacy and safety data. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;84(1):93-100.
- Cortes J, Jalhaz M, O'Brien S, et al. Effects of age on prognosis with imatinib mesylate therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 2003;98(6):1105-1113.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2408-2417.
- Faber E, Indrák K. Chronická myeloidní leukémie. Praha: Galén, 2010. 234 s.
- Gugliotta G, Castagnetti F, Apollinari M, et al. First-line treatment of newly diagnosed elderly patients with chronic myeloid leukemia: current and emerging strategies. *Drugs*. 2014;74(6):627-643.
- Gugliotta G, Castagnetti F, Palandri F, et al. Frontline imatinib treatment of chronic myeloid leukemia: no impact of age on outcome, a survey by the GIMEMA CML Working Party. *Blood*. 2011;117(21):5591-5599.



**Vývoj hladiny transkriptů BCR-ABL1 u pacienta J. A. při léčbě imatinibem v čase**

R0 BCR-ABL1 – hladina transkriptů BCR-ABL1 vyšetřena metodou real time kvantitativní PCR s využitím reverzní transkriptázy, IS – mezinárodní škála (international scale); CCyR – kompletní cytogenetická odpověď (complete cytogenetic response); MMR – velká molekulární odpověď (major molecular response)



- Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011;118:686-692.
- Iurlo A, Ubertis A, Artuso S, et al. Comorbidities and polypharmacy impact on complete cytogenetic response in chronic myeloid leukaemia elderly patients. *Eur J Intern Med*. 2014;25(1):63-66.
- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*. 2014;89:548-556.
- Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2260-2270.
- Latagliata R, Breccia M, Carmosino I, et al. "Real-Life" results of front-line treatment with imatinib in older patients ( $\geq 65$  years) with newly diagnosed chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res*. 2010;34(11):1472-1475.
- Latagliata R, Breccia M, Castagnetti F, et al. Dasatinib is safe and effective in unselected chronic myeloid leukaemia elderly patients resistant/intolerant to imatinib. *Leuk Res*. 2011;35(9):1164-1169.
- Latagliata R, Ferrero D, Iurlo A, et al. Imatinib in very elderly patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: a retrospective study. *Drugs Aging*. 2013;30(8):629-637.
- Rohrbacher M, Berger U, Hochhaus A, et al. Clinical trials under estimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia*. 2009;23:602-604.
- Rosti G, Iacobucci I, Bassi S, et al. Impact of age on the outcome of patients with chronic myeloid leukemia in late chronic phase: results of a phase II study of the CIMEMA CML Working Party. *Haematologica*. 2007;92(1):101-105.
- Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al. ENESTnd Investigators. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2251-2259.
- Záčková D, Klamová H. Chronická myeloidní leukemie. In: Postupy diagnostiky a léčby leukemií a jejich infekční komplikací u dospělých pacientů. Doporučení České leukemické skupiny pro život (CELL). Doubek M, Mayer J, editoři. 2. předprac. vyd. Brno: Česká leukemická skupina - pro život, 2013, s. 50-79.

Podpořeno MZCR - RVO (FNBr, 65269705)

### 1.1.3. Příloha 3

Žáčková D., Faber E., Indrák K., Rohoň P., Klamová H., Machová Poláková K., Karas M., Černá O., Skoumalová I., Bělohávková P., Žák P., Ráčil Z., Mayer J. Chronická myeloidní leukemie. In: Mayer J. ed. *Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 1. vyd. Praha: Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně, 2016, s. 79–99. ISBN 978-80-260-9718-1.

## 7. CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE (C92.1)

**Daniela Žáčková, Edgar Faber, Karel Indrák, Peter Rohoň, Hana Klámová, Kateřina Machová Poláková, Michal Karas, Olga Černá, Ivana Skoumalová, Petra Bělohávková, Pavel Žák, Zdeněk Ráčil, Jiří Mayer**

### 7.1 Charakteristika onemocnění

Chronická myeloidní leukemie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění charakterizované přítomností tzv. Filadelfského chromozomu (Ph), vzniklého reciprokou translokací mezi chromozomy 9 a 22, a fúzního genu *BCR-ABL1* z translokace resultujícího. Konstitutivně aktivovaná tyrozinkináza *Bcr-Abl*, která je genem *BCR-ABL1* kódována, je zodpovědná za nekontrolované množení krvetvorných buněk a z toho vyplývající projevy onemocnění. Přítomnost unikátní genetické abnormality se silným patogenetickým potenciálem umožnila vývoj specifických inhibitorů patologické tyrozinkinázy, jejichž uvedení do klinické praxe a zejména pak vynikající účinnost doslova revolučním způsobem změnil dosavadní léčebný management a prognózu tohoto onemocnění. Předpokládány medián léčbou dobře kontrolované onemocnění nezkracuje přirozenou délku života jeho nositelů. Incidence CML v ČR je 1,2/100 000 obyvatel, medián věku 56 roků a prevalence sevěť tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) ročně zvyšuje o 10 %.

### 7.2 Definice fází onemocnění a léčebných odpovědí

Klinický průběh CML má tři fáze: rozlišujeme chronickou fázi (*chronic phase*; CP), ve které je dnes diagnostikováno téměř 95 % pacientů, dále pak akcelerovanou fázi (*accelerated phase*; AP) a blastickou krizi (*blast crisis*; BC), označované jako tzv. pokročilá fáze choroby. V éře TKI by se dalo předpokládat, že dojde k určité modifikaci klasického dělení CML do tří fází či posunu hranic mezi jednotlivými fázemi, nicméně data nejsou doposud dostatečně zralá pro revizi tradiční klasifikace. Kritéria sloužící k odlišení jednotlivých stadií onemocnění dle *World Health Organization* (WHO) jsou uvedena v tabulce 7.1.

**Tabulka 7.1. Definice klinických fází chronické myeloidní leukemie (akcelerované a blastické) dle *World Health Organization* (WHO) kritérií.**

<b>Akcelerovaná fáze (AP)</b> – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:
▪ Blastů 10% – 19% v KD nebo PK
▪ Bazofilů $\geq$ 20% v PK
▪ Perzistující trombocytopenie ( $<100 \times 10^9/l$ ) nezásoobená léčbou nebo perzistující trombocytóza ( $> 1000 \times 10^9/l$ ) nereagující na terapii
▪ Zvětšující se slezina a narůstající počet leukocytů nereagující na léčbu
▪ Klonální evoluce (tj. přidatné cytogenetické změny)
<b>Blastická krize (BC)</b> – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:
▪ Blastů $> 20\%$ v KD nebo PK
▪ Extramedulární blastická infiltrace
▪ Velká ložiska nebo shluky blastů (CD34+, TdT+) v biopsii KD

Zkratky: KD, kostní dřeň; PK, periferní krev

Pacienti diagnostikovaní v CP jsou před zahájením léčby stratifikováni do rizikových skupin na základě kalkulace 3 rizikových skóre dle Sokala, Hasforda a EUTOS (*The European Treatment and Outcome Study for CML*, EUTOS). Způsob výpočtu je uveden v tabulce 7.2. Ke snadnějšímu zařazení pacientů do příslušné rizikové skupiny poslouží automatické kalkulátory, např. [http://www.leukemia-net.org/content/leukemia/cml/cml\\_score/](http://www.leukemia-net.org/content/leukemia/cml/cml_score/) a [http://www.leukemia-net.org/content/leukemia/cml/eutos\\_score/](http://www.leukemia-net.org/content/leukemia/cml/eutos_score/).

Definice léčebných odpovědí na úrovni hematologické, cytogenetické a molekulárně-genetické jsou uvedeny v tabulce 7.3. Nejvíce změn doznaly definice odpovědi na molekulárně-genetické úrovni, které by měly být vyjadřovány v % jako poměr množství *BCR-ABL1* transkriptů ke množství transkriptů kontrolního genu (*ABL1*, *GUSB* nebo *BCR*) v mezinárodní škále (*international scale*, IS), kde 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% a 0,001% odpovídá poklesu o 1, 2, 3, 4, 5 a 5 logaritmtů oproti výchozí standardizované hladině transkriptů, která byla odvozena v rámci studie IRIS a odpovídá 100%. V případě nedetekovatelných transkriptů je v současné době termín „kompletní molekulární odpověď“ nahrazen termínem „molekulárně nedetekovatelná leukemie“.

**Tabulka 7.2. Výpočet rizikových skóre dle Sokala, Hasforda a EUTOS.**

	<b>Sokalovo skóre</b>	<b>Hasfordovo skóre</b>	<b>EUTOS skóre</b>
<b>Výpočet</b>	Exp0,1116 (věk - 43,4) + 0,0345 (velikost sleziny - 7,51) + 0,188 (trombocyty:700 <sup>3</sup> -0,563) + 0,0887 (blasty - 2,1)	(0,666 x věk 0 pokud je věk < 50 let, jinak 1 + 0,042 x velikost sleziny (cm pod žeberní oblouk) + 0,0584 x blasty % + 0,0413 x ezoinofily % + 0,2039 x bazofily 0 pokud jsou bazofily < 3%, jinak 1 + 1,0956 x trombocyty 0 pokud jsou trombocyty < 1500 x 10 <sup>9/l</sup> , jinak 1) x 1000	Velikost sleziny x 4 + bazofily x 7
<b>Nizké riziko</b>	< 0,8	≤ 780	≤ 87
<b>Střední riziko</b>	0,8 – 1,2	781 – 1480	-
<b>Vysoké riziko</b>	> 1,2	> 1480	> 87

Tabulka 7.3. Definice léčebných odpovědí *alle*-ELN.

Léčebná odpověď	Definice
<b>Kompletní hematologická odpověď (CHR)<sup>1</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Trombocyty &lt; 450 x 10<sup>9</sup>/l</li> <li>Leukocyty &lt; 10 x 10<sup>9</sup>/l</li> <li>Absence nezralých elementů granulopoey v diferenciálu PK</li> <li>Bazofily &lt; 5% v PK</li> <li>Nehmatná slezina</li> <li>Kompletní (CCyR): 0 Ph+ metafázi</li> <li>Parciální (PCyR): 1-35% Ph+ metafázi</li> <li>Malá: 36-65% Ph+ metafázi</li> <li>Minimální: 66-95% Ph+ metafázi</li> <li>Žádná: &gt; 95% metafázi</li> <li>Velká (major, MMIR, též MR3.0): hladina transkriptů BCR-ABL1/kontrolní gen ≤ 0,1% IS</li> </ul>
<b>Cytopgenetická odpověď (CyR)<sup>2</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>MR4.0: buď hladina BCR-ABL1 transkriptů ≤ 0,01% IS nebo nedetekovatelné BCR-ABL1 transkriptů se součtem transkriptů kontrolního genu ABL1 ≥ 10 000 a ≥ 24 000 pro kontrolní gen GUSB</li> <li>MR4.5: hladina BCR-ABL1 transkriptů &lt; 0,0032% IS nebo nedetekovatelné BCR-ABL1 transkriptů se součtem transkriptů kontrolního genu ABL1 ≥ 32 000 a ≥ 77 000 pro kontrolní gen GUSB</li> <li>MR5.0: hladina BCR-ABL1 transkriptů &lt; 0,001% IS nebo nedetekovatelné BCR-ABL1 transkriptů se součtem transkriptů kontrolního genu ABL1 ≥ 100 000 a ≥ 240 000 pro kontrolní gen GUSB</li> </ul>
<b>Molekulární odpověď (MR)</b>	

Zkratky: CHR, kompletní hematologická odpověď (complete hematologic response); CCyR, kompletní cytopgenetická odpověď (complete cytogenetic response); PCyR, parciální cytopgenetická odpověď (partial cytogenetic response); MR, molekulární odpověď (molecular response); MMIR, velká molekulární odpověď (major molecular response); IS, mezinárodní škála (international scale); ELN, Evropská leukemická síť (The European LeukemiaNet)

<sup>1</sup>Musi být splněny všechny podmínky.  
<sup>2</sup>Cytopgenetickou odpověď lze hodnotit pouze na základě konvenční cytopgenetické analýzy nejméně 20 metafáz z kostní dřeně. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) může nahradit konvenční cytopgenetiku pouze pro zhodnocení CCyR, zde definované jako < 1% BCR-ABL1 pozitivních jader z alespoň 200 jader zhodnocených.

Dosažení určité hloubky léčebné odpovědi v určitém časovém intervalu od zahájení terapie TKI se ukázalo být nejvýznamnějším prognostickým faktorem s ohledem na další osud nemocných. Jako 'optimální odpověď' je označována ideální situace, kdy není indikována změna terapie, naopak pokračování v zavedené léčbě je příslibem dosažení dlouhodobých výborných výsledků. Je-li léčebná odpověď vyhodnocena jako 'selhání', je jednoznačně indikována změna doposud podávané terapie s cílem snížit riziko progresse do pokročilých fází onemocnění až případného úmrtí. Mezi těmito dvěma kategoriemi figurují tzv. 'varovné znaky', které představují takové charakteristiky onemocnění samotného či léčebnou odpověď, které samy o sobě nejsou výzvou ke změně terapie, ale spíše k bedlivějšímu monitorování. Definice odpovědí na léčbu kterýmikoliv schváleným TKI v první linii u nově diagnostikovaných pacientů v kterékoli fázi onemocnění jsou uvedeny v tabulce 7.4.

Tabulka 7.4. Definice odpovědí na léčbu kterýmikoliv schváleným TKI v první linii (platí pro všechny fáze CML a rovněž pro 2. linii léčby v případě změny pro intolerance prvního TKI).

Doba hodnocení	Optimální odpověď	Varování	Selhání
V době diagnózy	NA	Vysoké riziko nebo CCA/Ph+	NA
3 měsíce	BCR-ABL1 ≤ 10% a/nebo Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL1 > 10% a/nebo Ph+ > 95%	< CHR a/nebo Ph+ > 95%
6 měsíců	BCR-ABL1 < 1% a/nebo Ph+ 0	BCR-ABL1 1-10% a/nebo Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 > 10% a/nebo Ph+ > 35%
12 měsíců	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	BCR-ABL1 > 0,1-1%	BCR-ABL1 > 1% a/nebo Ph+ > 0
Posléze a kdykoliv	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	CCA/Ph- (-7 nebo 7q-)	Ztráta CHR Ztráta CCyR, Potvrzená ztráta MMIR? Mutace CCA/Ph+

Zkratky: NA, nelze použít (not applicable); CCA/Ph+, klonální cytopgenetické abnormality v Ph pozitivních buňkách (clonal chromosomal abnormalities in Ph positive cells); CHR, kompletní hematologická odpověď (complete hematologic response); CCyR, kompletní cytopgenetická odpověď (complete cytogenetic response); PCyR, parciální cytopgenetická odpověď (partial cytogenetic response); MMIR, velká molekulární odpověď (major molecular response); BCR-ABL1 ≤ 0,1% – MR3.0 nebo lepší; CCA/Ph-, klonální cytopgenetické abnormality v Ph negativních buňkách (clonal chromosomal abnormalities in Ph negative cells)  
<sup>1</sup>Hladina transkriptů BCR-ABL1 v mezinárodním měřítku IS  
<sup>2</sup>Ve 2. po sobě následujících testech, z nichž v jednom je hladina transkriptů BCR-ABL1 ≥ 1%.

Definice odpovědí na léčbu TKI ve druhé linii v případě selhání prvního TKI jsou uvedeny v tabulce 7.5.

Tabulka 7.5. Definice odpovědí na léčbu TKI ve druhé linii v případě selhání prvního TKI.

Doba hodnocení	Optimální odpověď	Varování	Selhání
V úvodu	NA	< CHR nebo ztráta CHR na imatiblu nebo nedosažení CyR v první linii nebo vysoké riziko pří.dg.	NA
3 měsíce	BCR-ABL1 ≤ 10% a/nebo Ph+ < 65%	BCR-ABL1 > 10% a/nebo Ph+ 65-95%	< CHR nebo Ph+ > 95%
6 měsíců	BCR-ABL1 ≤ 10% a/nebo Ph+ < 35%	Ph+ 35-65%	Nové mutace BCR-ABL1 > 10% a/nebo Ph+ > 65%
12 měsíců	BCR-ABL1 < 1% a/nebo Ph+ 0	BCR-ABL1 1-10% a/nebo Ph+ 1-35%	Nové mutace BCR-ABL1 > 10% a/nebo Ph+ > 35% a/nebo nové mutace
Posléze a kdykoliv	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	CCA/Ph- (-7 nebo 7q-) nebo BCR-ABL1 > 0,1%	Ztráta CHR nebo ztráta CCyR či PCyR Potvrzená ztráta MMIR? Nové mutace CCA/Ph+

Zkratky: NA, nelze použít (not applicable); CHR, kompletní hematologická odpověď (complete hematologic response); CCyR, kompletní cytogenetická odpověď (complete cytogenetic response); MMK, velká molekulární odpověď (major molecular response); BCR-ABL1  $\leq 0,1\%$  = MR3.0 nebo lepší; CCA/Ph, klonální cytogenetické abnormality v Ph negativních buňkách (clonal chromosomal abnormalities in Ph negative cells); CCA/Ph+, klonální cytogenetické abnormality v Ph pozitivních buňkách (clonal chromosomal abnormalities in Ph positive cells); Hladina transkriptů BCR-ABL1 v mezinárodním měřítku IS  $\geq 1\%$  = 2 po sobě následujících testech, z nichž v jednom je hladina transkriptů BCR-ABL1  $\geq 1\%$ .

### 7.3 Léčebná doporučení

Léčba pacientů s CML je v ČR soustředěna do několika málo center specializovaných hematologické péče, která zaručují vysokou úroveň erudice svých odborníků a disponují všemi potřebnými diagnostickými metodami a přístroji.

#### 7.3.1 Cytoredukční léčba po stanovení diagnózy CML

Vysokou vstupní leukocytózu (nezřídka až kolem  $400 \times 10^9/l$ ) je třeba před zahájením specifické terapie TKI snížit na hodnoty kolem  $20-30 \times 10^9/l$ , stejně tak je vhodná redukce případné vstupní trombocytémie. Přehled cytoredukční terapie je uveden v tabulce 7.6. Hydroxycarbamid (hydroxyurea) rovněž nachází uplatnění v indikaci paliativní léčby.

**Tabulka 7.6.** Prostředky cytoredukční terapie zejména pro úvod terapie CML.

Název a síla léku	Účinná látka	Způsob podávání	Dávkování
Litalir tbl. 500 mg	Hydroxycarbamid	p.o.	Individuální, 40-60 mg/kg/den, rozdělené do 2-3 dávek, titrace dle aktuálního KO; v paliativní indikaci dlouhodobě 20-30mg/kg/den
Thromboreductin cps. 0,5 mg*	Anagrelid	p.o.	Individuální, postupně navyšování k dávce 1-3 mg/den rozděleno do 2-3 denních dávek

\*Thromboreductin nemá uvedenu v SPC indikaci u CML, ale dle informací SDJL je možné ho kromě esenciální indikace centrem specializované a rozšířené hematologické péče u pacientů: a) mladších 65 let věku s vysokým rizikem trombotických komplikací. Musí být přítomen alespoň jeden z následujících rizikových faktorů: tromboza v anamnéze, přítomnost mutace JAK2 genu, přítomnost vrozeného či získaného trombofilního stavu, počet trombocytů  $> 1000 \times 10^9/l$ , přítomnost klinických symptomů vyplývajících z onemocnění a tromboticémie, b) starších 65 let věku, u nichž selhala nebo je kontraindikována léčba hydroxyureou.

V indikovaných případech (vysoká či refrakterní a/nebo symptomatická leukocytóza a/nebo trombocytémie) je vhodné či nutné provést leukaférezu a/nebo trombocytaférezu na separátorech krevních částic. Jako prevence hyperurikémie lze v úvodu léčby CML podávat alopurinol (Milurit) v dávce 100-300 mg/den. Je třeba dbát na dostatečnou hydrataci pacienta.

#### 7.3.2 Terapie pacientů s CML v chronické fázi (CP)

##### 7.3.2.1 Terapie pacientů s CML v chronické fázi v 1. linii

Pro úvodní léčbu pacientů s nově diagnostikovanou CML v CP byly americkou „Food and Drug Administration“ (FDA) a „European Medicines Agency“ (EMA) schváleny 3 TKI: imatinib, nilotinib a dasatinib.

V CR mají k 1. 1. 2016 stanovenou úhradu v 1. linii léčby jen 2 přípravky, a sice imatinib a nilotinib, viz tabulku 7.7.

**Tabulka 7.7.** Léčba CML v CP v první linii.

Název a síla léku	Účinná látka	Způsob podávání	Dávkování
Glivec tbl. 400mg a 100 mg	Imatinib mesylát	p.o.	400 mg/den v jedné denní dávce
Tasigna cps. 150 mg	Nilotinib	p.o.	600 mg/den rozděleno do dvou denních dávek á 12 hodin
Sprycel tbl. 20 mg, 50 mg a 70 mg*	Dasatinib	p.o.	100 mg/den v jedné denní dávce

\*Sprycel nemá v ČR k 1. 1. 2016 stanovenou úhradu pro 1. linii léčby

V případě, že jsou při diagnóze přítomny varovné známky onemocnění (viz tabulku 7.4), je vhodné provést HLA typizaci pacienta a jeho sourozenců. Délka podávání terapie se řídí léčebnou odpovědí, monitorováním a hodnocením v pravidelných intervalech (viz tabulku 7.4). V případě optimální odpovědi či varovných známek je indikováno pokračování v terapii neomezeně, resp. po dobu trvání optimálního léčebného efektu. V případě selhání či intolerance léku je indikována změna přípravku.

#### 7.3.2.2 Terapie pacientů s CML v chronické fázi ve 2. linii v případě intolerance 1. TKI

V případě intolerance kteréhokoliv přípravku v 1. linii je možno užít kterýkoliv z dalších dostupných TKI schválených pro první linii (viz tabulku 7.7).

#### 7.3.2.3 Terapie pacientů s CML v chronické fázi ve 2. linii v případě selhání imatinibu

V případě selhání imatinibu v první linii je indikována změna léčby za použití některého z TKI schválených pro druhou linii léčby. V této indikaci jsou regulačními autoritami FDA a EMA schváleny následující přípravky: dasatinib, nilotinib, bosutinib a ponatinib. V CR jsou registrované všechny zmíněné přípravky, ale úhradu v této indikaci mají k 1. 1. 2016 stanovenou pouze dasatinib a nilotinib, viz tabulku 7.8. Při selhání imatinibu v první linii je rovněž doporučeno provést HLA typizaci pacienta a jeho sourozenců v případě, že jsou splněna indikační kritéria pro alogenní transplantaci (věková limitace, komorbidita, apod.).

**Tabulka 7.8.** Léčba CML v CP ve druhé linii po selhání imatinibu.

Název a síla léku	Účinná látka	Způsob podávání	Dávkování
Tasigna cps. 200 mg	Nilotinib	p.o.	800 mg/den rozděleno do dvou denních dávek á 12 hodin
Sprycel tbl. 20 mg, 50 mg a 70 mg	Dasatinib	p.o.	100 mg/den v jedné denní dávce
Bosulfil tbl. 100 mg a 500 mg*	Bosutinib	p.o.	500 mg/den v jedné denní dávce
Iclusil tbl. 15mg a 45 mg*	Ponatinib	p.o.	45 mg/den v jedné denní dávce

\*Bosulfil ani Iclusil nemají v ČR k 1. 1. 2016 stanovenou úhradu pro 2. linii léčby

### 7.3.2.4 Terapie pacientů s CML v chronické fázi ve 2. linii v případě selhání nilotinibu

V případě selhání nilotinibu v první linii léčby jsou FDA a EMA schváleny: dasatinib, bosutinib a ponatinib. V CR má k 1. 1. 2016 stanovenou v této indikaci úhradu dasatinib, viz tabulku 7.9. Při selhání nilotinibu v první linii je rovněž doporučeno provést HLA typizaci pacienta a jeho sourozenců a v případě nedostupnosti příbuzného dárce zahájit vyhledávání v registrech dárců krevtvořných buněk. Dle výsledků pak zvážení případné alogenní transplantace krevtvořných buněk (alo-TKB).

**Tabulka 7.9. Léčba CML v CP ve druhé linii po selhání nilotinibu v 1. linii.**

Název a síla léku	Účinná látka	Způsob podávání	Dávkování
Sprycel tbl. 20 mg, 50 mg a 70 mg	Dasatinib	p.o.	100 mg/den v jedné denní dávce
Bosulif tbl. 100 mg a 500 mg*	Bosutinib	p.o.	500 mg/den v jedné denní dávce
Iclusig tbl. 15mg a 45 mg*	Ponatinib	p.o.	45 mg/den v jedné denní dávce

\*Bosulif ani Iclusig nemají v CR k 1. 1. 2016 stanovenou úhradu pro 2. linii léčby

### 7.3.2.5 Terapie pacientů s CML v chronické fázi ve 2. linii v případě selhání dasatinibu

V případě selhání dasatinibu v první linii léčby jsou FDA a EMA schváleny: nilotinib, bosutinib a ponatinib. V CR nemá k 1. 1. 2016 stanovenou úhradu ani dasatinib v 1. linii ani bosutinib či ponatinib ve 2. linii. Doporučení pro postup při selhání dasatinibu v první linii v případě jeho dostupnosti je k náhledu v tabulce 7.10. Podobně jako u selhání nilotinibu v 1. linii je rovněž doporučeno provést HLA typizaci pacienta a jeho sourozenců a v případě nedostupnosti příbuzného dárce zahájit vyhledávání v registrech dárců krevtvořných buněk. Dle výsledků pak zvážení případné alogenní transplantace krevtvořných buněk (alo-TKB).

**Tabulka 7.10. Léčba CML v CP ve druhé linii po selhání dasatinibu v 1. linii.\***

Název a síla léku	Účinná látka	Způsob podávání	Dávkování
Tasigna cps. 200 mg	Nilotinib	p.o.	800 mg/den rozděleno do dvou denních dávek a 12 hodin
Bosulif tbl. 100 mg a 500 mg**	Bosutinib	p.o.	500 mg/den v jedné denní dávce
Iclusig tbl. 15mg a 45 mg**	Ponatinib	p.o.	45 mg/den v jedné denní dávce

\*Sprycel nemá v CR k 1. 1. 2016 stanovenou úhradu pro 1. linii léčby

\*\*Bosulif ani Iclusig nemají v CR k 1. 1. 2016 stanovenou úhradu pro 2. linii léčby

### 7.3.2.6 Terapie pacientů s CML v chronické fázi ve 3. linii v případě selhání alo-TKB/nebo intolerance 2 předchozích TKI

Pro situaci selhání léčby 2 předchozími TKI jsou FDA a EMA schváleny přípravky uvedené výše v tabulkách 7.9. a 7.10., se stejnou limitací stran absence úhrady Bosulifu a Iclusigu v CR. U všech vhodných kandidátů je indikována alo-TKB.

### 7.3.2.7 Terapie pacientů s CML v chronické fázi v kterékoli fázi léčby není indikováno pokračování

Při výskytu polyrezistentní mutace T3151 ať již v kterékoli fázi léčby není indikováno pokračování v užívání přípravku. V této indikaci je EMA a FDA schváleno podání ponatinibu (Iclusig) v dávce 45 mg p.o. 1x denně. Iclusig, ač registrován, ani v této indikaci nemá v CR stanovenou úhradu.<sup>1</sup> Další variantou při detekci mutace T3151 je provedení HLA typizace pacienta a jeho sourozenců a v případě nedostupnosti příbuzného dárce zahájení vyhledávání v registrech dárců krevtvořných buněk. Dle výsledků pak zvážení případné alogenní transplantace krevtvořných buněk (alo-TKB). Alternativou je podání interferonu- $\alpha$ -2b (IntronA) v dávce 4-5 milionů IU/m<sup>2</sup>/den subkutánně s postupnou úpravou dávky dle hematologické tolerance. Je možné jej podávat v monoterapii nebo v kombinaci s TKI či s cytarabinem.

### 7.3.2.8 Poznámky k volbě mezi jednotlivými TKI

Jak pro volbu přípravku do první linie léčby, tak pro výběr mezi dostupnými TKI ve druhé a další linii nejsou dle stávajících doporučení stanovená jasná či striktní pravidla. Při rozhodování je zapotřebí zohlednit vedle účinnosti zejména bezpečnost přípravku, respektive spektrum nežádoucích účinků, kterými se může daný TKI prezentovat. Stejně tak je nutno zvážit některé charakteristické onemocnění, jako například vysoké vstupní rizikové skóre a věk a přidružená onemocnění pacienta, která mohou přímo predikovat nízkou účinnost některých nežádoucích účinků. Ve druhé a dalších liniích může volbě napomoci znalost přítomnosti specifické mutace v kinázové doméně Bcr-Abl, o níž jsou známy informace stran *in vitro* citlivosti buněk nesoucích mutovaný Bcr-Abl protein k jednotlivým TKI. Nehledě na finální volbu příslušného přípravku je pak velký důraz kladen na pravidelné a kvalitní monitorování léčebného efektu s případnou včasnou změnou TKI v situaci, kdy není terapeutická odpověď adekvátní.

### 7.3.3 Terapie pacientů s CML v akcelerované fázi a blastické krizi

#### 7.3.3.1 Terapie pacientů s CML diagnostikovanou v akcelerované fázi (AP) nebo blastické krizi (BC)

Léčba pacientů diagnostikovaných v AP a BC se též opírá o TKI, jak je patrné z tabulky 7.11.

**Tabulka 7.11. Léčba CML nově diagnostikované v akcelerované fázi (AP) nebo blastické krizi (BC)**

Název a síla léku	Účinná látka	Způsob podávání	Dávkování
Glivec tbl. 100 mg a 400 mg	Imatinib	p.o.	600-800 mg/den rozděleno do dvou denních dávek a 12 hodin
Sprycel tbl. 20 mg, 50 mg a 70 mg*	Dasatinib	p.o.	140 mg/den v jedné denní dávce nebo rozděleno do dvou denních dávek

\*Sprycel nemá v CR k 1. 1. 2016 stanovenou úhradu pro 1. linii léčby, navíc dle SPC i indikačních ustanovení SUKL je podání dasatinibu směřováno do 2. linie, po selhání či intoleranci imatinibu

Pro účinnou kontrolu onemocnění je však zpravidla nutná kombinace TKI s intenzivní chemoterapií, kopírující indukční chemoterapeutické režimy užívané v léčbě akutní myeloblastické a akutní lymfoblastické leukemie. V případě AP by měla být zvážena alo-TKB, není-li dosaženo optimální

<sup>1</sup> V podmínkách ČR lze požádat revizního lékaře o souhlas s mimořádnou úhradou přípravku v situaci, kdy se jedná o jedinou léčebnou možnost pro pacienta, na základě §16 Zákona o veřejném zdravotním pojištění.

léčebné odpovědi (viz tabulku 7.4.). V případě BC by měli být všichni vhodní kandidáti směřováni k provedení alo-TKB, do níž by měli vstupovat ideálně ve fázi léčbou kontrolovaného onemocnění, tj. s navozenou chronickou fází CML a s co nejlépejšími léčebnými odpověďmi na úrovni hematologické, cytogenetické a molekulární. Alo-TKB není doporučovaná v případě refraktérního, léčbu nekontrolovaného onemocnění. Z hlediska volby přípravného režimu před transplantací pro BC je preferován myeloablativní přípravný režim. Význam užívání TKI jako sekundární profylaxe či udržovací terapie po úspěšně provedené alo-TKB není sice jednoznačně prokázán, ale podání TKI v této indikaci se nabízí jako poměrně logický krok ochrany pacienta před život limitující situací v podobě relapsu choroby. V případě molekulárního relapsu onemocnění či přetrvávající zbytečné nemoci na molekulárně-genetické úrovni má léčba TKI své pevně zakotvené místo spolu s podáním infuze dárcovských lymfocytů (*donor lymphocyte infusion*, DLI).

### 7.3.3.2 Terapie pacientů s CML léčených TKI s progresí do akcelерованé fáze (AP) nebo blastické krize (BC) z fáze chronické (CP)

Situace, kdy dojde k progresi onemocnění do AP nebo BC během terapie TKI v chronické fázi, je spojena s obzvláště špatnou prognózou a léčba samotnou chemoterapií či bezpřídání TKI nesplňuje dlouhodobě uspokojivou léčebnou odpověď. Z tohoto důvodu je alo-TKB indikována u všech pacientů vhodných pro tuto proceduru. Platí pro ni analogické principy jako je uvedeno v předchozí kapitole 7.3.3.1. Přehled TKI schválených v indikaci AP a BC resultujících z progresie během léčby CP je k nalezení v tabulce 7.12. Voli se přípravek, který u daného pacienta nebyl dosud podáván. Podobně, jako je uvedeno v předchozí kapitole, je kontrola onemocnění před alo-TKB je zpravidla nutné užít intenzivní chemoterapii v podobě indukčního režimu pro léčbu akutní leukemie odpovídajícího fenotypu.

**Tabulka 7.12.** Léčba CML v AP/BC vzniklých progresí z CP již léčené TKI.

Název a síla léku	Účinná látka	Způsob podávání	Dávkování
Sprycel tbl. 20 mg, 50 mg a 70 mg	Dasatinib	p.o.	140 mg/den v jedné denní dávce nebo rozděleno do dvou denních dávek
Iclusig tbl. 15mg a 45 mg*	Ponatinib	p.o.	45 mg/den v jedné denní dávce
Bosulfif tbl. 100 mg a 500 mg*	Bosutinib	p.o.	500 mg/den v jedné denní dávce

\*Iclusig anti Bosulfif nemají k 1. 1. 2016 v ČR stanovenou úhradu v této indikaci!

### 7.3.4 Terapie urgentních stavů u CML

#### 7.3.4.1 Syndrom leukostázy

Syndrom leukostázy je život ohrožující situace, která se ve spojení s CML vyskytuje nejčastěji při iniciální hyperleukocytóze při stanovení diagnózy nebo při progresi do pokročilého stadia CML charakteru BC. Klinikému obrazu dominuje různé vyjádřené neurologické alterace a respirační tíseň. Léčba spočívá v leukaféze, případně opakované ve 12-24 hodinových intervalech, do ustupu symptomů. Souběžně v leukaféze, případně opakované ve 12-24 hodinových intervalech, do ustupu symptomů. Souběžně 2 V podmínkách ČR lze požádat revizního lékaře o souhlas s množstevní úhradou přípravku v situaci, kdy se jedná o jedinou léčebnou možnost pro pacienta, na základě §16. Zakona o veřejném zdravotním pojištění.

je nutné zajistit farmakologickou cytoredukcí hydroxyureou (viz tabulku 7.6.) a intenzivní podpůrnou péči spočívající v přiměřené hydrataci nemocného, opatrné korekci anémie, prevenci syndromu nádorového rozpadu (viz dále), úpravě poruch vnitřního prostředí a v případě nutnosti v zajištění ventilační podpory a hemodialýzy.

#### 7.3.4.2 Přípismus

Přípismus je definován jako protrahovaná (více než 6 hodin trvajících) nechtěná a sexuální podněty nevyvolaná erekce nejčastěji v důsledku leukostázy či méně často blastické infiltrace kavernozních těles penisu. Terapeutická intervence spočívá v punkci kavernozních těles s aspirací stagnující krve, popřípadě doplněné proplachem. Pokud není touto procedurou dosaženo úspěchu, doporučuje se lokální aplikace adrenalinu či noradrenalinu (jednorázově 10-5000ug) za monitorování tlaku krve. Systémově zasahujeme leukaférou, cytoredukční terapií, hydratací a antikoagulační léčbou.

#### 7.3.4.3 Syndrom nádorového rozpadu

Preventivními opatřeními jsou intenzivní hydratace (3l/m<sup>2</sup>/den) a podání alopurinolu (100 – 300 mg p.o./den). V případě rozvoje syndromu je doporučována dávka alopurinolu 100 mg/m<sup>2</sup> 3x denně, případně rasburikáza (Fasturtec) i.v. v dávce 0,05 – 0,20 mg/kg/den. Pátetí terapie syndromu nádorového rozpadu je masivní hydratace, v případě zhoršení renálních funkcí a oběhového přetížení pak hemodialýza, případně hemofiltrace.

#### 7.3.5 Plánování rodičovství a management gravidity u CML

Preklinické studie s imatinibem, nilotinibem i dasatinibem poukázaly na jejich potenciální teratogenicitu a embryotoxicitu a z omezených klinických zkušeností u gravidních žen léčených imatinibem pak i přes většinou fyziologický průběh gravidity a stav novorozence nelze riziko pro plod vyloučit. Z těchto důvodů je doporučeno informovat ženy ve fertilitním věku před zahájením terapie TKI o potenciálním riziku pro plod a doporučit jim užívání spolehlivé antikoncepce.

Pokud žena plánuje mateřství, je vhodné počít odložit na dobu, kdy je nemoc stabilizována, ideálně ve fázi velké molekulární odpovědi, trvající alespoň 2 roky. Poté je možno léčbu TKI vysadit (délka bezpečného vysazení TKI před počátkem není přesně definována) a doporučit ženě pokoušet se o otěhotnění. V případě úspěšného otěhotnění po vysazení TKI musí být žena bedlivě monitorována svým ošetřujícím hematologem, samozřejmě v úzké spolupráci s gynecologem. Monitorování KO je doporučeno v měsíčních intervalech a sledování vývoje hladiny BCR-ABL1 transkriptů á 2-3 měsíce. Dochází-li ke ztrátě MMR, popřípadě CCyR, je třeba terapii obnovit. Léčem volby je interferon- $\alpha$ , eventuelně leukaféza při výrazné leukocytóze, což připadá v úvahu spíše při stanovení diagnózy CML u již těhotné ženy a v průběhu 1. trimestru. Při stanovení diagnózy CML v průběhu gravidity lze zvolit variantu zachování gravidity po zvažení všech rizik zejména s ohledem na zachování zdraví a života matky. Po porodu je možno záhy podávat TKI obnovit za podmínky zastavení kojení, protože jak imatinib, tak i dasatinib se vylučují do mateřského mléka. Rovněž o průniku interferon- $\alpha$  do mateřského mléka nejsou dostatečné informace. Pokud trvá MMR, lze s nasazením TKI vyčkat a kojení tak umožnit.

V případě, že i přes doporučení používání spolehlivé antikoncepce dojde k otěhotnění během terapie TKI, je doporučeno léčbu ihned vysadit a zvážit přerušení gravidity. Jde o individuální rozhodnutí, kdy poškození plodu nelze vyloučit, ale kdy existují i četné literární podložené varianty narození zdravého dítěte.

U mužských pacientů s CML užívajících TKI by dle publikovaných dat nemělo dojít k nežádoucímu ovlivnění fertility, početi či samotné gravidity v případě imatinibu a nilotinibu. Dat týkajících se dasatinibu v této souvislosti je velmi málo a pro bosutinib a ponatinib zcela chybí. Zde je třeba zvážit kryokonzervaci spermatu před započatím terapie.

### 7.3.6 Ukončení terapie TKI

Současná doporučení pro léčbu pacientů s CML pomocí TKI vyznívají ve smyslu jejich dlouhodobého podávání v případě, že trvá jejich klinický přínos (ať již jde o optimálně odpovídající pacienty či případy, kdy není dosaženo optimální odpovědi, ale pacientům nelze z různých důvodů nabídnout jinou alternativu a z podávané terapie jednoznačně profitují).

Ve snaze docílit stavu, kdy bude optimální léčebná odpověď zachována i bez nutnosti celoživotního podávání léků, jsou v současné době prováděny kontrolované pokusy s vysazováním TKI u pacientů se setrvalou hlubokou molekulární odpovědí v rámci klinických studií. Dosavadní výsledky vyznívají ve smyslu reálné a bezpečné varianty setrvání v hluboké molekulární odpovědi i po vysazení TKI přibližně pro 40% pacientů s mediánem sledování 50 měsíců od vysazení terapie. Nicméně, data jsou stále ještě nedostatečná jak co do délky sledování tak i velikosti souboru, aby bylo možno vyslovit jasné doporučení pro vysazení terapie mimo kontrolované klinické studie. Vysazení je možno zvážit pouze v individuálních případech, jedním z nich je výše popsaná problematika plánování mateřství u fertálních žen s CML. Stejně tak je možné uvažovat u ukončení terapie u pacientů léčených dlouhodobě výhradně interferonem- $\alpha$ , u nichž trvá MMR déle než 2 roky. Nepodkročitelnou podmínkou vysazení jakékoliv podávané medikace je frekventní a vysoce kvalitní monitorování molekulární odpovědi.

### 7.4 Doporučení pro monitorování výsledků léčby CML

Cytogenetické a molekulárně-genetické monitorování léčebné odpovědi je neméně důležitou součástí úspěšné a racionální terapie jako léčba TKI samotná. Obecné shrnutí doporučení pro sledování léčebné odpovědi je uvedeno v tabulce 7.14. Za téměř automatické je možno považovat paralelní vyšetřování krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů (KO + dif.) s každým odběrem periferní krve na molekulárně-genetickou analýzu pomocí kvantitativní RQ RT-PCR (*real-time quantitative reverse transcriptase PCR*; RQ RT-PCR), v úvodu léčby pak ještě častěji (a týden až 14 dní) do stabilizace krevního obrazu či zvládnutí zejména v úvodu časté hematologické toxicity TKI.

### Tabulka 7.14. Doporučení pro cytogenetické a molekulární sledování efektu léčby TKI u CML.

V době diagnózy
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Konvenční cytogenetické vyšetření KD</li> <li>▪ FISH v případě negativity Ph chromozomu k odhalení variantní kryptické translokace</li> <li>▪ Kvantitativní PCR analýza (k identifikaci typu transkriptu)</li> <li>▪ Kvantitativní RQ-PCR a 3 měsíce do dosažení MMR, následně a 3-6 měsíců a/nebo</li> </ul>
Během léčby
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Konvenční cytogenetická analýza KD ve 3., 6. a 12. měsíci od zahájení léčby TKI, do dosažení CCyR, po té a 12 měsíců. Po dosažení CCyR je možno provádět i FISH z PK. Pokud je zajištěno kvalitní molekulární monitorování, je možné cytogenetickou analýzu vynechat</li> <li>▪ Kvantitativní RQ-PCR, mutační analýza a konvenční cytogenetika KD. V případě BC, též imunofenotypizace.</li> <li>▪ Molekulárně-genetické i cytogenetické vyšetření je nutno provádět častěji</li> <li>▪ Cytogenetická analýza doporučena v případě myelodysplázie či CCA/Ph- zahrnujících chromozom 7</li> </ul>
Při selhání či progresi
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kvantitativní RQ-PCR, mutační analýza a konvenční cytogenetika KD. V případě BC, též imunofenotypizace.</li> </ul>
Při varovných znamkách
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cytogenetická analýza doporučena v případě myelodysplázie či CCA/Ph- zahrnujících chromozom 7</li> </ul>

Zkratky: KD, kostní dřeň; FISH, fluorescenční *in situ* hybridizace; RQ RT-PCR, *real-time quantitative PCR*; CCyR, kompletní cytogenetická odpověď (*complete cytogenetic response*); MMR, velká molekulární odpověď (*major molecular response*); CCA/Ph- klonální cytogenetické abnormality v Ph negativních buňkách (*clonal chromosomal abnormalities in Ph negative cells*)

Trebaže současná doporučení umožňují zvolit k hodnocení léčebné odpovědi jen jednu z technik, tedy buď konvenční cytogenetickou analýzu KD nebo molekulárně-genetickou analýzu z periferní krve (PK), obecně je preferovaným přístupem používat obě metody současně, alespoň do dosažení CCyR a MMR. Zde je nutno zohlednit vybavenost a úroveň standardizace příslušné molekulárně biologické laboratoře. Po dosažení MMR je pak samotné molekulárně-genetické sledování z PK plně dostačující. Výsledky molekulární analýzy RQ-PCR jsou vyjadřovány jako % transkriptů *BCR-ABL1* vztaheno k IS (viz též podkapitolu 7.2). Molekulární vyšetření je možno provádět z periferní krve, přičemž množství vzorku by nemělo být menší než 10 ml. Ke konvenční cytogenetické analýze je nezbytná kostní dřeň, kdy ke konstatování CCyR je nutné zhodnocení alespoň 20 metafází. Konvenční cytogenetika může být nahrazena metodou FISH i z periferní krve pouze v případě, kdy již bylo dosaženo CCyR, a s vědomím, že nám neposkytne informace o eventuelních chromozomálních abnormalitách v Ph-negativních buňkách.

Doporučené intervaly vyšetřování během léčby vycházejí z ideální situace, kdy je léčbou TKI v čase dosahováno postupného poklesu úrovně zbytkové choroby až na hodnotu MMR a nižší. Pokud tomu tak není a rovněž kdykoliv jsou naplněna kritéria varovných znamek či přímo selhání léčby, je nutné zkrátit intervaly mezi jednotlivými vyšetřeními, případně testy dle potřeby opakovat. V případě selhání či progresu do pokročilých fází onemocnění je na místě též provedení mutační analýzy vzorku kostní dřeně či periferní krve pomocí metody přímé sekvenace. Opominout bychom neměli ani stanovení hladiny léku v plazmě k ověření compliance nemocného.



## 7.5 Vybrané informace k biologické léčbě pomocí TKI

### 7.5.1 Imatinib (GLIVEC) v hematonekologii

#### Indikace dle SPC

Imatinib je indikován k léčbě:

- dospělých a dětských pacientů s nově diagnostikovanou Philadelphia chromozom (BCR-ABL1) pozitivní (Ph+) CML, u kterých není transplantace kostní dřeně považována za léčbu první volby.
- dospělých a dětských pacientů s Ph+ CML s CP onemocnění, u kterých selhala léčba interferonem-alfa nebo kteří jsou v AP nebo v BC.
- dospělých a dětských pacientů s nově diagnostikovanou Philadelphia chromozom pozitivní akutní lymfatickou leukémií (Ph+ ALL) doplněnou chemoterapií.
- dospělých pacientů s recidivující nebo refrakterní Ph+ ALL jako monoterapie.
- dospělých pacientů s myelodysplastickým/myeloproliferativním onemocněním (MDS/MPD) spojeným se změnou genu receptoru pro růstový faktor krevních destiček (PDGFR).
- dospělých pacientů se syndromem pokročilé hyperreozinofilie (HES) a/nebo chronickou eozinofilní leukémií (CEL) s přeskupením FIP1L1-PDGFRa.

#### Kontraindikace

Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na některou z pomocných látek

#### Vedlejší účinky

Hematologické: neutropenie, trombocytopenie, anémie; nehematologické: retence tekutin (periferní otoky, otoky v obličejí, zejména periorbitálně, nárůst hmotnosti), únava, svalové křeče, bolesti svalů, kloubů a kostí, bolest hlavy, nevolnost a zvracení, průjem, bolesti břicha, kožní vyrážka, konjunktivitida, krvácení do spojivek, alopecie, zvýšení jaterních testů, hypofosfátémie.

#### Interakce

Látky inhibující aktivitu izoenzymu CYP3A4 cytochromu P450 (např. ketokonazol, vorikonazol, erythromycin, klarithromycin) mohou snižovat metabolismus a tak zvyšovat koncentraci a účinnost imatinibu. Látky, které indukují aktivitu CYP3A4 (např. dexmethazon, fenytoin, karbamazepin, rifampicin, fenobarbital, třezalka tečkovaná) mohou snižovat koncentraci imatinibu v plazmě a tím jeho účinnost. Opatrnosti je třeba i při souběžném podávání substrátů CYP3A4 (např. cyklosporin, takrolim, fentanyl). Obzvlášť je na místě též při současném podávání vyšších dávek imatinibu a paracetamolu.

#### Dávkování

Doporučená denní dávka imatinibu pro dospělé pacienty s CML v CP je 400 mg jednou denně. Lék by měl být podáván s jídlem a zapit velkou sklenicí vody. Pro pacienty v AP je doporučená dávka 600 mg/den a v blastické krizi 600-800 mg/den rozdělené ve dvou denních dávkách. V případě závažné a/nebo recidivující neutropenie nebo trombocytopenie je doporučeno dočasně přerušit léčbu, popřípadě redukcí dávky léku. Stejně tak může být dávka léku snížena v případě, že není tolerována.

## Aktuální indikace a úhrada stanovená dle SÚKL

Imatinib je hrazen:

- v léčbě pacientů s nově diagnostikovanou Philadelphia chromozom (BCR-ABL1) pozitivní (Ph+) CML.
- v léčbě pacientů s Ph+ CML v CP, AP a BC.

### 7.5.2 Dasatinib (SPRYCEL)

#### Indikace dle SPC

Dasatinib je indikován k léčbě:

- dospělých s nově diagnostikovanou Philadelphia chromozom (BCR-ABL1) pozitivní (Ph+) CML v chronické fázi.
- dospělých pacientů s Ph+ CML v CP, AP nebo BC s rezistencí či intolerancí k předchozí léčbě včetně imatinibu.
- dospělých pacientů s Philadelphia chromozom pozitivní akutní lymfatickou leukémií (Ph+ ALL) a s lymfoidní blastickou krizí u CML s rezistencí či intolerancí k předchozí léčbě.

#### Kontraindikace

Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na některou z pomocných látek přípravku.

#### Vedlejší účinky

Hematologické: neutropenie, trombocytopenie, anémie; nehematologické: pleurální výpotky, dyspnoe, kašel, průjem, zvracení, nevolnost, bolesti břicha, bolesti hlavy, kožní vyrážka, infekce, krvácení, retence tekutin, únava, bolesti svalů a kloubů, plicní hypertenze, perikardiální výpotek, neuropatie, anorexie, poruchy vidění.

#### Interakce

Látky inhibující aktivitu izoenzymu CYP3A4 cytochromu P450 (např. ketokonazol, itraconazol, erythromycin, klarithromycin) mohou zvyšovat expozici dasatinibu. Látky, které indukují aktivitu CYP3A4 (např. dexmethazon, fenytoin, karbamazepin, rifampicin, fenobarbital, třezalka tečkovaná) mohou snižovat expozici dasatinibu a zvýšit tak riziko selhání léčby. Souběžné podání dasatinibu a silných inhibitorů či induktorů CYP3A4 se nedoporučuje. Opatrnosti je třeba i při souběžném podávání substrátů CYP3A4 a dasatinibu, kdy může dojít ke zvýšení expozice substrátu CYP3A4. Souběžné užívání dasatinibu a H2-blokátorů (např. famotidinu), inhibitorů protonové pumpy (např. omeprazolu) nebo hydroxidu hlinitého či hořečnatého může snížit expozici dasatinibu. Proto se nedoporučuje souběžně podávat antagonisty H2 a inhibitory protonové pumpy a přípravky s hydroxidem hlinitým či hořečnatým se musí podávat do 2 hodin před nebo 2 hodiny po podání dasatinibu.

#### Dávkování

Doporučená zahajovací dávka dasatinibu pro léčbu chronické fáze je 100 mg jednou denně, podávaná perorálně. Doporučená zahajovací dávka pro léčbu AP, BC nebo Ph+ ALL je 140 mg jednou denně. Lék je možno užívat jak s jídlem tak i nalačno. V případě absence léčebného efektu bylo v klinických

studích umožněno zvýšit dávku na 140 mg jednou denně v CP a 180 mg jednou denně v pokročilých fázích CML či v Ph+ALL. V případě závažné a/nebo recidivující neutropenie nebo trombocytopenie je doporučeno dočasné přerušení léčby, popřípadě redukce dávky léku. Stejně tak může být dávka léku snížena v případě, že není tolerována.

#### Aktuální indikace a úhrada stanovená dle SÚKL

Dasatinib je hrazen:

- jako léčba 2. linie po selhání léčby imatinibem u pacientů s CML v CP, AP a BC. I. léčba je hrazena do progresse onemocnění.

#### 7.5.3 Nilotinib (TASIGNA)

##### Indikace dle SPC

Nilotinib je indikován k léčbě:

- dospělých pacientů s nově diagnostikovanou Philadelphia chromozom (*BCR-ABL1*) pozitivní (Ph+) CML v chronické fázi.
- dospělých pacientů s Ph+ CML v CP a AP s rezistencí či intolerancí k předchozí léčbě zahrnující imatinib.

##### Kontraindikace

Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na některou z pomocných látek přípravku.

##### Vedlejší účinky

Hematologické: neutropenie, trombocytopenie, anémie; nehematologické: nevolnost, bolesti břicha, iritace pankreatu, kožní vyrážka, svědění, bolesti hlavy, bolesti svalů, únava, bolesti kloubů a kostí, periferní otoky, průjem, zvracení, prodloužení QT intervalu, hypofosfatémie, porucha glukózového metabolismu až rozvoj diabetu mellitu, hyperlipidémie, hypercholesterolemie, hypertriacylglycerolemie, hyperbilirubinémie, zvýšení ALT, AST, sérové amylázy a lipázy.

##### Interakce

Látky inhibující aktivitu izoenzymu CYP3A4 cytochromu P450 (např. ketokonazol, itraconazol, vorikonazol, erythromycin, klarithromycin) mohou zvyšovat expozici nilotinibu a souběžné podání se nedoporučuje. Látky, které indukují aktivitu CYP3A4 (např. dexamethazon, fenytoin, karbamazepin, rifampicin, fenobarbital, třezalka tečkovaná) mohou snižovat expozici nilotinibu a zvýšit tak riziko selhání léčby. Opatrnosti je třeba i v případě souběžného užití se substráty CYP3A4, jejichž expozice může být zvýšena (např. cyklosporin, ergotamin, fentanyl, takrolimus). Nilotinib by měl být podáván opatrně pacientům s prodlouženým QT intervalem nebo u pacientů užívajících medikaci s potenciálem prodloužení QT intervalu (amiodaron, prokainamid, chlorochin, klarithromycin, halperidol). Biologickou dostupnost nilotinibu zvyšuje současný příjem potravy, přípravek tedy nesmí být užíván s jídlem, ale alespoň 2 hodiny po jídle. Též hodinu po požití nilotinibu by neměla být přijímána žádná potravina. Restrikce platí též pro grapefruit a šťávu z něj. Sevliské pomerance a karamboly, neboť tyto potraviny též inhibují CYP3A4. Souběžné užívání nilotinibu a inhibitorů protonové pumpy (např. omeprazolu)

je možné, v případě nutného souběžného užívání antagonistů H2 je vhodné H2-blokátor podávat 10 hodin před a 2 hodiny po podání nilotinibu. Pro antacida platí analogie s užíváním dasatinibu a hydroxidů hlinitého nebo hořečnatého – viz výše.

#### Dávkování

Doporučená dávka nilotinibu je:

- 300 mg dvakrát denně u nově diagnostikovaných pacientů s CML v CP.
- 400 mg dvakrát denně u pacientů s CML v CP nebo AP s rezistencí či intolerancí předchozí léčby.

Nilotinib by měl být podáván dvakrát denně přibližně po 12 hodinách a nesmí být užíván s jídlem. Lačňet je třeba 2 hodiny před a alespoň hodinu po požití přípravku. V případě závažné a/nebo recidivující neutropenie nebo trombocytopenie je doporučeno dočasné přerušení léčby, popřípadě redukce dávky léku. Stejně tak může být dávka léku snížena v případě, že není tolerována.

#### Aktuální indikace a úhrada stanovená dle SÚKL

Nilotinib (TASIGNA 150 mg) je hrazen:

- jako léčba dospělých pacientů s nově diagnostikovanou Ph+ CML. Terapie je indikována do progresse onemocnění.
- jako léčba dospělých pacientů s CML v CP a AP, u nichž selhala či nebyla tolerována předchozí léčba zahrnující imatinib.

#### 7.5.4 Ponatinib (ICLUSIG)

##### Indikace dle SPC

Ponatinib je indikován k léčbě:

- dospělých pacientů s CML v CP, AP nebo BC, kteří jsou rezistentní k dasatinibu nebo nilotinibu, nebo je netolerují, u pacientů, kde není z klinického hlediska vhodná následná léčba imatinibem nebo kteří jsou nositeli mutace T315I.
- dospělých pacientů s Ph+ ALL při rezistenci či nesnášenlivosti dasatinibu, u pacientů, kde není z klinického hlediska vhodná následná léčba imatinibem nebo kteří jsou nositeli mutace T315I.

##### Kontraindikace

Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na některou z pomocných látek přípravku.

##### Vedlejší účinky

Hematologické: neutropenie, trombocytopenie, anémie; nehematologické: nevolnost, bolesti břicha, pankreatitida, nevolnost, zvracení, průjem, zácpa, febrilie, cévní okluze (ischemická choroba dolních končetin, infarkt myokardu, cévní mozkové příhody), kožní vyrážka, infekce, bolesti hlavy, závratě, hypertenze, dušnost, kašel, bolesti svalů, kloubů a kostí, únava, periferní otoky, zvýšení hladiny lipázy, amylázy, elevace ALT a AST, hyperbilirubinémie, hypofosfatémie, hyperglykémie.

**Interakce**

Látky inhibující aktivitu izoenzymu CYP3A4 cytochromu P450 (např. ketokonazol, itraconazol, vorikonazol, erythromycin, klarithromycin) mohou zvyšovat expozici ponatibibu, je tedy třeba opatrnosti či redukce úvodní dávky ponatibibu při nutnosti souběžného podání. Látky, které indukují aktivitu CYP3A4 (např. fenytoin, karbamazepin, rifampicin, fenobarbital, třezalka tečkovaná) mohou snižovat expozici ponatibibu a zvýšit tak riziko selhání léčby, je tedy lepší se jim vyhnout. Souběžné podání ponatibibu se substráty P-gp (např. digoxin, dabigatran, kolchicin) nebo BCRP (metotrexát, sulfasalazin) může zvyšovat jejich účinnost i výskyt nežádoucích reakcí.

**Dávkování**

Doporučená zahajovací dávka ponatibibu je 45 mg jednou denně. Před zahájením léčby ponatibibem je třeba zkontrolovat kardiovaskulární stav pacienta a aktivně ovlivňovat kardiovaskulární rizikové faktory. V případě závažné a/nebo recidivující neutropenie nebo trombocytopenie je doporučeno dočasné přerušení léčby, popřípadě redukce dávky léku. Stejně tak může být dávka léku snížena v případě, že není tolerována.

**Aktuální indikace a úhrada stanovená dle SÚKL**

Ponatibib nemá v době přípravy této publikace (k 1. 1. 2016) v ČR ve své indikaci stanovenou úhradu. V podmínkách ČR lze požádat revizního lékaře zdravotní pojišťovny o souhlas s mimořádnou úhradou přípravku v situaci, kdy se jedná o jedinou léčebnou možnost pro pacienta, na základě §16 Zákona o veřejném zdravotním pojištění.

**7.5.5 Bosutinib (BOSULIF)****Indikace dle SPC**

Bosutinib je indikován k léčbě:

- dospělých pacientů s CML v CP, AP nebo BC, kteří byli již léčeni jedním či více tyrosinkinázovými inhibitory a u těch, u kterých léčba imatinibem, nilotinibem nebo dasatinibem není považována za vhodnou volbu.

**Kontraindikace**

Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na některou z pomocných látek přípravku.

**Vedlejší účinky**

Hematologické: neutropenie, trombocytopenie, anémie; nehematologické: průjem, nevolnost, bolesti břicha, zvracení, vyrážka, febrilie, bolest hlavy, únava, kašel, bolesti kloubů a svalů, nechutenství, závrať, retence tekutin, infekce dýchacích cest, zvýšení ALT, AST, elevace sérové lipázy.

**Interakce**

Látky inhibující aktivitu izoenzymu CYP3A4 cytochromu P450 (např. ketokonazol, itraconazol, vorikonazol, erythromycin, klarithromycin) mohou zvyšovat expozici bosutinibu, je třeba se tedy současněmu podání vyvarovat. Látky, které indukují aktivitu CYP3A4 (např. fenytoin, karbamazepin,

rifampicin, fenobarbital, třezalka tečkovaná) mohou snižovat expozici bosutinibu a zvýšit tak riziko selhání léčby, rovněž v tomto případě je vhodné se souběžnému podání vyhnout. Opatrnosti je třeba při podávání bosutinibu současně s inhibitory protonové pumpy. Jako alternativa lze užívat antacida v delším časovém odstupu od požití bosutinibu. Souběžné podání bosutinibu se substráty P-gp (např. digoxin, dabigatran, kolchicin) může zvyšovat jejich účinnost i výskyt nežádoucích reakcí. Bosutinib má být též užíván s opatrností u pacientů s prodlouženým QT intervalem či při souběžné medikaci s léky QT interval prodlužujícími.

**Dávkování**

Doporučená dávka bosutinibu je 500 mg jednou denně. Vhodné je podání s jídlem. V klinické studii bylo přípustné zvýšení dávky na 600 mg/den v případě nedostatečného efektu, tj. nedosažení CHR do 2 měsíců a CcyR do 3 měsíců od zahájení léčby. V případě závažné a/nebo recidivující neutropenie nebo trombocytopenie je doporučeno dočasné přerušení léčby, popřípadě redukce dávky léku. Stejně tak může být dávka léku snížena v případě, že není tolerována.

**Aktuální indikace a úhrada stanovená dle SÚKL**

Bosutinib nemá v době přípravy této publikace (k 1. 1. 2016) v ČR ve své indikaci stanovenou úhradu. V podmínkách ČR lze požádat revizního lékaře zdravotní pojišťovny o souhlas s mimořádnou úhradou přípravku v situaci, kdy se jedná o jedinou léčebnou možnost pro pacienta, na základě §16 Zákona o veřejném zdravotním pojištění.

## 7.6 Literatura

1. Abruzzese E, Trawinska MM, Perotti AP, de Fabritiis P. Tyrosine kinase inhibitors and pregnancy. *Mediter J. Hematol. Infect. Dis.* 2014; 6(1):2014028.
2. Apperley JF. CML in pregnancy and childhood. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2009;22:455-474.
3. Bacarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013;122(6):872-884.
4. Bacarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:6041-6051.
5. Bacarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2006;108:1809-1820.
6. Branford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood.* 2009;114(27):5426-5435.
7. Cortes JE, Talpaz M, Gilda F, et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood.* 2003;101:3794-3800.
8. Cortes J, Goldman JM, Hughes T. Current issues in chronic myeloid leukemia: monitoring, resistance, and functional cure. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2012;10 Suppl 3:51-513.
9. Databáze léků Státního ústavu pro kontrolu léčiv: <http://www.sukl.cz>.
10. Deininger MW, Cortes J, Paquette R, et al. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. *Cancer.* 2007;110(7):1509-1519.
11. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:2408-2417.
12. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2001;344(14):1031-1037.
13. Faber E., Indrák K. Chronická myeloidní leukémie. Praha: Galén 2010: 234 s. ISBN 978-80-7262-680-689.
14. Faber E, Muzík J, Koza V, et al. Treatment of consecutive patients with chronic myeloid leukemia in the cooperating centres from the Czech Republic and the whole of Slovakia after 2000 – a report from the population-based CAMELIA Registry. *Eur. J. Haematol.* 2011;87(2):157-168.
15. Faber E, Kuba A, Zapletalova J, et al. Interferon-alpha chronic myeloid leukemia revisited: A long term retrospective study in Central and Northern Moravia. *Biomedical Papers.* 2013;157(3):246-256.
16. Hahn EA, Glendenning GA, Sorensen MV, et al. Quality of life in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib versus interferon alfa plus low-dose cytarabine: results from the IRIS Study. *J. Clin. Oncol.* 2003;21(11):2138-2146.
17. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1998;90(11):850-858.
18. Hasford J, Bacarani M, Hoffmann V, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood.* 2011;118:686-692.
19. Hehlmann R, Hochhaus A, Bacarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2007; 370:342-350.
20. Hochhaus A, Dreyling M. ESMO Guidelines Working Group. Chronic myelogenous leukemia: ESMO clinical recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2008;19 Suppl 2:63-64.
21. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009;23(6):1054-1061.
22. Hughes TP, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood.* 2006;108:28-37.
23. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003;349:1423-1432.
24. Itonaga H, Tsumima H, Hata T et al. Successful treatment of a chronic phase T3151 mutated chronic myelogenous leukemia patient with a combination of imatinib and interferon-alfa. *Int. J. Haematol.* 2012;95:209-213.
25. Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood.* 2012;119(9):1981-1987.
26. Kreuzman A, Rohon P, Faber E, et al. Chronic myeloid leukemia patients in prolonged remission following interferon- $\alpha$  monotherapy have distinct cytokine and oligoclonal lymphocyte profile. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e23022.
27. Jabbour E, Hochhaus A, Cortes JE. Choosing the best treatment strategy for chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib: weighing the efficacy and safety of individual drugs with BCR-ABL mutations and patient history. *Leukemia.* 2010;24(1):6-12.
28. Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al; Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1029-1035.
29. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology, version 4.2013. [www.nccn.org](http://www.nccn.org).
30. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:994-1004.
31. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T3151 mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell.* 2009;16(5):401-412.
32. Pye SM, Cortes J, Ault P, et al. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood.* 2008; 111(12):5505-5508.
33. Racil Z, Raza F, Drapalova J, et al. Mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica.* 2013;98(10):124-126.

34. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63(4):789-799.
35. Vardiman JW, Hartus NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292-2302.
36. Zackova D, Klamova H, Dusek L, et al. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials? *Am. J. Hematol*. 2011;86(3):318-321.
37. Zackova D, Klamova H, Muzik J, et al. Efficacy and tolerance of dasatinib after imatinib failure or intolerance for patients with chronic myeloid leukemia treated in three different hospitals compare well with results achievable in formal clinical trials. *Leuk. Lymphoma*. 2013;54(10):2310-2313.
38. Záčková D, Klamová H. Chronická myeloidní leukémie. In: Postupy diagnostiky a léčby leukemií a jejich infekční komplikací u dospělých pacientů. Doporučení České leukemické skupiny pro život (CELL). Editors: Doubek M. a Mayer J. Druhé, přepracované vydání, 2013:50-79.

#### 1.1.4. Příloha 4

Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie. In: Büchler T. *Speciální onkologie*. Vydal Maxdorf s. r. o. v Praze, 2020. 2. aktual. a dopl. vyd. Praha: Maxdorf, 2020, s. 185–191. ISBN 978-80-7345-651-1.

**Prognóza**

CLL je nadále konvenčními režimy nevyléčitelná. Jediným kurativním přístupem zůstává alloSCT, která je vhodná pro mladší a fyzicky zdatné pacienty. Díky pokrokům v posledních letech (zejména léčba inhibitory BCR signalizace) jsme však svědky prodlužování doby do progresse nemoci i celkového přežití pacientů s CLL. Výrazně se také zlepšuje kvalita jejich života.

**LITERATURA**

1. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia – what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(1):38–47.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL: guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745–60.
3. Smolej L, Špaček M, Oberlíková P et al. Chronická lymfocytární leukemie. In: Mayer J, editor. *Exponované postupy v hematologii*. Nové Město nad Metují: KNOOP; 2016.

**12.4 CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE**

Daniela Žáčková

**MINIMUM PRO PRAXI**

- Chronická myeloidní leukemie (CML) je charakterizována specifickou genetickou odchylkou (chromozom Philadelphia) zodpovědnou za etiopatogenezi choroby.
- Příznaky budou žáné (50 % pacientů), nebo jsou nespecifické: únava, pocení, hubnutí; byvá zvětšená slezina.
- Přežití pacientů s onemocněním zjištěným v chronické fázi se díky cílené léčbě pomocí inhibitorů tyrosinkinázy Bcr-Abl (TKI) prakticky nelíší od přežití celkové populace.
- V současnosti je k dispozici k léčbě pacientů s CML pět inhibitorů tyrosinkinázy Bcr-Abl.
- Ve výběru jednotlivých preparátů hrají roli zejména rozdílné profily nežádoucích účinků.
- Novým trendem v léčbě onemocnění je kontrolované vysazování léčby a dosažení remise bez nutnosti podávání terapie.

**Úvod**

Chronická myeloidní leukemie (CML) je nádorovým onemocněním křetvorné tkáně, jnými slovy klonálním myeloproliferativním onemocněním, charakterizovaným přítomností specifické získané genetické abnormality zvané chromozom Philadelphia (Ph chromozom), vzniklé reciprokovou translokací částí chromozomu 9 a 22. V důsledku translokace vzniká patologický fuzní gen *BCR-ABL1*, který kóduje vznik patologické, konstitutivně aktivované tyrosinkinázy Bcr-Abl, zodpovědné za nekontrolované množení křetvorných buněk a z toho vyplývající projevy onemocnění.

**Epidemiologie**

CML představuje asi 15–20 % všech nově zjištěných leukemií a její incidence v ČR je 1,2/100 000 obyvatele/rok, celosvětově se udává 0,6–2/1 milion obyvatele za rok. Incidence CML narůstá s věkem, v dětskvi je její výskyt vzácný. Věkový medián při diagnóze se pohybuje kolem 60–65 let, v klinických studiích však může být nižší i o více než 10 let. Díky úspěšné léčbě pomocí TKI trvale narůstá prevalence onemocnění s předpokladem dosažení hodnoty 1/1000 obyvatele kolem roku 2040. Roční mortalita onemocnění po zavedení TKI do terapie poklesla z 10–20 % na 1–2 %.

**Symptomatologie**

U CML rozlišujeme tři fáze onemocnění: chronickou fázi (chronic phase – CP), ve které je v současné době diagnostikováno téměř 95 % pacientů, *akcelerovanou fázi* (accelerated phase – AP) a *blastickou fázi* (blastic phase – BP), ty jsou označovány jako tzv. pokročilé fáze choroby. Kritéria k odlišení jednotlivých fází choroby jsou uvedena v tabulce 12.8. Choroba je až u 50 % případů zjištěna náhodně, kdy příznaky zcela chybí nebo jsou velmi mírné. U symptomatických nemocných zahrnují únavu, zvýšené pocení, hmotnostní úbytek, sub- až febrilie, bolesti v levém podžebří, pocíty plnosti po jídle, vzácněji pak krvácení, trombozu či projevy leukostázy, např. dušnost či priapismus, což je trvalá a bolestivá erekce. Fyzikální vyšetření odhalí zejména různé velikou splenomegalii u nece- lých 50 % nemocných, méně často i hepatomegalii. S pokročilostí fáze narůstá i intenzita symptomů, existují však i výjimky z tohoto pravidla.

**Etiopatogeneze**

CML je způsobena přítomností chromozomu Philadelphia, což je abnormálně zkrácený chromozom 22 vznikající reciprokovou translokací částí dlouhých ramének chromozomů 9 a 22. V důsledku translokace dochází k fúzi genu *ABL1* (Abelson murine leukemia) na chromozomu 9 a genu *BCR* (breakpoint cluster region) na chromozomu 22. Patologická fúze rezultuje v onkoprotein Bcr-Abl, který má vlastnosti konstitutivně aktivované tyrosinkinázy a způsobuje nekontrolované množení křetvorných buněk a jejich sníženou odpověď na proapoptické signály cestou ovlivnění signálních drah typu RAS, RAF, JUN kinázy, MYC a STAT. Příčina vzniku chromozomu Philadelphia není známa.

**Diagnostika**

**Krevní obraz (KO)** – leukocytóza ( $20\text{--}500 \times 10^9/l$ ), často i trombocytémie ( $400\text{--}1000 \times 10^9/l$ ), vzácněji pak trombocytopenie, erytrocytóza či anemie.

**Diferenciální rozpočet leukocytů** – tzv. posun doleva s vyplavením nezralých forem granulocytů (myelocytů, metamyelocytů, promyelocytů a blastů), typicky též eozinofilie a bazofilie.

**Cytologické vyšetření kostní dřevě (KD)**, *nejčastěji sternální punkci* – zvýšená buněčnost, podíl bílé složky ku erytroidní linii 10 : 1 až 25 : 1, dominance granulocytů různého stupně zralosti, eozinofilie a bazofilie.

■ **Tabulka 12.8** Definice akcelerované fáze (AP) a blastické fáze (BP) dle WHO kritérií (2016)

Akcelerovaná fáze (AP) – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:
• blastů 10–19%* v PK a/nebo v KD
• bazofilů $\geq 20\%$ v PK
• perzistující trombocytopenie ( $< 100 \times 10^9/l$ ) nezpůsobená léčbou nebo perzistující trombocytóza ( $> 1000 \times 10^9/l$ ) nereagující na terapii
• perzistující či zvětšující se slezina nereagující na terapii
• perzistující či narůstající počet leukocytů ( $> 10 \times 10^9/l$ ) nereagující na terapii
• přidatné chromozomální abnormality v Ph+ buňkách při diagnóze, zahrnující „major route“ změny (přidání Ph chromozomu, 8+, izochromozom 17q, 19+), kompletní karyotyp nebo abnormality 3q26.2
• všichni nové přidatné chromozomální abnormality v Ph+ buňkách, které se objeví v průběhu terapie
Blastická fáze (BP) – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:
• $\geq 20\%$ blastů v PK či KD
• extramedulární blastická proliferace

PK – periferní krev; KD – kostní dřeň; TN – inhibitory tyrosinkinázy

\* Míra Numbíblastů v PK či KD **úměrně až 10%** předstoupje riziku z hlediska možné rychlé myeloblastické transformace a vyžaduje další laboratorní a klinické vyšetření.

**Konvenční cytogenetické vyšetření KD** – prokáže Ph chromozom, tj. t(9;22)(q34;q11) u 95% pacientů, zachytí případně přidatné klonální chromozomální abnormality.

**Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) KD nebo periferní krve (PK)** – citlivější metoda, prokáže BCR-ABL1 gen u všech pacientů.

**Kvalitativní polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptázy (reverse transcriptase polymerase chain reaction – RT-PCR) KD i PK** – potvrzuje pozitivitu BCR-ABL1 genu (či spíše jeho transkriptu), pozitivní u 100% případů, určí typ transkriptu (např. b2a2, b3a2).

**Určení prognostických skóre (Sokalova, Hasfordova a EUTOS)** – platí jen pro pacienty v CP, nutno vypočítat před zahájením léčby, vypočet kombinuje vstupní parametry (věk, velikost sleziny, množství bazofilů, eoziinofilů, blastů a trombocytů v PK); automatická kalkulace na [http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml\\_score/](http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml_score/).

#### Diferenciální diagnóza

Diferenciální diagnóza CML je zásadně vymezena nutností průkazu pozitivity Ph chromozomu a/nebo BCR-ABL1 genu. Oslabí případy leukocytózy BCR-ABL negativní mohou zahrnovat: atypickou CML, Ph-negativní myeloproliferace (polycytemia vera, esenciální trombocytémie, chronická primární myelofibróza),

■ **Tabulka 12.9** Porovnání profilů nežádoucích účinků dostupných TKI

Nežádoucí účinek	Imatinib	Nilotinib	Dasatinib	Bosutinib	Ponatinib
periferní otoky	++	+/-	+/-	+/-	-
pleurální výpotky	-	-	+++	+/-	-
perikardiální výpotky	-	-	++	+/-	-
nauzea	+	-	-	+	-
průjem	++	+	-	+++	-
krvácení	+/-	-	+/-	-	-
ischemické cévní komplikace	-	++	+/-	+/-	++
hypertenze	-	-	-	-	++
plicní hypertenze	-	-	+	-	-
exaném	+	++	+	+	++
muskuloskeletální obtíže	++	+	+	+/-	+
hepatotoxicita	+	+	-	+	+
hyperglykemie	-	++	-	-	-
hypercholesterolemie	-	++	-	-	+

chronickou myelomonocytií leukemii, akutní leukemii (výjimkou je Ph pozitivní akutní lymfoblastická leukemie) či tzv. leukemoidní reakci, přítomnou např. při infekcích.

#### Terapie

• **Cíle léčby** – normalizace poměrů v kostní dřeni a krvi a normalizace velikosti sleziny (*kompletní hematologická odpověď*), complete hematologic response – CHR), vymizení Ph pozitivních (Ph+) buněk v kostní dřeni, tj. dosažení *kompletní cytogenetické odpovědi* (complete cytogenetic response – CCyR), ideálně také poklesu hladiny BCR-ABL1 transkriptů pod úroveň 0,1% mezinárodní škály, tj. dosažení *velké molekulární odpovědi* (major molecular response – MMR či MR3.0), zajištění dlouhodobého přežití, plnohodnotný a kvalitní život.

• **Cytorédukční terapie** – po stanovení diagnózy, ke snížení výrazné leukocytózy a/nebo trombocytémie, případně v paliativní indikaci. Prostředky: hydroxyurea (Litalir), anagrelid (Thromboreductin), leukaféza, trombocytaféza.

• **Biologická terapie tyrosinkinázy** – moderní léčba, která prodloužila celkové přežití pacientů s CML zejména v CP na úroveň přežití celkové populace. Mechanismus účinku: kompetitivní inhibice interakce ATP a Bcr-Abi kinyázy vedoucí k blokadě proliferace buněk maligního klonu a k jejich apoptóze.



■ **Tabulka 12.10** Doporučení léčby CML dle kritérií European Leukemia Net (ELN) z roku 2013

Chronická fáze
<b>PRVNÍ LINIE</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>imatinib (400 mg 1× d) nebo nilotinib (300 mg 2× d) nebo dasatinib (100 mg 1× d)*</li> <li>HLA typizace pacientů a sourozenců v případě vysokého rizikového skóre či přídatných cytogenetických abnormalit v době diagnózy</li> </ul>
<b>DRUHÁ LINIE (intolerance 1. TKI)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>kterýkoli jiný TKI schválený do 1. linie</li> </ul>
<b>DRUHÁ LINIE (selhání imatinibu v 1. linii)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>dasatinib nebo nilotinib nebo bosutinib** nebo ponatinib**</li> <li>HLA typizace pacientů a sourozenců</li> </ul>
<b>DRUHÁ LINIE (selhání nilotinibu či dasatinibu v 1. linii)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>dasatinib nebo nilotinib nebo bosutinib** nebo ponatinib**</li> <li>HLA typizace pacientů a sourozenců, vyhledání dárce v registru, zvažení alo-TKB</li> </ul>
<b>TŘETÍ LINIE (selhání a/nebo intolerance 2 TKI)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>kterýkoli ze zbyvajících TKI, alo-TKB u všech vhodných kandidátů</li> </ul>
<b>KTERÁKOLI LINIE, PŘÍTOMNOST MUTACE T315I</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>ponatinib**</li> <li>HLA typizace pacientů a sourozenců, vyhledání dárce v registru, zvažení alo-TKB</li> </ul>
<b>Akelerovaná fáze a blastická fáze</b>
<b>NOVÉ DIAGNOSTIKOVANÁ AP/BP, PACIENTI NEPŘEDLÉČENÍ TKI</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>imatinib (400 mg 2× denně) nebo dasatinib* (140 mg/den 1× denně či ve 2 dávkách) často v kombinaci s chemoterapií jako u akutní leukemie</li> <li>vyhledání dárce a alo-TKB u všech s BP a v případě absence optimální odpovědi u AP</li> </ul>
<b>AP/BP JAKO PROGRES Z CP V PRŮBĚHU LÉČBY TKI</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>dosud neužitý TKI (dasatinib nebo bosutinib nebo v případě mutace T315I ponatinib**) většinou v kombinaci s chemoterapií</li> <li>alo-TKB u všech vhodných (ne v případě zcela refrakterní BP)</li> </ul>

alo-TKB – alogenní transplantace krvetvorných buněk, AP – akcelerovaná fáze, BP – blastická fáze, CP – chronická fáze, HLA – histokompatibilní antigeny, TKI – inhibitory tyrosin kinázy

\* Dasatinib (Sprycel) nemá v ČR stanovenu úhradu pro 1. linii léčby

\*\* Bosutinib (Bosulif) ani ponatinib (Iclusig) nemají v ČR stanovenu úhradu, je žádoucí z indikací. V podmínkách ČR lze požádat rezimbu lékařsko souhlas s mimořádnou úhradou přípravku v situaci, kdy se jedná o jedinou léčebnou možnost pro pacienta, nazdařkud 516 Žilna o veřejném zdravotním pojištění.

V ČR je soustředěna do center specializované hematologické péče. Zahajuje se při poklesu leukocytů k hodnotám kolem  $20-30 \times 10^9/L$ . K dispozici je pět komerčně dostupných TKI: *imatinib* (Glivec), *nilotinib* (Tasigna), *dasatinib* (Sprycel), *ponatinib* (Iclusig) a *bosutinib* (Bosulif). Všechny léky se užívají perorálně a liší se spektrem svých nežádoucích účinků, což je také hlavní vodítko při volbě jednotlivých preparátů pro daného pacienta, u něž se pak zohledňují zejména přidružená onemocnění, věk a riziková skóre, a v dalších liniích pak případná přítomnost a typ mutací rezistentních na TKI. Porovnání míry výskytu nežádoucích účinků jednotlivých TKI je uvedeno v tabulce 12.9. Účinnost přípravků v jednotlivých liniích léčby je zejména z hlediska celkového přežití srovnatelná.

• *Alogenní transplantace krvetvorných buněk (alo-TKB)* – dříve sítěžní metoda léčby mladších pacientů, schopná z CML zcela vyléčit, nyní díky zavedení TKI odsunutá do 3. až 4. linie léčby. Stále významná v léčbě pokročilých fází CML.

• *Interferon alfa* – dříve zlatý standard léčby starších pacientů a nevhodných pro alo-TKB, nyní využití při selhání či intoleranci všech TKI a nemožnosti alo-TKB či v graviditě.

» *Současná platná doporučení pro léčbu v jednotlivých fázích choroby jsou uvedena v tabulce 12.10.*

• *Monitorování léčebného efektu* – zásadní pro optimální léčebné výsledky. V pravidelných intervalech KO a diferenciální rozpočet leukocytů, aspirace KD a cytogenetické vyšetření (měsíc 3, 6 a 12 od zahájení terapie, do dosažení CCyR), molekulární monitoring pomocí *kvantitativní RT-PCR (real-time quantitative reverse transcriptase PCR – RQ RT-PCR)* z PK à 3 měsíce. Nedosažení požadované léčebné odpovědi na cytogenetické a/nebo molekulární úrovni (tj. absence CHR či poklesu Ph+ buněk pod 95 % ve 3. měsíci; *BCR-ABL1* > 10 % a/nebo Ph+ > 35 % v 6. měsíci a *BCR-ABL1* > 1 % a/nebo Ph+ > 0 ve 12. měsíci léčby) je označováno jako selhání a je indikací ke změně dosavadní terapie. Stejně tak pokud dojde ke ztrátě již nabytých CHR, CCyR či potvrzené ztrátě MMR, dále při výskytu *BCR-ABL1* mutací rezistentních na TKI či objevení se nových přidatných chromozomálních změn v Ph+ buňkách.

• *Delka trvání léčby* – v současnosti je doporučeno v účinné léčbě pokračovat trvale, doživotně. Vysazování TKI po dosažení hluboké molekulární odpovědi je předmětem zájmu řady klinických studií, jeví se jako proveditelné, bezpečné a úspěšné asi u 50 % pacientů splňujících kritéria vysazení (celkové u méně než 10 % všech pacientů s CML), zatím však není doporučováno v klinické praxi.

**Průběh/prognóza**

Desetileté přežití pacientů s CML zjištěnou v CP se za předpokladu optimální léčebné odpovědi na TKI pohybuje mezi 80 a 90%. Předpokládáné 6–8leté přežití u pacientů s CML zjištěnou v AP se pohybuje mezi 60 a 80%. Prognóza pacientů v blastické fázi CML zůstává i v éře TKI nepříznivá, medián přežití při kombinované léčbě TKI a chemoterapii se pohybuje mezi 6 a 24 měsíci.

**LITERATURA**

1. Baccarani M, Deininger MW, Rossi G, et al. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukaemia. 2013. *Blood*, 2013;122(6):872–84.
2. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukaemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2016;91(2):252–65.
3. Faber E, Indrak K. Chronická myeloidní leukémie. Praha: Galén; 2010.
4. Zalcová D, Faber E, Indrak K, et al. Chronická myeloidní leukémie. In: Mayer J, editor. Léčebné postupy v hematologii... 1st ed. Nové Město nad Metují: Česká hematologická společnost ČLS JEP; 2016.

**12.5 PROLYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE**

Yvona Brychtová, Anna Panovská, Michael Doubek

**MINIMUM PRO PRAXI**

- Prolymfocytární leukemie (PLL) je vzácné lymfoproliferativní onemocnění z B a T prolymfocytů s agresivním průběhem, tvoří méně než 2% z lymfoidních leukemií.
- Prognóza je velmi závažná: u PLL z B lymfocytů (B-PLL) je medián celkového přežití 3 roky.
- Základními příznaky jsou častá masivní splenomegalie a vysoká lymfocytóza nad  $100 \times 10^9/l$ . Asi 30% pacientů s PLL z T buněk (T-PLL) je asymptomatických.
- Diagnostika B-PLL může být obtížná pro absenci specifických cytologických nebo fenotypických znaků. Analýzou genové exprese byl potvrzen určitý překryv PLL s lymfomem z pláštěvé zóny (MCL).
- U PLL se lze velmi často setkat s defekty genu *TP53*.
- Standardní léčbou první linie B-PLL bez defektu *TP53* zůstává kombinace rituximab, fludarabin, cyklofosfamid, pro B-PLL s defektem *TP53* je lékem volby alemtuzumab. Pro T-PLL je léčbou první linie alemtuzumab.

**Úvod**

Prolymfocytární leukemie z B lymfocytů (B-PLL) a prolymfocytární leukemie z T buněk (T-PLL) jsou lymfoidní malignity s velmi nepříznivou prognózou. Vychází z B nebo T lymfocytů. Morfologicky tvoří u PLL prolymfocyty více než 55% lymfoidních buněk v periferní krvi. U PLL nalézáme většinou významnou lymfocytózu v periferní krvi, pravidelně je postižena kostní dřeň, téměř

### 1.1.5. Příloha 5

Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie – je možné léčbu ukončit? *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2020;22(1):36-45. ISSN 1212-4184.

# Chronická myeloidní leukemie – je možné terapii ukončit?

MUDr. Daniela Žáčková, Ph.D.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Brno, Interní hematologická a onkologická klinika

## Souhrn

Zavedení inhibitorů tyrozinkinázy (TKI) do klinické praxe dramaticky zlepšilo prognózu pacientů s chronickou myeloidní leukemií, jejichž očekávaná délka života se blíží celkové populaci. Celoživotně koncipovaná terapie TKI však kromě výrazného profitu přináší i zátěž především v podobě nežádoucích účinků, snížené kvality života a ekonomické náročnosti. Pokusy o vysazení TKI, realizované zejména v klinických studiích, vedly k nastolení tzv. remise bez nutnosti terapie (treatment-free remission – TFR) u přibližně 50 % pacientů, kteří na léčbě dosáhli setrvalé hluboké molekulární odpovědi. Bezpečnost vysazovacích pokusů byla potvrzena rychlou obnovou ztracené molekulární odpovědi u naprosté většiny pacientů s molekulární rekurencí po opětovně zahájené terapii TKI. Neočekávaným jevem se stal tzv. syndrom z vysazení TKI, který v podobě kloubně-svalových obtíží postihuje až 40 % pacientů s ukončenou terapií. Přesun vysazování TKI do klinické praxe je spojen s potřebou dořešení nezodpovězených otázek, jakými jsou identifikace faktorů prediktivních pro úspěšnou TFR, sjednocení kritérií pro ukončení terapie a její obnovení v případě ztráty odpovědi, zajištění vysoce senzitivního molekulárního monitorování, a konečně navýšení podílu vhodných kandidátů pro vysazení optimalizací předchozí terapie či modifikací vlastního vysazovacího schématu. Všechny tyto aspekty včetně přehledu klinických studií i zkušeností z praxe s vysazováním TKI jsou diskutovány v předkládané práci.

## Klíčová slova

chronická myeloidní leukemie • inhibitory tyrozinkinázy • ukončení terapie • remise bez nutnosti léčby • hluboká molekulární odpověď • syndrom z vysazení

## Summary

*Záčková D. Chronic myeloid leukemia – is it possible to discontinue the therapy?*

Tyrosine kinase inhibitors (TKI) introduction into clinical practice has dramatically improved chronic myeloid leukemia patients prognosis with life expectancy approaching that of global population. Besides significant benefit, life-long TKI therapy brings also some obstacles namely in terms of adverse events, impaired quality of life, and economical burden. TKI discontinuation attempts carried out particularly with clinical trials have led to treatment-free remission (TFR) establishment in approximately 50% of patients with sustained deep molecular response. Safety of discontinuation attempts was confirmed by rapid molecular

response re-institution in a vast majority of patients thanks to TKI re-treatment after molecular recurrence. Quite unexpected TKI withdrawal syndrome with musculoskeletal pain affected up to 40% of patients. Since TKI discontinuation has been gradually shifted into clinical practice, solving some pending issues such as factors predictive for TFR success identification, criteria for TKI cessation and re-introduction unification, highly sensitive molecular monitoring assurance, and finally previous TKI treatment optimization as well as respective TKI discontinuation approach modification in order to enable more patients to attempt TFR has been warranted. All these aspects including TKI stopping clinical trials and clinical practice experience review are presented in this manuscript.

## Key words

chronic myeloid leukemia • tyrosine kinase inhibitors • treatment discontinuation • treatment-free remission • deep molecular response • withdrawal syndrome

## ÚVOD

Chronická myeloidní leukemie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění s incidencí přibližně 1,2 případů na 100 000 obyvatel, představující asi 15 % nově diagnostikovaných leukemií v dospělém věku.<sup>(1)</sup> Je chorobou v mnoha ohledech unikátní, a to nejen v kontextu hematologických malignit, ale napříč celou onkologií. CML byla vůbec prvním nádorovým onemocněním, u něhož byla identifikována specifická genetická změna. Abnormálně zkrácený chromosom 22, v roce 1960 objevený americkými vědci Novellem a Hungerfordem, byl podle místa objevu nazván filadelfským (Ph1) chromosomem. V následujících letech byla rozkryta podstata Ph1 chromosomu v podobě reciproké translokace chromosomů 9 a 22, a posléze byl odhalen v důsledku translokace nově vzniklý patologický fúzní gen BCR-ABL1. Konstitutivně aktivovaná tyrozinkináza Bcr-Abl1, která je genem BCR-ABL1 kódována, je zodpovědná za nekontrolované množení krvetvorných buněk a z toho vyplývající projev onemocnění.<sup>(2)</sup>

Byla to právě přítomnost unikátní genetické abnormality se silným patogenetickým potenciálem, která umožnila vývoj specifických inhibitorů patologické tyrozinkinázy (tyrosine kinase inhibitors – TKI), jejichž prototyp, imatinib, vstoupil do klinické praxe v roce 2001 jako vůbec nejrychleji schválený protinádorový lék v historii. Uvedení imatinibu, následovaného dalšími ještě účinnějšími přípravky do klinické praxe, a zejména pak jejich vynikající účinnost, doslova revolučním způsobem změnil management a prognózu tohoto onemocnění. Předpokládaná doba přežití pacientů s CML zjištěnou

v chronické fázi (chronic phase - CP) se díky účinné terapii blíží očekávané délce přežití celkové populace.<sup>(3)</sup> V současnosti v klinické praxi disponujeme pěti zástupci TKI, z nichž 4 jsou schváleny pro léčbu v první linii: již zmíněný imatinib a dále představitelé 2. generace TKI - nilotinib, dasatinib a bosutinib. V případě rezistence či nesnášenlivosti léčby první linie je kromě dasatinibu, nilotinibu a bosutinibu, schválených i do následujících linií léčby, dostupný zástupce 3. generace TKI, ponatinib, jediný účinný i na multirezistentní mutaci Bcr-Abl1 kinázy T315I. Léčba TKI, ať již původně zvoleným či následným preparátem, je koncipována celoživotně z důvodu obavy před možným návratem onemocnění při prokázané rezistenci leukemických kmenových buněk vůči působení TKI.<sup>(4-6)</sup> Celoživotní léčba, která nemá v rámci onkologie obdoby, má však nezanedbatelná úskalí, zejména v podobě nežádoucích účinků a ekonomické zátěže v důsledku narůstající prevalence úspěšně, ale také nákladně léčené choroby. Souběžně s účinnou terapií je nedílnou součástí managementu CML monitorování léčebné odpovědi na hematologické, cytogenetické, a zejména pak na molekulární úrovni pomocí kvantitativní molekulárně-biologické analýzy hladiny BCR-ABL1 transkriptů v kostní dřeni či komfortněji v periferní krvi.<sup>(7)</sup> Výše uvedené nevýhody dlouhodobé léčby a rovněž fakt, že s účinnou terapií narůstá podíl pacientů dosahujících velmi nízkých hodnot hladiny transkriptů BCR-ABL1, často až na hranici či pod hranici limitu detekce, stály u zrodu myšlenky na možnost vysazení dlouhodobé terapie. Koncept tzv. remise bez nutnosti léčby (treatment-free remission - TFR) byl co do bezpečnosti a proveditelnosti prověřen v řadě klinických studií u více než tří tisíc pacientů a po dosažení mety dlouhodobého přežití se stal novým cílem terapie pacientů s CML.<sup>(8-27)</sup>

### HLUBOKÁ MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚĎ - ZÁKLADNÍ PŘEDPOKLAD PRO VYSAZENÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY

Základním předpokladem pro vysazování terapie TKI je dosažení výrazné redukce leukemické nálože na úroveň tzv. hluboké molekulární odpovědi (deep molecular response - DMR). Ta je definovaná jako hladina transkriptů BCR-ABL1  $\leq 0,01\%$ , vztaženo k mezinárodní škále (international scale - IS), a označovaná též jako MR4.0 podle míry logaritmického poklesu oproti vstupní standardizované hladině transkriptů odpovídající 100 % (IS). Ještě hlubší míra poklesu hladiny transkriptů je označována jako MR4.5 a odpovídá hodnotě hladiny transkriptů  $\leq 0,0032\%$ , a případně MR5.0, odpovídající poklesu hladiny transkriptů  $\leq 0,001\%$ . Od dřívějšího označení, jako je kompletní molekulární odpověď (complete molecular response - CMR) nebo nedetekovatelné transkripty (undetectable minimal residual disease - UMRD), daného spíše nižší citlivostí dříve používaných vyšetřovacích metod, se nyní upouští.

Podíly pacientů dosahujících DMR se liší při léčbě různými TKI. Randomizované studie porovnávající v první linii léčby imatinib s dasatinibem (DASISION) a imatinib s nilotinibem (ENESTnd) prokázaly, že při léčbě TKI 2. generace jsou rychlost dosažení i podíly MR4.5 po 5 letech léčby vyšší než při léčbě imatinibem (dasatinib vs. imatinib: 42 % vs. 33 %,  $p < 0,025$ ; nilotinib 300 2x denně vs. nilotinib 400 2x denně vs. imatinib: 53,5 % vs. 52,3 % vs. 31,4 %,  $p < 0,000$  1).<sup>(28, 29)</sup>

Podle stávajících doporučení pro management pacientů s CML nefiguruje dosažení DMR jako nezbytná meta pro záruku dlouhodobého přežití.<sup>(6, 30)</sup> Jako optimální léčebná odpověď spojená s výbornou prognózou je stanovena tzv. velká molekulární od-

pověď (major molecular response - MMR), odpovídající hladině transkriptů  $\leq 0,1\%$  (IS), nicméně z výsledků některých studií vyplývá, že i dosažení DMR je asociováno s obzvláště dobrými dlouhodobými výsledky, nehledě na nesporný význam jejího dosažení pro vlastní vysazování TKI.<sup>(31)</sup>

### FAKTORY PODPORUJÍCÍ VYSAZENÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY

Jak již bylo předesláno v úvodu, dlouhodobá a celoživotně koncipovaná terapie TKI, motivovaná obavami z relapsu onemocnění, přináší kromě nesporných benefitů také nemalou zátěž. Alarmující je zejména závažný až život ohrožující charakter některých nežádoucích účinků (NÚ), jakými jsou např. periferní arteriální hypertenze a pleurální výpotky při léčbě dasatinibem či cévní nežádoucí účinky při léčbě nilotinibem a ponatinibem.<sup>(28, 29, 32, 33)</sup> Ale i méně závažné NÚ v dlouhodobém kontextu pacienty zatěžují a nepříznivě ovlivňují kvalitu života, jako je tomu v případě imatinibu, který ač je dlouhodobě bezpečný, tak je přesto spojen s vytrvale obtěžujícími mírnými až středně intenzivními projevy intolerance, jako například únavou, svalovými bolestmi a křečemi či periferními otoky.<sup>(34)</sup> Terapie TKI může nepříznivě ovlivnit vývoj plodu, její přerušení je tedy vysoce žádoucí pro zajištění bezpečných gravidit.<sup>(35)</sup> Nezanedbatelným důvodem podporujícím snahu o vysazení TKI je značná finanční náročnost terapie, která spolu s narůstající prevalence onemocnění představuje významnou ekonomickou zátěž pro systémy zdravotní péče jednotlivých zemí.<sup>(36)</sup> Ve většině důvodů pro vysazení TKI nelze opomenout přání samotných pacientů, i když ne všichni se chtějí účinné terapie vzdát.<sup>(37, 38)</sup>

### PŘEHLED KLINICKÝCH STUDIÍ VYSAZUJÍCÍCH INHIBITORY TYROZINKINÁZY

#### STUDIE VYSAZUJÍCÍ IMATINIB

První informace o vysazení imatinibu měly charakter popisu jednotlivých případů nebo malých studií, kdy bylo ukončení léčby motivováno dominantně NÚ, těhotenstvím či přáním samotných pacientů.<sup>(39-43)</sup> Pilotní studie francouzských autorů, v rámci níž byl imatinib vysazen 12 pacientům v délce než 2 roky trvající CMR, prolomila dosavadní představu, že vysazení TKI není možné, aniž by nedošlo vždy k návratu onemocnění.<sup>(8)</sup> Naopak, polovina pacientů setrvala v CMR bez podávání terapie dlouhodobě v mediánu sledování 7,5 let (rozmezí: 4,4-8,4 roků).<sup>(42)</sup> Proveditelnost a bezpečnost vysazení imatinibu u většího počtu pacientů byly poté potvrzeny nezávisle dvěma sesterskými studii, francouzskou STIMI a australskou TWISTER. Ve studii STIMI byl imatinib po léčbě trvající  $\leq 3$  roky vysazen pacientům, u nichž nebylo možno detekovat BCR-ABL1 transkripty po dobu alespoň 2 let. Molekulární relaps a současně impuls pro opětovné zahájení terapie byl definován jako potvrzená pozitivita BCR-ABL1 transkriptů se vzestupem hladiny mezi dvěma vyšetřeními o 1 log. Po 12 měsících sledování setrvalo v TFR, tj. bez nutnosti terapie a v trvající CMR, celkem 41 % pacientů.<sup>(9)</sup> Poslední aktualizace studie potvrdila setrvalou TFR u 38 % pacientů po 5 letech od vysazení imatinibu v mediánu sledování 77 měsíců.<sup>(10)</sup> K analogickým závěrům dospěla i australská studie TWISTER, v níž podmínky pro vysazení a opětovné nasazení TKI byly obdobné jako ve studii STIMI, jen počet pacientů byl nižší ( $n = 40$ ). V mediánu sledování 42 měsíců byl podíl pacientů v TFR ve 24 měsících 47,1 % a ve 4 letech 42,7 %.<sup>(11)</sup> Zjištění, že během sledování pacientů v obou výše popsáných studiích byla pozorována občasná pozitivita BCR-ABL1 transkrip-

tů, aniž by došlo k relapsu onemocnění, vedlo ke koncepci **studie A-STIM**, v níž kritérium pro molekulární relaps a současně opětovné zahájení terapie bylo zvoleno méně striktně, a sice jako ztráta MMR, tedy vzestup hladiny BCR-ABL1 transkriptů > 0,1 % (IS). Díky volnějšímu kritériu narostl podíl pacientů setrvávajících v TFR ve 36 měsících na 61 %.<sup>(12)</sup> Vyšší podíl pacientů setrvávajících po ukončení léčby TKI bez nutnosti terapie potvrdily i další dvě studie se stejně definovaným kritériem pro návrat terapie jako ve studii A-STIM. Korejská **studie KID** (Korean Imatinib Discontinuation) hodnotila vysazení imatinibu u 90 pacientů léčených imatinibem  $\geq 3$  roky se setrvalou DMR  $\geq 2$  roky. Pravděpodobnost setrvání v MMR ve 12. a 24. měsíci od vysazení byla 62,2 %, respektive 58,5 %.<sup>(13)</sup> V japonské **studii JALSC-STIM213** bylo za stejných vstupních kritérií pro vysazení i stejné definice molekulárního relapsu dosaženo u 68 hodnocených pacientů ve 12. měsíci od vysazení 67,6 % a ve 3. roce 64,6 % podílu pacientů setrvávajících v TFR.<sup>(14)</sup> Imatinib byl po alespoň 2 letech léčby a nejméně 18 měsících trvání CMR vysazen také 112 pacientům v rámci mezinárodní **ISAV studie** (Imatinib Suspension and Validation), přičemž podíl pacientů v TFR po 3 letech od vysazení léčby činil 51,9 %.<sup>(15, 16)</sup>

## STUDIE VYSAZUJÍCÍ INHIBITORY TYROZINKINÁZY 2. GENERACE

Kromě studií vysazujících imatinib probíhá či již má výsledky opublikovány i řada studií vysazujících TKI 2. generace podávané v indikaci první či druhé linie či případně užití cílené v roli konsolidační terapie po úvodní léčbě imatinibem.

Do **studie STOP 2G-TKI** (Stop Second-Generation TKI) bylo zařazeno celkem 60 pacientů léčených nilotinibem a dasatinibem v první či následné linii déle než 3 roky s nedetekovatelnými BCR-ABL1 transkripty po dobu nejméně 2 let. Podíl pacientů v TFR ve 12 měsících a 4 letech od vysazení byl 63,3 %, respektive 53,6 %. Pacienti, kteří na předchozí léčbu odpovídali suboptimálně či na ni byli rezistentní, měli významně nižší pravděpodobnost dosažení TFR než pacienti s optimální odpovědí (23 % versus 62 %;  $p = 0,0029$ ).<sup>(17)</sup> Japonská **studie DADI** (Dasatinib Discontinuation) hodnotila úspěšnost vysazení dasatinibu podávaného ve druhé linii u 63 pacientů s alespoň rok trvajícím hladinou transkriptů < 0,006 9 % (IS). Podíl pacientů v TFR po 3 letech od vysazení byl 44 %.<sup>(18)</sup> Další japonskou studii zaměřenou na vysazování dasatinibu podávaného 54 pacientům ve 2 roky trvajícím konsolidační léčbě byla **studie D-STOP**, z níž vyplynul 62,9 % podíl pacientů, kteří po roce od vysazení udrželi DMR bez nutnosti léčby.<sup>(19)</sup> Zcela recentně byly publikovány závěry komerční **studie DASFREE**, ve které 84 pacientů vysadilo dasatinib po nejméně 2 roky trvajícím léčbě a alespoň rok trvajícím MR4.5. Podíl pacientů v TFR ve 2 letech byl 46 %.<sup>(20)</sup>

Ve **studii ENESTfreedom** bylo testováno vysazení nilotinibu podávaného v první linii po dobu nejméně 3 let a s nejméně rok trvajícím MR4.5 u 190 pacientů. Po 12 měsících od vysazení zůstalo v TFR 51,6 % pacientů.<sup>(21)</sup> Podobné podmínky pro vysazení terapie i definici molekulárního relapsu v podobě ztráty MMR nalezneme ve **studii ENESTop**, která na rozdíl od studie ENESTfreedom nilotinib zařazovala jako konsolidační léčbu po předchozí terapii imatinibem. Z celkem 126 pacientů setrvalo v TFR po roce 58 % a po 2 letech 53 %.<sup>(22)</sup> Vysazení nilotinibu po 2leté konsolidační fázi předcházené terapií imatinibem a při setrvalé MR4.5 po dobu trvání konsolidace bylo testováno v japonské **studii STAT2**. Z 96 zařazených pacientů setrvalo v TFR po 12 měsících 67,9 %. Molekulární relaps byl definován buď jako ztráta MMR, nebo jako konfirmovaná (potvrzená 2 odběry

v rozmezí 4 týdnů) ztráta MR4.5.<sup>(23)</sup> Nedávno byly publikovány závěry **studie NILSt**, v rámci níž rovněž japonští autoři vysadili nilotinib po 2leté konsolidační fázi, již předcházela léčba buď imatinibem, či nilotinibem, 87 pacientům, kteří udrželi po dobu konsolidace MR4.5. Podíl pacientů v TFR po roce od vysazení činil 60,9 % a zůstal neměnný i ve 3. roce sledování.<sup>(24)</sup>

## STUDIE VYSAZUJÍCÍ VÍCE INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY

Suverénně dosud a pravděpodobně i vůbec největší vysazovací studii byla panevropská akademická **studie EURO-SKI** (EUROpe Stop TKI), která zařadila 755 pacientů z několika evropských zemí včetně významného příspěvku z ČR. Se 64 pacienty vzešlymi ze spolupráce všech 6 tehdy působících center specializované hematologické péče jsme se stali v pořadí 5. nejúspěšnější rekrutující zemí. Do studie EURO-SKI byli zařazeni pacienti, kteří byli léčeni  $\geq 3$  roky jakýmkoliv TKI v první či druhé linii z důvodu intolerance předchozího přípravku a kteří dosáhli MR4.0 trvajícím nejméně rok. Jako molekulární relaps byla označena i jednorázová ztráta MMR. Ve 2 letech od vysazení přesně polovina ze zařazených pacientů setrvala v MMR bez nutnosti opětovného nasazení terapie.<sup>(25)</sup>

Design britské **studie DESTINY** (De-Escalation and Stopping Therapy with Imatinib, Nilotinib or sprYcel) byl poněkud odlišný od všech dosud uvedených studií, které vysazovaly TKI po určité době podávání náhle. Ve studii DESTINY byla dávka TKI po vstupu do studie nejprve na rok snížena na polovinu standardní dávky, tj. imatinib na 200 mg 1× denně, nilotinib na 200 mg 2× denně a dasatinib na 50 mg 1× denně, a teprve poté, v případě udržení MMR, byly léky zcela vysazeny. Vstupním kritériem studie byla léčba TKI trvajícím nejméně 3 roky a MR4.0 buď stabilní (skupina „MR4.0“;  $n = 125$ ), či fluktuující k hodnotám MMR (skupina „MMR“;  $n = 49$ ) v délce trvání alespoň jeden rok. Kritériem pro navýšení dávky, resp. opětovné nasazení TKI byla konfirmovaná ztráta MMR. Podíl pacientů, u nichž došlo k molekulární rekurenci během de-eskalační fáze, činil pouhých 7 %, přičemž u všech byla po opětovném návratu plné dávky léku obnovena MMR.<sup>(26)</sup> Po úplném vysazení léčby bylo ve skupině MR4.0 dosaženo 3letého přežití bez molekulární rekurence u 72 % a ve skupině MMR pak 36 %.<sup>(27)</sup>

## ZKUŠENOSTI S VYSAZOVÁNÍM INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY V BĚŽNÉ KLINICKÉ PRAXI

Recentně byly publikovány závěry dvou analýz studujících úspěšnost a bezpečnost TFR mimo rámec klinických studií. Fava a kol. informovali o výsledcích retrospektivní **observační studie** zaměřené na vysazování TKI u velkého souboru **293 italských pacientů**, z nichž 88 % vysadilo TKI v podmínkách běžné klinické praxe, nejčastěji na základě společného rozhodnutí lékaře i pacienta (62 %), z důvodu nesnášenlivosti TKI (20 %) či těhotenství (6 %). U 72 % pacientů byl vysazován imatinib a u 28 % pacientů TKI 2. generace. V mediánu sledování 34 měsíců byl podíl pacientů v TFR 62 %. Ve 12 měsících od vysazení bylo v TFR 68 % pacientů vysazujících imatinib a 73 % pacientů po vysazení TKI 2. generace. Celkem 39 % pacientů obnovilo terapii TKI z důvodu ztráty MR4.0 (19 %), ztráty MMR (70 %), ztráty kompletní cytogenetické odpovědi (complete cytogenetic response – CCyR) (9 %) či z jiných důvodů (2 %). U 94 % pacientů byla po opětovném nasazení TKI obnovena MMR a u 82 % z nich i DMR. Naprostá většina pacientů (75 %) obnovila terapii v prvním roce od vysazení, poslední opětovné nasazení bylo realizováno po

Tab. 1 Definice kritérií pro vysazení TKI a jejich opětovné zahájení v klinických studiích (v abecedním pořadí)

Studie	n	Požadovaná délka léčby TKI před vysazením	Požadovaná hloubka DMR před vysazením	Požadovaná délka trvání DMR před vysazením	Definice molekulárního relapsu (= nasazení TKI)
A-STIM <sup>(12)</sup>	80	≥ 3 roky IM	UMRD	≥ 2 roky	> MMR 1×
DAD <sup>(18)</sup>	63	> 1 rok na D ve 2. linii po IM	< 0,006 9 % IS	≥ 1 rok	> 0,006 9 % IS
DASFREE <sup>(20)</sup>	84	≥ 2 roky na D	MR4.5	≥ 1 rok	> MMR 1×
DESTINY <sup>(26)</sup>	117*	≥ 3 roky IM, N, D	MMR**	≥ 2 roky	> MMR 2×
D-STOP <sup>(30)</sup>	54	≥ 2 roky na D	MR4.0	≥ 2 roky	> MR4.0 2×
ENESTfreedom <sup>(27)</sup>	190	≥ 2 roky na N v 1. linii	MR4.5	≥ 1 rok	> MMR 1×
ENESTop <sup>(22)</sup>	126	≥ 3 roky TKI včetně ≥ 2 roky na N ve 2. linii	MR4.5	≥ 1 rok	> MR4 2×, > MMR 1×
EURO-SKI <sup>(25)</sup>	755	≥ 3 roky TKI v 1. linii či po intoleranci ve 2. linii	MR4.0	≥ 1 rok	> MMR 1×
ISAV <sup>(15)</sup>	112	> 2 roky na IM	UMRD	≥ 1,5 roku	> UMRD 2×, > MMR 1×
JALSG-STIM213 <sup>(14)</sup>	68	≥ 3 roky IM	MR4.5	≥ 2 roky	> MMR 1×
KID <sup>(13)</sup>	90	≥ 3 roky IM	UMRD	≥ 2 roky	> MMR 2×
NILst <sup>(24)</sup>	87	IM či N (2 roky N)	MR4.5	≥ 2 roky	> MR4.5 2×
STAT2 <sup>(25)</sup>	73	IM (2 roky N)	MR4.5	≥ 2 roky	> MR4.5 2×
STIM1 <sup>(9)</sup>	100	≥ 3 roky IM	UMRD	≥ 2 roky	> UMRD 2×, > MMR 1×
STIM-Pilot <sup>(6)</sup>	12	> 2 roky na IM	UMRD	≥ 2 roky	> UMRD 2×
STOP 2G-TKI <sup>(17)</sup>	60	≥ 3 roky, D či N v 1. či 2. linii	MR4.5	≥ 2 roky	> MMR 1×
TWISTER <sup>(10)</sup>	40	≥ 3 roky IM	UMRD	≥ 2 roky	> UMRD 2×, > MMR 1×

TKI – inhibitor tyrozinkinázy, IM – imatinib, D – dasatinib, N – nilotinib, DMR – hluboká molekulární odpověď (deep molecular response), UMRD – nedetekovatelná minimální zbytková nemoc (undetectable minimal residual disease), MR – molekulární odpověď (molecular response), MMR – velká molekulární odpověď (major molecular response), IS – mezinárodní škála (International scale)

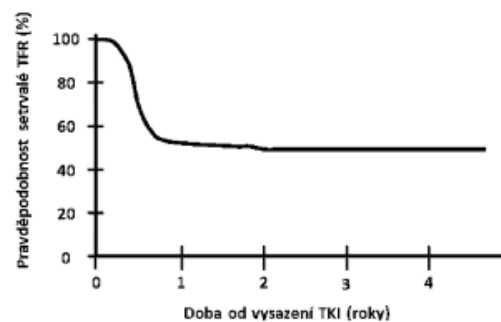
\*MR4.0 podskupina; \*\*vlastnímu vysazení předcházela deeskalace dávky na 50 % po dobu 1 roku, před vlastní deeskalací byla požadavkem vstupu buď striktní rok trvající MR4.0, nebo fluktuující MR mezi MR4.0 a MMR

105 měsících trvání TFR. Během sledování nebyla zaznamenána žádná progresse do pokročilých fází onemocnění.<sup>(43)</sup> V celonárodní retrospektivní analýze osudu **236 pacientů** vysazujících TKI v každodenní klinické praxi ve Španělsku byl podíl pacientů v TFR po 4 letech od vysazení 64 %. U většiny pacientů, kteří obnovili z důvodu molekulární rekurence terapii TKI, byla DMR obnovena do 3–5 měsíců od zahájení terapie. Nevyskytla se žádná progresse a 5 pacientů zemřelo z jiných příčin než z důvodu CML.<sup>(44)</sup>

#### LEKCE Z VYSAZOVÁNÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY VE STUDIÍCH I KLINICKÉ PRAXI

##### ÚSPĚŠNOST POKUSŮ O VYSAZENÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY

Na základě výše popsaných zkušeností s vysazováním TKI ve studiích i v klinické praxi můžeme konstatovat, že úspěšnost dosažení setrvalé TFR se pohybuje cca mezi 40–60 % (výjimku tvoří závěry studie DESTINY s podílem pacientů v TFR 72 %, kde však byla strategie vysazování odlišná od ostatních studií). Rozdíly v podílech dosažených TFR jsou dány mimo jiné i rozdílnými kritérii pro vysazení i re-iniciaci léčby TKI v jednotlivých studiích (tab. 1). Křivka vyjadřující pravděpodobnost setrvání v TFR v čase od vysazení terapie má v jednotlivých analýzách přibližně stejný tvar, kdy po relativně strmém poklesu na vrub časných relapsů



Obr. 1 Schéma křivky pravděpodobnosti setrvání v remisii bez nutnosti užívání TKI (treatment-free remission – TFR) v čase

koncentrovaných zpravidla do prvních 6 měsíců od vysazení zaujímá charakter více méně plateau s méně častými pozdními relapsy (obr. 1). Ve studii STIM1 95 % pacientů zrelabovalo do 7 měsíců od vysazení, ve studii TWISTER a EURO-SKI se 68 %, respektive 80 % relapsů odehrálo v prvních 6 měsících.<sup>(9,11,25)</sup> Co do charakteru relapsů se v naprosté většině jednalo o vzestup zbytkové choroby na molekulární úrovni a spíše ojediněle došlo i ke ztrátě cytogenetické odpovědi. Pozdější relapsy byly

vzácnější; ve studii STIM 1 se po 22. měsíci nevyskytl žádný, ve studii EURO-SKI, resp. po jejím ukončení však byly registrovány i pozdní molekulární relapsy 51 a 54 měsíců od vysazení (vlastní pozorování, nepublikováno) a v souboru italských pacientů byl nejzazší molekulární návrat zaznamenán dokonce po více než 8 letech trvání TFR.<sup>(9, 43)</sup>

#### BEZPEČNOST POKUSŮ O VYSAZENÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY

Ve světle vynikající prognózy pacientů s CML, kteří na dlouhodobé terapii TKI dosáhli a udrželi MMR či případně ještě hlubší úroveň odpovědi, je zajištění maximální bezpečnosti pokusů o vysazování TKI nezbytnou podmínkou. Z tohoto úhlu pohledu se dosud pokusy o vysazení TKI jeví jako poměrně bezpečné, kdy je po opětovném zahájení terapie TKI pro molekulární relaps velmi rychle obnovena MMR téměř u všech a DMR u naprosté většiny pacientů. Co do výběru přípravku k obnovené terapii dominuje původně užívaný TKI a v menší míře, například při nesnášenlivosti původního léku, je léčba měněna na jiný přípravek.

Dosud byly v kontextu vysazování TKI popsány 2 události progresu do pokročilé fáze. U pacientky zařazené do studie A-STIM byl pro molekulární relaps během TFR znovu nasazen imatinib a po 8 měsících trvání obnovené MMR došlo k fulminantní progresi do lymfoidního blastického zvratu, naštěstí úspěšně zvládnutého nilotinibem a následnou alogenní transplantací

krvetočných buněk (aloTKB).<sup>(42)</sup> Případ progresu do náhlé lymfoblastické krize po 18 měsících trvající TFR po vysazení dasatinibu byl publikován zcela nedávno a je de facto prvním případem transformace do pokročilé fáze časově přímo související s TFR.<sup>(45)</sup>

Otázka velmi pozdních relapsů dosud nemůže být zcela zodpovězena vzhledem k mnohdy ještě omezené době setrvání pacientů v TFR. S ohledem na známou skutečnost, kdy byly popsány relapsy onemocnění po 15–25 letech trvání molekulární remise po úspěšně provedené aloTKB, je potřeba tuto možnost zohlednit a v adekvátním sledování pacienta po vysazení medikace dlouhodobě pokračovat.<sup>(46)</sup>

#### SYNDROM Z VYSAZENÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY

Jednou z hlavních motivací pro vysazování TKI byly NÚ léčby. Poněkud neočekávaným se tedy stal tzv. syndrom z vysazení TKI (TKI withdrawal syndrome – TWS), který byl poprvé popsán Richterem a kol. v subanalýze studie EURO-SKI. Kloubně svalové bolesti postihly 15/50 (30 %) pacientů s lokalizací dominantně v ramenech, kyčlích, loktech, pažích, zápěstích, ale i v celém těle, a podobaly se projevům revmatické polymyalgie. Objevily se v mediánu 2 týdnů od vysazení a stupeň závažnosti byl hodnocen jako 1–2 podle Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Symptomy přetrvávaly v horizontu měsíců, se spontánním ústupem či za přispění nesteroidních

Tab. 2a Predikce úspěšnosti TFR ve studiích (v abecedním pořadí, 1. část) – červeně vyznačeny faktory, u nichž byla prokázána signifikantní korelace s úspěšností TFR

Studie/faktor ke korelaci	Věk	Pohlaví	Sokal skóre	Hasford skóre	EUTOS skóre	ELTS skóre	ECOG	Terapie INF- $\alpha$	Typ transkriptu BCR-ABL1	Typ TKI	Délka léčby TKI	Dávka TKI
A-STIM	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
DADI <sup>a</sup>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
DASFREE	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
DESTINY <sup>b</sup>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
DESTINY <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
D-STOP <sup>d</sup>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ENESTfreedom	+	+	-	-	-	-	-	NA	-	-	+	-
ENESTop <sup>e</sup>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
EURO-SKI <sup>f</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
ISAV <sup>g</sup>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
JALSG-STIM213 <sup>h</sup>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
KID	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
NILst <sup>i</sup>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
STAT2 <sup>ch</sup>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
STIM1	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
STIM-Pilot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STOP 2G-TKI <sup>j</sup>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TWISTER <sup>k</sup>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Španělsko real-life	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-



antiflogistik (NSA) či kortikoidů, některé však byly přítomny dlouhodobě, i v době hodnocení. V laboratorním nálezu (CRP, elfo proteinů, kreatinkináza, laktátdehydrogenáza) nebyly shledány významné abnormality.<sup>(47)</sup> Vzhledem k neočekávanosti jevu se ne všechny studie systematicky na sledování TWS zaměřily, pozornosti se pak syndromu dostalo až s jeho narůstající evidencí.<sup>(13-16, 20-23, 25-27, 44, 47, 48)</sup> Souhrnně lze říci, že TWS se může vyskytnout po každém TKI, jeho výskyt varíruje v širokém rozmezí 10–42 %, nastupuje v rozplytu mediánu 0,5–3 měsíců od vysazení (rozmezí: 0,5–15 měsíců), je buď přechodného trvání, kdy odeznívá spontánně či za přispění NSA či kortikoidů, nebo naopak přetrvává dlouhodobě

(1–36+ měsíců). Co do intenzity příznaků sice dominuje stupeň 1–2 podle CTCAE, ale popsány byly i vyšší stupně intenzity. Z nepublikovaných diskusí v početné mezinárodní skupině pacientů v TFR na sociálních sítích navíc vyplynulo, že se v řadě případů jedná o palčivý problém limitující pacienty v každodenních aktivitách, mnohdy obtížně léčebně ovlivnitelný a snad i částečně podceňovaný ošetřujícími lékaři (<https://www.facebook.com/groups/CMLTFR/>).

V korejské studii KID byla dokonce prokázána pozitivní korelace výskytu TWS s úspěšností TFR (TFR byl 79,5 % u pacientů s TWS versus 49,2 % u pacientů bez TWS,  $p = 0,003$ ), v japonské studii byla zase shledána asociace s nízkou tělesnou

**Tab. 2b** Predikce úspěšnosti TFR ve studiích (v abecedním pořadí, 2. část) – červeně vyznačeny faktory, u nichž prokázána signifikantní korelace s úspěšností TFR

Studie/faktor ke korelaci	Línie TKI (1. versus následující)	T/NK buňky v PK	Důvod změny na 2G TKI (R/I)	Doba do DMR	Délka trvání DMR	Doba od dg. CML do startu TKI	Digitální PCR (v době vysazení)	Délka trvání MMR	Hloubka DMR	Syndrom z vysazení
A-STIM	-	-	NA	+	+	-	-	-	-	-
DADI <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DASFREE	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
DESTINY <sup>b</sup>	-	-	NA	-	-	-	-	+	-	-
DESTINY <sup>c</sup>	-	-	NA	-	-	-	-	+	+	-
D-STOP <sup>d</sup>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
ENESTfreedom	-	-	NA	-	+	-	-	-	-	-
ENESTop <sup>e</sup>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
EURO-SKI <sup>f</sup>	-	+	NA	+	+	-	-	-	-	-
ISAV <sup>g</sup>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
JALSG-STIM213 <sup>h</sup>	-	-	NA	+	+	-	-	-	+	-
KID	-	-	NA	+	+	-	+	-	-	+
NILSt <sup>i</sup>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
STAT2 <sup>ch</sup>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
STIMI	-	-	NA	+	+	+	-	-	-	-
STIM-Pilot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STOP 2G-TKI <sup>j</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
TWISTER <sup>k</sup>	-	-	NA	+	+	-	-	-	-	-
Španělsko real-life	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-

+ – faktor korelovan, - – faktor nepoužit ke korelaci, TFR – remise bez nutnosti léčby (treatment-free remission), NA – nelze hodnotit (not applicable), R – rezistence, I – intolerance, PK – periferní krev, INF- $\alpha$  – interferon- $\alpha$ , TKI – inhibitor tyrozinkinázy, DMR – hluboká molekulární odpověď (deep molecular response), MMR – velká molekulární odpověď (major molecular response), PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction), 2G – druhá generace (second generation), EUTOS – European Treatment and Outcome Study, ELTS – EUTOS long-term survival score, ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group performance Status

<sup>a</sup>v DADI korelovan množství T a NK buněk v PK během terapie dasatinibem, sledáno statisticky signifikantní

<sup>b</sup>v DESTINY ve vztahu k molekulární rekurenci v průběhu deeskalační fáze dále korelovan: kohorta (MMR versus MR4.0), tělesná hmotnost

<sup>c</sup>v DESTINY ve vztahu k TFR dále korelovan: kohorta (MMR versus MR4.0), tělesná hmotnost, hloubka DMR na vstupu (MR4.0 versus MR4.5)

<sup>d</sup>v D-STOP dále korelovan: podtypy T-lymfocytů (cytotoxické a regulatorní) a NK buněk před nasazením dasatinibu a dále po 3, 6, 12 a 24 měsících od konsolidace dasatinibem, změna z imatinibu na dasatinib před konsolidací

<sup>e</sup>dostupné v Supplement materiálu on-line

<sup>f</sup>v EURO-SKI imunologické faktory vyhodnocovány sólo formou podprojektu(54)

<sup>g</sup>v ISAV dále korelována doba do CCyR

<sup>h</sup>v JALSG-STIM213 dále korelována hloubka DMR (UMRD versus MR4.5) – sledována signifikance

<sup>i</sup>ve studii STAT2 dále korelovan: výška, tělesná hmotnost, komorbidity, velikost sleziny, počet destiček, procento blastů, eozinofilů a bazofilů

<sup>j</sup>ve studii NILST dále korelovan: trough sérové hladiny nilotinibu před vysazením

<sup>k</sup>ve studii STOP 2G dále korelována molekulární odpověď ve 3 M od vysazení [ $BCR-ABL1 > 0,0032\%$  (ale stále v MMR) versus  $BCR-ABL1 \leq 0,0032\%$ ] s kumulativní incidencí relapsu a sledována signifikantní korelace

<sup>l</sup>signifikantní korelace s rizikem relapsu byla pozorována pro délku trvání terapie IFN a dobu do dosažení UMRD po změně léčby z INF na imatinib

hmotností a nízkým BMI.<sup>(33, 46)</sup> V nedávno publikované analýze 427 francouzských pacientů vysazujících TKI v rámci studií STIM2 a EURO-SKI byly identifikovány délka předchozí léčby TKI a anamnéza předchozích kostně-klobových potíží jako faktory predisponující k rozvoji TWS.<sup>(46)</sup>

Etiopatogeneze TWS není objasněna. Předpokládá se, že by se mohlo jednat o rebound fenomén po náhlém odejmutí tlumícího vlivu TKI na „off target“ kinázy jako např. c-KIT a PDGFR.<sup>(50)</sup>

#### FAKTORY PREDIKUJÍCÍ ÚSPĚŠNOST VYSAZENÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY

Zásadním zjištěním, které ze studií vyplynulo, je fakt, že TFR je možná i v situaci, kdy zjevně nejsou zlikvidovány všechny leukemické kmenové buňky a kdy je možno detekovat zbytkové onemocnění buď velmi citlivými metodami na úrovni genomické DNA, nebo i standardními metodami kvantitativního RNA monitoringu.<sup>(51, 52)</sup>

Identifikaci faktorů umožňujících kontrolu zbytkové nemoci, aniž by došlo k relapsu onemocnění, respektive predikujících úspěšnou TFR, si výtýčila za cíl naprostá většina vysazovacích studií a podobně jako v jiných aspektech, i v průkazu asociace jednotlivých faktorů se studie liší (tab. 2a, 2b). Faktorem s největším průnikem

prokázané asociace s úspěšností TFR je bezesporu délka předchozí léčby TKI. Podíl TFR u pacientů léčených ve studii STIM1 < 4,5 let versus > 4,5 let byl 22 % vs. 50 %, ve studii EURO-SKI < 5,8 let versus > 5,8 let byl 34 % vs. 57 %.<sup>(9, 25)</sup> Naopak například hloubka DMR (MR4.0 versus MR4.5 versus MR5.0) se nejvíce jeví pro úspěšnost TFR rozhodující.<sup>(53)</sup> Předchozí rezistence na léčbu TKI se ve studii STOP 2G-TKI a DADI ukázala být silným prediktorem neúspěšné TFR, a tato skupina pacientů by tudíž neměla být směřována k vysazování TKI v klinické praxi i přes dosažení ostatních atributů požadovaných k vlastnímu vysazení.<sup>(37, 18)</sup>

Z hlediska potenciálních biologických markerů úspěšného vysazení jsou nejvíce studovány imunologické faktory. Byla prokázána signifikantní asociace úspěšné TFR s vyšším počtem cirkulujících NK buněk a naopak nižším množstvím plazmocytoidních dendritických buněk, nicméně stále nelze ani zdaleka říci, že by byl biologický marker prediktivní pro úspěch TFR spolehlivě identifikován.<sup>(17-19, 54)</sup>

#### DOPORUČENÍ PRO VYSAZOVÁNÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY V KLINICKÉ PRAXI

Logickým procesem navazujícím na boom klinických vysazovacích studií je uvedení snah o dosažení setrvalé TFR do podmínek

Tab. 3 Přehled doporučení pro vysazování TKI v klinické praxi

	ESMO*	NCCN*	Tasigna SPC	Hughes & Ross**		
				Zelená	Žlutá	Červená
<b>Věková kategorie</b>	dospělí	dospělí	dospělí	dospělí	NA	NA
<b>Požadavky na molekulární monitoring***</b>	splněny	splněny	splněny	splněny	NA	nesplněny
<b>Sokal skóre při dg.</b>	nizké/střední	neuveдено	neuveдено	nizké/střední	vysoke	-
<b>BCR-ABL1 transkript</b>	typický b2a2 nebo b3a2; či atypický kvantifikovatelný	měřitelný	typický	typický	atypický kvantifikovatelný	nekvantifikovatelný
<b>CML historie</b>	CP	CP	CP	CP	rezistence či mutace KD	předchozí AP/BC
<b>Odpověď na léčbu 1. linie</b>	optimální	bez rezistence	neuveдено	optimální	varování	selhání
<b>Délka léčby TKI</b>	> 5 let	≥ 3 roky	≥ 3 roky	> 8 let	3-8 let	< 3 roky
<b>Hloubka DMR</b>	MR4.5	MR4.0	MR4.5	MR4.5	MR4.0	> MR4.0
<b>Trvání DMR</b>	MR4.5 či MR4.0 > 2 roky	≥ 2 roky	≥ 1 rok	> 2 roky	1-2 roky	< 1 rok
<b>Nasazení TKI</b>	NR	> MMR	> MMR či > MR4.0 2x	neuveдено	neuveдено	neuveдено
<b>Monitoring po vysazení</b>	à 1 M prvních 6 M, à 1,5 M dalších 6 M, dále à 3 M	à 1 M prvních 6 M, à 1,5 M dalších 6 M, dále à 3 M	à 1 M během 1. roku, à 1,5 M během 2. roku, dále à 3 M	à 1 M během prvních 6 M, dále à 2-3 M	-	-
<b>Dostupnost výsledků PCR</b>	≤ 4 týdny	≤ 2 týdny	neuveдено	≤ 4 týdny	-	-

TKI - inhibitory tyrozin kinázy, ESMO - European Society for Medical Oncology, NCCN - The National Comprehensive Cancer Network, SPC - Souhrn údajů o léčivém přípravku (Summary of Product Characteristics), DMR - hluboká molekulární odpověď, PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction), MR - molecular response, MR4.0 - hladina transkriptů BCR-ABL1 ≤ 0,01 % vztaheno k mezinárodní škále (International Scale - IS), MR4.5 - hladina transkriptů BCR-ABL1 ≤ 0,003 2 % vztaheno k mezinárodní škále (International Scale - IS), M - měsíc, NA - nelze použít (not applicable), KD - kinázová doména, AP - akcelerovaná fáze (accelerated phase), BC - blastická krize (blast crisis), NR - neuvedeno (not reported)

\*oficiální doporučení (guidelines)

\*\*expertní doporučení

\*\*\*vysoce citlivé a standardizované metody ke kvantitativní PCR analýze (v ESMO, Tasigna SPC i Hughes & Ross, citlivost <sup>3</sup> MR4.5), rychlá dostupnost výsledků (do 4 týdnů) umožňující včasné restart TKI v případě molekulárního relapsu

Vše zelené: silné doporučení ke zvažování vysazení; jakákoliv oranžová: vysazení TKI jen za vysoce prioritních okolností (např. plánované těhotenství či významná toxicita TKI); jakákoliv červená: vysazení TKI není doporučeno vyjma klinických studií

klinické praxe. Bylo publikováno hned několik doporučení vyjadřujících se k parametrům a požadavkům pro bezpečné vysazení TKI: oficiální evropská a americká doporučení a dále pak doporučení australských expertů.<sup>(30, 35, 36)</sup> V evropských podmínkách nejrespektovanější doporučení pro management pacientů s CML, vydávaná panelem expertů Evropské leukemické sítě (The European LeukemiaNet, ELN) stále ještě čekají na svou aktualizaci. Pro nilotinib jsou pravidla pro případné vysazení upravena přímo v SPC přípravku.<sup>(37)</sup> Detaily jednotlivých doporučených postupů jsou uvedeny tabulce 3. Nejsou v nich opomenuta ani pravidla bezpečného monitorování zbytkové choroby pomocí standardizovaných molekulárních metod, a to jak co do frekvence odběrů, tak i s apelem na včasnou dostupnost výsledků, včetně požadavku rychlé reakce na ně ve smyslu neprodleného znovuzahájení TKI terapie v případě molekulární rekurence.

### DŮVODY PROTI VYSAZENÍ A POSTOJE PACIENTŮ K VYSAZENÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY

Kromě syndromu z vysazení mluví proti vysazování TKI nejspíše riziko pozdních relapsů onemocnění. Strach z návratu onemocnění je také jedním z hlavních argumentů, které jsou uváděny pacienty jako zdůvodnění pro rozhodnutí setrvat na léčbě TKI. V dotazníkovém šetření u 1133 italských pacientů s CML se vyslovalo 49 % pacientů proti vysazení právě z důvodu strachu ze ztráty léčebné odpovědi, 16 % pacientů by vysadilo zejména kvůli NÚ, 20 % pacientů nevidělo rozdíl mezi vysazením a pokračováním v terapii a 12 % pacientů by vysadilo léčbu v případě silného doporučení jejich lékaře.<sup>(38)</sup> Pouze 42 % pacientů bylo pro vysazení TKI v analogickém dotazníkovém šetření provedeném u 210 pacientů ve Spojených státech amerických.<sup>(37)</sup> Pokračovat v TKI si přálo 34 % pacientů a 25 % si nebylo jistých. Důvodem odmítnutí vysazení byla u 58 % obava z návratu onemocnění. V analýze postojů k vysazení u 329 čínských pacientů s CML se jasně pro vysazení vyslovalo pouze 34 % pacientů, 27 % si nebylo jisto, ale po doporučení lékařem by vysadili, a 39 % dotázaných bylo proti vysazení, opět zejména z obavy z možného relapsu. Polovina respondentů vyžadovala od svých lékařů více podložených informací o TFR.<sup>(38)</sup> Potřeba adekvátní informovanosti nejen pacientů, ale také lékařů, je zdůrazněna v unikátním sdíleném stanovisku šesti specialistů na léčbu CML a šesti zástupců z řad samotných pacientů a jejich obhájců.<sup>(39)</sup> V publikaci je mimo jiné použit pro označení návratu onemocnění mírnější termín „molekulární rekurence“ se zdůrazněním, že se nejedná o relaps choroby či selhání v pravém slova smyslu.

### ALTERNATIVNÍ ZPŮSOB VYSAZENÍ INHIBITORŮ TYROZINKINÁZY PO PŘEDCHOZÍ REDUKCI DÁVKY

Společným rysem naprosté většiny vysazovacích studií je zhruba 50 % úspěšnost vysazení, které je realizováno více méně náhle, z plné a kontinuální terapie TKI. Výjimku představuje britská studie DESTINY, v níž byla dávka TKI před kompletním vysazením nejprve zredukována na polovinu standardní dávky v délce trvání 1 roku a jejíž design a výsledky jsou popsány výše.<sup>(36, 27)</sup> Výsledek dosažený ve skupině MR4.0, a sice přežití bez molekulární rekurence ve 36 měsících 72 %, je suverénně nejlepší z dosud publikovaných analýz. Jedním z možných vysvětlení tohoto dosud neobjasněného fenoménu je mechanismus desenzibilizace organismu při postupném odnímání vlivu TKI. Hypoteticky by se též pomalu probouzející leukemické buňky mohly

stát snazším cílem pro imunitní systém a udržení zbytkové choroby pod kontrolou.

Studie DESTINY se stala inspirací pro ambiciózní akademickou klinickou studii HALF, která je tuzemským celonárodním projektem testujícím úspěšnost a bezpečnost postupné deeskalace dávky TKI (redukce dávky TKI na polovinu standardní po dobu půl roku a podávání takto redukované dávky ob den další půlrok) a jejich následného vysazení. Kromě předpokladu, že udržitelost TFR bude vyšší právě u pacientů, kteří udělají léčebnou odpověď již při redukcii dávky TKI, právě intermitentní dávkování by mohlo ve druhém půlroce deeskalační fáze při zachovaném účinku díky prokázané vydatné retenci TKI v buňce vést ke zmírnění nežádoucích účinků, z nichž se alespoň část jeví být závislá na kontinuální expozici léku.<sup>(40-43)</sup> Studie HALF již byla schválena regulačními autoritami v ČR a v lednu 2020 je plánováno její spuštění (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04147533).<sup>(44)</sup>

### PERSPEKTIVY DO BUDOUCA A ZÁVĚR

Výsledky četných klinických studií, ale i zkušenosti z každodenní praxe vyvrátily původní předpoklad, že TKI je nutné užívat celoživotně. Pokusy o jejich kontrolované vysazení u pacientů se setrvalou DMR se ukázaly být úspěšné pro přibližně 50 % vhodných kandidátů a současně relativně bezpečné pro ty, u nichž byla ztracená molekulární odpověď rychle obnovena opětovně zahájenou terapií. Doporučení, vydaná za účelem rozšíření vysazování TKI do běžné praxe, částečně odrážejí zjištění, že délka léčby TKI alespoň 5 let, nejméně však 3 roky, a délka trvání MR4.0 alespoň 2 roky byly spojeny s vyšší pravděpodobností úspěchu TFR. I přesto jsou však kritéria pro vysazení terapie i její opětovně zahájení spíše opřena o empirii než o jasný průkaz, že právě jejich naplnění zajistí jasný benefit setrvalé TFR. I z toho důvodu se jednotlivá doporučení stejně jako studie navzájem v definicích liší. Ještě vyšší míra nejistoty pak panuje na poli odhadu úspěšnosti TFR, kdy vyjma výše uvedené délky terapie TKI a pravděpodobné účasti imunitního systému nebyl žádný silný a jednoznačný prediktivní faktor dosud identifikován. Lze tedy s vědomím uvedeného odpovědět na otázku položenou v titulu článku kladně? Ano, vysazení TKI bezesporu možné je, nicméně i přes relativní bezpečnost nemůžeme vyloučit zejména pozdní relapsy. Obava z návratu onemocnění je také nejčastějším důvodem odmítnutí pokusu o vysazení udávaným samotnými pacienty, kterými je současně opakovaně zdůrazňována poptávka po dostatečných informacích. Spolu s adekvátním a pacientům srozumitelným vysvětlením všech aspektů TFR je zásadním a nepodkořitelným faktorem realizace bezpečného vysazování monitorování léčebné odpovědi pomocí vysoce citlivých a standardizovaných molekulárních metod. Tento faktor je například v podmínkách centralizované specializované hematologické péče v ČR, kde molekulárněbiologické laboratoře procházejí pravidelně procesem mezinárodní standardizace a evaluace, samozřejmostí, situace je však diametrálně odlišná v méně rozvinutých zemích, kde do hry vstupuje i otázka nedostatečného finančního krytí jak samotné léčby, tak i monitorování jejího efektu. I přes odlišnosti v jednotlivých parametrech je ve všech doporučeních pro vysazování patrná shoda na velmi častém monitorování zejména v prvním půlroce od vysazení, kdy je výskyt molekulárních rekurencí nejvyšší (tab. 3). Samozřejmostí by měla být i rychlá dostupnost výsledků a neméně pružné zajištění včasného navrácení TKI do medikace. Opakovaně byla zmíněna cca 50% úspěšnost všech pokusů o vysazení. Pokud ale připustíme, že setrvalé DMR dosáhne

v závislosti na zvoleném TKI zhruba 20–40 %, dosažení setrvalé TFR je tak souzeno pouhým 10–20 % ze všech pacientů s diagnostikovanou CML, již v otázce samotné léčby před vlastním vysazením je tedy dostatek prostoru na její intenzifikaci či optimalizaci za účelem zvýšení podílu vhodných kandidátů k vysazení, ať již v užití TKI vyšších generací v úvodní terapii či v časně změně na jiný preparát za účelem dosažení DMR. Zvýšení šance na setrvalou TFR se očekává i od studií testujících například efekt přidávaného interferonu- $\alpha$  k nilotinibu či postupů kombinujících zavedenou terapii s látkami cílenými na leukemické kmenové buňky.<sup>(65)</sup> Jednou ze slibných strategií se jeví postupné vysazování TKI, jak ukázala studie DESTINY a jak je plánováno v české akademické studii HALF, kdy nelze vyloučit, že právě redukce dávky TKI či jejich intermitentní podávání přinese přijatelnou alternativu poněkud černobílému postoji k léčbě CML, nabízejícímu cestu buď úplného vysazení, či naopak trvalé celoživotní léčby.

Prohlášení o případném střetu zájmů: Autorka poskytla konzultační služby společností Novartis, Bristol-Myers Squibb, Incyte a Angelini.

## Literatura

- Jemal A, Siegel R, Xu L, et al. Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:277–300.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370:342–350.
- Bower H, Björkholm M, Dickman PW, et al. Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population. *J Clin Oncol*. 2016;34:2851–2857.
- Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*. 2011;121:396–409. Erratum in: *J Clin Invest*. 2011;121:1222.
- Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017;129:1595–1606.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122:872–884.
- Müller MC, Cross NC, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia*. 2009;23:1957–1963.
- Rousselot P, Huguet F, Rea D, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood*. 2007;109:58–60.
- Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11), p. 1029–1035.
- Etienne G, Guilhot J, Rea D, et al. Long-term follow-up of the French Stop Imatinib (STIM) study in patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35:298–305.
- Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood*. 2013;122:515–522.
- Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, et al. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol*. 2014;32:424–430.
- Lee SE, Choi SY, Song HY, et al. Imatinib withdrawal syndrome and longer duration of imatinib have a close association with a lower molecular relapse after treatment discontinuation: the KID study. *Haematologica*. 2016;101:717–723.
- Takahashi N, Tauchi T, Kitamura K, et al. Deeper molecular response is a predictive factor for treatment-free remission after imatinib discontinuation in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia: the JALSG-STIM213 study. *Int J Hematol*. 2018;107:185–193.
- Mori S, Vagge E, le Coutre P, et al. Age and dPCR can predict relapse in CML patients who discontinued imatinib: the ISAV study. *Am J Hematol*. 2015;90(10), p. 910–914.
- Mori S, le Coutre P, Abruzzese E, et al. Imatinib suspension and validation (ISAV) study: Final results at 79 months. *Blood*. 2018;132:461.
- Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, et al. Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood*. 2017;129:846–854.
- Okada M, Imagawa J, Tanaka H, et al. Final 3-year results of the dasatinib discontinuation trial in patients with chronic myeloid leukemia who received dasatinib as a second-line treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18:353–360.
- Kumagai T, Nakaseko C, Nishiwaki K, et al. Dasatinib cessation after deep molecular response exceeding 2 years and natural killer cell transition during dasatinib consolidation. *Cancer Sci*. 2018;109:182–192.
- Shah NP, Garcia-Gutiérrez V, Jiménez-Velasco A, et al. Dasatinib discontinuation in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia and stable deep molecular response: the DASFREE study. *Leuk Lymphoma*. 2019;24:1–10.
- Ross DM, Masszi T, Gómez Casares MT, et al. Durable treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following frontline nilotinib: 96-week update of the ENESTfreedom study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144:945–954.
- Mahon FX, Boquimpani C, Kim DW, et al. Treatment-free remission after second-line nilotinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from a single-group, phase 2, open-label study. *Ann Intern Med*. 2018;168:461–470.
- Takahashi N, Nishiwaki K, Nakaseko C, et al. Treatment-free remission after two-year consolidation therapy with nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia: STAT2 trial in Japan. *Haematologica*. 2018;103:1835–1842.
- Nagafuji K, Matsumura I, Shimose T, et al. Cessation of nilotinib in patients with chronic myelogenous leukemia who have maintained deep molecular responses for 2 years: a multicenter phase 2 trial, stop nilotinib (NILS). *Int J Hematol*. 2019;110:675–682.
- Saussele S, Richter J, Guilhot J, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:747–757.
- Clark RE, Polydoros F, Apperley JF, et al. De-escalation of tyrosine kinase inhibitor dose in patients with chronic myeloid leukaemia with stable major molecular response (DESTINY): an interim analysis of a non-randomised, phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2017;4:310–316.
- Clark RE, Polydoros F, Apperley JF, et al. De-escalation of tyrosine kinase inhibitor therapy before complete treatment discontinuation in patients with chronic myeloid leukaemia (DESTINY): a non-randomised, phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2019;6:375–383.
- Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, et al. Final 5-year study results of DASISION: The dasatinib versus imatinib study in treatment-naïve chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol*. 2016;34:2333–2340.
- Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016;30:1044–1054.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines for CML, Version 2.2020 – September 25, 2019. Dostupné z: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cml.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf)
- Hehlmann R, Müller MC, Lauseker M, et al. Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV. *J Clin Oncol*. 2014;32:415–423.
- Giles FJ, Mauro MJ, Hong F, et al. Rates of peripheral arterial occlusive disease in patients with chronic myeloid leukemia in the chronic phase treated with imatinib, nilotinib, or non-tyrosine kinase therapy: a retrospective cohort analysis. *Leukemia*. 2013;27:1310–1315.
- Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, et al. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood*. 2018;132:393–404.
- Efficace F, Baccarani M, Breccia M, et al. Health-related quality of life in chronic myeloid leukemia patients receiving long-term therapy with imatinib compared with the general population. *Blood*. 2011;118:4554–4560.
- Pye SM, Cortes J, Ault P, et al. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood*. 2008;111:5505–5508.
- Experts in Chronic Myeloid Leukemia. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. *Blood*. 2013;121:4439–4442.
- Goldberg S, Hamerman S. Patient with chronic myelogenous leukemia may not want to discontinue tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2015;126:abs. 1584.
- Breccia M, Efficace F, Sica S, et al. Adherence and future discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic phase chronic myeloid leukemia. A patient-based survey on 1133 patients. *Leuk Res*. 2015;39:1055–1059.
- Cortes J, O'Brien S, Kantarjian H. Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response. *Blood*. 2004;104:2204–2205.
- Mauro MJ, Druker BJ, Maziarz RT. Divergent clinical outcome in two CML patients who discontinued imatinib therapy after achieving a molecular remission. *Leuk Res*. 2004;28:71–73.
- Merante S, Orlandi E, Bernasconi P, et al. Outcome of four patients with chronic myeloid leukemia after imatinib mesylate discontinuation. *Haematologica*. 2005;90:979–981.
- Mahon FX. Is going for cure in chronic myeloid leukemia possible and justifiable? *Hematology Am Soc Educ Program*. 2012;122–128.
- Fava C, Rege-Cambrin G, Dogliotti I, et al. Observational study of chronic myeloid leukemia Italian patients who discontinued tyrosine kinase inhibitors in clinical practice. *Haematologica*. 2019;104:1589–1596.
- Hernández-Boluda JC, Pereira A, Pastor-Galán I, et al. Feasibility of treatment

- discontinuation in chronic myeloid leukemia in clinical practice in Spain: Results from a nationwide series of 236 patients. *Blood Cancer J.* 2018;8:91.
45. Alfayez M, Richard-Carpentier G, Jabbour E, et al. Sudden blastic transformation in treatment-free remission chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2019;187:543–545.
46. Sekhri A, Liu D, Rasul M, et al. Very late relapse of chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Res.* 2009;33:1291–1293.
47. Richter J, Söderlund S, Lübking A, et al. Musculoskeletal pain in patients with chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib: a tyrosine kinase inhibitor withdrawal syndrome? *J Clin Oncol.* 2014;32:2821–2823.
48. Katagiri S, Tauchi T, Ando K, et al. Low body weight and body mass index may be associated with musculoskeletal pain following imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res Reports.* 2017;7:33–35.
49. Berger MG, Pereira B, Rousselot P, et al. Longer treatment duration and history of osteoarticular symptoms predispose to tyrosine kinase inhibitor withdrawal syndrome. *Br J Haematol.* 2019;187:337–346.
50. Ceko M, Milenkovic N, le Coutre P, et al. Inhibition of c-Kit signaling is associated with reduced heat and cold pain sensitivity in humans. *Pain.* 2014;155:1222–1228.
51. Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia.* 2010;24:1719–1724.
52. Chomel JC, Bonnet ML, Sorel N, et al. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood.* 2011;118:3657–3660.
53. Mahon F, Richter J, Guilhot J, et al. Interim analysis of a pan european stop tyrosine kinase inhibitor trial in chronic myeloid leukemia: The EURO-SKI study. *Blood.* 2014;12: abs. 151.
54. Ilander M, Olsson-Strömberg U, Schlums H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2017;31:1108–1116.
55. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28:41–51.
56. Hughes TP, Ross DM. Moving treatment-free remission into mainstream clinical practice in CML. *Blood.* 2016;128:17–23.
57. Tasigna. Souhrn údajů o přípravku. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tasigna-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tasigna-epar-product-information_cs.pdf)
58. Lou J, Huang J, Wang Z, et al. Chronic myeloid leukemia patients and treatment-free remission attitudes: a multicenter survey. *Patient Prefer Adherence.* 2018;12:1025–1032.
59. Saglio G, Sharf G, Almeida A, et al. Considerations for treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukemia: A joint patient-physician perspective. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2018;18:375–379.
60. Widmer N, Decosterd LA, Csajka C, et al. Population pharmacokinetics of imatinib and the role of alpha-acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;62:97–112.
61. le Coutre P, Kreuzer KA, Pursche S, et al. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53:313–323.
62. Wagner MC, Dziadosz M, Melo JV, et al. Nilotinib shows prolonged intracellular accumulation upon pulse-exposure: a novel mechanism for induction of apoptosis in CML cells. *Leukemia.* 2013;27:1567–1570.
63. Hiwase DK, White DL, Saunders VA, et al. Short-term intense Bcr-Abl kinase inhibition with nilotinib is adequate to trigger cell death in BCR-ABL(+) cells. *Leukemia.* 2009;23:1205–1206.
64. Efficacy and safety of TKIs' withdrawal after a two-step dose reduction in patients with chronic myeloid leukemia (HALF). Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04147533?term=HALF&cond=Chronic+Myeloid+Leukemia&draw=1&rank=1>.
65. Holyoake TL, Helgason GV. Do we need more drugs for chronic myeloid leukemia? *Immunol Rev.* 2015;263:106–123.

e-mail: [zackova.danela@fnbrno.cz](mailto:zackova.danela@fnbrno.cz)

## 2. Cíle habilitační práce

Předkládaná habilitační práce, koncipovaná jako komentovaný soubor publikací, reflektuje více než 15 leté působení aspirantky na poli výzkumu, diagnostiky a léčby pacientů s CML, a to nejen na půdě domovského pracoviště – Interní hematologické a onkologické kliniky (IHOK) FN Brno, ale i v rámci koordinace řady národních projektů a rovněž hojně mezinárodní spolupráce. Během tohoto období uchazečka publikovala jako autorka či spoluautorka k tématu celkem 62 článků, z nichž 34 je zahrnutých ve Web of Science (WOS) Core Collection se souhrnným impakt faktorem (IF) přibližně 100 (publikace za rok 2020 nezapočítány) a celkovým počtem citací 214 (bez autocitací). U 15 publikací figuruje uchazečka jako první či korespondenční autor. Na jejím autorském a spoluautorském kontě je dále k nalezení 10 kapitol v recenzovaných knihách či učebnicích a rovněž monografie určená nejen pro pacienty s CML a jejich blízké. Autorsky a spoluautorsky se uchazečka podílela na více než 60 abstraktech v rámci tuzemských (24) a zahraničních (39) konferencí, a dále na více než 95 většinou vyzvaných přednášek v tuzemsku (79) i zahraničí (9) či na mezinárodních akcích konaných v ČR (6). Součástí jejích edukačních aktivit zejména na poli spolupráce s patientskou podpůrnou organizací jsou také mediální prezentace ať již ve formě TV pořadů či edukačních videí. Z titulu národní koordinátorky pak aspirantka zaštiťuje mezinárodní projekty PONDEROSA (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03933852), BLAST CRISIS REGISTRY a AFTER-SKI, mezinárodní akademické studie EURO-SKI (NCT01596114) a TIGER (NCT01657604), testující vysazování TKI u pacientů s CML v hluboké molekulární odpovědi, a je hlavní investigátorkou a národní koordinátorkou podobně zaměřené ambiciózní multicentrické akademické studie HALF (NCT04147533), která autorsky vzešla a je řízena z domovské kliniky uchazečky.

Habilitační práce je rozčleněna do **4 tématických okruhů či cílů**, které odrážejí hlavní výzvy na poli optimalizace léčby pacientů s CML tak, jak byly nastíněny v úvodní kapitole a jak budou rozvinuty v následujícím textu.

Jak již bylo zmíněno, zavedení TKI do terapie pacientů s CML dramaticky zlepšilo jejich prognózu, a to do takové míry, že onemocnění nezkracuje přirozenou délku života oproti celkové populaci. V současné době se cíl léčby posunul ještě dál, a sice umožnit pacientům mít onemocnění nejen pod dlouhodobou kontrolou, ale současně je zbavit zátěže celoživotního užívání léků. Obě tyto roviny léčby pacientů s CML, ať již její celoživotní podávání, tak

kontrolované pokusy o její vysazení s sebou nesou nároky na pravidelné, precizní a vysoce citlivé monitorování léčebné odpovědi, na včasnou identifikaci situací, kdy léčebná odpověď není optimální nebo dokonce dochází k selhání terapie, na ozřejmení důvodů, které k nedostatečné odpovědi vedou, na správně časovanou a vhodně zvolenou změnu terapie, na monitorování její snášenlivosti a účinný management případných NÚ, na dostatečnou a erudovanou komunikaci jak s pacienty a jejich blízkými, tak s dalšími specialisty jiných oborů medicíny či odesílajícím hematologem a praktickými lékaři. Domovské pracoviště aspirantky, IHOK FN Brno, jako jedno z největších center specializované péče o pacienty s CML v ČR záhy po zavedení imatinibu do klinické praxe rozpoznalo důležitost jednotlivých zmíněných faktorů a pod vedením prof. MUDr. Jiřího Mayera, CSc. se zapojilo intenzivně do řady laboratorních a klinických výzkumných projektů, ať již lokálních či národních a mezinárodních.

Pochopení významu účasti na akademických projektech přesahujících hranice ČR našlo svůj odraz ve spolupráci s klíčovými hematologickými centry napříč Evropou v čele s německou CML studijní skupinou, datující se již do 90. let, tedy období krátce po založení kliniky. Potřeba sběru kvalitních dat v rámci zapojení do německých akademických studií CML IIIA a CML IV a obecně globální hlad po informacích o účinnosti a snášenlivosti nové léčby pomocí TKI byly jedněmi z prvních impulsů pro **vytvoření detailní databáze pacientů s CML**. Databáze, nazvaná INFINITY (Tyrosine Kinase Inhibitors in First and following CML Treatment), která byla aspirantkou vyvinuta v rámci jejího doktorského studia původně jako rozsáhlá excelovská tabulka a u jejíhož zrodu stála původně dvě největší česká hemato-onkologická centra, byla postupně úspěšně nabídnuta ke spoluúčasti dalším spolupracujícím centrům v ČR, již rok po svém vzniku byla začleněna do Evropského registru CML pacientů a v rámci procesu zkvalitňování postupně převedena ve spolupráci s Institutem biostatistiky a analýz (IBA) MU Brno nejprve do systému TrialDB a následně do její nejmodernější podoby na platformě Clinical Data Warehousing Information System (CLADE-IS). Vyvrcholením snah o vytvoření celonárodní databáze všech pacientů s CML se stala fúze INFINITY s registrem CAMELIA, která byla realizována v roce 2019 právě za odborné garance uchazečky a prof. J. Mayera.

Kvalitně parametricky sestavená, vyškolenými datamanažery fundovaně vyplňovaná a pravidelně odborně validovaná databáze poskytla ideální platformu pro sběr a **analýzu dat o**

**pacientech s CML léčených pomocí TKI v podmínkách každodenní klinické praxe.** Jak již bylo předestřeno v úvodní kapitole a platí to nejen pro CML, většina léčebných doporučení a návodů na péči o pacienty se rekrutuje z výsledků velkých klinických studií. Mezi pacienty léčenými v rámci či naopak vně klinických studií však existují významné rozdíly, což bylo prokázáno jak u CML, tak i u dalších nejen onkologických onemocnění [10-12]. Automatická extrapolace výsledků klinických studií na širší populaci pacientů tak není zcela proveditelná, a naopak je důležité ověřovat účinnost a snášenlivost terapie a platnost doporučených postupů i v reálné klinické praxi. Na základě kvalitních dat evidovaných v databázi INFINITY byla uchazečkou a spoluautory analyzována účinnost a tolerance imatinibu v první linii u nově diagnostikovaných pacientů a dasatinibu ve druhé linii po selhání terapie imatinibem či jeho nesnášenlivosti. Ve snaze porovnat naše výsledky s výstupy velkých klinických studií jsme narazili na značný nesoulad v definicích léčebných cílů a událostí užitých pro hodnocení efektivity léčby ve střednědobém až dlouhodobém horizontu, komplikující nejen porovnání závěrů studií a výsledků z reálné praxe, ale i mezi studii jako takovými. Ve spolupráci s kolegy z IBA jsme se chopili výzvy a navrhli nový typ analýzy přežití, nazvaný „alternative treatment-free survival (ATFS)“, reflektující pravděpodobnost setrvání na dané léčbě nehledě na výskyt případné události, a dále jsme modifikovali již zavedená měřítka účinnosti léčby, tzv. „current leukemia-free survival (CLFS)“ a „current cumulative incidence (CCI)“, hodnotící efekt změny terapie na případnou obnovu původně ztracené léčebné odpovědi. Kromě kvalitně citovaných publikačních výstupů v impaktovaných časopisech byl ATFS akceptován panelem expertů v mezinárodních doporučeních pro hodnocení účinnosti léčby pacientů s CML v klinických studiích [36].

**Rezistence na léčbu TKI a/nebo jejich nesnášenlivost** zůstává problémem i v éře, kdy stále více pacientů dosahuje hlubokých molekulárních odpovědí a míří k pokusům o vysazení dlouhodobé léčby. Jak v případě rezistence, tak i intolerance a výskytu NÚ zůstávají jejich etiopatogenetické mechanismy do značné míry neobjasněny. Uchazečka se v rámci klinicko-laboratorního týmu zapojila do intenzivního výzkumu v rámci této problematiky. V případě rezistence v poměrně širokém záběru, tedy nejen v oblasti nejčastějšího a nejlépe prostudovaného mechanismu selhávání terapie, a sice mutací Bcr-Abl kinázové domény, ale i na úrovni transportních mechanismů jednotlivých TKI a změn jejich dostupnosti jak v extracelulárním prostoru, a rovněž v problematice leukemických kmenových buněk, které



jak co do míry rezistence, tak co do jejich obtížné izolace od fyziologických kmenových buněk představují jednu z největších výzev na poli výzkumu a případného léčebného ovlivnění. V četných impaktovaných publikačních výstupech výzkumného týmu bylo mimo jiné kriticky nahlédnuto na výsledky publikované jinými skupinami, včetně průkazu nesrovnalostí nedovolujících některé výsledky opakovat, a tudíž i správně interpretovat.

Otázka nesnášenlivosti a NÚ TKI nabývá v kontextu celoživotní terapie na zcela zásadním významu. Sběr validních dat v rámci databáze INFINITY umožnil analyzovat reálnou incidenci NÚ jednotlivých TKI v každodenní klinické praxi a porovnat ji s výstupy z klinických studií. Právě rychlé zavedení TKI vyšších generací do klinické praxe vedlo i k výskytu nových a závažných až potenciálně život ohrožujících NÚ, o kterých některé úvodní reporty z klinických studií nepřinesly validní informace už jen z prostého důvodu, že jejich sledování nebylo součástí původního designu studií. Tým na IHOK soustředil svou pozornost zejména na závažný jev poruchy glukózového a lipidového metabolismu, které se vyskytují při léčbě nilotinibem a jsou minimálně přispěvatelem k dalšímu velmi nežádoucímu jevu v podobě vyššího výskytu tepenných uzávěrů [21]. Jak pilotní projekt zaměřený na výzkum mechanismu poruchy glukózové tolerance nazvaný ENIGMA 1 a jeho rozšířené pokračování ENIGMA 2, tak projekt nazvaný LIPIDY přinesly nové poznatky reprezentující poměrně zásadní příspěvek na poli poznání těchto nežádoucích jevů.

„*Last but not least*“ rozhodně platí pro obsáhlou **edukační činnost a osvětu** aspirantky, zaměřenou nejen na odbornou veřejnost, ale i na pacienty a jejich blízké. Právě u pacientů s CML se ukázalo, že jejich dostatečná informovanost o principech onemocnění a jeho léčby podporuje i tzv. adherenci k terapii, která v efektivitě léčby TKI hraje větší úlohu, než by se předpokládalo [34,35,37]. I v kontextu moderního trendu pokusů o vysazování dlouhodobé terapie se správná a důvěryhodná komunikace s pacientem stává jedním z nejdůležitějších faktorů, které nejen zajistí psychickou pohodu pacienta během vysazovacího procesu, ale významně přispívají i k objasnění pacientových preferencí a jeho vlastnímu rozhodnutí, zda se o vysazování pokusit [38]. Právě osvěta cílená na pacienty i mimo zdi ordinace či lůžkového oddělení se stala doménou uchazečky, a to nejen na národní, ale i na mezinárodní úrovni. V úzké spolupráci s podpůrnou patientskou organizací Diagnóza leukemie, kde již od roku 2007 působí jako členka Poradní rady, se vine mnohavrstevná edukační aktivita: od přednášek

na pravidelných setkáních komunity pacientů a jejich blízkých, přes sérii edukačních videí a dva TV pořady, až k informační brožuře, která přibližuje CML v celé její šíři nejen pacientům a jejich blízkým, ale slouží jako vítaný vzdělávací materiál i studentům či zástupcům odborné veřejnosti z řad nezdravotníků. Vyvrcholením spolupráce s patientskou komunitou byly dvě vyzvané přednášky na světovém summitu představitelů patientských organizací „CML Horizons 2016“ konaném ve slovinské Ljubljani a pozvání do poradní rady mezinárodního osvětového projektu „What If? What Now?“, jehož završením se stal unikátní manuskript prezentující sdílené stanovisko expertů na CML a zástupců patientské veřejnosti na téma vysazování TKI a edukační video-rozhovor o diagnostice a léčbě CML s předsedou britské patientské organizace, natočený v Londýně v roce 2017 a veřejně dostupný pro všechny zájemce o problematiku.

V následujících podkapitolách budou jednotlivá témata vědecko-výzkumného zaměření rozvedena a doplněna okomentovanými nejvýznamnějšími publikačními výstupy uchazečky.

### **3. Vytvoření databáze pacientů s chronickou myeloidní leukémií**

#### **3.1. Cíle a charakteristika databáze**

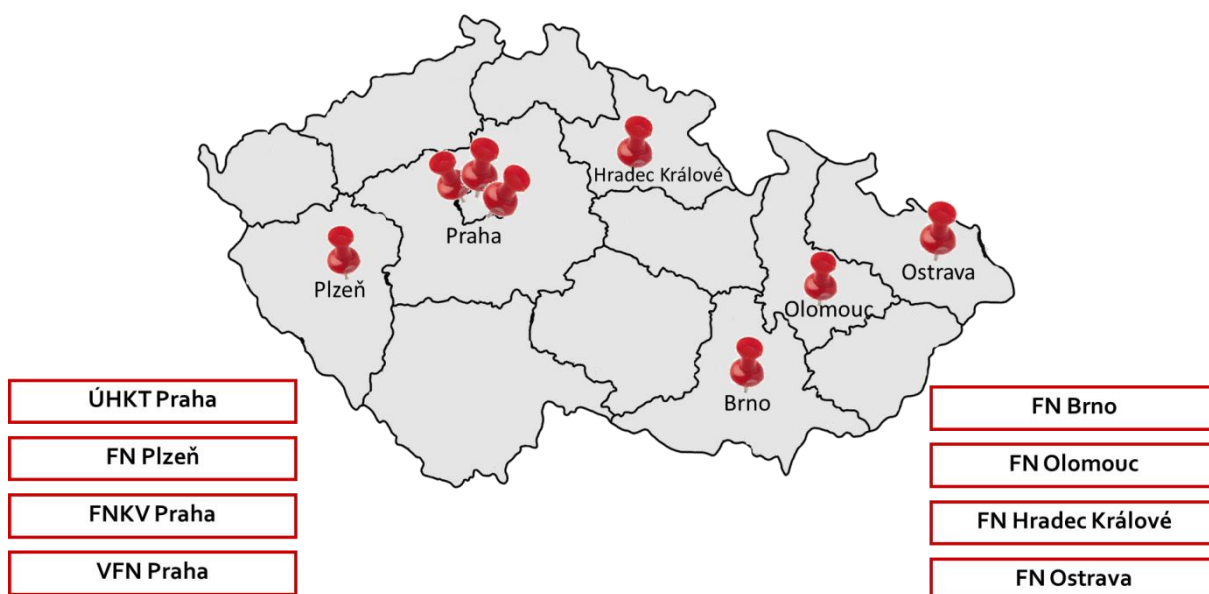
Zavedení TKI do terapie CML zásadním způsobem proměnilo dosavadní charakter onemocnění z fatálního na chronické a přineslo pacientům prodloužení délky života téměř na roveň celkové populace. Potřeba vyhodnocovat účinnost a snášenlivost mnohdy celoživotní terapie nejen u jednotlivých pacientů, ale i u neselektovaných velkých souborů nemocných byla jedním z hlavních impulsů pro vytvoření kvalitní a detailní databáze, jejíž analytické výstupy by sloužily jako zpětná vazba pro optimalizaci terapie jak na individuální úrovni, tak i v národním a mezinárodním měřítku. Představa o zisku informativních a validních populačních dat byla podpořena faktem, že péče o pacienty s CML léčené TKI je v ČR soustředěna do limitovaného počtu specializovaných center disponujících vysoce citlivými metodami ke sledování léčebné odpovědi a erudovaným personálem, následujícím platná doporučení pro léčbu a monitorování jejího efektu u prakticky kompletní populace pacientů z daného spádového regionu. Neoddiskutovatelná potřeba dat z reálné klinické praxe k porovnání s výstupy

z klinických studií a prověření, zda i na celkové populaci pacientů s CML platí pravidla a doporučené postupy ze studií odvozené, byly dalšími silnými podněty pro vytvoření databáze. Kromě předpokladu začlenění databáze do již existujících renomovaných registrů v mezinárodním měřítku bylo další motivací k jejímu vzniku využití databáze jako platformy pro další klinické a klinicko-laboratorní vědecké projekty a jako důležitého zdroje podkladů o poskytované zdravotní péči pro jednání se zdravotními pojišťovnami a státními regulačními autoritami.

Databáze INFINITY, reflektující výše nastíněná východiska, byla vyvinuta v roce 2007 v rámci doktorského studia uchazečky pod vedením prof. MUDr. Jiřího Mayera, CSc. v roli školitele. Zaštiťujícím subjektem se stala Česká leukemická skupina pro život („The Czech Leukemia Study Group – for Life“, *CELL*). U zrodu databáze stála původně dvě největší centra specializované hematologické péče v ČR – IHOK FN Brno a Ústav hematologie a krevní transfúze (ÚHKT) Praha, která za účelem sjednocení výsledků z molekulárně-biologických laboratoří obou pracovišť prošla procesem vzájemného porovnání metod kvantitativního vyšetření hladiny transkriptů *BCR-ABL1*. Výsledkem přípravného procesu, který zahrnoval i četné a důkladné diskuze nad návrhy sledovaných parametrů, byla pro obě centra identická databáze, vedená kompletně v anglickém jazyce v programu Excel. Původní modul zaměřený pouze na pacienty s CML v chronické fázi léčené imatinibem v první linii byl následně modifikován a rozšířen pro všechny další klinické situace, tj. léčbu všemi dalšími dostupnými TKI, a to nejen v první, ale i v následných liniích, a také ve všech fázích CML. Velký důraz byl již od počátku kladen na proškolení a erudici týmu, který byl a je na chodu databáze zaangažován.

Jedním z cílů databáze bylo nabídnout spolupráci i dalším tuzemským centrům specializované hematologické péče a pokrýt tak spádovou oblast celé ČR. Postupem času se tak k databázi připojila i další centra, jmenovitě Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady v Praze, 1. Interní klinika - klinika hematoonkologie Všeobecné fakultní nemocnice (VFN) v Praze, IV. Interní hematologická klinika FN Hradec Králové a Klinika hematoonkologie FN Ostrava. Původní spádová oblast čítající přibližně 6 milionů obyvatel se během roku 2019 rozšířila na celé území ČR poté, co došlo k fúzi databáze INFINITY s registrem CAMELIA, ve kterém byla shromažďována data ze zbývajících území ČR spadajících do kompetence Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc a Hemato-onkologického oddělení FN Plzeň.

V současnosti tedy databáze INFINITY obsahuje data ze všech 8 center pečujících o pacienty s CML na celém území ČR (Obrázek 2).



*Obrázek 2.* Centra zúčastněná v databázi INFINITY k 1. 11. 2020.

Díky začlenění databáze do Evropského CML registru v lednu 2008 pod záštitou Evropské leukemické sítě (The European LeukemiaNet, ELN) její význam přesáhl hranice ČR. Téma mezinárodní spolupráce bude dále rozvedeno v podkapitole 3.4. Mezinárodní začlenění databáze.

S přibývajícím počtem pacientů a rozšiřujícími se léčebnými možnostmi vyvstala potřeba modernizace struktury databáze i jejího technického zajištění. Ve spolupráci s IBA spinoff MU Brno byla v roce 2013 přesunuta databáze do nové on-line verze TrialDB v systému ORACLE9i, a posléze v roce 2016 spolu s úpravami struktury záznamových formulářů (case report form, CRF) do nejmodernější a stávající verze elektronické databáze CLADE-IS. Také technickému zajištění databáze, včetně mechanismů kontroly kvality dat a analytických výstupů bude dále věnována pozornost.

Z hlediska kompetencí je iniciátorem projektu databáze a správcem v ní zadaných údajů CELL, s prof. MUDr. Jiřím Mayerem, CSc. v roli garanta a uchazečkou zastávající funkci národní koordinátorky databáze. Technické zajištění, kontrola kvality dat a analytická činnost jsou

v gesci IBA, s.r.o., spinoff MU. Databáze INFINITY je vedena na Státním úřadu pro kontrolu léčiv (SÚKL) pod identifikačním číslem 1411140000 v kategorii Jiný typ studie. Samozřejmostí je podpis informovaného souhlasu pacientů se sběrem dat a nakládání s daty v souladu s požadavky zákona č. 101/2000 Sb., o ochraně osobních údajů a s nařízením Evropského parlamentu a Rady EU 2016/679 o ochraně fyzických osob v souvislosti se zpracováním osobních údajů a o volném pohybu těchto údajů (GDPR).

### 3.2. Struktura databáze a sledované parametry

Databáze INFINITY, resp. její jednotlivé elektronické formuláře jsou uspořádány tak, aby pokryly veškeré stěžejní situace, které pacient se svou nemocí zažívá, tedy období stanovení diagnózy onemocnění (formulář „Diagnosis“), zvolenou léčbu (formulář „TKI treatment“), sledování její účinnosti a snášenlivosti (opakující se formuláře „Follow-up“ a „Adverse events“), a konečně přehled o aktuálním stavu pacienta a jeho léčebné odpovědi (formulář „Patient status and treatment overview“).

Ve formuláři „Diagnosis“ figurují kromě základních demografických údajů a identifikace pacienta a centra, kde je léčen, informace o pohlaví a věku v době stanovení diagnózy, přesné datum jejího stanovení, fáze onemocnění, prognostická stratifikace pacienta dle rizikových skóre, automaticky kalkulovaných po zadání příslušných hodnot, dále anamnestická data se specifikací případných vstupních symptomů onemocnění, tělesná hmotnost, výška, celkový stav, vstupní fyzikální vyšetření včetně kvantifikace případné splenomegalie a/nebo hepatomegalie, kompletní vstupní krevní obraz s diferenciálním rozpočtem leukocytů, kompletní vyšetření kostní dřeně (KD) cytologické, cytogenetické, molekulárně-biologické a případně i histologické, dále molekulárně-biologické vyšetření periferní krve (PK) se stanovením typu transkriptu *BCR-ABL1* a jeho kvantifikací, a také kompletní biochemické vyšetření PK. Pro samotnou léčbu pomocí TKI jsou založeny příslušné formuláře, např. „Imatinib treatment“, „Dasatinib treatment“, apod. Zaznamenávána jsou data zahájení a případného ukončení terapie, jednotlivé léčebné epizody dle podané dávky léčiva s vysvětlením důvodů pro změny v dávkování, důvody jak pro zahájení terapie, tak pro její případné ukončení a informace, zda je léčba podaná v rámci či vně klinické studie. I přes odsun alogenní transplantace křevetvorných buněk (aloTKB) do dalších linií léčby je i této modalitě

věnován prostor ve specifickém formuláři „Transplantation“ s informacemi o dárci, typu transplantátu, přípravném režimu, datu transplantace a jejím výsledku. Ve formulářích „Follow-up“ jsou v pravidelných intervalech (3, 6 až 12měsíčních) zaznamenávány výsledky fyzikálního i laboratorních vyšetření pacientů, analogicky jako bylo popsáno u formuláře „Diagnosis“, doplněné o hodnocení léčebné odpovědi na úrovni hematologické, cytogenetické a molekulární a v případě biochemického rozboru PK a krevního obrazu také o automatické vyhodnocení stupně závažnosti případné odchylky dle Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAEv4.0). Formulář „Adverse events“ se soustředí na projevy klinické nehematologické toxicity, které jsou specifikovány jak co do stupně závažnosti, tak co do přesného časového ohraničení jejich výskytu a posouzení míry vztahu k užívané medikaci. V přehledovém formuláři „Patient status and treatment overview“ jsou shrnuty jednotlivé léčebné linie a epizody, uvedena informace o případném úmrtí pacienta, jeho příčině a aktuální fázi onemocnění, u žijícího pacienta pak udána aktuální léčebná odpověď a u všech pacientů uveden přehled přidružených onemocnění a konkomitantní medikace.

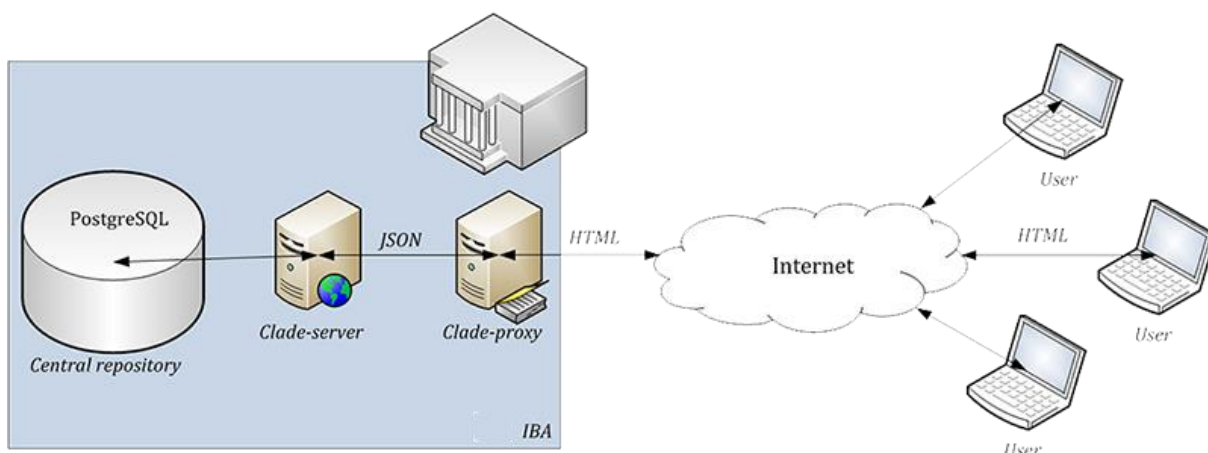
K 1. 8. 2020 obsahuje databáze INFINITY více než 39 530 formulářů s údaji o celkem 1905 zařazených pacientech.

### **3.3. Technické zajištění databáze a kontrola kvality dat**

Jak již bylo uvedeno výše, databáze prošla v průběhu své existence procesem zkvalitňování a modernizace nejen co do vlastní náplně sbíraných dat odrážející vývoj na poli léčby CML a monitorování jejího efektu, ale také co do technického zabezpečení. Původní excelovské tabulky byly převedeny do online elektronických systémů: nejprve do verze TrialDB v systému ORACLE9i a posléze do stávající verze CLADE-IS, vyvinuté přímo pracovníky IBA, s.r.o., spinoff MU Brno.

Systém CLADE-IS byl navržen za účelem sběru velkých objemů dat v klinických studiích a registrech a je plně přizpůsoben struktuře a požadavkům databáze INFINITY. Online aplikace registru je dostupná přes jakýkoliv internetový prohlížeč autorizovaným osobám, které disponují přiděleným uživatelským jménem a heslem. Záznamy jsou pseudoanonymizovány a uloženy pod unikátními identifikačními kódy, které neumožňují jakoukoliv zpětnou identifikaci pacienta. Totožnost pacienta je tak známa pouze ošetřujícímu lékaři nebo autorizovanému

zdravotnickému pracovníkovi. Také veškerý přenos dat je šifrován za účelem ochrany před jejich zneužitím. Všechna zasláná data jsou bezpečně uložena na centrálním serveru (Obrázek 3).



Obrázek 3. Schéma elektronického systému CLADE-IS pro sběr dat v databázi INFINITY.

Příklad webového formuláře je znázorněn na obrázku 4 (Obrázek 4).

Obrázek 4. Náhled webového formuláře systému CLADE-IS ke sběru dat v databázi INFINITY.

Vstup do databáze INFINITY je možný buď z portálu CELL <http://www.leukemia-cell.org/>, odkud se dá vstoupit i do dalších registrů, nebo přímo z webového rozhraní <https://infinity.data-warehouse.cz/login>.

Integrální součástí technického zabezpečení databáze je kontrola kvality zadávaných dat s následnou zpětnou vazbou vůči zadavatelům údajů, která je jištěna na několika úrovních prostřednictvím:

- generování zpětných upozornění zadávajícím dat automaticky v průběhu jejich zadávání do eCRF (např. nesmyslně zadané hodnoty mimo stanovené rozsahy);
- automatické validace formuláře při uložení do tzv. kompletního stavu. Pokud např. chybí vyplněná povinná položka, systém generuje chybové hlášení a formulář přepne do rozpracovaného stavu;
- kontroly formuláře zadávajícím a následné validace zodpovědným lékařem daného centra;
- kontroly konzistence dat mezi formuláři pomocí tzv. queries (např. posloupnosti časových údajů);
- funkce vyhledávání nevalidních formulářů centra a konkrétního zadávajícího, která umožňuje zadávajícímu doplnění nebo změnu údajů;
- tzv. reportů nevalidit, které jsou generovány před pravidelnou každoroční analýzou zkušeným analytikem z IBA a slouží jako nástroj nezávislé kontroly dat oproti automatickým kontrolám popsaným výše. Report nevalidit umožní porovnat (ne)souvislosti v datech jak technického rázu, např. chybějící formulář, neuvedené klíčové proměnné pro analýzu, apod., tak klinického rázu, např. překryv léčebných linií, neodpovídající si léčebné odpovědi, apod. Report je vytvořen pomocí konzistentní syntaxe příkazů ve statistickém softwaru SPSS, doplněném o nástroje Microsoft Excel.

### 3.4. Analytické výstupy z databáze

V pravidelných ročních intervalech generuje IBA **deskriptivní analýzu ze všech dat v databázi**, tj. za všechna centra dohromady, a rovněž individualizovaně pro každé jednotlivé centrum zvlášť. Celkový podrobný analytický výstup slouží potřebám garantů databáze a CELL jako takové a zahrnuje popisnou charakteristiku souboru, analýzy léčebných linií včetně důvodů pro ukončení jedné a započetí další linie léčby, rozbor příčin úmrtí v souboru, křivky kumulativních incidencí dosažených léčebných odpovědí, tzv. time-to-event analýzy zahrnující



kromě celkového přežití a přežití bez události progresu také kompozitní analýzy kalkulující i nesnášenlivost terapie a další příčiny ukončení léčby, detailní hodnocení NÚ léčby ať ve smyslu hodnocení jejich kumulativních výskytů, tak i analýz v čase. Poslední globální analytický výstup, poskytnutý IBA k 5. 8. 2020, je uveden jako Příloha 6 v podkapitole 3.6. Přílohy ke kapitole 3.

Vedle celkového ročního analytického výstupu z databáze je možné využít i dalších nástrojů k prezentaci dat. Patří k nim **interaktivní prohlížeč dat** vyvinutý ve spolupráci s IBA a umístěný na webových stránkách CELL (<http://www.leukemia-cell.org/>) pod záložkou Infinity, který nabízí základní analytické výstupy pro různé podskupiny pacientů (odkaz: <http://www.leukemia-cell.org/index.php?pg=infinity--interaktivni-prohlizec-dat>). Další variantou je funkcionality systému CLADE-IS nazvaná **Reportér**, která umožňuje vytváření datových exportů podle volby uživatele buď z daného centra, nebo z celé databáze podle úrovně oprávnění. Funguje přes odkaz <https://reporting.data-warehousing.net/login> a je zpřístupněna pouze pro autorizované osoby s přiděleným uživatelským jménem a heslem.

Na žádost garanta, národní koordinátorky, odborné společnosti, zástupců jednotlivých center či komerčních subjektů (po schválení garantem databáze) je možno žádat **dílič analytické výstupy** za účelem vědeckých projektů, prezentačních či publikačních výstupů či jako podklad pro jednání například se zdravotními pojišťovnami. Formulace žádostí, realizace analýz i jejich finanční krytí podléhají jasně stanoveným a smluvně ošetřeným pravidlům.

### 3.5. Mezinárodní začlenění databáze

Od samého počátku své existence měla databáze INFINITY ambice mezinárodního přesahu a na to konto byla kompletně vedena v anglickém jazyce již v dobách sběru dat do excelovských formulářů. V roce 2008, pouhý rok od uvedení do chodu, byla databáze přijata do Evropského CML registru (The European CML Registry) v rámci projektu The EUropean Treatment and Outcome Study (EUTOS) zaštitěného ELN, kde INFINITY plnila roli významného přispěvatele do sekce „Out-study patients“. Od roku 2009 byla data z databáze INFINITY zasílána rovněž do nově vzniklé sekce „Population-based Registry“, vytvořené za účelem reálného zmapování epidemiologie CML a dodržování léčebných doporučení napříč Evropou. Analýza dat získaných z jednotlivých národních registrů je soustředěna do Institut für Medizinische

Informationsverarbeitung Biometrie und Epidemiologie (IBE) v Mnichově pod vedením prof. J. Hasforda. Rozsáhlá analýza dat více než 2900 pacientů zařazených do „Population-based registry“ byla publikována za spoluautorské účasti uchazečky v roce 2017 v časopise *Leukemia* (Hoffmann VS, Bacarani M, Hasford J, Castagnetti F, Di Raimondo F, Casado LF, Turkina A, Zackova D, Ossenkoppele G, Zaritskey A, Höglund M, Simonsson B, Indrak K, Sninska Z, Sacha T, Clark R, Bogdanovic A, Hellmann A, Griskevicius L, Schubert-Fritschle G, Sertic D, Guilhot J, Lejniece S, Zupan I, Burgstaller S, Koskenvesa P, Everaus H, Costeas P, Lindoerfer D, Rosti G, Saussele S, Hochhaus A, Hehlmann R. Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry. *Leukemia*. 2017;31(3):593-601. IF 10,023 v roce 2017; Journal Citation Reports (JCR) kategorie Q1 v oboru ONCOLOGY; 26 x citováno dle WOS či Scopus, bez autocitací) a je uvedena a okomentována jako Příloha 7 v podkapitole 3.6. Přílohy ke kapitole 3.

Recentně byly publikovány dvě rozsáhlé analýzy, čerpající rovněž z dat z národních databází včetně významného příspěví z databáze INFINITY, opět se spoluautorským podílem uchazečky: analýza zaměřená na identifikaci prognostických faktorů u pacientů s CML v pokročilé fázi onemocnění (Lauseker M, Bachl K, Turkina A, Faber E, Prejzner W, Olsson-Strömberg U, Bacarani M, Lomaia E, Zackova D, Ossenkoppele G, Griskevicius L, Schubert-Fritschle G, Sacha T, Heibl S, Koskenvesa P, Bogdanovic A, Clark RE, Guilhot J, Hoffmann VS, Hasford J, Hochhaus A, Pfirrmann M. Prognosis of patients with chronic myeloid leukemia presenting in advanced phase is defined mainly by blast count, but also by age, chromosomal aberrations and hemoglobin. *Am J Hematol*. 2019; 94(11):1236-1243. IF 6,973 v roce 2019; JCR kategorie HEMATOLOGY Q1), a dále práce statisticky podporující převahu tzv. EUTOS long-term survival (ELTS) skóre nad tradičními skórovacími systémy dle Sokala, Hasforda a EUTOS v prognostické stratifikaci pacientů s CML v době diagnózy zejména z hlediska pravděpodobnosti úmrtí na CML (Pfirrmann M, Clark R, Prejzner W, Lauseker M, Bacarani M, Saussele S, Guilhot F, Burgstaller S, Hehlmann R, Faber E, Turkina A, Ossenkoppele G, Höglund M, Zaritskey A, Griskevicius L, Olsson-Stromberg U, Everaus H, Koskenvesa P, Labar B, Sacha T, Zackova D, Cervantes F, Colita A, Zupan I, Bogdanovic A, Castagnetti F, Guilhot J, Hasford J, Hochhaus A, Hoffmann V. The EUTOS long-term survival (ELTS) score is superior to the Sokal score for predicting survival in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(8):2138-2149. IF 8,665 v 2019/2020; ONCOLOGY Q1).

Databáze INFINITY se za roky své existence etablovala mezi nejvýznamnější evropské, či dokonce světové registry shromažďující údaje o pacientech s CML. Její analytické výstupy byly nejen publikovány a citovány v impaktovaných časopisech, ale díky inovativním parametrům analýz přežití významnou měrou přispěly k optimalizaci statistického hodnocení výsledků dosahovaných léčbou TKI u pacientů s CML, jak bude rozvedeno dále v kapitole 4.

## **3.6. Přílohy ke kapitole 3**

### **3.6.1. Příloha 6**

Pravidelný roční analytický výstup z databáze INFINITY pro všechna zúčastněná centra vytvořený k 5. 8. 2020.

# Overview of data of CML patients from Infinity registry 2020



Expert guarantors: Prof. Jiří Mayer, M.D., PhD and Daniela Žáčková, M.D., PhD  
Partners: large haemato-oncological centers in the Czech Republic

Data analyses: Institute of Biostatistics and Analyses, Ltd., spin-off company of the Masaryk University

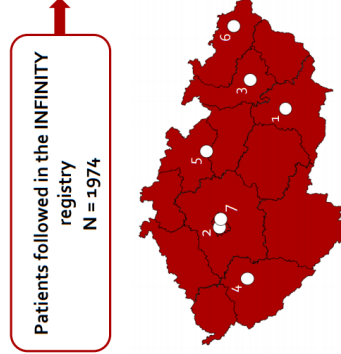
Date export: 5th August 2020



## Population distribution of CML patients

### Summary of participating centres

1. **FN Brno** N = 512  
(participation since 1991/1)
2. **ÚHK Praha** N = 512  
(participation since 1995/6)
3. **FN Olomouc** N = 288  
(migrated from CAMELIA, data since 2005/10)
4. **FN Pízeň** N = 283  
(migrated from CAMELIA, data since 2005/12)
5. **FN Hradec Králové** N = 235  
(participation since 2005/8, partly migrated from CAMELIA)
6. **FN Ostrava** N = 85  
(participation since 2015/9)
7. **VFN Praha** N = 59  
(migrated from CAMELIA, data since 2007/6)



In the following slides, only 1452 patients diagnosed after 1.1.2005 are summarized.

In the Czech Republic, there had been two registries running concurrently till 2019 - Camelia and Infinity. Both of those focused on monitoring and evaluation of the treatment of CML patients. In May 2019, centres involved agreed to unite all data in the Infinity registry with transfer of data from Camelia. That means that Infinity has expanded by adding the centres FN Olomouc, FN Pízeň and VFN; in FN Hradec Králové the data from both registries have been combined.

That is why it's important to remember while assessing this year's analysis that the added centres are now in the process of gradually data validation based on Infinity's requirements and can't be expected to have completed all the data perfectly. Because of that only patients without any major invalidity found have been included in the overall analysis. The process of completing the data is still going on.



N = 1974

## Data selection for analysis

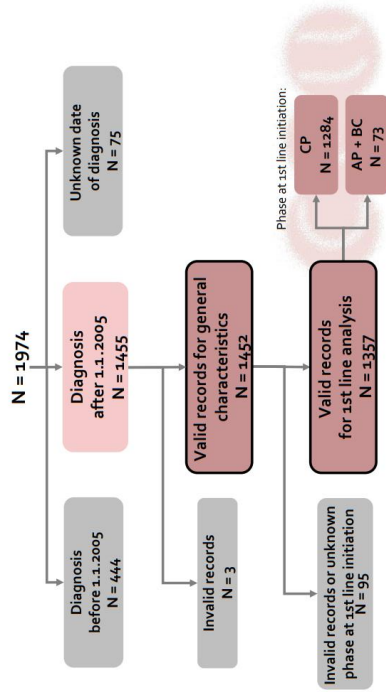
### According to the date of diagnosis and data validity

Centre	Total	Date of diagnosis		Validity for analysis	
		Unknown	Before 1.1.2005	After 1.1.2005	General characteristics of the 1st line
FN Brno	512 (100.0%)	47 (9.2%)	100 (19.5%)	365 (71.3%)	365 (100.0%)
ÚHK Praha	512 (100.0%)	0 (0.0%)	79 (15.4%)	433 (84.6%)	433 (100.0%)
FN Olomouc	288 (100.0%)	20 (6.9%)	103 (35.8%)	165 (57.3%)	162 (98.2%)
FN Pízeň	283 (100.0%)	5 (1.8%)	79 (27.9%)	199 (70.3%)	199 (100.0%)
FNHK	235 (100.0%)	3 (1.3%)	71 (30.2%)	161 (68.5%)	161 (100.0%)
FN Ostrava	85 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (1.2%)	84 (98.8%)	84 (100.0%)
VFN Praha	59 (100.0%)	0 (0.0%)	11 (18.6%)	48 (81.4%)	48 (100.0%)
<b>Total</b>	<b>1974 (100.0%)</b>	<b>75 (3.8%)</b>	<b>444 (22.5%)</b>	<b>1452 (73.7%)</b>	<b>1452 (99.8%)</b>

N = 1974

## Data selection for analysis

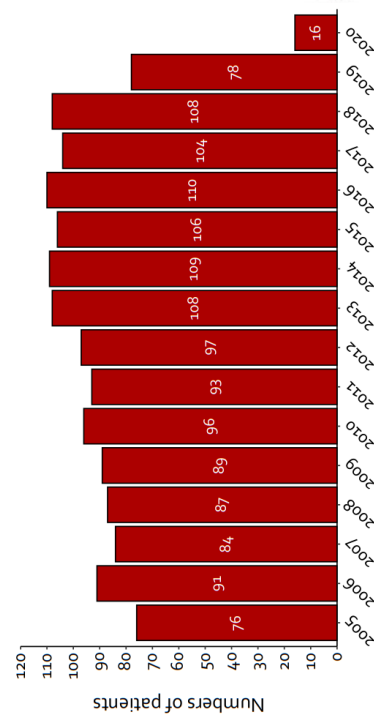
### According to the date of diagnosis and data validity



N = 1452

## Numbers of diagnosed CML patients

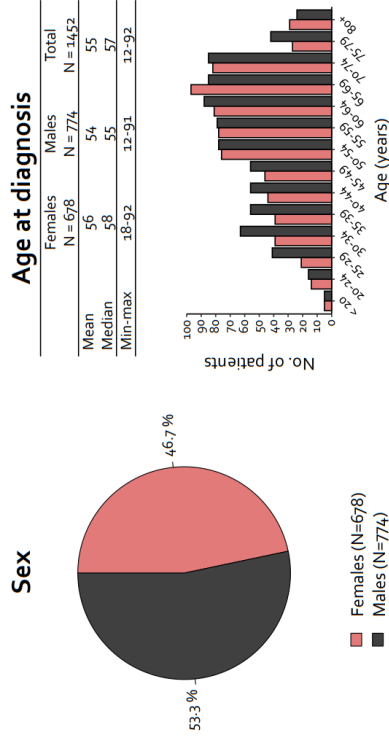
### Summary according to the year of diagnosis



N = 1452

## Patients' characteristics

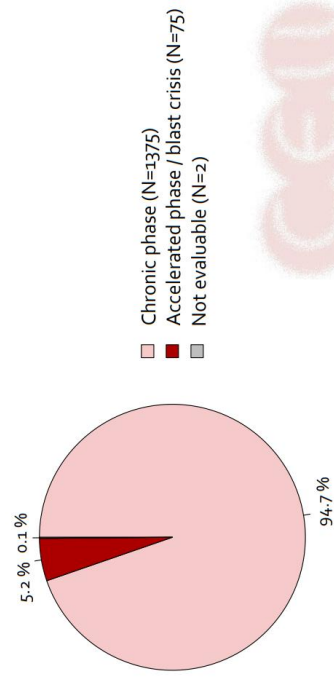
### At the time of diagnosis



N = 1452

## Phase of disease

### At the time of diagnosis (based on WHO or ELN criteria)



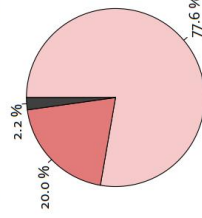
7 patients moved from CP to AP/BC, 10 patients with CP at diagnosis had unknown phase prior 1st line therapy, 4 patients moved from AP/BC to CP, 2 patients had unknown phase at diagnosis and also prior 1st line therapy. So, there were 1362 patients in CP, 78 in AP/BC and 12 with unknown phase before 1st line therapy initiation.

N = 1452

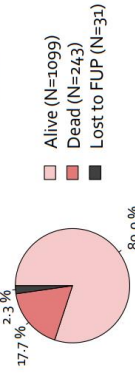
## Patients' status

### At the last follow-up according to phase at diagnosis

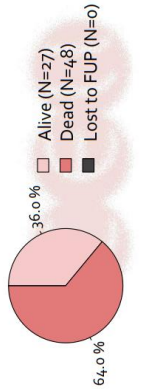
All patients (N = 1452\*)



Patients in CP (N = 1375\*)



Patients in AP/BC (N = 75)



Follow-up [months]  
 median (min-max)  
 67.8 (0.0-300.2)  
 35.2 (0.0-162.7)  
 27.3 (0.0-130.0)  
 59.7 (0.0-300.2)

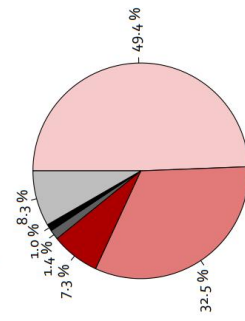
\*2 patients in CP had unknown patients' status.  
 2 patients had unknown phase at the time of diagnosis.

N = 1452

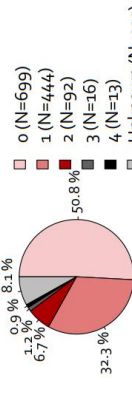
## ECOG performance status

### At the time of diagnosis

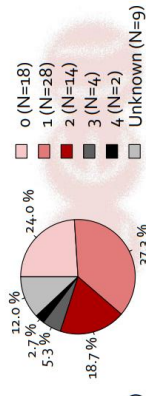
All patients (N = 1452)



Patients in CP (N = 1375)



Patients in AP/BC (N = 75)

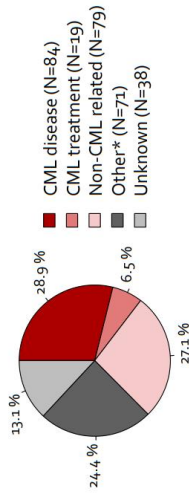


2 patients had unknown phase at the time of diagnosis.

N = 291

## Cause of death

### Summary of the cause of death



Phase at the time of death	CML disease	CML treatment related	Non-CML related	Other*	Unknown	Total
Remission	6	10	30	16	8	64
CP	16	2	38	34	12	92
AP	46	7	1	2	3	21
BC	16	10	19	19	15	47
Total	84	19	79	71	38	291

\*Other: other malignity -14, cardiovascular disease -13, stroke -5, pneumonia -2, complication after surgery -1, meningioencephalitis -1, multiple organ failure -1, pulmonary embolism -1, sepsis -1, sudden death -1, unspecified -31.

## Summary of characteristics of patients in chronic phase, their treatment, outcomes and AEs

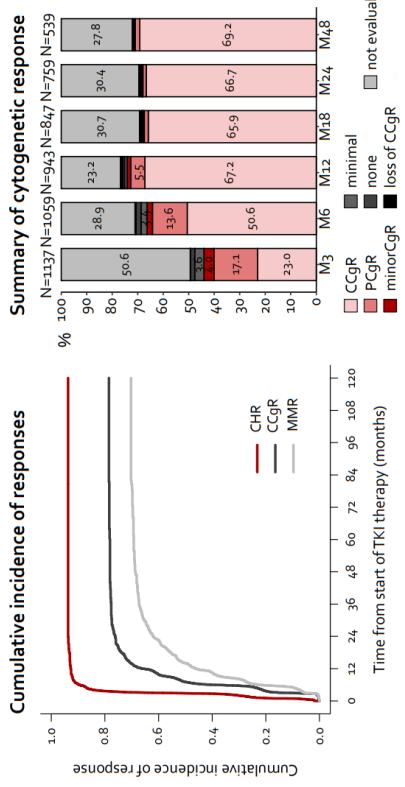




N = 1215

# CP – Efficacy of first line treatment

Patients with any TKI therapy first line

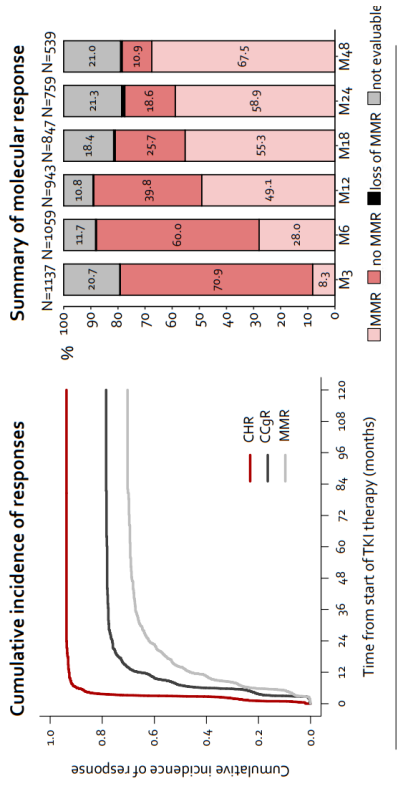


In the cumulative incidence curves, treatment change and death were considered as competitive events.

N = 1215

# CP – Efficacy of first line treatment

Patients with any TKI therapy first line

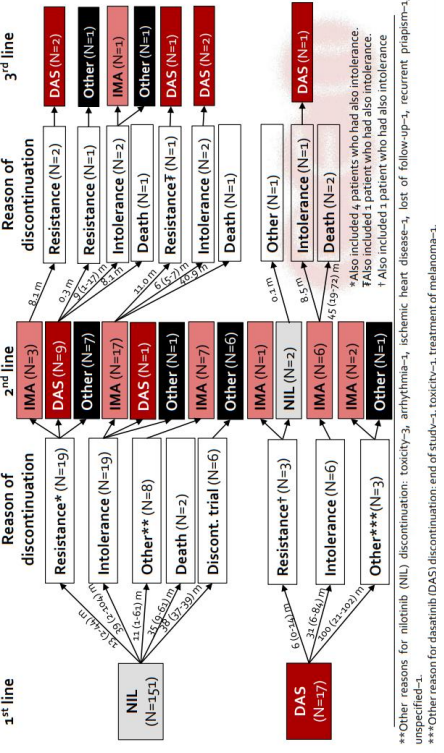


In the cumulative incidence curves, treatment change and death were considered as competitive events.

N = 168

# CP - Subsequent treatments

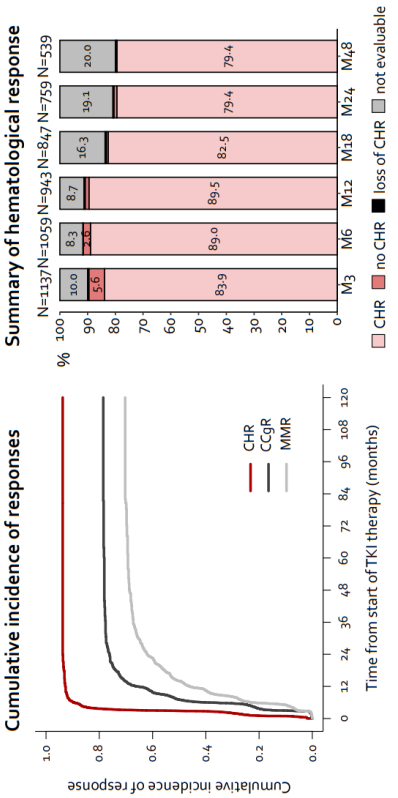
Patients with 1<sup>st</sup> line nilotinib or 1<sup>st</sup> line dasatinib



N = 1215

# CP – Efficacy of first line treatment

Patients with any TKI therapy first line



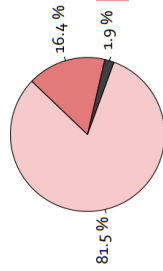
In the cumulative incidence curves, treatment change and death were considered as competitive events.

N = 1284

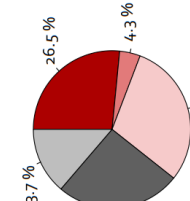
## CP – Patients' status

### Patient disposition at the last follow-up

Patients' status at the last follow-up (N = 1284)\*\*



Cause of death (N = 211)



Follow-up [months]  
median (min-max)

Alive (N=1046)	67.6 (0.0-182.5)
Dead (N=211)	42.1 (0.0-162.7)
Lost to FUP (N=25)	26.0 (0.0-115.2)
All patients (N=1284)	61.1 (0.0-182.5)

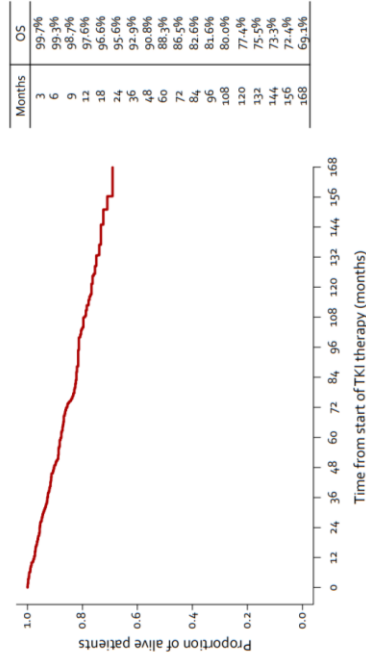
\*\*2 patients had unknown patients' status.

\* Other: other malignancy – 14, cardiovascular disease – 11, stroke – 4, complication after surgery – 1, meningioencephalitis – 1, multiple organ failure – 1, pneumonia – 1, pulmonary embolism – 1, sepsis – 1, sudden death – 1, unspecified – 18.

N = 1215

## CP – Overall survival (ITT approach)

### Patients with any TKI therapy first line

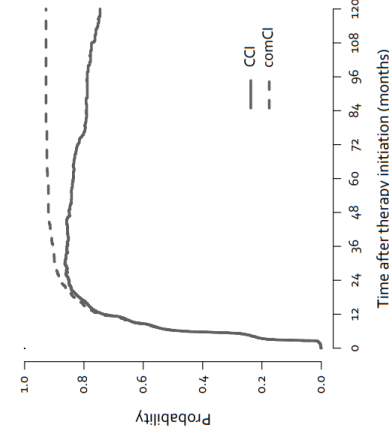


Overall survival (OS) is calculated as a time from start of TKI therapy to the last contact with the patient or to the death. Patients were not censored at the time of change of therapy.

N = 1215

## CP – Current cumulative incidence (CCI)

### Patients with any TKI therapy first line

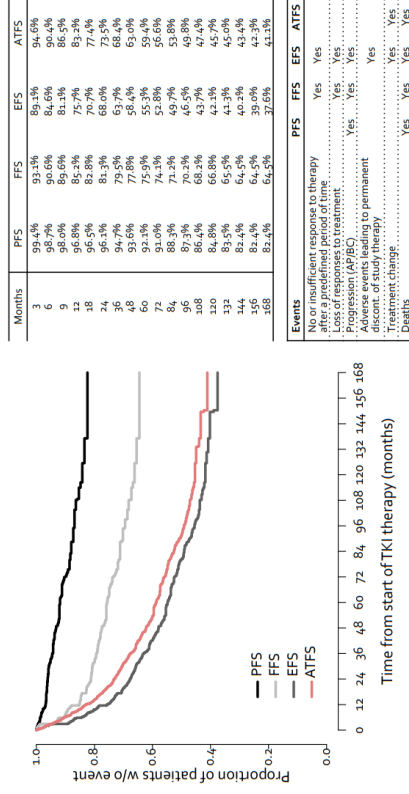


Current cumulative incidence (CCI) is the probability that a CML patient will experience a complete cytogenetic response after initiating his or her therapy  
comCI – common cumulative incidence of cytogenetic responses

N = 1215

## CP – Survival analysis on the 1st line therapy

### Patients with any TKI therapy first line

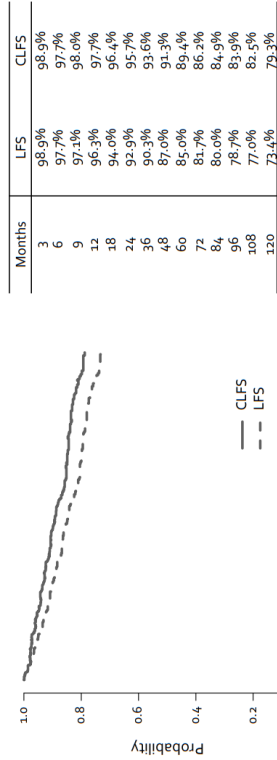


In progression-free survival (PFS) and failure-free survival (FFS), patients were censored at the time of treatment change.

N = 1215

## CP – Current leukaemia-free survival (CLFS)

Patients with any TKI therapy first line

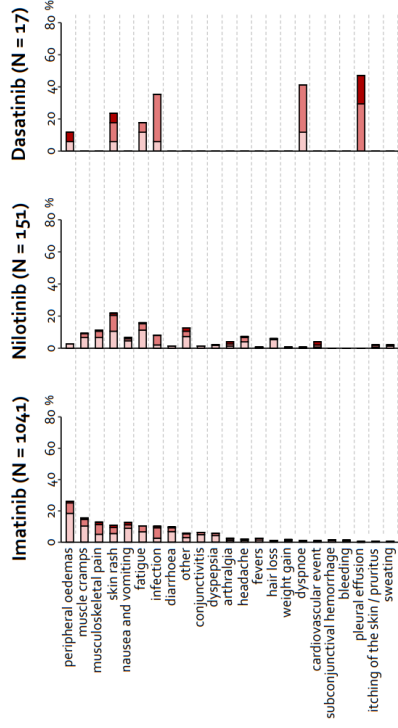


Current leukaemia-free survival (CLFS) is the probability that a CML patient is alive and in any disease remission after achieving the first disease remission  
LFS – leukaemia free survival assessed probability of being in the first disease remission

N = 1209

## CP – Most frequent non-hematol. toxicities

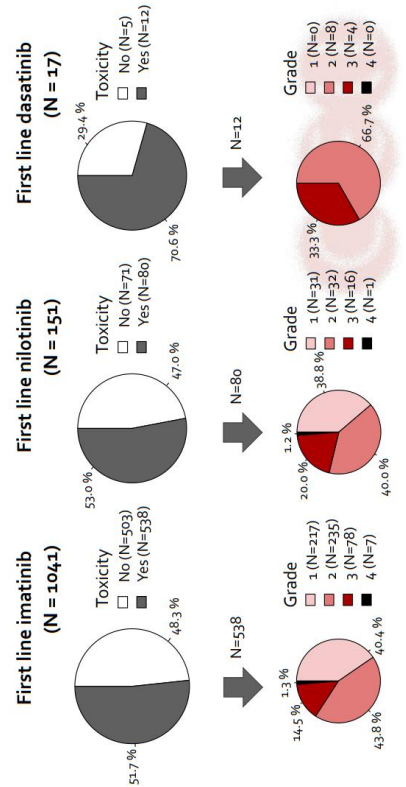
Patients with 1st line imatinib, nilotinib or dasatinib



N = 1209

## CP – Clinical non-hematological toxicity

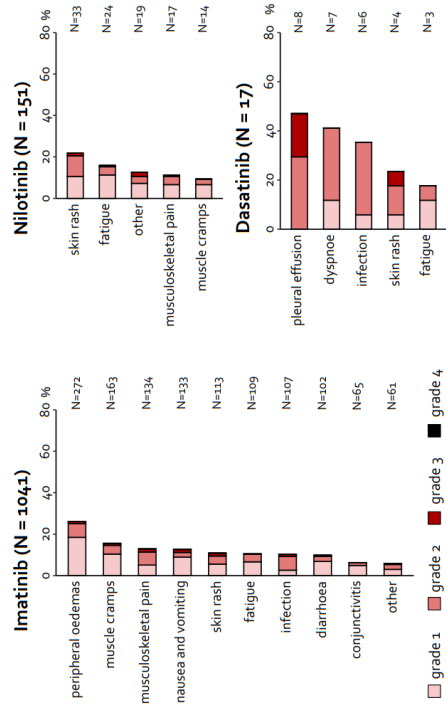
Patients with 1st line imatinib, nilotinib or dasatinib



N = 1209

## CP – Most frequent non-hematol. toxicities

Patients with 1st line imatinib, nilotinib or dasatinib

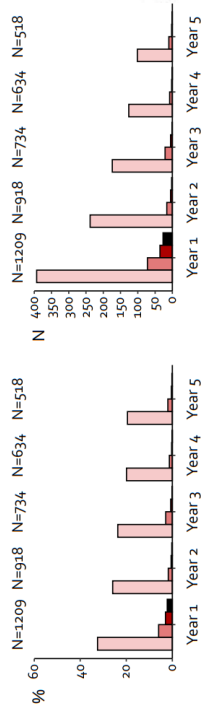


## CP – Hematological adverse events (summary by patients in time)

N = 1209

Patients with 1st line imatinib, nilotinib or dasatinib

Grade	Year 1	Year 2	Year 3	Year 4	Year 5
	N=1209	N=918	N=734	N=634	N=518
1	393 (32.5%)	238 (25.9%)	174 (23.7%)	126 (19.9%)	101 (19.5%)
2	72 (6.0%)	16 (1.7%)	21 (2.9%)	8 (1.3%)	10 (1.9%)
3	36 (3.0%)	5 (0.5%)	5 (0.7%)	2 (0.3%)	2 (0.4%)
4	27 (2.2%)	2 (0.2%)	1 (0.1%)	0 (0.0%)	1 (0.2%)
Total	528 (43.7%)	261 (28.4%)	201 (27.4%)	136 (21.5%)	114 (22.0%)

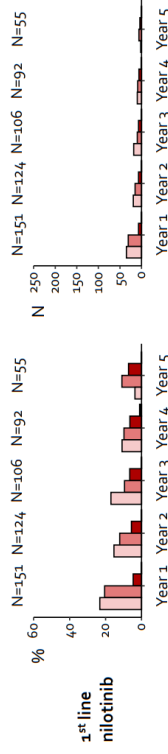
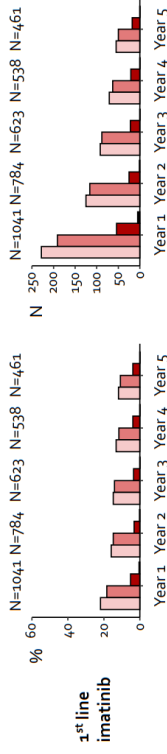


■ grade 1 ■ grade 2 ■ grade 3 ■ grade 4

## CP – Clinical non-hematological toxicities (summary by patients in time)

N = 1192

Patients with 1st line imatinib or nilotinib

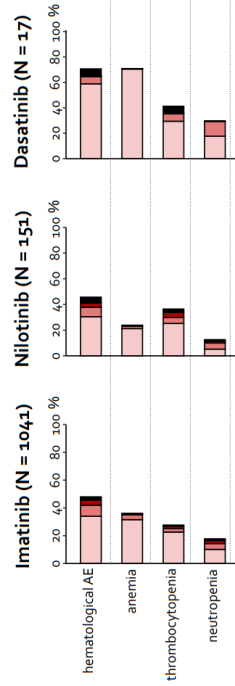


■ grade 1 ■ grade 2 ■ grade 3 ■ grade 4

## CP – Hematological adverse events

N = 1209

Toxicity	1st line Imatinib (N=1041)	1st line Nilotinib (N=151)	1st line Dasatinib (N=17)	
	N (%)	Max. grade	N (%)	Max. grade
hematological AE	499 (47.9%)	4	69 (45.7%)	4
anemia	375 (36.0%)	4	36 (23.8%)	4
thrombocytopenia	288 (27.7%)	4	55 (36.4%)	4
neutropenia	185 (17.8%)	4	19 (12.6%)	4



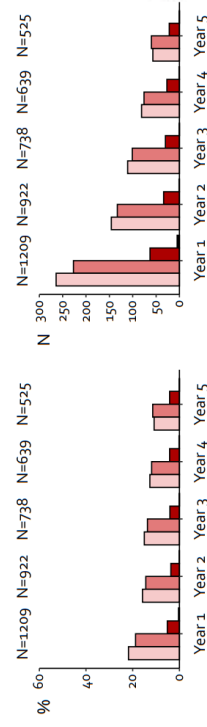
■ grade 1 ■ grade 2 ■ grade 3 ■ grade 4

## CP – Clinical non-hematological toxicities (summary by patients in time)

N = 1209

Patients with 1st line imatinib, nilotinib or dasatinib

Grade	Year 1	Year 2	Year 3	Year 4	Year 5
	N=1209	N=922	N=738	N=639	N=525
1	264 (21.8%)	146 (15.8%)	111 (15.0%)	81 (12.7%)	57 (10.9%)
2	227 (18.8%)	133 (14.4%)	101 (13.7%)	76 (11.9%)	60 (11.4%)
3	63 (5.2%)	34 (3.7%)	30 (4.1%)	27 (4.2%)	22 (4.2%)
4	5 (0.4%)	1 (0.1%)	0 (0.0%)	1 (0.2%)	0 (0.0%)
Total	559 (46.2%)	314 (34.1%)	242 (32.8%)	185 (29.0%)	139 (26.5%)

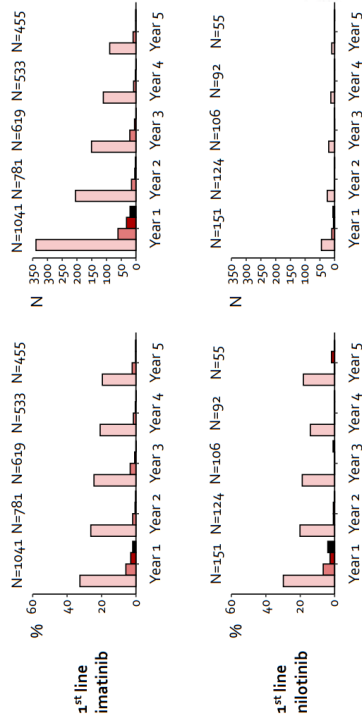


■ grade 1 ■ grade 2 ■ grade 3 ■ grade 4

## CP – Hematological adverse events (summary by patients in time)

N = 1192

Patients with 1st line imatinib or nilotinib

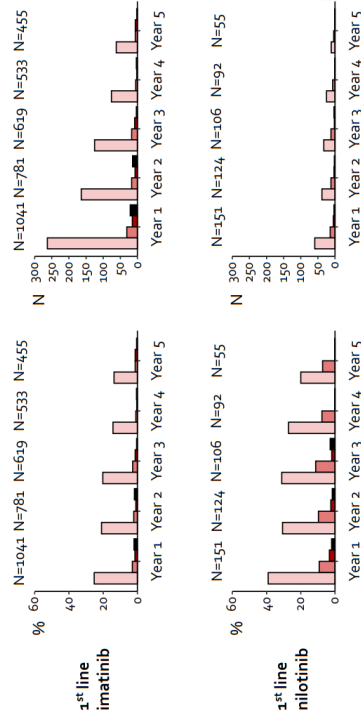


■ grade 1 ■ grade 2 ■ grade 3 ■ grade 4

## CP – Laboratory adverse events in time (excluding hypophosphatemia)

N = 1192

Patients with 1st line imatinib or nilotinib

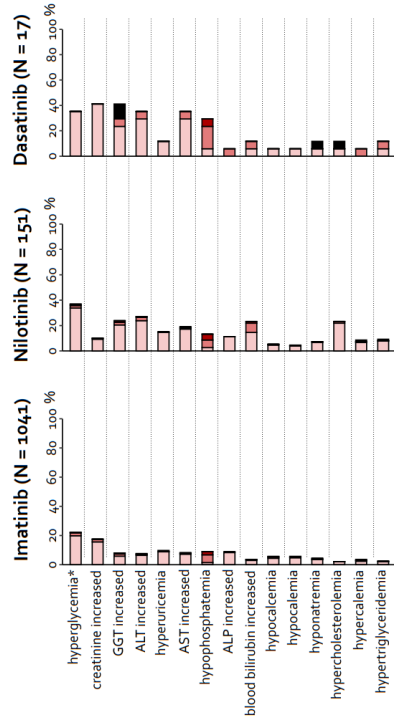


■ grade 1 ■ grade 2 ■ grade 3 ■ grade 4

N = 1209

## CP – Laboratory adverse events

Patients with 1st line imatinib, nilotinib or dasatinib



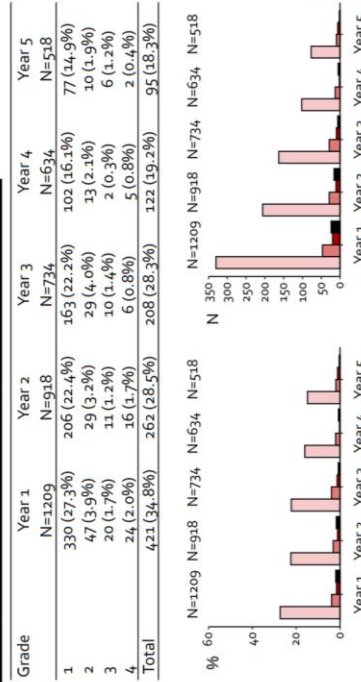
■ grade 1 ■ grade 2 ■ grade 3 ■ grade 4

\* majority of patients were not fasting

## CP – Laboratory adverse events in time (excluding hypophosphatemia)

N = 1209

Patients with 1st line imatinib, nilotinib or dasatinib



■ grade 1 ■ grade 2 ■ grade 3 ■ grade 4

### 3.6.2. Příloha 7

Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, Castagnetti F, Di Raimondo F, Casado LF, Turkina A, Zackova D, Ossenkuppele G, Zaritskey A, Höglund M, Simonsson B, Indrak K, Sninska Z, Sacha T, Clark R, Bogdanovic A, Hellmann A, Griskevicius L, Schubert-Fritschle G, Sertic D, Guilhot J, Lejniece S, Zupan I, Burgstaller S, Koskenvesa P, Everaus H, Costeas P, Lindoerfer D, Rosti G, Saussele S, Hochhaus A, Hehlmann R. Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry. *Leukemia*. 2017; 31(3):593-601.

IF = 10,023 v roce 2017; HEMATOLOGY Q1, ONCOLOGY Q1; 23 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Analýze podrobena 2094 pacientů s nově zjištěnou CML (medián věku 55 let) z 20 zemí či definovaných regionů v Evropě, zařazených do „EUTOS Population-based Registry“ v období od 1/2008 do 12/2013
- Cílem práce bylo v prospektivním sledování zmapovat situaci v Evropě stran léčby dospělých pacientů s CML a jejich výsledků a vyhodnotit kvalitu péče o tyto pacienty i v kontextu dodržování postupů stanovených mezinárodními doporučeními
- Podíl pacientů v CP dosahujících CCyR a velké molekulární odpovědi (major molecular response, MMR) ve 12 měsících od zahájení léčby TKI byl 57 % a 41 %. Pravděpodobnost celkového přežití (overall survival, OS) a přežití bez progresse (progression-free survival, PFS) ve 12 a 24 měsících byla 97 % a 94 %
- EUTOS prognostické skóre mělo dobrou výpovědní hodnotou pro diferenciaci pacientů dle pravděpodobnosti dosažení CCyR a MMR
- Validováno nové EUTOS long-term survival (ELTS) prognostické skóre – OS signifikantně odlišný ve všech 3 rizikových skupinách
- Práce představuje první a unikátní prospektivní zmapování léčby a jejich výsledků u dospělé populace pacientů s CML v Evropě. Ukázala, že stran volby terapie evropské regiony a státy následují platná doporučení a že výsledky dosahované v širší populaci pacientů s CML jsou do značné míry konkordantní s výsledky z klinických studií
- Věk pacientů neovlivňuje negativně léčebné výsledky a není tedy žádný důvod pro neposkytnutí specifické léčby TKI starším pacientům.

## ORIGINAL ARTICLE

## Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry

VS Hoffmann<sup>1</sup>, M Baccarani<sup>2</sup>, J Hasford<sup>1</sup>, F Castagnetti<sup>3</sup>, F Di Raimondo<sup>4</sup>, LF Casado<sup>5</sup>, A Turkina<sup>6</sup>, D Zackova<sup>7</sup>, G Ossenkoppele<sup>8</sup>, A Zaritsky<sup>9</sup>, M Höglund<sup>10</sup>, B Simonsson<sup>10</sup>, K Indrak<sup>11</sup>, Z Sninska<sup>12</sup>, T Sacha<sup>13</sup>, R Clark<sup>14</sup>, A Bogdanovic<sup>15</sup>, A Hellmann<sup>16</sup>, L Griskevicius<sup>17</sup>, G Schubert-Fritschle<sup>18</sup>, D Sertic<sup>19</sup>, J Guilhot<sup>20</sup>, S Lejniece<sup>21</sup>, I Zupan<sup>22</sup>, S Burgstaller<sup>23</sup>, P Koskenvesa<sup>24</sup>, H Everaus<sup>25</sup>, P Costeas<sup>26</sup>, D Lindoerfer<sup>1</sup>, G Rosti<sup>27</sup>, S Saussele<sup>28</sup>, A Hochhaus<sup>29</sup> and R Hehlmann<sup>28</sup>

The European Treatment and Outcome Study (EUTOS) population-based registry includes data of all adult patients newly diagnosed with Philadelphia chromosome-positive and/or BCR-ABL1+ chronic myeloid leukemia (CML) in 20 predefined countries and regions of Europe. Registration time ranged from 12 to 60 months between January 2008 and December 2013. Median age was 55 years and median observation time was 29 months. Eighty percent of patients were treated first line with imatinib, and 17% with a second-generation tyrosine kinase inhibitor, mostly according to European LeukemiaNet recommendations. After 12 months, complete cytogenetic remission (CCyR) and major molecular response (MMR) were achieved in 57% and 41% of patients, respectively. Patients with high EUTOS risk scores achieved CCyR and MMR significantly later than patients with low EUTOS risk. Probabilities of overall survival (OS) and progression-free survival for all patients at 12, 24 and 30 months was 97%, 94% and 92%, and 95%, 92% and 90%, respectively. The new EUTOS long-term survival score was validated: the OS of patients differed significantly between the three risk groups. The probability of dying in remission was 1% after 24 months. The current management of patients with tyrosine kinase inhibitors resulted in responses and outcomes in the range reported from clinical trials. These data from a large population-based, patient sample provide a solid benchmark for the evaluation of new treatment policies.

Leukemia (2017) 31, 593–601; doi:10.1038/leu.2016.246

## INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia (CML) has become a model of a malignancy that has moved from an almost always fatal outcome to an almost full control, because of an understanding of its molecular basis, and to the discovery of the tyrosine kinase inhibitors (TKIs), targeting specifically the tyrosine kinase activity of the proteins coded by the BCR-ABL1 fusion gene.<sup>1,2</sup> The therapeutic management of CML has become very successful, although it requires highly competent professionals, compliant patients and considerable financial resources. The cost of treatment is estimated in many ten thousands Euro or Dollars per year and patient.<sup>3</sup> However, almost all outcome data are based on prospective, academic or commercial trials or on retrospective analyses performed at referral centers. To find out

if treatment success reaches all patients, it is important to analyze population-based treatment and outcome data, but these are limited.

The European LeukemiaNet (ELN) is a network of excellence founded in 2002 and funded by the European Union in 2004,<sup>4</sup> linking many research institutions across Europe, with the mission of improving knowledge, management and care of leukemia. Several population-based registries have reported survival times that were somewhat shorter, particularly in the elderly, compared with those in clinical trials.<sup>5–7</sup> To improve this situation, ELN provided management recommendations that were first published in 2006.<sup>8</sup> As CML is a rare disease, with an annual age-adjusted incidence of about 1 case per 100 000,<sup>5</sup> progress requires international efforts and cooperation. For that purpose, ELN established a joint venture with Novartis Oncology Region Europe.

<sup>1</sup>Institute for Medical Information Sciences, Biometry and Epidemiology, Ludwig-Maximilians-Universität, IBE, University of Munich, Munich, Germany; <sup>2</sup>University of Bologna, Bologna, Italy; <sup>3</sup>Institute of Hematology 'L & A Seragnoli', Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, University of Bologna, Bologna, Italy; <sup>4</sup>Division of Hematology, AOU Policlinico-OVE, University of Catania, Catania, Italy; <sup>5</sup>Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain; <sup>6</sup>Federal State-Funded Institution 'National Research Center for Hematology' of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation; <sup>7</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno and Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>8</sup>Department of Haematology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; <sup>9</sup>St Petersburg State Medical University, St Petersburg, Russian Federation; <sup>10</sup>University of Uppsala, Uppsala, Sweden; <sup>11</sup>Department Hemato-oncology, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic; <sup>12</sup>Department of Hematology, University Hospital, Bratislava, Slovakia; <sup>13</sup>Katedra i Klinika Hematologii UJCM, Kraków, Poland; <sup>14</sup>Royal Liverpool University Hospital, Liverpool, UK; <sup>15</sup>Clinic of Hematology CCS and Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia; <sup>16</sup>Department of Hematology and Transplantation, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland; <sup>17</sup>Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos and Vilnius University, Vilnius, Lithuania; <sup>18</sup>Munich Cancer Registry, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany; <sup>19</sup>Department of Internal Medicine, Division of Hematology, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia; <sup>20</sup>INSERM CIC 1402, CHU Poitiers, Poitiers, France; <sup>21</sup>Riga East Clinical University Hospital, Riga, Latvia; <sup>22</sup>Department of Hematology, University Clinical Centre, Ljubljana, Slovenia; <sup>23</sup>Klinikum Wells-Grieskirchen, Wells, Austria; <sup>24</sup>Helsinki University Central Hospital and Hematology Research Unit, Biomedicum Helsinki, Helsinki, Finland; <sup>25</sup>Tartu University Hospital, Tartu, Estonia; <sup>26</sup>The Karaiskaki Foundation, Nicosia, Cyprus; <sup>27</sup>Department of Oncology and Hematology, Hematology Unit, St Orsola University Hospital, Bologna, Italy; <sup>28</sup>III. Medizinische Klinik, University of Heidelberg at Mannheim, Mannheim, Germany and <sup>29</sup>Abteilung Hämatologie/Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany. Correspondence: Dr VS Hoffmann, Institute for Medical Information Sciences, Biometry and Epidemiology, Ludwig-Maximilians-Universität, IBE, University of Munich, Marchioninistrasse 15, München 81377, Germany. E-mail: hoffmann@ibe.med.uni-muenchen.de

Received 4 May 2016; revised 22 July 2016; accepted 15 August 2016; accepted article preview online 29 August 2016; advance online publication, 23 September 2016

The project, named European Treatment and Outcome Study (EUTOS) of CML, included the establishment of a prospective population-based registry. The purpose of the population-based section of the ELN CML registry was to provide an overview of the current situation of CML and its management in Europe. The baseline characteristics and the incidence have already been reported.<sup>9</sup> Now, we report on treatment and early treatment outcome of the same patients.

**PATIENTS AND METHODS**

The EUTOS for CML registry was established in 2007. For the population-based section of the registry, data collection was started between 2008 and 2010, because of different regulatory requirements in the participating countries, and was terminated in 2012. Follow-up information was collected until December 2014. Data were collected on all newly diagnosed adult CML patients in predefined areas or whole countries from all parts of Europe to prospectively evaluate treatment and outcome. Details on patient numbers and countries are given in Supplementary Table 1.

According to the population-based approach, the data of all Philadelphia chromosome-positive (Ph+) and/or BCR-ABL1-positive (BCR-ABL1+) patients were collected without any exclusion criteria, except for age (>18 years).

In this registry, the information of all newly diagnosed patients irrespective of their participation in a clinical trial were collected, to limit the bias due to the eligibility criteria that are typically established in prospective studies. Moreover, there were no predefined obligations for management, including treatment and monitoring. The ELN recommendations<sup>3</sup> were known and appreciated in all countries, but no reference to those recommendations was mentioned in the protocol, which was strictly observational and the study plan was approved by ethics committees and other competent authorities in all participating countries in agreement with national laws and regulations. Informed consent was provided according to the laws and the regulations in the participating countries. More details on data collection were reported elsewhere.<sup>9</sup>

An unrestricted support to the study was provided by Novartis Oncology Europe through a contract with the legal representative of the Heidelberg University. The sponsor had no direct access to the data. Data collection, processing and all statistical analyses were exclusively carried out by the

Central Data Center at the Department for Medical Information Sciences, Biometry and Epidemiology of the Ludwig-Maximilians-Universität in Munich, Germany.

**Definitions and end points**

Chronic phase (CP), accelerated phase (AP) and blastic phase (BP) were defined according to the ELN criteria.<sup>3</sup> EUTOS<sup>10,11</sup> and EUTOS long-term survival (ELTS)<sup>12</sup> scores were calculated according to the respective publications. Only cytogenetic examinations including at least 20 metaphases were considered for the assessment of cytogenetic response. For complete cytogenetic remission (CCyR), none out of at least 20 marrow cell metaphases could be Ph+. For the assessment of molecular response, only measurements on international scale (IS) and for patients with b2a2 and/or b3a2 BCR-ABL1 transcripts were accepted. Major molecular response (MMR) was defined as a BCR-ABL1 transcript level ≤0.1% (IS).

All time to response variables (CCyR, MMR), progression-free survival (PFS, progression to AP and BP and death) and overall survival (OS) were calculated from the date of diagnosis. Death was defined as leukemia related when it occurred after progression to AP or BP, or during hematologically uncontrolled CP. All other deaths were classified as leukemia unrelated, and were divided in two groups, namely 'death in remission' when a cytogenetic and/or a molecular test showed CCyR and/or MMR in the last 6 months before death, and 'death with leukemia' in all the other cases.

**Statistical analysis**

For OS and PFS analyses Kaplan–Meier curves were calculated. To quantify differences in survival probabilities between groups the log-rank test was used.

Cumulative incidence probability curves were calculated to analyze treatment response, considering death and progression as competing risks using the Aahlen–Johanson estimator.<sup>13</sup> The Gray test was used for group comparisons.<sup>14</sup> For the analysis of the influence of age on response, proportional hazard regressions were computed to evaluate the cause-specific hazard of age.

Level of significance was 0.05, and all tests were calculated two-sided. Calculations were carried out using SAS version 9.2 software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

**Table 1.** Baseline characteristics and treatment of the patients in the EUTOS registry diagnosed in CP

	Patients in CP	Pat. with follow-up	Pat. without follow-up	Pat. with first-line treatment documentation <sup>a</sup>	Pat. without first-line treatment documentation <sup>a</sup>
Number	2638	2342	296	2212	130
<i>Baseline characteristics</i>					
Age (n = 2638) years, median (range)	56 (18–99)	55 (18–99)	60 (20–91)	55 (18–99)	61 (19–86)
Sex (n = 2638), % male	54	53	58	54	46
<i>EUTOS score (n = 2325)</i>					
Low <sup>b</sup>	89%	89%	92%	89%	81%
High <sup>b</sup>	11%	11%	8%	11%	19%
Unknown	12%	11%	15%	12%	41%
<i>ELTS score (n = 2196)</i>					
Low <sup>b</sup>	54%	54%	53%	54%	47%
Medium <sup>b</sup>	31%	31%	31%	30%	37%
High <sup>b</sup>	16%	15%	16%	15%	15%
Unknown	7%	6%	14%	4%	40%
<i>Enrolled in trials (n = 2638)</i>					
Yes <sup>b</sup>	15%	18%	< 1%	18%	21%
Unknown	15%	5%	94%	1%	85%

Abbreviations: CP, chronic phase; ELTS, EUTOS long-term survival; EUTOS, European Treatment and Outcome Study. <sup>a</sup>From countries that documented information on treatment. <sup>b</sup>Of patients with documentation on this characteristic.



**RESULTS**

Of the 2904 adult Ph+ patients included into the registry from 20 countries from 2008 to 2012 (mainly 2010 to 2012), 2638 were confirmed to have been diagnosed in CP: 125 in AP, 63 in BP and 78 in unknown phase.

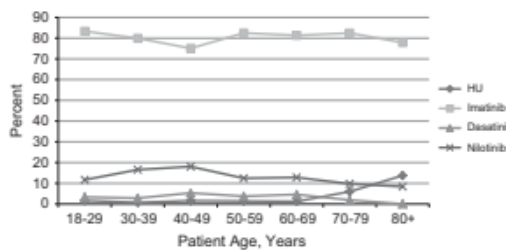
Of the patients, 11% had no follow-up information, 83% of the patients had follow-up information for > 1 year or died within the first year and 6% had information for < 1 year. Patients without follow-up information were significantly older than those with follow-up information (median age 60 vs 55 years,  $P < 0.0001$ ), but did not differ regarding sex and EUTOS score.

The 2342 patients who were diagnosed in CP and had follow-up information available were considered for this analysis. The median age of these patients was 55 years (range: 18–99 years); 53% of them were male, and 18% of them were enrolled in clinical trials. Eleven percent of the patients were at high risk of not achieving CCyR at 18 months after the start of therapy according to the EUTOS score. According to the ELTS score, 54% of patients had a low risk of dying of CML, whereas 31% and 16% were at high and intermediate risk, respectively (Table 1).

**Treatment**

Treatment data of 2212 patients were available (94% of 2342).

As first-line therapy 97% of patients received a TKI (imatinib 80%, nilotinib 13%, dasatinib 4%), often preceded by a short



**Figure 1.** Percentages of patients treated with imatinib, nilotinib, dasatinib and HU by age.

course of hydroxyurea (HU) (in 61% of patients). HU was the only reported antileukemic treatment in 3% of all patients, more frequently in older patients who were > 70 years of age (8%; Figure 1). Of the patients receiving first-line imatinib, 95% were scheduled to receive 400 mg once daily. Of the patients receiving nilotinib and dasatinib, 58% and 72%, respectively, had been enrolled into controlled clinical trials. Of the patients treated with first-line nilotinib, 93% received 300 mg twice daily. Patients treated with dasatinib received mostly 100 mg once daily (95%).

There were no significant differences between female and male patients regarding the choice of first-line therapy.

Treatment switches were common in CML patients. Overall, 26% of patients changed treatment at least once. More detail on treatment switches is given in Figure 2.

Forty-three patients received an allogeneic stem cell transplantation; 39 after treatment with a TKI.

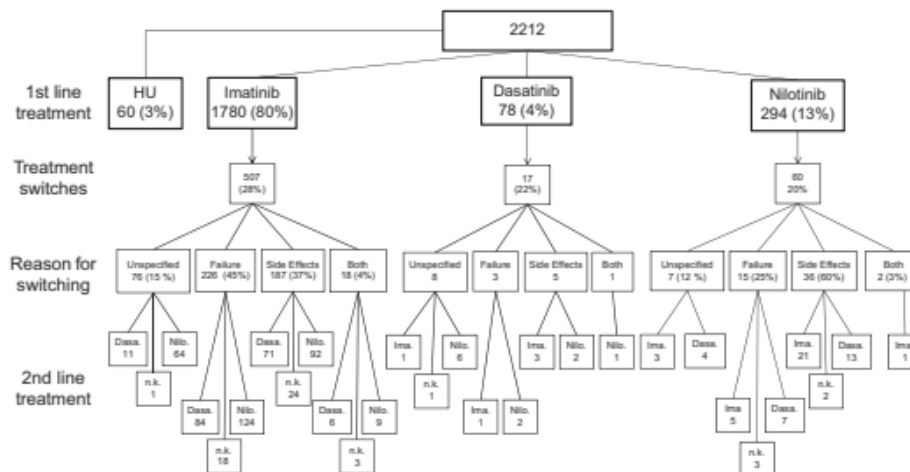
**Response**

Time to first CCyR could be calculated for 1491 of 2342 patients (64%). There were no statistically significant differences between the patients with and without information on CCyR regarding sex, age and risk profile. Twenty-one percent of the information was retrieved from patients participating in clinical trials compared with 18% of all patients with follow-up information participating in clinical trials. Median time to first CCyR was 10 months; after 12 months, 57% (95% confidence interval (CI): 54–60%), and after 18 months, 76% (95% CI: 74–79%) had achieved CCyR (Figure 3a).

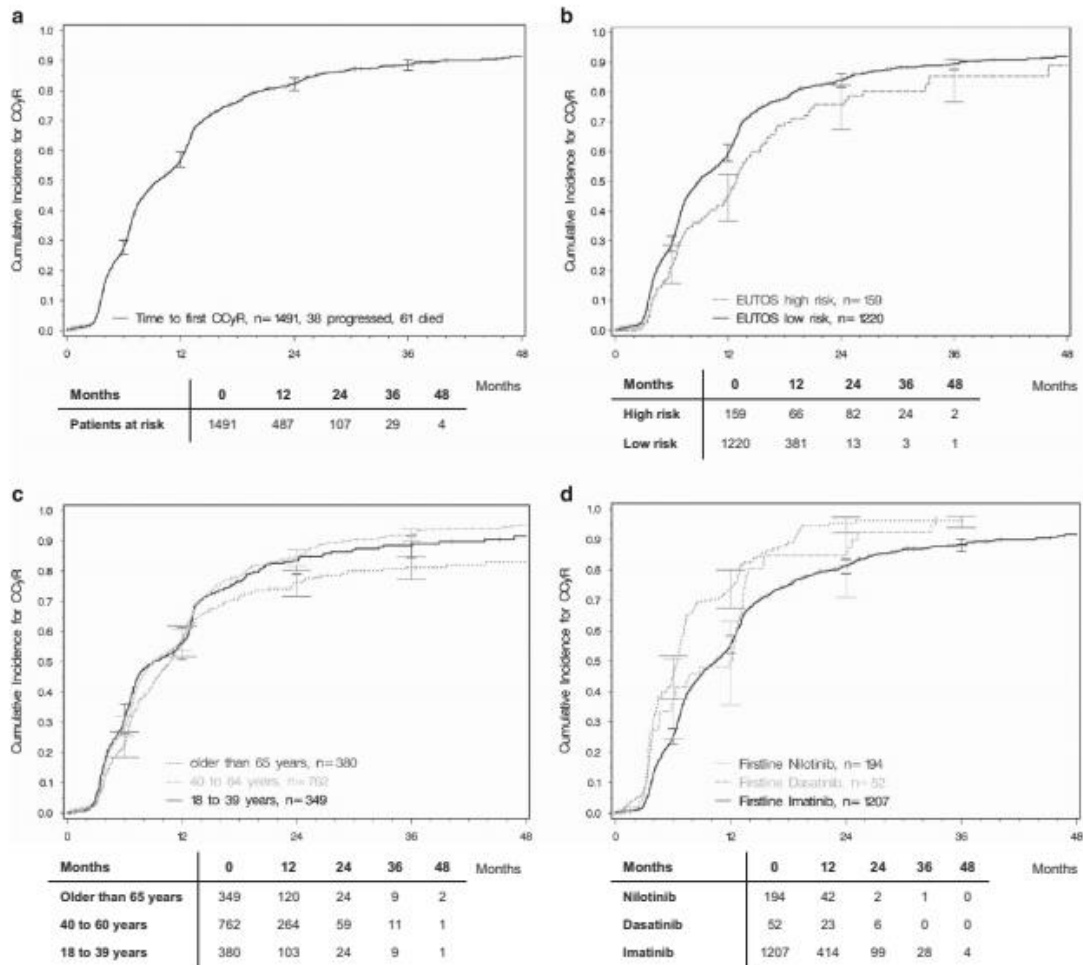
Time to first CCyR differed significantly regarding the EUTOS score. Median time to first CCyR was 9 months for the low-risk group and 13 months for the EUTOS high-risk group ( $P < 0.0001$ ). After 18 months, 78% (95% CI: 75–80%) of patients in the low-risk group and 69% (95% CI: 60–76%) of patients in the high-risk group had achieved CCyR (Figure 3b).

The patients' age did not have major influence on the time to first CCyR ( $P = 0.8974$ , median time to first CCyR—18–39 years: 9 months; 40–65 years: 9 months; older than 65 years: 11 months; Figure 3c).

Time to first MMR could be calculated for 1259 of 2342 patients (54%). Nineteen percent of the information was retrieved from patients participating in clinical trials. Median time to first MMR



**Figure 2.** First-line treatment and treatment switches by medication and reason for switching.



**Figure 3.** Cumulative incidence probability of CCyR for all patients (a), and according to EUTOS score (b), age group (c) and first-line treatment (d).

was 15 months. Cumulative incidence of MMR after 12 months was 41% (95% CI: 38–44%; Figure 4a).

Patients in the EUTOS high-risk group achieved MMR significantly later than patients in the low-risk group (median 20 vs 14 months,  $P < 0.0001$ ; Figure 4b). Cumulative incidence of MMR at 12 months was 42% (95% CI: 39–45%) in the low-risk group and 27% (95% CI: 20–36%) in the high-risk group.

Age did not have significant influence on the time to first MMR ( $P = 0.9467$ , median time to first MMR—18–39 years: 17 months; 40–65 years: 16 months; older than 65 years: 18 months; Figure 4c).

Time to first CCyR and first MMR was somewhat longer with imatinib 400 mg compared with 2G-TKI (Figures 3d and 4d).

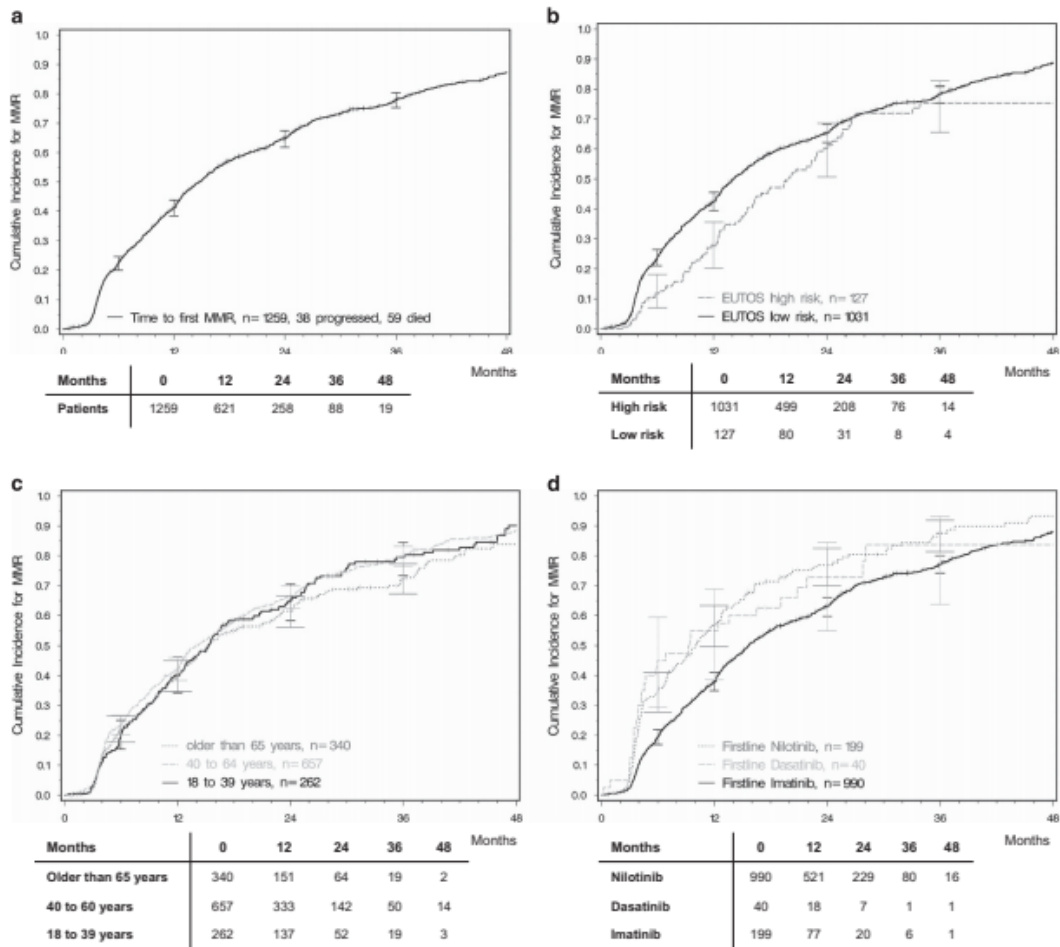
#### Survival

**Overall Survival.** The median observation time of living patients was 29 months (9 days to 73 months). One hundred and eighty-seven patients died (8%). The probability of OS for all patients at

12, 24 and 30 months was 97% (95% CI: 96–97%), 94% (95% CI: 93–95%) and 92% (95% CI: 91–93%), respectively (Figure 5a).

Stratified by ELTS score, the patients had a 30-month survival of 96% (95% CI: 94–97%), 89% (95% CI: 86–92%) and 84% (95% CI: 79–88%) in the low-, intermediate- and high-risk group, respectively. All risk groups differed significantly from each other ( $P = 0.0026$  for intermediate vs high risk,  $P < 0.0001$  for low vs high and intermediate; Figure 5b). OS did not differ when stratified by first-line TKI (Figure 5c).

**Progression-free survival.** Progression to AP or BP was reported in 113 patients, 63 of them died later (in 25 patients progression was detected upon death, the median survival time for the remaining patients was 3 months (2 days to 36 months)). Forty-six patients with progression were reported to be still alive at last contact (median time to last contact 13 months (2 days to 48 months)). For four patients, the information on the date of progression was missing and they did not die until the date



**Figure 4.** Cumulative incidence probability of MMR for all patients (a), and according to EUTOS score (b), age group (c) and first-line treatment (d).

of last contact. One hundred and twenty patients died without progression. The probability of PFS for all patients at 12, 24 and 30 months was 95% (95% CI: 94–96%), 92% (95% CI: 91–93%) and 90% (95% CI: 88–91%), respectively (Figure 6a).

PFS differed significantly according to the ELTS score group ( $P < 0.0001$ ; Figure 6b), with a 30-month survival of 94% (95% CI: 93–96%), 88% (95% CI: 85–90%) and 80% (95% CI: 75–85%) in the low-, intermediate- and high-risk group, respectively.

**Leukemia-related survival.** Of the 187 patients who died, 34% died after progression to AP or BP, 20% died in remission (CCyR or MMR) and 46% with leukemia without remission or progression.

The probability of dying in remission accumulated to < 1% at 12 months and to 1% (95% CI: 0.6–1.6%) at 24 months. The probability of dying after progression accumulated to 1% (95% CI: 1–2%) at 12 months and to 2% (95% CI: 2–3%) at 24 months.

## DISCUSSION

The EUTOS population-based registry provides the first and unique, prospective large-scale assessment of treatment and outcomes in the general population of adult Ph+ and/or BCR/ABL1 + CML patients in Europe including patients inside and outside of clinical trials alike. The registry shows that in Europe ELN recommendations are widely applied for the choice of treatment of CML. Concerning treatment outcomes, the EUTOS data show that the success reported from randomized trials is achieved in the general population to a large degree, too.

It is important to highlight that this EUTOS registry provides solid data on first-line treatment with imatinib, as 80% of patients were treated first line with this TKI, representing a period when the availability and the use of second-generation TKIs first-line treatment was limited. Today, there is a trend towards a more frequent and earlier use of second-generation TKIs. The EUTOS data provide a necessary benchmark for the evaluation of this trend, and of new treatment policies.

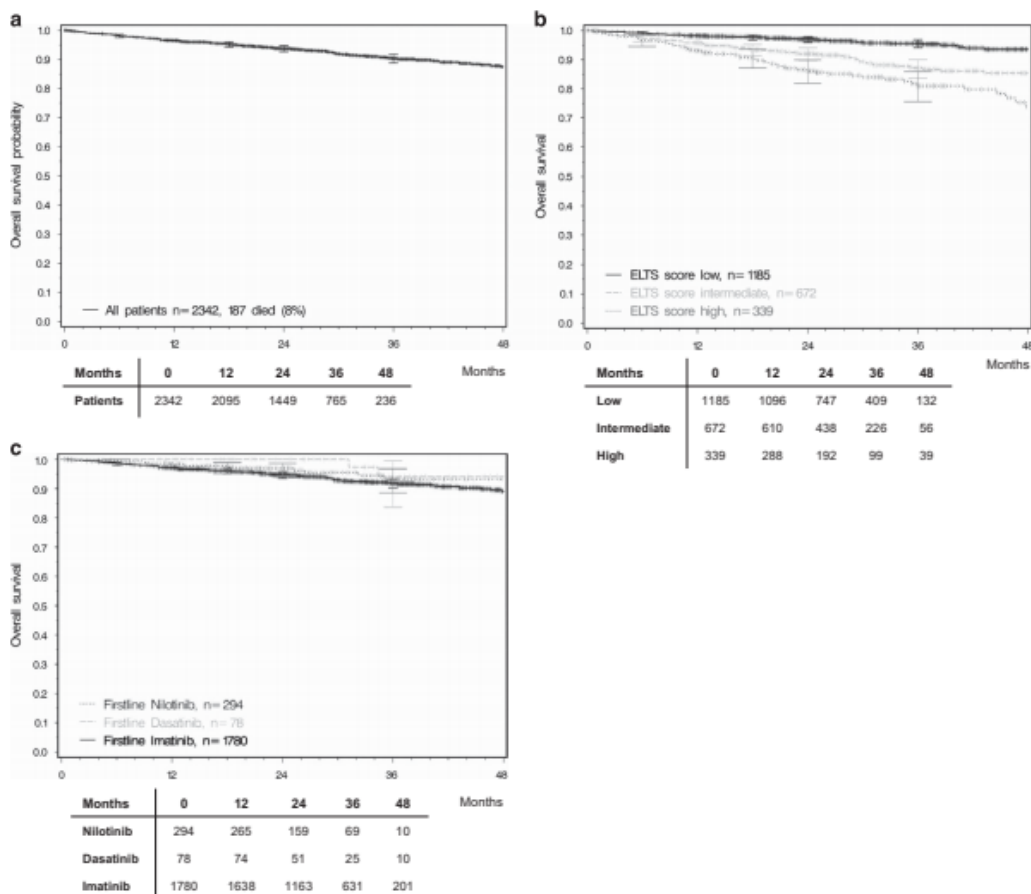


Figure 5. Overall survival for all patients (a), according to ELTS score (b), and first-line treatment (c).

### Treatment

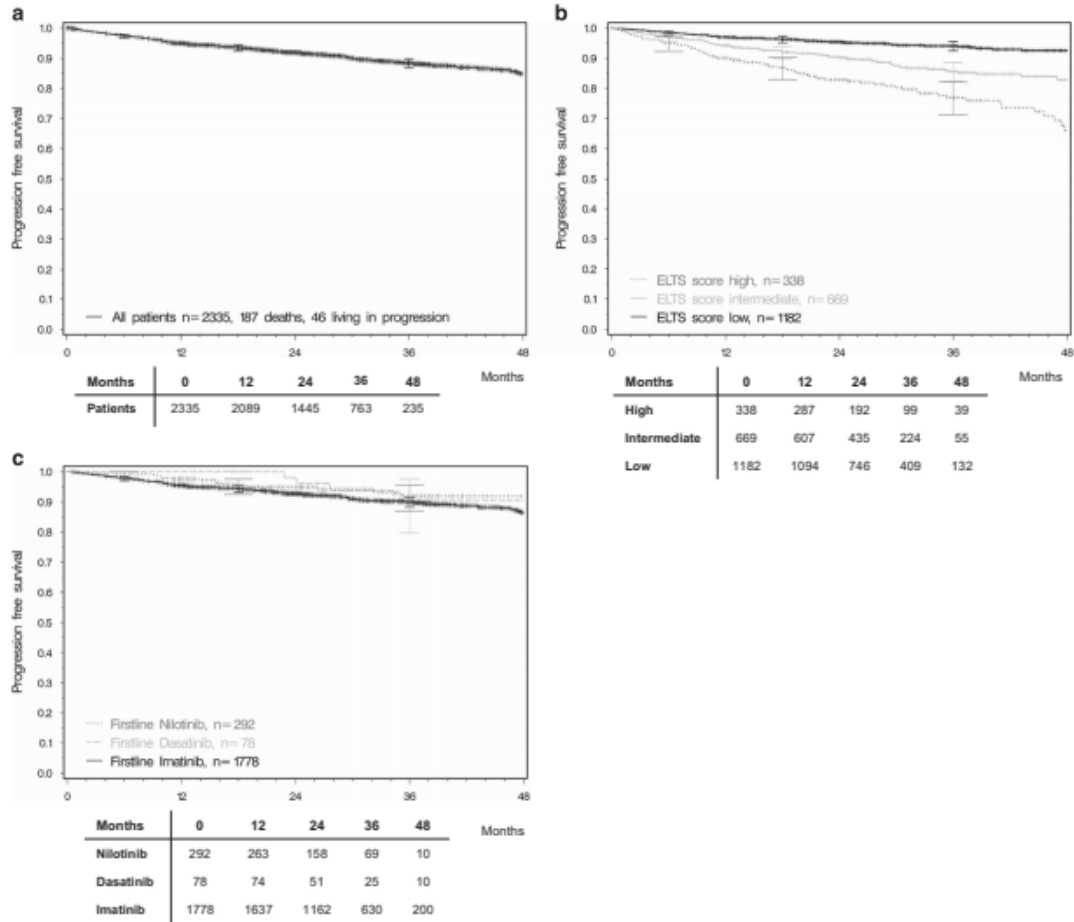
According to the recommendations of the ELN, CML patients diagnosed in CP should be treated with a TKI.<sup>3</sup> Although the availability and the coverage by health insurances of all TKIs varied substantially from one country to another and over the registration years, this recommendation was followed regarding first-line treatment: almost all patients (97%) were treated first line with a TKI, which is comparable to the proportions of patients in other population-based registries. They reported 88% from the Netherlands<sup>6</sup> (years 2007–2012), 90% from Sweden<sup>5</sup> (years 2007–2009) and 97% from the United Kingdom<sup>7</sup> (years 2004–2011).

The majority of the EUTOS patients was treated with imatinib (80%), which was the only TKI approved for first-line treatment use by the European Medicines Agency during most of the registration period. First-line imatinib was approved in December 2002, second-line dasatinib in November 2006 and first-line dasatinib in November 2010, second-line nilotinib in November 2007 and first-line nilotinib in December 2010. Second-line bosutinib and ponatinib were approved in March and July 2013, only.

Second-generation TKIs were mainly used in clinical trials. However, there still was a fraction of mainly older patients who

were treated with HU only. As we assume elderly patients to be underreported in our sample,<sup>9</sup> the fraction of patients treated with HU only might be underestimated too. The reports from the Swedish<sup>5</sup> population-based registry and the population-based registry from the Netherlands<sup>6</sup> can be used as a reference to quantify the possible gap in reports. Høglund *et al.*<sup>5</sup> report 85% of patients between 70 and 79 years and 79% of patients over 80 years are treated with a TKI; Thielen *et al.*<sup>6</sup> report 80% of patients between 71 and 80 years and only 59% of patients over 80 years are treated with a TKI; the findings from the EUTOS database were 94% (70–79 years) and 85% (over 80 years; Figure 1), respectively.

The proportion of patients switched from imatinib to another second-generation TKI was 27%. The trend towards an early switch became relatively popular only in 2013 and 2014 after the publication of early response data and as during the earlier study period second-generation TKIs were not yet available or reimbursable in several European countries. The percentage of switches seen here was identical to that reported in a large nation-wide, Italian study of more than 500 patients treated first line with imatinib.<sup>15</sup> Surprisingly, 16% of all patients exchanged one TKI for another without documented substantial reasons like toxicity or treatment failure.



**Figure 6.** Progression-free survival for all patients (a), and according to ELTS score (b) and first-line treatment (c).

**Response**

A variety of end points and analysis methods was used in clinical trials evaluating different dosages of imatinib, bosutinib, dasatinib and nilotinib. Regarding the rates of CCyR and MMR at 12 and 18 months, the results of the EUTOS patients fit in the respective ranges of the results from clinical trials (Table 2). This is true when looking at all trial arms together but also when—for better comparability—only looking at the patients initially treated with 400 mg imatinib.

Further, the response rates from the EUTOS registry are comparable to the rates from the Swedish population-based CML registry.<sup>5</sup> At 12 months CCyR was 66% and MMR 36% (compared with 57 and 41%).

It needs to be noted that rates of CCyR and MMR were calculated using different methods sometimes resulting in a rate ‘at’ and sometimes in a rate ‘up to’ a specific time adding some variance to the results.

Thus, despite the large range of results from clinical trials and the possible underreporting of response results (negative as well as positive ones), the response rates in our registry are similar to the responses in clinical trials. It is important to note that age does

not influence remission rates; thus, there can be no justification to deny TKIs to older patients.

**Survival**

Comparing the PFS in the registry with that reported in clinical trials at different times we observed lower to similar probabilities for all patients and for patients treated with imatinib 400 mg once daily (Table 2). The slightly lower PFS might be a result of patient selection in clinical trials. Trials typically apply inclusion and exclusion criteria, and patients with many comorbidities or living away from specialized centers might not even be considered to participate in clinical trials.

As CML mainly affects elderly patients and treatment with TKI is so effective, many CML patients die meanwhile from causes unrelated to CML and its treatment.<sup>12</sup> Other patients die with leukemia but without remission or progression. Reasons for their death might be related to CML and its treatment or not—they however do not die from the common course of disease with AP/BP. Other reasons for death such as comorbidities could also be the reason for not reaching remission. Thus, it has become important to analyze both overall survival and leukemia-related survival.

**Table 2.** Information from large randomized clinical trials on PFS, CCyR and MMR in comparison with the data from the EUTOS population-based registry (95% CI within parentheses)

Study	N	Arm	PFS at 12 months	PFS at 24 months	PFS at 36 months	CCyR at 12 months	CCyR at 18 months	MMR at 12 months	MMR at 18 months
EUTOS PB	2342	All	95 (94–96)	92 (91–93)	88 (87–89)	57 <sup>a</sup> (54–60)	76 <sup>a</sup> (74–79)	41 <sup>a</sup> (38–44)	57 <sup>a</sup> (54–60)
	1780	Imatinib 400	96 (94–97)	93 (91–94)	91 (89–92)	57 <sup>a</sup> (53–60)	75 <sup>a</sup> (71–77)	38 <sup>a</sup> (35–41)	55 <sup>a</sup> (52–59)
IRIS <sup>17</sup> 2003	553	Imatinib 400	96.6 <sup>b</sup>	90 <sup>c</sup>	—	—	76.2 <sup>d</sup> (72.5–79.9)	—	—
ENESTnd <sup>18</sup> 2010	282	Nilotinib 600	98 <sup>c,e</sup>	—	—	80	—	44 <sup>f</sup> /51 <sup>g</sup>	60.2 <sup>g</sup>
	281	Nilotinib 800	98 <sup>c,e</sup>	—	—	78	—	43 <sup>f</sup> /50 <sup>g</sup>	56.4 <sup>g</sup>
	283	Imatinib 400	96 <sup>c,e</sup>	—	—	65	—	22 <sup>f</sup> /27 <sup>g</sup>	25.8 <sup>g</sup>
ENEST1st <sup>19</sup> 2016	1089	Nilotinib 600	—	99 (99–100)	—	82 <sup>h</sup> (80–85)	—	69 <sup>h</sup> (66–72)	77 <sup>h</sup> (75–80)
Dasision <sup>20,21</sup>	259	Dasatinib 100	—	93.7 <sup>i</sup>	—	85 <sup>h</sup> /83 <sup>g</sup>	86 <sup>c,a</sup>	46 <sup>h</sup> /46 <sup>g</sup>	50 <sup>c,a</sup>
2010/2012	260	Imatinib 400	—	92.1 <sup>i</sup>	—	73 <sup>h</sup> /72 <sup>g</sup>	75 <sup>c,a</sup>	28 <sup>h</sup> /28 <sup>g</sup>	32 <sup>c,a</sup>
CML IV <sup>22</sup> 2011	328	Imatinib 800	—	—	94 (92–95)	62.9 (56.4–67.9) <sup>a</sup>	—	59 (53–65)	—
	325	Imatinib 400	—	—	94 (92–95)	49.4 (42.6–54.4) <sup>a</sup>	—	44 (37–50)	—
BELA <sup>23</sup> 2012	250	Bosutinib 500	—	—	—	70 (64–76)	—	41 (35–47)	—
	252	Imatinib 400	—	—	—	68 (62–74)	—	27 (22–33)	—
TOPS <sup>24</sup> 2010	319	Imatinib 800	—	97.4 <sup>j</sup> (95.3–99.6)	—	69.9 <sup>h</sup>	—	46.4/61 <sup>c,h</sup>	69.9/70 <sup>c,h</sup>
	157	Imatinib 400	—	95.0 <sup>j</sup> (90.2–99.8)	—	65.6 <sup>h</sup>	—	40.1/49 <sup>c,h</sup>	65.6/65 <sup>c,h</sup>

Abbreviations: AP, accelerated phase; BP, blastic phase; BM, bone marrow; CCyR, complete cytogenetic remission; CHR, complete hematologic response; CI, confidence interval; CML, chronic myeloid leukemia; EUTOS, European Treatment and Outcome Study; MMR, major molecular response; PFS, progression-free survival; Ph, Philadelphia chromosome. <sup>a</sup>Calculated as cumulative incidences with competing risks. <sup>b</sup>Progression defined as death, progression to AP or BP, loss of response or increasing white cell count. <sup>c</sup>Estimated from figures. <sup>d</sup>Calculated as cumulative incidence without competing risks censoring patients who crossed over to the alternative treatment group or discontinued treatment for reasons other than progression at the last follow-up of the initial treatment period. <sup>e</sup>Progression defined as transformation to AP/BP. <sup>f</sup>Rate at 12 months, patients without assessment were considered to have had no response. <sup>g</sup>Rate at 12 months, only patients with assessment. <sup>h</sup>Calculated as cumulative incidence without consideration of competing risks. <sup>i</sup>Progression was defined per protocol as any of the following: doubling of white cell count to >20x10<sup>9</sup>/l in the absence of CHR; loss of CHR; increase in Ph-positive BM metaphases to >35%; transformation to AP/BP; or death from any cause. <sup>j</sup>PFS at 18 months.

The EUTOS registry also replicated two findings from clinical trials on second-generation TKIs: patients treated first-line with nilotinib and dasatinib achieved CCyR and MMR earlier than patients treated with imatinib 400 mg once daily, but this did not result in longer PFS or OS (Figures 2d, 3d, 4c and 5c). As the EUTOS registry is not a randomized trial, neither the earlier response nor the similar outcomes should be overinterpreted as the results may be confounded by other and unknown factors.

All analyses were also calculated by country, but differences were not substantial considering the variation, especially in countries with only few observations. We also analyzed the data stratified by enrollment in a clinical trial. There were some minor differences that are likely related to the younger age and slightly better prognosis of patients in clinical trials<sup>9</sup> and more frequent measurements of response. As clinical trials are a part of the health-care reality for CML patients in Europe, the data were not excluded.

The newly developed ELTS score divides the patients from the EUTOS population-based registry into three well-separated groups according to their overall survival probabilities. This shows that the ELTS score is a valid instrument in predicting the long-term outcome of CML patients in CP. Thus, there now is one valid score to predict short-term treatment success (the EUTOS score) as well as a valid score to predict long-term outcome (the ELTS score) of patients treated with TKIs.

#### Strengths and limitations

The comprehensive nature of this study is its major strength and its main limitation at the same time. The prospective design, the size of the sample, the collection of all newly diagnosed patients from the territory, and not only from referral centers, and the participation of many countries with differences in health-care systems and patient management result in a comprehensive overview of the situation of CML in Europe. It reduced selection bias as far as possible and provides sufficiently representative and reliable estimates of treatment and outcome. However, with the

aim to collect information about all patients, it is not possible to reach the data quality of an intensively monitored clinical trial.

Underreporting of patients is possible for individual reasons such as health-care-seeking behaviors, limitation of mobility and socioeconomic reasons, as well as structural reasons such as reimbursement systems and clinical institutions that are not trained in epidemiological surveys.

Data on MMR were numerous and solid. More than 80% of quantitative PCR tests were performed at laboratories that had received their conversion factor through the ELN and EUTOS network and could express the results according to the IS.

The median follow-up of living patients was 29 months (range 12–73 months). Even with that comparatively short follow-up, the response and also the outcome are fairly representative of a period that is crucial for the assessment of the response, and to a slightly lesser extent for the calculation of progression, because most progressions occur within the first 2 years from diagnosis.<sup>16</sup> The calculation of a common estimator for relative survival was not possible as the reference survival of the population of the participating countries was too diverse.

#### CONCLUSION

The purpose of the EUTOS registry was to evaluate the quality of CML care and management in Europe and to give clinicians in routine care a reference of what can be expected. We found that during the registration period, newly diagnosed patients were treated according to the ELN recommendations, with rates of response and of short-term outcome comparable to the rates reported in prospective trials. Therefore, their results can be extended to the general population.

The data provide a solid, valid, unbiased overview of the management of CML in Europe during the past 5 years. They reflect a situation when first-line imatinib and second-line dasatinib and nilotinib were available, although with some different limitations and prices. This scenario is continuously moving, on the one hand, because there is a trend towards a

larger use of second-generation TKIs, and, on the other hand, because generic imatinib will become available very soon, and prices will likely be adjusted with affordability of higher dose imatinib. The late impact of these variables on outcome cannot be predicted and will not be known until some years from now. This registry will serve as a useful and unbiased reference for comparison and interpretation.

CML is a rare disease that was fatal and because of the success of science is now well controllable in most patients. This needed and needs rationalization and optimization of treatment and management to be pursued in an international cooperative effort such as established by the ELN to continue the successful research on the path to a cure of CML.

#### CONFLICT OF INTEREST

VSH, MB, and JH receive research funding from Novartis. FC has a consulting role and receives honoraria from Novartis, BMS, ARIAD and Pfizer. FR receives honoraria from BMS and has a consulting role at Novartis. LFC has a consulting role and receives funding for clinical research from Novartis, BMS and Pfizer. AT has a consulting role at Novartis, BMS and Pfizer. DZ receives funding of travel, accommodations or expenses from Novartis and BMS. AZ has a consulting or advisory role at and participated in a speakers' bureau for Novartis and received research funding from BMS. BS has a consulting or advisory role at BMS. ZS has a consulting or advisory role at Novartis. TS has a consulting role at Novartis, BMS, Adamed and Angelini. RC has had research funding from Novartis, Bristol-Myers-Squibb and Pfizer, and has been on the speakers bureau of Novartis and Pfizer in the past 5 years. AB has participated in a speakers' bureau and received research support from Novartis Pharma Services/Office in Serbia via the patient assistant support program. AH participated in a speakers' bureau for Novartis and BMS, receives research funding and funding of travel, accommodations or expenses from Novartis and BMS, and provides expert testimony for Novartis and BMS. LG receives research grants from Novartis. SB receives honoraria from Novartis, Celgene and AOP, has a consulting or advisory role at Novartis and Celgene and receives funding of travel, accommodations or expenses from Novartis and AOP. PK has a consulting or advisory role at GSK, BMS and Novartis, receives funding from Novartis, provides expert testimony for Pfizer and Novartis and receives funding of travel, accommodations or expenses from BMS and Ariad. DL receives research funding from Novartis. SS has received research support from Novartis and BMS and receives honoraria from Novartis, BMS, Ariad and Pfizer. AH has received research funding from Novartis. RH has received research support from Novartis, Consultant for BMS. KI, GSF, DS, JG, SL, IZ, HE, PC, GO and GR have no conflict of financial interests to declare.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

For the contribution to patient registration, data collection and follow-up, we thank Hana Klamova, Prague and Olga Cerna, Prague. The contribution of Jiri Mayer, Brno, as a chairman of the Czech Leukemia Study Group for Life, is also acknowledged. For the Camelia and Infinity study groups, very important support was given by Institution of Biostatistics and analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic (Vladimir Dusek, head, Jan Muzik, Zuzana Zbozinkova, Tomas Pavlik). In addition, Barbara Braithwaite, Florence Tarantin and the KROHEM (Croatian Cooperative Group for Hematologic Diseases) are acknowledged for their valuable contributions. We thank Catherine Sodan-Boyer and Gabi Bartsch for For the administrative support.

#### REFERENCES

- 1 Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol* 2015; **94**: 107–121.
- 2 Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007; **370**: 342–350.
- 3 Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF *et al*. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2013; **122**: 872–884.
- 4 Hehlmann R, Grimwade D, Simonsson B, Apperley J, Baccarani M, Barbui T *et al*. The European LeukemiaNet: achievements and perspectives. *Haematologica* 2011; **96**: 156–162.

- 5 Hoglund M, Sandin F, Hellstrom K, Bjoreman M, Bjorkholm M, Brune M *et al*. Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: report from the population-based Swedish CML registry. *Blood* 2013; **122**: 1284–1292.
- 6 Thielen N, Visser O, Ossenkuppe G, Janssen J. Chronic myeloid leukaemia in The Netherlands: a population-based study on incidence, treatment and survival in 3,585 patients from 1989–2012. *Eur J Haematol* 2016; **97**: 145–154.
- 7 Smith AG, Painter D, Howell DA, Evans P, Smith G, Patmore R *et al*. Determinants of survival in patients with chronic myeloid leukaemia treated in the new era of oral therapy: findings from a UK population-based patient cohort. *BMJ Open* 2014; **4**: e004266.
- 8 Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F *et al*. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; **108**: 1809–1820.
- 9 Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, Lindoerfer D, Burgstaller S, Sertic D *et al*. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia* 2015; **29**: 1336–1343.
- 10 Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G *et al*. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood* 2011; **118**: 686–692.
- 11 Hoffmann VS, Baccarani M, Lindoerfer D, Castagnetti F, Turkina A, Zaritsky A *et al*. The EUTOS prognostic score: review and validation in 1288 patients with CML treated frontline with imatinib. *Leukemia* 2013; **27**: 2016–2022.
- 12 Pffirmann M, Baccarani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkuppe G *et al*. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2016; **30**: 48–56.
- 13 Kalbfleisch JD, Prentice RL. *The Statistical Analysis of Failure Time Data*, vol. 36. Wiley: New York, NY, USA, 2011.
- 14 Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat* 1988; **16**: 1141–1154.
- 15 Castagnetti F, Gugliotta G, Breccia M, Stagno F, Iurla A, Albano F *et al*. Long-term outcome of chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib. *Leukemia* 2015; **29**: 1823–1831.
- 16 Saussele S, Silver RT. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Ann Hematol* 2015; **94**(Suppl 2): S159–165.
- 17 O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F *et al*. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; **348**: 994–1004.
- 18 Saglio G, Kim D-W, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C *et al*. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; **362**: 2251–2259.
- 19 Hochhaus A, Rosti G, Cross NC, Steegmann JL, le Coutre P, Ossenkuppe G *et al*. Frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the European ENEST1st study. *Leukemia* 2016; **30**: 57–64.
- 20 Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M *et al*. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; **362**: 2260–2270.
- 21 Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS *et al*. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 2012; **119**: 1123–1129.
- 22 Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Muller MC, Pletsch N *et al*. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon-alpha in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 1634–1642.
- 23 Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, Brummendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L *et al*. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 3486–3492.
- 24 Cortes JE, Baccarani M, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Kim DW *et al*. Phase III, randomized, open-label study of daily imatinib mesylate 400 mg versus 800 mg in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points: tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity study. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 424–430.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

## 4. Analýza dat pacientů s chronickou myeloidní leukemií léčených v každodenní klinické praxi

Zavedení prototypu TKI imatinibu do léčby pacientů s CML doslova revolučním způsobem změnilo osud pacientů, zejména pokud bylo onemocnění zjištěno v CP. Proces urychleného schválení regulačními autoritami a uvedení imatinibu do pozice nového zlatého standardu léčby pacientů s CML s nově zjištěným onemocněním byl motivován dominantně výsledky studie IRIS, zmiňované již v úvodní kapitole (Kapitola 1. Úvod) [5]. Na bázi výsledků téže studie byla také formulována první empirická doporučení pro léčbu a monitorování pacientů s CML v každodenní klinické praxi [39]. Je však známým faktem, že extrapolace dat získaných v klinických studiích na celkovou populaci pacientů je obtížná a někdy až nemožná z důvodu prokázaných rozdílů mezi pacienty léčenými v rámci a naopak vně klinických studií, jak se potvrdilo nejen u pacientů s CML, ale i s jinými nejen nádorovými onemocněními [10-12].

I přes povzbudivé důkazy o srovnatelných či dokonce i lepších výsledcích dosahovaných u pacientů s CML léčených imatinibem mimo rámec klinických studií [40-45], některé práce výborné výsledky dosažené ve studii IRIS nepotvrdily [46] a řada publikovaných analýz se vyznačovala nedostatky ve smyslu chybějících dat, pouze částečného pokrytí cílové populace či finančních omezení, která např. znemožnila další fungování registrů [47-49]. Příčinou diskrepancí ve výsledcích mohou být také alespoň z části rozdíly ve vybavenosti a erudici jednotlivých pracovišť či v míře, s jakou jsou následována platná doporučení.

Dalším faktorem, limitujícím nejen extrapolaci výsledků studií na všechny pacienty s daným onemocněním, ale i porovnání mezi studii navzájem a interpretaci výsledků v nich dosažených, je různorodost, jaká panuje ve výběru a definicích událostí v analýzách přežití [8]. Již v první publikaci výstupů samotné studie IRIS bylo přežití bez progresse (progression-free survival, PFS) definováno jako doba od zahájení léčby do úmrtí z jakékoliv příčiny, rozvoje akcelerované fáze (accelerated phase, AP) nebo blastické fáze (blast phase, BP), ztráty kompletní hematologické odpovědi (complete hematologic response, CHR), velké cytogenetické odpovědi (major cytogenetic response, MCyR) či do vzestupu leukocytů [5], aby v následných publikacích výsledků téže studie bylo přejmenováno na event-free survival (EFS) a pod původním názvem PFS byl prakticky bez varování uveden jiný typ analýzy s pouhými dvěma typy sledovaných událostí, a sice úmrtím a progresí do AP či BP [9]. Ukázalo se rovněž,



a to nejen ve studii IRIS, že analýzy, které nezahrnují důležité události v osudu léčených pacientů, jakými jsou ztráta CCyR, nedosažení příslušné léčebné odpovědi do určitého časového bodu či ukončení léčby například z důvodu její nesnášenlivosti, jsou do značné míry nadhodnocené a nereflktují skutečný stav léčby dané skupiny pacientů příslušným lékem [8,40]. Platí to mimo jiné pro situace, kdy se díky zavedení ještě účinnějších preparátů z řad TKI vyšších generací daří v případě selhání terapie imatinibem opětovně nastolit CCyR v asi 50 % případů a účinná „záchranná“ terapie tak může klesající trend křivek přežití bez události zvrátit [13-16]. Tato skutečnost však v klasických analýzách přežití rovněž není zohledněna.

Všechny výše uvedené aspekty nás přiměly k uskutečnění sondy do péče o pacienty s CML v tzv. reálném světě, či lépe v každodenní klinické praxi s cílem vyhodnotit účinnost a bezpečnost moderní terapie pomocí imatinibu v první linii, ale i TKI vyšších generací v liniích následujících, a porovnat námi dosažené výsledky s daty získanými z klinických studií. Základní premisa pro splnění vytyčeného úkolu – detailní a dobře fungující databáze – byla představena v předchozí kapitole (Kapitola 3. Vytvoření databáze pacientů s chronickou myeloidní leukemií). Níže jsou prezentovány její publikované analytické výstupy.

#### **4.1. Účinnost a snášenlivost léčby imatinibem v první linii v každodenní klinické praxi**

V první fázi bylo analýze podrobena celkem 152 konsekutivních pacientů (69 mužů a 83 žen, mediánu věku 55 let) diagnostikovaných v CP CML a léčených imatinibem v první linii v letech 2003 až 2009 v centrech v té době participujících v databázi INFINITY. Účinnost léčby byla hodnocena jednak pomocí funkce kumulativních incidencí léčebných odpovědí, kdy bylo po 4 letech terapie dosaženo CHR u 95,3 %, CCyR u 80,6 % a MMR u 65,4 % pacientů, jednak pomocí analýz přežití: odhadovaný OS a PFS ve 4 letech byl 91,5 % a 78,1 %. Námi dosažené výsledky obstály jak při porovnání s výsledky ze studie IRIS s analogickým mediánem sledování, tak se závěry z analýzy z Hammersmith Hospital zaměřené na pacienty léčené mimo rámec klinických studií [9,40]. V případě kumulativní incidence MMR byly naše výsledky dokonce lepší než byly reportovány z londýnského centra. Výskyt a intenzita NÚ u našich pacientů byly rovněž srovnatelné s projevy intolerance imatinibu v obou uvedených pracích.

S ohledem na skutečnosti zmíněné v úvodu kapitoly 4., týkající se neuspokojivého způsobu vyjadřování výsledků léčby TKI s velkou variabilitou definic událostí v analýzách přežití a chyběním celé řady důležitých událostí pro objektivní reflexi skutečné pozice daného léku v klinické praxi, jsme tradiční a běžně užívané analýzy přežití rozšířili o další parametry, jejichž definice jsou přehledně uvedeny v Tabulce 1 (Tabulka 1).

*Tabulka 1.* Definice událostí v analýzách přežití.

Událost (kterákoliv první)	OS	TFS	PFS	EFS	ATFS
Ztráta CHR	-	-	+	+	-
Ztráta MCyR	-	-	+	+	-
Progrese do AP/BP	-	+	+	+	-
Vzestup leukocytů	-	-	+	+	-
Smrt	+	+	+	+	+
Ztráta CCyR	-	-	-	+	-
Nedosažení CHR do 6 M	-	-	-	+	-
Nedosažení MCyR do 12 M	-	-	-	+	-
Nedosažení CCyR do 18 M	-	-	-	+	-
Vysazení IMA pro intoleranci	-	-	-	+	-
Start alternativní léčby	-	-	-	-	+

Vysvětlivky: OS, celkové přežití (*overall survival*); TFS, přežití bez transformace (*transformation-free survival*); PFS, přežití bez progrese (*progression-free survival*); EFS, přežití bez události (*event-free survival*); ATFS, přežití bez změny na alternativní léčbu (*alternative treatment-free survival*); CHR, kompletní hematologická odpověď (*complete hematologic response*); MCyR, velká cytogenetická odpověď (*major cytogenetic response*); CCyR, kompletní cytogenetická odpověď (*complete cytogenetic response*); AP, akcelerovaná fáze (*accelerated phase*); BP, blastická fáze (*blast phase*); IMA, imatinib; M, měsíc

Analýza, nazvaná přežití bez události (*event-free survival*, EFS), má charakter tzv. kompozitní analýzy a oproti parametrické skladbě PFS je obohacena o sledování událostí, jakými je ztráta CCyR, nedosažení léčebných odpovědí v daných časových bodech, jak je definují platná mezinárodní doporučení pro léčbu CML, a vysazení imatinibu z důvodu intolerance. Předpokládaný EFS ve 4 letech od nasazení imatinibu v našem souboru byl 60,7 %. Naše zjištění tak, zcela v souladu se zkušenostmi centra v Hammersmith Hospital, kde 5letá pravděpodobnost setrvání na léčbě imatinibem bez výskytu události byla 63 % [40], narušilo

optimismus s léčbou imatinibem spojený. Ukázalo se také, že i přes výskyt události významný podíl pacientů setrvává na léčbě imatinibem z různých důvodů, například na vrub vlastní či lékařovy preference. Na to konto jsme nadefinovali zcela nový parametr nazvaný **přežití beze změny na alternativní léčbu (alternative treatment-free survival, ATFS)**, který reflektuje pravděpodobnost setrvání na léčbě imatinibem nehledě na případnou událost, a tak lépe a realističtěji odráží pozici imatinibu v podmínkách každodenní klinické praxe. V našem souboru pacientů byla 4letá pravděpodobnost ATFS 67,6 %.

Naše výsledky, pokud jsme k jejich vyjádření použili tradičních analýz přežití, jakými jsou OS a PFS, potvrdily velmi dobrou účinnost imatinibu v první linii u pacientů s CP CML i mimo rámec klinických studií, v podmínkách kvalitní péče v erudovaných specializovaných centrech. Analogicky srovnatelná byla i snášenlivost terapie. Na druhou stranu jsme ukázali, že při vhodnější selekci událostí do tzv. time-to-event analýz, které reflektují mimo jiné všechny situace naplňující kritéria selhání léčby dle platných doporučení, získáme méně optimistický obraz efektivity dané léčby. Avšak ani kompozitní analýza charakteru EFS nereflektuje realitu zcela adekvátně, jak ukázala až kalkulace námi navrženého parametru ATFS, přinášejícího informaci o podílu pacientů skutečně setrvávajících na dané léčbě nehledě na výskyt události. Naše výsledky potvrdily důležitost sběru kvalitních dat a poukázaly na potřebu sjednocení výstupů ať již z každodenní praxe, tak z klinických studií. Významnou měrou jsme přispěli také k optimalizaci statistického hodnocení výsledků dosahovaných léčbou TKI, jak bude rozvedeno v další kapitole.

Výsledky výše uvedené analýzy byly publikovány v původní práci nazvané „Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials?“ v časopisu *American Journal of Hematology* (IF = 4,671 v roce 2011; Q1 v oboru HEMATOLOGY), kde uchazečka figuruje jako první i korespondující autor a která je uvedena a okomentována v Příloze 8 v podkapitole 4.4. Přílohy ke kapitole 4.

## 4.2. Zavedení nových způsobů statistického hodnocení výsledků léčby TKI u pacientů s CML

Náš originální vklad do statistického hodnocení výsledků léčby pomocí TKI u pacientů s CML v podobě nově definovaného parametru přežití nezůstal odbornou veřejností nepovšimnut. ATFS byl uznán mezinárodním panelem expertů jako validní a užitečný způsob hodnocení účinnosti léčby TKI a vedle tradičních analýz přežití se stal součástí oficiálních doporučení ELN pro statistické hodnocení výsledků klinických studií na poli CML, která byla publikována v roce 2012 v časopisu *Blood* (IF 9,06 v roce 2012, Q1 v oboru HEMATOLOGY) v práci autorů Guilhot J, Baccarani M, Clark RE, et al. Definitions, methodological and statistical issues for phase 3 clinical trials in chronic myeloid leukemia: a proposal by the European LeukemiaNet. *Blood*. 2012;119(25):5963-5971 (51 citací dle WOS) [36] (Obrázek 5).

BLOOD, 21 JUNE 2012 • VOLUME 119, NUMBER 25

DEFINITIONS AND METHODS IN CML TRIALS 5967

considered here are as follows: no response according to the ELN definition and recommended timelines at 3, 6, 12, and 18 months (Tables 1 and 2); loss of responses; AP or BC at any time; and death at any time. If a patient experiences several successive events, the date of failure is the date of the first of these events.

Within this definition, patients who are considered as failure in such analysis are (1) patients experiencing primary and secondary resistance to study treatment, including progression; and (2) patients who did not achieve response, lost response, or who progressed to AP/BC because of dose reduction or transient discontinuation of the study treatment related to toxicity or poor adherence.

Some other patients may have to switch to alternative therapy because of toxicities whatever the severity, even though they were responding to study treatment. In this context, the adverse event should be considered as a competing risk as described in "How to handle analyses."

The occurrences of adverse events are obviously not in favor of the study treatment. However, they are not considered as events of interest per se in this definition of "failure-free survival" (FFS). The reasons are that (1) adverse event does not necessarily mean "no response"; and (2) the severity of the adverse event does not necessarily correlate with dose intensity that the patient received before the assessment of the response. For example, even mild chronic toxicities may lead to poor compliance. Consequently, it is important to perform longitudinal analyses, including responses and duration of responses only, independently of the dose of treatment.

**EFS.** In an EFS analysis, the same events as for FFS analysis, plus drug discontinuation because of adverse events are considered, whichever comes first. The aim of this end point, which includes efficacy and toxicity considerations, is to assess the whole useful-

made up of the background mortality rate in the general comparator population (ie, deaths from all causes) plus the excess mortality rate associated with the condition of interest (ie, more additional deaths resulting from CML). When the comparator population is available, this method offers a useful tool for additional analyses.

**Alternative treatment-free survival (ATFS).** Discontinuation of the study treatment by patients still in chronic phase, in accelerated or in blastic phase, is a key issue. In clinical trials, the reasons for discontinuation mainly relate to objective failure or side effects. However, it may also relate to subjective inclinations, such as lack of compliance or unsatisfactory effects combining mild toxicities and suboptimal responses. In such situations, the panel strongly recommends not including subjective events in a failure or in an EFS analysis. Definition, assessment, and date of such events are not reliable; the date of discontinuation of the study treatment may also be questionable because of transient discontinuation.

In such a situation, the panel considers that the ATFS method, as documented by Zackova et al,<sup>38</sup> is a reasonable approach to assess the usefulness of a study treatment. Some reasons for switching to an alternative treatment may be subjective in some patients, but the switch per se is a robust marker; the study treatment is replaced, and the date of switch is easily assessable. As indicated by the term "survival," alternative treatment-free survival includes "death" also.

Of note, discontinuation of treatment for patients with sustained undetectable BCR-ABL transcripts has been recently proposed.<sup>10</sup> It could be considered a goal in future protocols. However, the discontinuation of therapy should not be considered as an event in all previous analyses. The favorable event is the achievement of the molecularly undetectable disease and then, if present, the unfavorable event would be the molecular relapse.

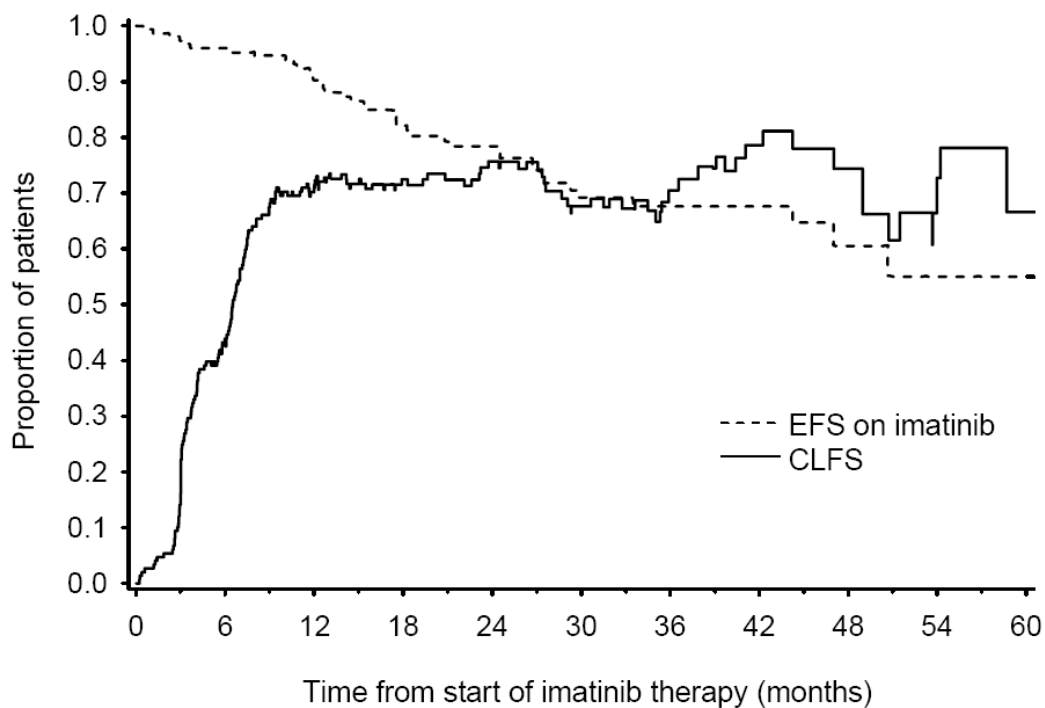
*Obrázek 5.* Výňatek z mezinárodních doporučení pro statistické hodnocení výsledků léčby v klinických studiích u CML s uznáním parametru alternative treatment-free survival (ATFS) [36].

V souvislosti se vstupem účinnějších TKI vyšších generací do léčby pacientů s CML, u nichž léčba imatinibem selhala nebo nebyla tolerována, vyvstala otázka, jak ideálně zhodnotit pozitivní vklad záchranné léčby podané ve 2. linii. Klasické analýzy přežití, vyjma přežití celkového, hodnotí události vzniklé pouze po dobu podávání příslušného preparátu a nezohledňují tak „záchranný efekt“ léčby druhé linie, kdy v přibližně 50 % případů původního nedosažení nebo ztráty je díky změně terapie na TKI 2. generace nastolena léčebná odpověď charakteru CCyR [13-16]. Limitace tradičního způsobu vyjadřování dlouhodobých výsledků léčby byla rozpoznána již v souvislosti s úspěšnou terapií relapsů po aloTKB pomocí infúzí dárcovských lymfocytů (donor lymphocyte infusion, DLI) a vyústila v zavedení nové kategorie statistického hodnocení osudu pacientů po prodělané transplantaci v podobě tzv. **current leukemia-free survival (CLFS)**, definovaného jako přežití bez známek leukemie v okamžiku recentního hodnocení a zohledňujícího vliv opakovaného podání DLI na stav zbytkového onemocnění [50].

Princip vyhodnocení aktuální léčebné odpovědi v daném časovém bodě pomocí CLFS jsme posoudili jako přílehlající i pro situaci u pacientů s CML, u nichž je ztracená léčebná odpověď znovunastolena nebo u primárně nereagujících nově dosažena po změně terapie v rámci 2. a následných linií. Soubor 152 pacientů primárně léčených imatinibem (viz Přílohu 8 v podkapitole 4.4. Přílohy ke kapitole 4) a v případě události selhání přecházejících na léčbu TKI 2. generace, dasatinibem či nilotinibem, jsme podrobili další analýze a získali 4letý odhadovaný CLFS 74,4 %. Oproti EFS, jehož 4letý odhad v našem souboru byl 60,7 %, je patrné, že v CLFS je událost „odsunuta“ v čase a pacientům je tak ponechána šance k obnově ztracené či zisku primárně nedosažené odpovědi (Obrázek 6). Analogicky byla modifikována i analýza typu kumulativní incidence léčebných odpovědi na tzv. **current cumulative incidence (CCI)** vyjadřující pravděpodobnost setrvání ve stavu remise onemocnění v daném čase od začátku léčby TKI, která, jak bylo uvedeno výše, může mít sekvenční charakter a jednou ztracená odpověď může být opětovně dosažena.

Problematicke CLFS a CCI jsme se detailně věnovali z metodologického hlediska v původní práci nazvané „Estimation of current cumulative incidence of leukaemia-free patients and current leukaemia-free survival in chronic myeloid leukaemia in the era of modern pharmacotherapy“ publikované autory Pavlík T, Janoušová E, Pospíšil Z, Mužík J, Žáčková D, Ráčil Z, Klamová H,

Cetkovský P, Trněný M, Mayer J, Dušek L v časopisu *BMC Med Res Methodol.* 2011;11:140 (IF 2,668 v roce 2011; Q1 v oboru HEALTH CARE SCIENCES & SERVICES). Klinický impakt nového způsobu hodnocení účinnosti terapie TKI u pacientů s CML byl prověřen na velkém souboru 723 pacientů z databází INFINITY a CAMELIA a výsledky publikovány v časopisu *American Journal of Hematology* (IF 3,477 v roce 2013; HEMATOLOGY Q1) v práci Pavlík T, Janousova E, Mayer J, Indrak K, Jarosova M, Klamova H, Zackova D, Voglova J, Faber E, Karas M, Machova Polakova K, Racil Z, Demeckova E, Demitrovicova L, Tothova E, Chudej J, Markuljak I, Cmunt E, Kozak T, Muzik J, Dusek L. Current survival measures reliably reflect modern sequential treatment in CML: correlation with prognostic stratifications. *Am J Hematol.* 2013;88(9):790-797, která je uvedena a okomentována jako Příloha 9 v podkapitole 4.4. Přílohy ke kapitole 4.



**Obrázek 6.** Srovnání přežití bez události (event-free survival, EFS) na imatinibu a "current leukemia-free survival" (CLFS) u 152 pacientů v CP CML léčených vstupně imatinibem. Odhadovaná 4letá pravděpodobnost setrvání v CCyR nehladě na vysazení imatinibu a změnu na jinou terapii (CLFS) versus pravděpodobnost setrvání na imatinibu v CCyR (EFS) byla 74,4 % versus 60,7 %.

Použití funkcí CLFS a CCI, odrážejících efektivitu případného sekvenčního podání TKI, přineslo nový pohled na způsob statistického hodnocení dlouhodobé terapie, ke které je odkázána

většina pacientů s CML a v případě které tradiční analýzy přežití mohou vést ke zkreslení analyzovaných výsledků.

### **4.3. Dasatinib ve druhé linii po selhání a/nebo intoleranci imatinibu v každodenní praxi**

Zavedení účinných TKI 2. generace do léčby pacientů s CML, u kterých terapie první linie selhala či nebyla tolerována, vedlo jednak k rozšíření portfolia databáze INFINITY i na tyto klinické situace, jednak k dalším analýzám koncentrovaným na účinnost a snášenlivost léčby ve druhé linii. Rovněž zde panuje nedostatek informací z reálné klinické praxe a podobně jako v linii první je i ve výstupech z klinických studií na toto téma přítomna diskrepance ve způsobu hodnocení efektu léčby a v definicích událostí v analýzách přežití [13-16,51,52].

V naší analýze jsme se zaměřili na pacienty léčené dasatinibem ve druhé linii po selhání či intoleranci terapie imatinibem. Dasatinib je představitelem TKI 2. generace, *in vitro* 325 krát účinnějším než je imatinib v inhibici nemutované Bcr-Abl1 kinázy i většině jejích mutovaných variant. Do druhé linie léčby pro pacienty v CP byl uveden na základě výsledků studií fáze II nazvaných START-C a START-R [14,15]. Účinnost terapie dasatinibem u pacientů po selhání imatinibu či jeho netoleranci se v obou studiích pohybovala po 2 letech terapie kolem 50 % dosažených CCyR a 40 % MMR. Obě studie však vydaly data pouze po 2 letech od zahájení léčby dasatinibem, další osud pacientů však bohužel není znám. Jedinou studií s dlouhodobým sledováním účinnosti a bezpečnosti dasatinibu ve druhé linii byla studie fáze III CA180-034 zaměřená na optimalizaci dávky dasatinibu, z níž vzešla nová standardní denní doporučená dávka pro pacienty v CP, a sice 100 mg jednou denně [53,54]. Právě kohorta pacientů léčených ve studii v dávkovacím schématu 100 mg 1x denně (n = 166) nám posloužila pro nepřímé porovnání s našimi pacienty léčenými v podmínkách každodenní praxe.

Předmětem naší první analýzy bylo 106 pacientů s CML (74 v CP, 15 v AP a 17 v BP v době zahájení terapie dasatinibem) léčených dasatinibem ve druhé linii v době od 11/2005 do 12/2011 ve 3 centrech specializované hematologické péče přispívajících do databáze INFINITY. Medián sledování na terapii dasatinibem pro pacienty v CP byl 28 měsíců a pro pacienty v AP/BP 10 měsíců. Pro pacienty v CP byla 2letá pravděpodobnost dosažení CHR 93 %, CCyR 60 % a MMR 51 %; v AP/BC byly 2leté kumulativní incidence CHR, CCyR a MMR 50 %, 19 % a 9

% Co se analýz přežití týče, v souladu s aktualizovanou verzí doporučení ELN pro management pacientů s CML [55] byly aktualizovány kompozitní analýzy: místo EFS bylo definováno přežití bez selhání terapie (failure-free survival, FFS) a dále přežití bez úplného selhání terapie (total failure-free survival, TFFS), přičemž definice dalších parametrů zůstaly beze změny (Tabulka 2). Pravděpodobnost přežití bez události ve 2 letech od zahájení terapie v CP byla následující: OS 92 %, TFS 95 %, PFS 89 %, ATFS 68 %, FFS 63 % a TFFS 61 %. Analogické hodnoty pro pacienty v AP/BP byly 39 %, 53 %, 40 %, 28 %, 19 % a 19 %.

**Tabulka 2.** Definice událostí v analýzách přežití při léčbě dasatinibem ve 2. linii.

Událost (kterákoliv byla první)	OS	TFS	PFS	FFS	TFFS	ATFS
Ztráta CHR	-	-	+	+	+	-
Ztráta MCyR	-	-	+	+	+	-
Progrese do AP/BP	-	+	+	+	+	-
Nárůst WBC (nikdy nebyla CHR)	-	-	+	+	+	-
Smrt z jakékoliv příčiny	+	+	+	+	+	+
Ztráta CCyR	-	-	-	+	+	-
Není CyR ve 3 M, nové mutace	-	-	-	+	+	-
Není minimal CyR v 6 M, n. mutace	-	-	-	+	+	-
Není MCyR ve 12 M, nov. mutace	-	-	-	+	+	-
Ukončení DASA pro intoleranci	-	-	-	+	+	-
Ukončení DASA jakékoliv	-	-	-	-	+	-
Start alternativní terapie	-	-	-	-	-	+

Vysvětlivky: OS, celkové přežití (*overall survival*); TFS, přežití bez transformace (*transformation-free survival*); PFS, přežití bez progrese (*progression-free survival*); FFS, přežití bez selhání (*failure-free survival*); TFFS, přežití bez úplného selhání (*total failure-free survival*); ATFS, přežití bez alternativní léčby (*alternative treatment-free survival*); CHR, kompletní hematologická odpověď (*complete hematologic response*); MCyR, velká cytogenetická odpověď (*major cytogenetic response*); CCyR, kompletní cytogenetická odpověď (*complete cytogenetic response*); AP, akcelerovaná fáze (*accelerated phase*); BP, blastická fáze (*blast phase*); WBC, leukocyty (*white blood cells*); DASA, dasatinib; M, měsíc

Nehematologická toxicita všech stupňů závažnosti byla přítomna u 67,5 % pacientů v CP a 81 % pacientů AP/BP, s 24 %, resp. 28 % pacientů s NÚ stupně 3/4 dle CTCAE. Pleurální výpotky, coby nejsledovanější NÚ dasatinibu, byly přítomny u 26 % pacientů v CP a 28 % v AP/BP.



Při nepřímém porovnání s kohortou pacientů v CP léčenou dasatinibem v dávce 100 mg 1x denně v rámci studie CA180-034, kde byly 2leté pravděpodobnosti dosažení CHR 92 %, CCyR 50 %, MMR 37 %, OS 91 % a PFS 80 % vyšly naše výsledky analogicky a v některých parametrech dokonce příznivěji. Také neutropenie a trombocytopenie gr. 3/4 jevíly u našich pacientů nižší výskyt než ve studii. Nízký počet pacientů v pokročilé fázi CML podobné porovnání znemožnil.

Naše analýza potvrdila dobrou účinnost a bezpečnost dasatinibu ve druhé linii u pacientů léčených převážně mimo rámec klinických studií. Kvalitní a kvalifikovaná centralizovaná péče v ČR umožňuje dosažení nejen velmi dobrých léčebných výsledků, místy převyšujících výsledky z klinických studií, ale také vedení detailní databáze schopné evidovat všechny důležité události a mezníky léčby. Ty potom slouží ke kompozici analýz typu FFS, TFFS či ATFS, které sice ve většině reportů ze studií nenajdeme, ale které umožňují reálněji posoudit pozici příslušného léku v klinické praxi.

Práce autorského kolektivu Zackova D, Klamova H, Muzik J, Cmunt E, Racil Z, Machova Polakova K, Dvořáková D, Jurcek T, Razga F, Cetkovsky P, Dusek L, Mayer J. nazvaná „Efficacy and tolerance of dasatinib after imatinib failure or intolerance for patients with chronic myeloid leukemia treated in three different hospitals compare well with results achievable in formal clinical trials“ byla publikována v časopisu *Leukemia & Lymphoma* v roce 2013 (IF 2,605 v roce 2013; Q2 v oboru ONCOLOGY) a je součástí kapitoly 4.4. Přílohy ke kapitole 4 jako Příloha 10. Uchazečka zde figuruje jako první i korespondující autorka.

Jak již bylo zmíněno, dlouhodobé sledování pacientů nabídne málokterá studie, ačkoliv léčba TKI je u většiny pacientů celoživotní. Právě dlouhodobá účinnost a zejména pak snášenlivost terapie vystupují do popředí ve světle narůstající evidence mnohdy velmi závažných NÚ TKI vyšších generací, jakými jsou cévní uzávěry při terapii nilotinibem a ponatinibem nebo plicní arteriální hypertenze a pleurální výpotky při léčbě dasatinibem [20-22]. Otázku dlouhodobé účinnosti a bezpečnosti podávání dasatinibu v reálné praxi jsme se pokusili zodpovědět vyhodnocením dat 118 pacientů (60 mužů a 58 žen, mediánu věku 60 let v době zahájení terapie dasatinibem) v CP CML, léčených dasatinibem ve druhé linii v letech 2006 až 2019 ve 4 centrech přispívajících do databáze INFINITY. Odhadované kumulativní incidence CCyR, MMR a MR4.0, definované jako hladina *BCR-ABL1* transkriptů  $\leq 0,01$  % na mezinárodní škále

(International Scale, IS), v 5 letech byly 78 % (95% konfidenční interval [CI]: 69-85), 68 % (95% CI: 58-76) a 48 % (95% CI: 37-57). Definice událostí v analýzách přežití byly v souladu s platnými doporučeními [36] následující: OS bylo definováno jako doba od zahájení terapie dasatinibem do úmrtí kdykoliv, nehledě na vysazení dasatinibu, resp. ukončení terapie; PFS jako přežití bez progresu do AP/BP či úmrtí kdykoliv, nehledě na ukončení terapie dasatinibem; EFS jako doba od zahájení terapie dasatinibem do ztráty CHR, MCyR, do progresu do AP/BP, či vzestupu leukocytů bez předchozí CHR či úmrtí; FFS bylo kromě událostí obsažených v EFS obohaceno ještě o ztrátu CCyR, kritéria selhání dle aktualizovaných ELN doporučení [56] a vysazení dasatinibu pro intoleranci, a konečně v TFFS kromě všeho výše uvedeného ještě figurovalo ukončení léčby dasatinibem z jakéhokoliv důvodu. Definice ATFS se nelišila od předchozích již zmíněných analýz. Odhadované OS, PFS, EFS, ATFS, FFS a TFFS v 5 letech od zahájení léčby dasatinibem bylo následující: 86% (95% CI: 79-94), 85% (95% CI: 78-93), 83% (95% CI: 76-92), 53% (95% CI: 44-65), 43% (95% CI: 34-56) a 39% (95% CI: 30-51). Jak OS, tak EFS byly signifikantně lepší u pacientů, kteří dosáhli ve 3 měsících od zahájení terapie tzv. časné molekulární odpovědi, tj. poklesu hladiny transkriptů *BCR-ABL1*  $\leq 0,1$  %. Pleurální výpotky se vyskytly u 29 % pacientů a byly zodpovědné za 30 % případů trvalého ukončení terapie dasatinibem. Unikátní analýza incidence klinických nehematologických NÚ v čase ukázala, že i po letech terapie jsou tyto přítomny u téměř poloviny léčených pacientů. Obávaná plicní arteriální hypertenze (PAH) se nevyskytla u žádného pacienta ze souboru a incidence arteriálních ischemických příhod byla nízká (2 %).

Výsledky výše uvedené analýzy, která potvrdila výbornou účinnost a dobrou toleranci léčby dasatinibem ve druhé linii v podmínkách každodenní klinické praxe ukotvené do rámce centralizované péče, byly recentně publikovány v časopisu *Leukemia & Lymphoma* (IF v 2019/2020 2,969; Q2 v oboru HEMATOLOGY, Q3 v oboru ONCOLOGY) v práci nazvané „Dasatinib Treatment Long-Term Results among Imatinib-Resistant/Intolerant Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia are Favourable in Daily Clinical Practice“, která je uvedena jako Příloha 11 v kapitole 4.4. Přílohy ke kapitole 4 a kde figuruje uchazečka jako první i korespondující autorka.

Výsledky analýz účinnosti a bezpečnosti TKI u pacientů s CML léčených v podmínkách každodenní klinické praxe v rámci kvalitní centralizované péči podpořené vysoce senzitivními

a standardizovanými metodami molekulárního monitoringu a s pomocí detailního a pečlivě vedeného sběru dat v jedné z nejvýznamnějších evropských databází pacientů s CML významně přispěly jednak ke stavu vědění na tomto poli, jednak přinesly nový pohled na zavedené způsoby statistického hodnocení výsledků. Mezinárodní dopad našeho úsilí dokladuje jak citační ohlas vybraných příspěvků, tak uznání námi navržených parametrů „time-to-event“ analýz odbornou komunitou a jejich začlenění do oficiálních mezinárodních doporučení pro statistické analýzy u CML [36].

Kompletní přehled původních prací čerpajících z databáze INFINITY, na kterých se autorsky uchazečka podílela, je následující (řazeno chronologicky vzestupně):

- Mayer J., Klamová H., Žáčková D., Cetkovský P., Doubek M., Moravcová J., Rulcová J., Machová K., Dvořáková D., Jurček T., Březinová J., Michalová K., Zemanová Z., Oltová A. Imatinib v první linii léčby nemocných s nově diagnostikovanou chronickou myeloidní leukemií v chronické fázi. *Transfuze a Hematologie Dnes*. 2008;14(4):150-158.
- Žourková A., Kalvodová L., Mayer J., Žáčková D. Sexualita u pacientů s chronickou myeloidní leukemií léčených imatinibem. *Ceska a Slovenska Psychiatrie*. 2010;106(5):273-277.
- Racil Z, Klamova H, Voglova J, Faber E, Razga F, Zackova D, Buresova L, Cetkovsky P, Mayer J. Persistent splenomegaly during imatinib therapy and the definition of complete hematological response in chronic myelogenous leukemia. *American Journal of Hematology*. 2010; 85(5):386-389. IF = 3,576 v roce 2010; HEMATOLOGY Q2.
- Klamova H, Faber E, Zackova D, Markova M, Voglova J, Cmunt E, Novakova L, Machova-Polakova K, Moravcova J, Dvorakova D, Michalova K, Brezinova J, Oltova A, Jarosova M, Cetkovsky P, Indrak K, Mayer J. Dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant CML patients: data from the clinical practice of 6 hematological centers in the Czech Republic. *Neoplasma*. 2010; 57(4):355-359. IF = 1,449 v roce 2010; ONCOLOGY Q4 (9 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací).
- Voglova J, Muzik J, Faber E, Zackova D, Klamova H, Steinerova K, Michalovicova Z, Demitrovicova L, Cmunt E, Novakova L, Tothova E, Belohlavkova P, Mayer J, Indrak K. Incidence of second malignancies during treatment of chronic myeloid leukemia with

- tyrosine kinase inhibitors in the Czech Republic and Slovakia. *Neoplasma*. 2011;58(3):256-262. IF = 1,440 v roce 2011; ONCOLOGY Q3 (23 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací).
- Zackova D\*, Klamova H, Dusek L, Muzik J, Polakova KM, Moravcova J, Jurcek T, Dvorakova D, Racil Z, Pospisil Z, Oltova A, Michalova K, Brezinova J, Razga F, Doubek M, Cetkovsky P, Trneny M, Mayer J. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials? *American Journal of Hematology*. 2011;86(3):318-321. IF = 4,671 v roce 2011; HEMATOLOGY Q1; \*uchazečka je korespondující autorkou (viz Přílohu 8 v podkapitole 4.4.1.) (8 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací)
  - Pavlík T, Janoušová E, Pospíšil Z, Mužík J, Žáčková D, Ráčil Z, Klamová H, Cetkovský P, Trněný M, Mayer J, Dušek L. Estimation of current cumulative incidence of leukaemia-free patients and current leukaemia-free survival in chronic myeloid leukaemia in the era of modern pharmacotherapy. *BMC Medical Research Methodology* [online]. 2011;11,140. IF = 2,668 v roce 2011; HEALTH CARE SCIENCES & SERVICES Q1 (4 citace ve WOS či Scopus, bez autocitací)
  - Klamova H., Polakova KM., Muzik J., Racil Z., Zackova D., Steinerova K., Karas M., Faber E., Demeckova E., Michalovicova-Sninska Z., Voglova J., Demitrovicova L., Mikuskova E., Tothova E., Chudej J., Markuljak I., Cmunt E., Moravcova J., Dvorakova D., Michalova K., Jarosova M., Stastna MM., Cetkovsky P., Dusek L., Koza V., Trneny M., Indrak K. Evaluation of 5-year imatinib treatment of 458 patients with CP-CML in routine clinical practice and prognostic impact of different BCR-ABL cutoff levels. *Cancer Medicine*. 2013;2(2):216-225.
  - Pavlik T, Janousova E, Mayer J, Indrak K, Jarosova M, Klamova H, Zackova D, Voglova J, Faber E, Karas M, Machova Polakova K, Racil Z, Demeckova E, Demitrovicova L, Tothova E, Chudej J, Markuljak I, Cmunt E, Kozak T, Muzik J, Dusek L. Current survival measures reliably reflect modern sequential treatment in CML: correlation with prognostic stratifications. *American Journal of Hematology*. 2013;88(9):790-797. IF = 3,477 v roce 2013; HEMATOLOGY Q1 (4 citace ve WOS či Scopus, bez autocitací) (viz Přílohu 9 v podkapitole 4.4.2.)

- Zackova D<sup>‡\*</sup>, Klamova H<sup>‡</sup>, Muzik J, Cmunt E, Racil Z, Machova Polakova K, Dvořákova D, Jurcek T, Razga F, Cetkovsky P, Dusek L, Mayer J. Efficacy and tolerance of dasatinib after imatinib failure or intolerance for patients with chronic myeloid leukemia treated in three different hospitals compare well with results achievable in formal clinical trials. *Leukemia & Lymphoma*. 2013;54(10):2310-2313; IF = 2,605 v roce 2013; ONCOLOGY Q2; <sup>‡</sup>obě autorky se podílely stejným dílem, <sup>\*</sup> uchazečka je korespondující autorkou (viz Přílohu 10 v podkapitole 4.4.3.)
- Zackova D.<sup>\*</sup>, Klamova H., Belohlavkova P., Stejskal L., Necasova T., Semerad L., Weinbergerova B., Srbova D., Voglova J., Cikatková P., Sustkova Z., Hornak T., Baranova J., Prochazkova J., Mayer J. Dasatinib Treatment Long-Term Results among Imatinib-Resistant/Intolerant Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia are Favourable in Daily Clinical Practice. *Leukemia & Lymphoma*. 2020 Oct 6:1-9. doi: 10.1080/10428194.2020.1827242. Epub ahead of print. PMID: 33021423; IF v 2019 2,969, HEMATOLOGY Q2, ONCOLOGY Q3. <sup>\*</sup> uchazečka je korespondující autorkou (viz Přílohu 11 v podkapitole 4.4.4.)

## 4.4. Přílohy ke kapitole 4

### 4.4.1. Příloha 8

Zackova D\*, Klamova H, Dusek L, Muzik J, Polakova KM, Moravcova J, Jurcek T, Dvorakova D, Racil Z, Pospisil Z, Oltova A, Michalova K, Brezinova J, Razga F, Doubek M, Cetkovsky P, Trneny M, Mayer J. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials? *American Journal of Hematology*. 2011;86(3):318-321. (\*uchazečka první i korespondující autorkou)

IF = 4,671 v roce 2011; HEMATOLOGY Q1; 8 citací ve WOS či Scopus, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Analýze podrobena 152 konsektivních dospělých pacientů (69 mužů a 83 žen, mediánu věku 55 let) s nově zjištěnou CML v CP léčených imatinibem v první linii a evidovaných v databázi INFINITY, medián sledování na imatinibu 31,2 měsíců
- Odhadované 4leté kumulativní incidence léčebných odpovědí byly následující: CHR 95,3 %, CCyR 80,6 % a MMR 65,4 %
- Odhadované 4leté pravděpodobnosti v analýzách přežití byly následující: OS 91,5 %, TFS 88,4 % a PFS 78,1 %
- Potvrdili jsme velmi dobrou účinnost a toleranci imatinibu v první linii i u pacientů léčených mimo rámec klinických studií, ve vysoce kvalifikovaných a erudovaných centrech specializované hematologické péče
- Pravděpodobnost setrvání na imatinibu bez událostí selhání terapie definovaných dle platných doporučení, či bez ukončení léčby pro intoleranci ve 4 letech, vyjádřená parametrem event-free survival (EFS), však byla jen 60,7 %
- Námi nově definovaný parametr, tzv. alternative treatment-free survival (ATFS), vyjadřující setrvání na dané terapii nehledě na výskyt události selhání, jehož 4letý

odhad v našem souboru byl 67,6 %, reflektuje pozici daného léku v každodenní klinické praxi realističtěji než tradiční analýzy přežití

- Na kvalitních datech z každodenní klinické praxe jsme ukázali, že při použití tradičních analýz přežití, jakými jsou OS, TFS a PFS, jsou naše výsledky srovnatelné s klinickými studiemi, a naopak, při vhodnějším výběru událostí, reflektujících platná doporučení pro léčbu a definujících analýzy typu EFS či ATFS, je patrná jistá míra nadhodnocení výsledků ve studiích
- Definicí parametru ATFS, začleněného následně do oficiálních doporučení ELN pro statistické hodnocení výsledků studií u CML [35], jsme významně přispěli k optimalizaci postupu při hodnocení a srovnávání efektivity dlouhodobé léčby pomocí TKI
- Publikace byla dále citována v review předních expertů na poli CML J. Cortese a H. Kantarjiana, nazvaném “How I treat newly diagnosed chronic phase CML” a publikovaném v roce 2012 v časopisu *Blood* (IF 9,060, HEMATOLOGY Q1), se 72 citacemi uvedenými v databázi WOS [56]

versely, Frey et al. recently reported the transmission and engraftment of a clone bearing trisomy 8, initially masquerading as possible DCL, from a donor later identified to display constitutive trisomy 8 mosaicism [15].

However, simple transfer of frank malignancy cannot explain the majority of DCL cases since no other donors were reported to themselves develop leukemia. Moreover, many had been subsequently recalled for clinical assessment and BM examination, with no evidence of the culpable disease clone detected. Therefore, additional donor-, recipient-, and transplant-related factors must be involved in triggering and/or supporting the frank malignant transformation. Several putative mechanisms have been proposed, including: pre-leukemic potential of donor HSCs; transfection of latent viruses or other oncogenic material released during conditioning; hybridization of transplanted cells with residual malignant host cells; increased replicative stress and accelerated telomere attrition of donor HSCs; residual effects of prior chemo-/radiotherapy (including "radiation-induced bystander effects"); defective BM micro-environment (either innate or consequent on prior therapy); and impaired immune tumor surveillance in the immunocompromised transplant recipient. However, the paucity of reported cases and absence of prospective series preclude identification of any unifying mechanisms or risk factors, although a multifactorial, multiple hit pathogenesis appears likely.

The entity of DCL raises important ethical questions regarding the duty towards donor notification in these cases. Most registries have a policy of informing donors of serious developments that might have impact on their health, yet from the available evidence it seems doubtful that donors are at increased risk of developing leukemia. Consequently, most commentators have concluded that the anxiety resulting from such communication cannot currently be justified. This issue is particularly complex in the context of DCL following cord blood (CB) transplantation, after which DCL might be disproportionately common (owing to the observed high prevalence of potentially pre-leukemic clones detectable in CB samples) [16]. Furthermore, in some cases donors may have withdrawn from the registry (as in our case) and contact details may not have been maintained. This question remains unanswered, but the growing awareness of this important transplant complication should enable prospective collation and detailed examination of future cases, and ultimately provide clarification of this difficult ethical dilemma.

<sup>1</sup>*Haematology and Transplant Unit, Christie Hospital, Manchester, United Kingdom;* <sup>2</sup>*Transplantation Laboratory, Manchester Royal Infirmary, Manchester, United Kingdom*

\*Correspondence to: Daniel H. Wiseman, Christie Hospital, Withington, Manchester M20 4BX, United Kingdom  
E-mail: daniel.wiseman@cmlt.nhs.uk

Conflict of interest: Nothing to report.

Published online 22 November 2010 in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com).  
DOI: 10.1002/ajh.21938

## References

- Kohl SK, Aoun P. Granulocytic sarcoma of the small intestine. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1570–1574.
- Yamauchi K, Yasuda M. Comparison in treatments of nonleukemic granulocytic sarcoma: Report of two cases and a review of 72 cases in the literature. *Cancer* 2002;94:1739–1746.
- Chevallier P, Mohty M, Lioure B, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for myeloid sarcoma: A retrospective study from the SFGM-TC. *J Clin Oncol* 2008;26:4940–4943.
- Tan D, Wong GC, Koh LP, et al. Successful treatment of primary granulocytic sarcoma by non-myeloablative stem cell transplant. *Leuk Lymphoma* 2006; 47:159–162.
- Kowal-Vern A, Johnson FL, Trujillo Y, et al. Granulocytic sarcoma of the ileum treated by bone marrow transplantation. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13:34–38.
- Kitagawa Y, Sameshima Y, Shiozaki H, et al. Isolated granulocytic sarcoma of the small intestine successfully treated with chemotherapy and bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 2008;87:410–413.
- Fialkow PJ, Thomas ED, Bryant JL, et al. Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet* 1971;1:251–255.
- Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Garoós-Eisele J. Donor cell leukemia: A critical review. *Leuk Lymphoma* 2007;48:25–38.
- Hertenstein B, Hambach L, Bacigalupo A, et al. Development of leukemia in donor cells after allogeneic stem cell transplantation—A survey of the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). *Haematologica* 2005;90:969–975.
- Boyd CN, Ramberg RC, Thomas ED. The incidence of recurrence of leukemia in donor cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Res* 1982;6:833–837.
- Niederwieser DW, Appelbaum FR, Gastil G, et al. Inadvertent transmission of a donor's acute myeloid leukemia in bone marrow transplantation for chronic myelocytic leukemia. *N Engl J Med* 1990;322:1794–1796.
- Baron F, Dresse M-F, Beguin Y. Transmission of chronic myeloid leukemia through peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2003;349: 913–914.
- Berg KD, Brinster NK, Huhn KM, et al. Transmission of a T-cell lymphoma by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 2001;345:1458–1463.
- Mielcarek M, Bryant E, Loken M, et al. Long-term engraftment and clonal dominance of donor-derived del(20q) hematopoietic cells after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2006;107:1732–1733.
- Frey NV, Leid CE, Nowell PC, et al. Trisomy 8 in an allogeneic stem cell transplant recipient representative of a donor-derived constitutional abnormality. *Am J Hematol* 2008;83:846–849.
- Greaves MF. Cord blood donor cell leukemia in recipients. *Leukemia* 2006;20: 1633–1634.

## Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials?

Daniela Zackova,<sup>1\*</sup> Hana Klamova,<sup>2</sup> Ladislav Dusek,<sup>3</sup> Jan Muzik,<sup>3</sup> Katerina Machova Polakova,<sup>2</sup> Jana Moravcova,<sup>2</sup> Tomas Jurcek,<sup>1</sup> Dana Dvorakova,<sup>1</sup> Zdenek Racil,<sup>1</sup> Zdenek Pospisil,<sup>4</sup> Alexandra Oltova,<sup>5</sup> Kyra Michalova,<sup>2</sup> Jana Brezinova,<sup>2</sup> Filip Razga,<sup>1</sup> Michael Doubek,<sup>1</sup> Petr Cetkovsky,<sup>2</sup> Marek Trneny,<sup>2</sup> and Jiri Mayer<sup>1</sup>

Imatinib (IM) dramatically improved the prognosis of chronic myeloid leukemia (CML), particularly with newly diagnosed patients in a chronic phase (CP) [1]. The most robust source of data about IM efficacy in this setting is the IRIS trial. However, every day clinical practice data are still scarce. We analyzed IM efficacy and safety in the first-line therapy of 152 consecutive adult CP-CML patients from a defined region. The estimated 4-year cumulative incidences of complete hematologic, complete cytogenetic, major, and complete molecular responses were 95.3%, 80.6%, 65.4%, and 39.2%, respectively. The 4-year probability of overall and progression-free survival (PFS)

defined as with the IRIS [2] was 91.5% and 78.1%, respectively. We thus confirmed very good IM efficacy also in patients not participating in clinical trials. However, the estimated 4-year event-free survival (EFS), which also counted failure events according to valid recommendations [3] or IM discontinuation due to intolerance, was only 60.7%. The 4-year probability of an alternative treatment-free survival, our newly defined parameter, which better reflects the proportion of patients remaining on IM despite an event, was 67.6%. Therefore, more appropriate selection and unification of survival analyses end-points is desirable to describe and compare IM real efficacy.



Based on results from the International Randomized Study of Interferon versus ST1571 (IRIS), IM is currently recommended as front-line therapy for patients with CML in CP [2–5]. However, clinical trial results extrapolation to an entire patient population is difficult and sometimes nearly impossible due to significant differences between in-study and out-study patient populations, as was shown with CML [6] and also with other malignant diseases [7]. Despite several years of experience with IM use in first-line CML treatment, real-life data have been scarce [8], and some data did not confirm excellent results achieved during the IRIS trial [9]. Another factor making clinical trial results extrapolation and comparison difficult is a wide variability of survival analyses end-point definitions [2,4,8,10,11].

In the Czech Republic, the care of CML patients is concentrated at only six specialized centers, which cover a virtually complete population from a defined region. Informative real life data can thus be obtained.

Between July 2003 and July 2009, 152 consecutive adult patients with CML in CP received IM as first-line therapy in two of the largest hematological centers in the Czech Republic. The baseline characteristics are presented in Table 1. The median follow-up on IM treatment was 31.2 months (range, 5.7–68.1). The median of mean actually administered daily dose was 400 mg. Dose was escalated to 600–800 mg/day in 23 (15.1%) of patients, mainly because of inadequate response. The dose was reduced or treatment interrupted by 93 (61.2%) of patients, mainly because of side effects. In total, 36 patients (23.7%) permanently discontinued IM after a median of 16.0 months (range, 1.0–51.1) since the start of therapy for various reasons: Progression or IM failure ( $n = 20$ ), elective allogeneic transplantation ( $n = 4$ ), IM intolerance ( $n = 9$ ), and death from non-CML-related causes ( $n = 3$ ).

IM efficacy is presented in Fig. 1. At first, treatment responses on hematologic, cytogenetic, and molecular levels achieved at given time points are presented (Fig. 1A). Patient disposition reflecting treatment response definition according to European LeukemiaNet (ELN) recommendations [3] is shown in Fig. 1B. The 4-year cumulative incidence of CHR was 95.3% (95% CI: 91.7–98.9%), CCgR 80.6% (95% CI: 72.9–88.2%), major molecular response (MMoR) 65.4% (95% CI: 56.7–74.1%), and complete molecular response (CMoR) 39.2% (95% CI: 27.6–50.7%) (Fig. 1C).

In total, nonhematological and hematological toxicities of all grades occurred in 119 (78.3%) and 95 (62.5%) patients, respectively. The toxicity profile was comparable to published experience, with most adverse events being of grades 1 or 2 and manageable by dose reduction or treatment interruption. Grades 3 and 4 of nonhematological and hematological toxicities occurred in 13 (8.5%) and 19 (12.5%) patients, respectively.

Figure 2A shows a comprehensive set of time-to-event analyses. Estimated overall (OS) and transformation-free survival (TFS) at 4 years were 91.5% (95% CI: 84.8–98.2%) and 88.4% (95% CI: 80.4–96.3%), respectively. In total, seven patients died (4.6%) in a median of 27 months (range, 13.1–38.8) since the start of IM—three patients from CML-unrelated reasons and four patients from disease progression. Probability of PFS—defined according to first IRIS report [2]—was 78.1% (95% CI: 68.0–88.2%) at 4 years. However, this IRIS definition has not included events, which fulfilled criteria for failure according to ELN [3] and also discontinuations of IM due to intolerance. After including these important events into the definition of EFS, the 4-year probability of being in CCgR still receiving IM was only 60.7% (95% CI: 48.3–73.2%). At the time of data analysis, 10 patients among those with events (40; 26.3%) continued on IM, and the remaining 30 patients stopped IM before the date of analysis. The reasons for continuing on IM despite the event were various, including patient preference to stay on IM in case of less than CCgR at 18 months and attempt to achieve response with IM dose escalation. For the estimation of patients proportion actually receiving IM in spite of possible event, we performed analysis called alternative treatment-free survival (ATFS). The 4-year probability of remaining on first-line IM treatment in real clinical practice was 67.6% (95% CI: 56.9–78.3%).

The 4-year probability of being alive, progression-free, alternative treatment-free, and event-free was calculated also for the subset of patients achieving at least partial cytogenetic response or CCgR at 6 months of IM therapy ( $N = 94$ ) (Fig. 2B). With OS of 90.9% (95% CI: 81.6–100%) and PFS of 77.7% (95% CI: 63.9–91.6%), there were virtually no differences in comparison with the entire group of analyzed patients ( $N = 152$ ). On the other hand, EFS (67.1%; 95% CI: 51.2–83%) and ATFS (74%; 95% CI: 60.4–87.5%) calculated for the subset of optimal responders at 6 months showed better results than for all analyzed patients.

With median follow-up of 60 months, the cumulative incidences of CHR and CCgR reported with the IRIS trial were 98% and 87%, respectively, and the 5-year estimated OS, PFS, and EFS were 89%, 93%, and 83%, respectively [4]. It should be noted that PFS and EFS definitions used in the 5-year update [4] differ from those published in the first report on IRIS trial results [2]. Originally, PFS was defined as survival without evidence of AP or BC, loss of CHR, loss of MCgR, increasing white blood cell count (in patients who never achieved CHR), or death from any cause while on IM treatment [2], and we also used this original definition for our analysis purpose. EFS was not originally defined at all. In the work published by Druker et al. [4], PFS means survival without progression into AP or BC (which was defined as TFS in this presented report), and EFS is the former PFS. Another confusing issue is the fact that a considerable proportion of patients (28%) discontinued first-line IM therapy for a variety of reasons, which were censored and thus not counted as events in survival analyses [4].

De Lavallade et al. [8] performed an intention-to-treat analysis on 204 consecutive patients with newly diagnosed CML treated with IM with the aim to validate the IRIS data. Five-year cumulative incidences of CHR, CCgR, MMoR, and CMoR were 98.5%, 82.7%, 50.1%, and 8.3%, respectively, and the 5-year estimated OS and PFS (defined as in IRIS first report) [2] were 83.2% and 82.7%, respectively. On the opposite to this single-center experience, Lucas et al. [9] in a population-based analysis of 68 patients with IM as their first-line therapy from the defined area of 2 million people did not verify these results, with overall CCgR and MMoR rates at 24 months only 51% and 31%, respectively.

In our analysis, with 4-year estimated probability of CHR, CCgR, MMoR, and CMoR reaching 95.3%, 80.6%, 65.4%, and 39.2%, respectively, and 4-year estimated OS and PFS 91.5% and 78.1%, respectively, our results were similar to those achieved in IRIS with comparable median follow-up [4] and to those presented in a single-institution report [8]. In terms of the cumulative incidence of MMoR and CMoR, our results were even better than reported in the latter. As for the tolerability of IM, there were no meaningful differences between our report and others cited.

Similar or even improved IM efficacy results among our patients can be explained in part by the shorter follow-up and in part by the fact that the care of such patients is concentrated in a limited number of experienced centers in the Czech Republic where well-standardized techniques for treatment efficacy monitoring are used, and current recommendations for the management of CML patients are maintained. This real-life situation is also reflected in the time-to-event analyses in our report. PFS, as originally defined in the first IRIS trial report [2], does not contain the ELN criteria for IM failure or its discontinuation due to intolerance [3]. Using the more appropriate EFS definition in our analysis, the 4-year probability of being in CCgR while remaining on IM was 60.7%, which was consistent with the Hammer-smith study data [8] with 5-year probability of 62.7% remaining event-free. Both EFS results thus impair the optimistic expectations about IM efficacy. In our cohort, a significant proportion of the patients with event (10/40; 25%) continued on IM at the time of the latest assessment. In this light, our newly defined parameter—ATFS (4-year probability 67.6%)—drew a more realistic picture of the probability of remaining on first line IM treatment in every day clinical practice.

In summary, we confirmed very good IM efficacy and tolerability in first line CML therapy as well as with the patient population not participating in clinical trials that were treated at well-managed specialized centers. However, in spite of similar results to those obtained in the large multicenter trial in terms of OS, TFS, and PFS—with more appropriate selection of events for calculation of EFS and ATFS—overestimation of time-to-event analysis in IRIS trial is obvious.

#### Methods

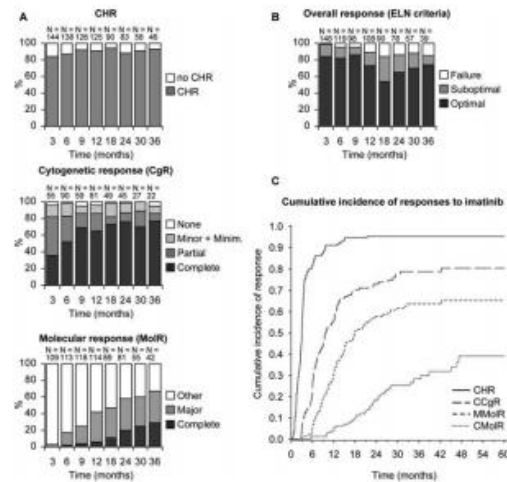
The data concerning all consecutive adult patients with newly diagnosed CP-CML treated with IM in the two largest hematological centers in the Czech Republic between July 2003 and July 2009 were stored in a detailed database called INFINITY (tyrosine kinase inhibitors in first and following CML treatment). The database design was reviewed and approved by the ethics committee at each participating center, and the patients were required to give written informed consent. Patients were treated with IM 400 mg orally once daily and had no prior treatment for CML except hydroxyurea, anagrelide, or leukapheresis. IM dose was modified mainly because of toxicity [12] or inadequate response [3].

letters

**TABLE I. Characteristics of patients at the time of diagnosis (N = 152)**

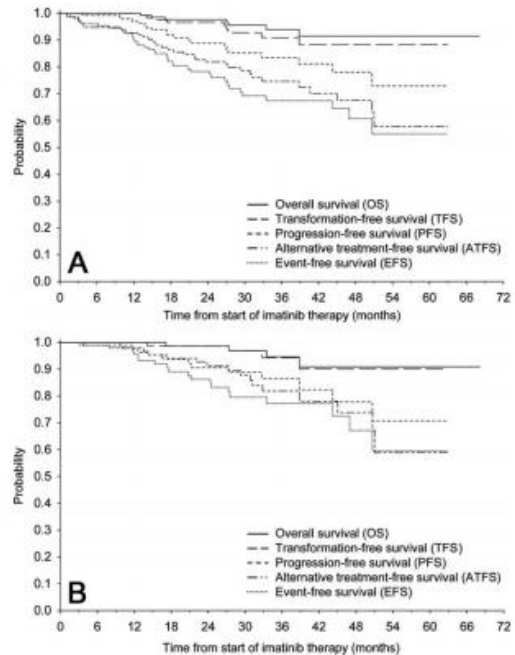
Parameter	No. (%) or median [range]
Sex (male/female)	N = 69/N = 83 (45.4%/54.6%)
Age (years)	55 [20-77]
Interval since diagnosis to start of IM therapy (months)	1.6 [0-13.3]
ECOG performance status (0/1/2) <sup>a</sup>	N = 44/N = 73/N = 33 (29.3%/48.7%/22.0%)
Palpable spleen (yes)	N = 58/150 (38.7%)
Leucocytes (10 <sup>9</sup> /l)	61.8 [3.9-612.0]
Platelet count (10 <sup>9</sup> /l)	387 [35-2237]
Hemoglobin (g/l)	123 [60-170]
Blasts in peripheral blood (%)	1 [0-10]
Basophiles in peripheral blood (%)	4 [0-17]
Sokal score risk group <sup>b</sup> (high/intermediate/low risk)	N = 33/N = 57/N = 59 (22.1%/38.3%/39.6%)
Hasford score risk group (high/intermediate/low risk)	N = 24/N = 77/N = 48 (16.1%/51.7%/32.2%)
Additional chromosomal abnormalities in Ph+ cells <sup>c</sup> (yes)	N = 14/129 (10.9%)
Warnings according to ELN criteria (yes)	N = 38/145 (26.2%)
Type of BCR-ABL transcript (b2a2 / b3a2 / other)	N = 45/N = 96/N = 11 (29.6%/63.2%/7.2%)

<sup>a</sup>One fifty (98.7%) patients were assessable for ECOG performance status.  
<sup>b</sup>One forty-nine patients (98.0%) were available for the Sokal and Hasford risk assessment.  
<sup>c</sup>Information about the presence of additional chromosomal abnormalities in Ph-positive cells was not available in 23/152 patients (15.1%) mainly due to not evaluable cytogenetic samples.



**Figure 1.** Profile of therapeutic responses reached during follow-up. A: CHR, CgR, and MoIR response rates at given time points. B: Disposition of treatment responses according to ELN criteria [3]. C: Cumulative incidence of responses to IM. The 4-year cumulative incidence of CHR was 95.3%, CCgR 80.6%, MMoIR 65.4%, and CMoIR 39.2%.

Cytogenetic and molecular studies were performed according to ELN recommendations [3,5,13]. Conventional cytogenetic analysis was done using the G-banding technique, and at least 20 metaphases were analyzed. A FISH analysis was used for cytogenetic response evaluation only in cases of poor quality samples or an insufficient number of assessable metaphases [14]. An optimized multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was adopted from Cross et al. [15] to determine the type of BCR-ABL transcript. Real-time quantitative PCR (RQ RT-PCR), standardized within the international program EUTOS for CML [16], was performed according to Europe Against Cancer recommendations [17,18]. B2M or ABL were applied as housekeeping genes in the Prague and Brno laboratories, respectively. The CMoIR was defined here as undetectable BCR-ABL tran-



**Figure 2.** Comprehensive set of time-to-event analyses. A: Estimated OS, TFS, PFS, ATFS, and EFS for entire group of analyzed patients (N = 152) at 4 years were 91.5%, 88.4%, 78.1%, 67.6%, and 60.7%, respectively. B: Estimated 4-years probability of OS, TFS, PFS, ATFS, and EFS for the subset of patients achieving either partial or complete cytogenetic response at 6 months (N = 94) was 90.9%, 90.1%, 77.7%, 74.0%, and 67.1%, respectively.

script by qualitative nested PCR with the sensitivity of 1 BCR-ABL positive cell in 10<sup>6</sup> leukocytes.

Treatment responses were evaluated and defined according to valid recommendations [3]; toxicity of IM was assessed according to CTCAEv.3. OS was defined as the time from the start of IM to death from any cause in spite of IM discontinuation. TFS was defined as survival without evidence of AP or BC or death from any cause during IM therapy. PFS was defined as in the IRIS trial [2], that is, survival without evidence of AP or BC, loss of CHR, loss of MCgR, increasing white blood cell count (in patients who had never had CHR), or death from any cause while on IM treatment, whichever came first. In EFS, events were defined as a progression (the same as in PFS, as described earlier), loss of CCgR, failure to achieve CHR at 6 months, MCgR at 12 months, and CCgR at 18 months, or intolerance of IM as the cause of its discontinuation, whichever came first [3,8,10]. ATFS was defined as time since start of IM to change to any alternative treatment or death from any cause during IM therapy. Survival probabilities were estimated using the Kaplan-Meier method. Patients who underwent stem cell transplantation were censored in all above-mentioned analyses with the exception of ATFS. Point estimates were supplied with corresponding 95% confidence intervals. The probabilities of hematologic, cytogenetic, and molecular responses were estimated using the cumulative incidence method. Analyses were performed using SPSS software (version 18.0.1), MedCalc (version 10), and R software for statistical computing and graphics (version 2.10.1).

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine Hematology and Oncology, University Hospital and Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic; <sup>3</sup>Institute of Biostatistics and Analyses Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>4</sup>Department of Mathematics and Statistics, Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>5</sup>Department of Medical Genetics, University Hospital Brno, Czech Republic

\*Correspondence to: Daniela Zackova, Department of Internal Medicine Hematology and Oncology University Hospital and Masaryk University Brno Jihlavská 20, 625 00 Brno Czech Republic E-mail: dzackova@fnbrno.cz  
Conflict of interest: Nothing to report.  
Published online 29 November 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).  
DOI: 10.1002/ajh.21942

#### Acknowledgments

In particular, we thank data-managers Blanka Dobesova and Jana Rysava for the data collection. We also thank Rich Zimmerman for the English correction of the manuscript. This work was supported by **CELL**—The Czech Leukemia Study Group for **Life**.

#### References

1. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007;370:342–350.
2. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994–1004.
3. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006;108:1809–1820.
4. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355:2408–2417.
5. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;27:6041–6051.
6. Rohrbacher M, Berger U, Hochhaus A, et al. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia* 2008;23:602–604.
7. Mengis C, Aebi S, Tobler A, et al. Assessment of differences in patient populations selected for or excluded from participation in clinical phase III acute myelogenous leukemia trials. *J Clin Oncol* 2003;21:3933–3939.
8. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: Incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008;26:3358–3363.
9. Lucas CM, Wang L, Austin GM, et al. A population study of imatinib in chronic myeloid leukaemia demonstrates lower efficacy than in clinical trials. *Leukemia* 2008;22:1963–1966.
10. Jabbour E, Kantarjian HM, Jones D, et al. Imatinib mesylate dose escalation is associated with durable responses in patients with chronic myeloid leukemia after cytogenetic failure on standard-dose imatinib therapy. *Blood* 2009;113:2154–2160.
11. Baccarani M, Rosti G, Castagnetti F, et al. Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study. *Blood* 2009;113:4497–4504.
12. Glivec® (imatinib). Summary of Product Characteristics (revised 7.11.2006) www.glivec.com.
13. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: Review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108:28–37.
14. Babicka L, Zemanova Z, Pavlistova L, et al. Complex chromosomal rearrangements in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;168:22–29.
15. Cross NC, Melo JV, Feng L, Goldman JM. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in hematological disorders. *Leukemia* 1994;8:186–189.
16. Müller MC, Cross NC, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia* 2009;23:1957–1963.
17. Beillard E, Paltsgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR): A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17:2474–2486.
18. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17:2318–2357.

## Successful management with clofarabine for refractory leukaemia in a young adult with chronic renal failure

Helene Sudour,<sup>1\*</sup> Antoine Kimmoun,<sup>1</sup> Audrey Contet,<sup>2</sup> Laurence Clement,<sup>2</sup> Alexandra Salmon,<sup>2</sup> Claudine Schmitt,<sup>2</sup> and Pascal Chastagner<sup>2</sup>

**Adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) remains a difficult disease to cure. For high-risk patients, front-line protocols are often aggressive and call for allogeneic HSCT with the aim to offer prolonged leukemia-free survival. If patients relapse after transplantation, novel salvage therapies are desperately needed. However, some comorbid medical conditions post-transplantation can preclude the potential to cure.**

Clofarabine is a new nucleoside analog, which appears to act by inhibiting DNA polymerase, alpha ribonucleotide reductase, and DNA primase, thus inhibiting DNA synthesis.

It has shown a significant efficacy in myeloid hematologic malignancies [1] and in patients with relapsed or refractory T-cell and B-cell lymphoblastic leukemia both in adult [2] and especially in pediatric patients [3]. Its combination with a low dose of cytarabine seems, in a phase II study, to exhibit greater antitumor activity [4]. For patients with moderate renal impairment, a reduced dose has to be chosen for a similar exposure, because the total body clearance of the principal metabolite (2-fluoro-ara-A) correlates with the creatinine clearance [5]. There are no published data on the possibility to use this chemotherapy in patient with chronic end-stage renal failure and only rare data about the effect of hemodialysis on the pharmacokinetics of clofarabine.

We report the pharmacokinetics data, tolerance and efficacy of clofarabine in combination with cytarabine, realized using continuous venovenous hemodialysis (CVVHD) in a young patient treated for relapsed high-risk leukemia.

#### Case Report

A 22-year-old young adult was referred with bone marrow relapse of a high risk B-cell ALL, 20 months following an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). He was diagnosed at the age of 20 with CD10 negative hyperleukocytosis B-cell ALL and complex cytogenetic karyotype. He received chemotherapy (GRALL 2005 protocol), then proceeded to HSCT (two unrelated umbilical cord blood) after a myeloablative conditioning regimen using total body irradiation 12 Gy and cyclophosphamide (120 mg/kg).

Evolution was marked by a Grade II acute gastro-intestinal graft versus host disease (GI GVHD), a chronic cutaneous GVHD, an obliterans bronchiolitis, a Grade III polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis, and finally, an acute tubular necrosis leading to end-stage renal failure. He was placed under a dialysis program from the second month following HSCT and continued afterwards with three sessions of dialysis per week.

He was in persistent complete remission (CR1) for 19 months. Then, he developed thrombopenia and the level of minimal residual disease (MRD), measured by RQ-PCR, increased. Bone marrow evaluation confirmed the bone marrow relapse.

A multidisciplinary discussion between hematologists, nephrologists, and intensivists allowed the administration of a chemotherapy plan taking into account some morbidities (intolerance to L-asparaginase and Erwinia asparaginase and end-stage renal failure). He received steroid therapy, vindesine, PEG asparaginase, and intrathecal injection of liposomal cytarabine (Dépocyt®). In parallel, he was dialysed four times per week to obtain the most

#### 4.4.2. Příloha 9

Pavlik T, Janousova E, Mayer J, Indrak K, Jarosova M, Klamova H, Zackova D, Voglova J, Faber E, Karas M, Machova Polakova K, Racil Z, Demeckova E, Demitrovicova L, Tothova E, Chudej J, Markuljak I, Cmunt E, Kozak T, Muzik J, Dusek L. Current survival measures reliably reflect modern sequential treatment in CML: correlation with prognostic stratifications. *American Journal of Hematology*. 2013; 88(9):790-797.

IF = 3,477 v roce 2013; HEMATOLOGY Q1; 4 citace ve WOS či Scopus, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Analýze podrobena 723 dospělých pacientů s nově zjištěnou CML v CP léčených imatinibem v první linii v období od 1/2000 do 12/2011 a evidovaných v databázi INFINITY a CAMELIA
- Cílem práce bylo ověření prognostického významu rizikových skóre dle Sokala, Hasforda (Euro) a EUTOS, dosažení časně molekulární odpovědi (hladina *BCR-ABL1* transkriptů  $\leq 10\%$  ve 3 měsících) a CCyR rovněž ve 3 měsících od zahájení terapie imatinibem ve vztahu ke current cumulative incidence (CCI), current leukemia-free survival (CLFS) a OS
- Byla shledána statisticky významná asociace všech výše uvedených parametrů s CCI, tj. s pravděpodobností setrvání v CCyR v daném časovém bodě; nejvyšší míra statistického rozdílu byla zaznamenána v případě časně molekulární odpovědi, tj. hladina *BCR-ABL1* transkriptů  $\leq 10\%$  versus  $> 10\%$  ve 3 měsících (5letá pravděpodobnost CCI 94,3 % vs. 57,1 %;  $p = 0,005$ )
- Asociace s OS prokázány u všech výše zmíněných parametrů vyjma EUTOS skóre
- Asociace s CLFS neprokázána u žádného ze zmíněných parametrů, přičemž ve všech rizikových skupinách dle Sokala, Hasforda i EUTOS byla 5letá pravděpodobnost CLFS vyšší než 80 %
- Jakmile je jednou dosaženo CCyR během terapie TKI, prognóza pacientů je dobrá neohledě na jejich úvodní prognostickou stratifikaci.

## Current survival measures reliably reflect modern sequential treatment in CML: Correlation with prognostic stratifications

Tomas Pavlik,<sup>1</sup> Eva Janousova,<sup>1</sup> Jiri Mayer,<sup>2</sup> Karel Indrak,<sup>3</sup> Marie Jarosova,<sup>3</sup> Hana Klamova,<sup>4</sup> Daniela Zackova,<sup>2</sup> Jaroslava Voglova,<sup>5</sup> Edgar Faber,<sup>3</sup> Michal Karas,<sup>6</sup> Katerina Machova Polakova,<sup>4</sup> Zdenek Racil,<sup>2</sup> Eva Demeckova,<sup>7</sup> Ludmila Demitrovicova,<sup>8</sup> Elena Tothova,<sup>9</sup> Juraj Chudej,<sup>10</sup> Imrich Markuljak,<sup>11</sup> Eduard Cmunť,<sup>12</sup> Tomas Kozak,<sup>13</sup> Jan Muzik,<sup>1</sup> and Ladislav Dusek<sup>1\*</sup>

Using the data of 723 chronic myeloid leukemia (CML) patients in the chronic phase, we analyzed the prognostic value of the Sokal, Euro, and EUTOS scores as well as the level of *BCR-ABL1* and the achievement of complete cytogenetic response (CCgR) at 3 months of imatinib therapy in relation to the so-called current survival measures: the current cumulative incidence (CCI) reflecting the probability of being alive and in CCgR after starting imatinib therapy; the current leukemia-free survival (CLFS) reflecting the probability of being alive and in CCgR after achieving the first CCgR; and the overall survival. The greatest difference between the CCI curves at 5 years after initiating imatinib therapy was observed for the *BCR-ABL1* transcripts at 3 months. The 5-year CCI was 94.3% in patients with *BCR-ABL1* transcripts  $\leq 10\%$  and 57.1% in patients with *BCR-ABL1* transcripts  $> 10\%$  ( $P = 0.005$ ). Therefore, the examination of *BCR-ABL1* transcripts at 3 months may help in early identification of patients who are likely to perform poorly with imatinib. On the other hand, CLFS was not significantly affected by the considered stratifications. In conclusion, our results indicate that once the CCgR is achieved, the prognosis is good irrespective of the starting prognostic risks. *Am. J. Hematol.* 88:790–797, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

### Introduction

Today, with the possibility of treating chronic myeloid leukemia (CML) patients with sequential tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy, the remission state in CML can be achieved repeatedly. In other words, CML patients who relapse after achieving the first remission need no longer be considered to have definitely failed the CML treatment. Therefore, the standard ways of patient outcome assessment, the common leukemia-free survival and cumulative incidences (CIs), are not well suited for quantifying CML treatment outcomes because these measures cannot account for multiple remissions [1]. To overcome this problem, the concept of the so-called current survival measures, which allow for the proportion of patients who have left the first remission and the proportion of leukemia-free patients in subsequent remissions, has recently become discussed in the literature [1–3]. In general, all current survival measures introduced so far aim at reliable estimation of the probability of being leukemia-free in time. As an example, Pavlik et al. [1] used the so-called current cumulative incidence (CCI) of leukemia-free patients and the current leukemia-free survival (CLFS) to estimate the probability of being alive and in the first or any subsequent complete cytogenetic response (CCgR) in time after initiating TKI therapy, and the probability of being alive and in the first or any subsequent CCgR after achieving the first CCgR, respectively.

In contrast to the standard ways of CML patient outcome assessment that have been evaluated many times with respect to the various predictive and prognostic factors [4–7], the association between the newly proposed survival measures and the standard prognostic classifications for CML patients has not yet been studied. In this study, we analyzed for the first time the impact of the internationally recognized prognostic scores, the Sokal [8], the Euro [9], and the EUTOS risk scores [7], as well as the achievement of CCgR at 3 months of imatinib therapy on the CCI, the CLFS, and the overall survival (OS) using the data of all

consecutive Czech and Slovak CML patients in chronic phase (CP-CML) who received first-line imatinib in the period 2000–2011. In addition, we evaluated the current survival measures and the OS with respect to the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months of imatinib therapy—a stratification that has been recently applied in several studies [3,10,11].

### Methods

#### Patients

All consecutive adult CP-CML patients diagnosed and treated in specialized hematological centers in the Czech Republic and Slovakia between January 2000 and December 2011 were included in this analysis. The data was obtained from two prospective, observational studies, CAMELIA [12] and INFINITY [13], which are managed according to Good Clinical Practice. Both studies were approved by the local ethics committee and all subjects signed the informed consent before their participation in the study. The CP-CML was defined according to

<sup>1</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>University Hospital Brno and CEITEC, Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Hematology, University Hospital Olomouc, Czech Republic; <sup>4</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic; <sup>5</sup>4th Department of Internal Medicine - Hematology, University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>6</sup>Department of Hematology, University Hospital Plzeň, Czech Republic; <sup>7</sup>Department of Hematology, University Hospital Bratislava, Slovakia; <sup>8</sup>National Oncology Institute, Bratislava, Slovakia; <sup>9</sup>Department of Hematology, University Hospital Kosice, Slovakia; <sup>10</sup>Department of Hematology, University Hospital Martin, Slovakia; <sup>11</sup>Department of Hematology, University Hospital Banská Bystrica, Slovakia; <sup>12</sup>1st Internal Department, General University Hospital, Prague, Czech Republic; <sup>13</sup>3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

\*Correspondence to: Ladislav Dusek, Kamenice 3, Brno, 62500, Czech Republic. E-mail: dusek@iba.muni.cz

Contract grant sponsor: Novartis and Bristol-Myers Squibb.

Received for publication 31 May 2013; Accepted 1 June 2013

*Am. J. Hematol.* 88:790–797, 2013.

Published online 11 June 2013 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/ajh.23508

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

American Journal of Hematology

790

<http://wileyonlinelibrary.com/cgi-bin/jhome/35105>

the European LeukaemiaNet (ELN) recommendations [14]. All patients received first-line imatinib and upon therapy failure or intolerance, they received second-generation TKIs, dasatinib and nilotinib, stem-cell transplantation, or other therapy.

#### Statistical methods

The CCI, estimating the probability that a patient is alive and in any CCgR after initiating imatinib therapy, the CLFS, reflecting the probability of being in any CCgR after achieving the first CCgR, and the OS were considered as the primary endpoints of this study. Since the cytogenetic response is considered as a reliable surrogate endpoint for survival in CML patients [14,15], we simplified, for the purpose of calculating the CCI and CLFS estimates, the patient's disease course to being in either CCgR or not. Thus, the course of CML treatment was represented as a series of achievements of CCgR and the subsequent losses. Statistically speaking, achievements of CCgR and subsequent losses of CCgR were regarded as the events of interest, whereas death was considered as a competing risk. For every case the time to each achievement or each loss of CCgR as well as the time to death was calculated from the starting date of imatinib treatment. It should be noted that not all patients were available for CLFS estimation as it counts only with patients who achieved at least one CCgR during their treatment course. Thus, given a patient had achieved at least one CCgR, the starting time point for his or her CLFS was the date of achievement of his or her first CCgR in time.

The methods for estimating CCI and CLFS curves are described elsewhere [1]. The methodology is based on nonparametric statistical methods; more specifically, the CCI estimator can be expressed as a linear combination of the Aalen-Johansen estimators allowing for competing risks, whereas the CLFS estimator can be expressed as a linear combination of the well-known Kaplan-Meier estimators. The procedure for CLFS estimation is closely related to the nonparametric estimator proposed by Klein et al. for monitoring the outcomes of patients after stem-cell transplantation using donor lymphocyte infusion [16]. Kaplan-Meier method was used to estimate the OS; the Aalen-Johansen method was used to estimate the common CI; the log-rank test was used to compare the OS curves; the point estimates of the current survival measures were compared using the test procedure published by Klein et al. [17]. The standard level of statistical significance  $\alpha = 0.05$  was considered. All computations were performed using the R software currentSurvival package version 1.0 that was developed by the authors.

#### Prognostic stratifications

The following risk stratifications were considered with respect to the CCI and OS curves: (1) the Sokal score, (2) the Euro score, (3) the EUTOS score, (4) the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months of imatinib therapy, and (5) the achievement of CCgR at 3 months of imatinib therapy. Regarding CLFS estimation, only the stratifications (1), (2), (3), and (4) were applied because the estimation of CLFS curves is conditional on achieving at least one CCgR in time.

The prognostic scores were calculated using the original formulas [7–9]; the cytogenetic response was assessed according to the ELN guidelines [14]. Therefore, cytogenetic examinations at 3 months of imatinib therapy were not available in some patients due to changes in the therapeutic recommendations for CML patients over the last decade. Regarding the analysis of *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months, the *BCR-ABL1* transcripts were evaluated as internationally recommended [18]; patients with *BCR-ABL1* transcript levels  $\leq 10\%$  were compared to those with *BCR-ABL1* transcript levels  $> 10\%$  [3,10,11]. However, the *BCR-ABL1* transcript levels were available only in patients, whose samples were analyzed in three laboratories with the standardized quantitative real-time RT-PCR methodology at the time of data collection (annual quality control was provided by the National reference laboratory for DNA diagnostics in the Czech Republic). These laboratories also began to participate in the international *BCR-ABL1* standardization project (EUTOS for CML) in 2007 [19].

## Results

### Patients

In total, 723 consecutive adult CP-CML patients were treated with first-line imatinib in specialized hematological centers in the Czech Republic and Slovakia between January 2000 and December 2011. Table I shows the patients' characteristics. The median follow-up was 38 months with the range 3–116 months. During follow-up, 218 patients discontinued imatinib due to disease progression, resistance to imatinib, intolerance, or an adverse event, and received dasatinib ( $n = 91$ ), nilotinib ( $n = 72$ ), stem-cell transplantation ( $n = 16$ ), or other treatment modality ( $n = 39$ ). In addition, 10 patients receiving second-generation TKIs underwent stem-cell transplantation.

Of the 723 CP-CML patients treated with first-line imatinib, 112 (15.5%), 314 (43.4%), and 449 (62.1%) achieved CCgR at 3, 6, and 12 months, respectively. Moreover, the 5-year common CI of CCgR was 87.4% (Fig. 1). The overall 5-year estimates of CCI (the probability of being alive and in any CCgR in time as defined above) and CLFS (the probability of being alive and in CCgR after achieving the first CCgR as defined above) were 73.8% and 88.2%, respectively. Fifty-nine patients died during follow-up, resulting in a 5-year and 8-year probability of OS of 88.4% and 78.5%, respectively.

### CCI according to prognostic stratifications

All considered risk stratifications except the achievement of CCgR at 3 months of imatinib therapy resulted in

TABLE I. Patients' Characteristics at Imatinib Therapy Initiation

	All patients ( $n = 723$ )	Patients with standardized <i>BCR-ABL1</i> transcript levels at 3 months ( $n = 236$ )	Patients with cytogenetic testing at 3 months ( $n = 281$ )
Sex: males (no., %)	377 (52.1%)	128 (54.2%)	134 (47.7%)
Age, years (median, range)	53.0 (14.8–88.6)	55.5 (18.0–88.6)	53.0 (14.8–80.8)
Sokal score (no., %)			
Low risk	271 (37.5%)	73 (30.9%)	105 (37.4%)
Intermediate risk	275 (38.0%)	98 (41.5%)	110 (39.1%)
High risk	177 (24.5%)	65 (27.5%)	66 (23.5%)
Euro score (no., %)			
Low risk	286 (39.6%)	69 (29.2%)	112 (39.9%)
Intermediate risk	344 (47.6%)	128 (54.2%)	130 (46.3%)
High risk	93 (12.9%)	39 (16.5%)	39 (13.9%)
EUTOS score: high risk (no., %)	102 (14.1%)	34 (14.4%)	42 (14.9%)
Spleen size, cm (median, range)	0 (0–26)	0 (0–20)	0 (0–23)
WBC <sup>a</sup> count, $\times 10^9/L$ (median, range)	77 (3–631)	73 (3–631)	76 (3–570)
Platelet count, $\times 10^9/L$ (median, range)	400 (102–3308)	413 (104–1922)	398 (102–2050)
Hemoglobin, g/L (median, range)	121 (57–170)	120 (60–170)	120 (57–170)
Hematocrit, % (median, range)	36 (15–52)	36 (18–49)	35 (15–52)
Blast cells, % (median, range)	1 (0–14)	1 (0–13)	1 (0–14)
Basophils, % (median, range)	3 (0–19)	4 (0–19)	3 (0–18)
Eosinophils, % (median, range)	2 (0–15)	2 (0–14)	2 (0–14)
Follow-up, months (median, range)	38 (3–116)	30 (3–93)	37 (3–108)
Death (no., %)	59 (8.2%)	17 (7.2%)	24 (8.5%)

<sup>a</sup> WBC indicates white blood cell.

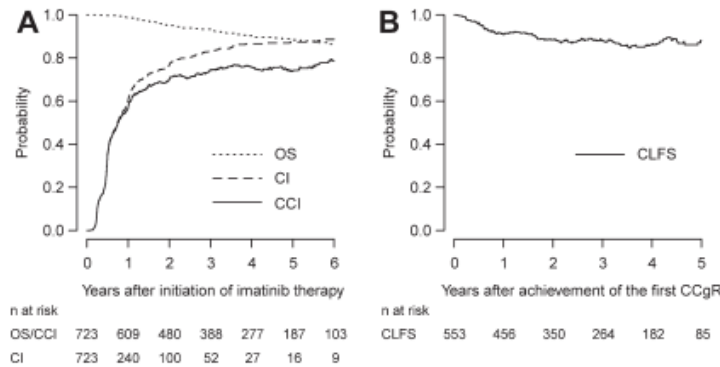


Figure 1. Overall survival (OS), common cumulative incidence (CI), current cumulative incidence (CCI), and current leukemia-free survival (CLFS) estimates for CP-CML patients treated with first-line imatinib. A: OS, CI, and CCI curves calculated from the starting date of imatinib treatment ( $n = 723$ ). B: CLFS curve calculated from the date of achievement of the first CCgR ( $n = 553$ ).

significantly different CCI at both 3 and 5 years of TKI therapy (Fig. 2, Table II). Regarding both the Sokal and Euro scores (Fig. 2A,B), all three CCI curves corresponding to the individual risk categories were clearly separable with the high-risk group having the lowest probability of being alive and in CCgR in time. As for the Sokal score, the estimated CCI at 3 years after starting imatinib therapy was 85.7%, 73.2%, and 59.2% in the low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients, respectively ( $P < 0.001$ ). At 5 years after initiating imatinib therapy, the CCI was 80.6%, 75.5%, and 62.9% in the low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients, respectively ( $P = 0.006$ ). In case of the Euro score, the 3-year CCI estimates were 83.9%, 70.8%, and 57.1% in the low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients, respectively ( $P < 0.001$ ). The CCI estimates for the Euro score at 5 years were 78.1%, 74.4%, and 58.1% in the low-risk, intermediate-risk, and high-risk group, respectively ( $P = 0.007$ ). Regarding the EUTOS score (Fig. 2C), high-risk patients had significantly lower CCI than the low-risk patients at 3 years after starting imatinib therapy—77.5% versus 55.1% ( $P < 0.001$ ). The difference in CCI at 5 years—76.4% versus 57.6%—proved to be statistically significant as well ( $P = 0.007$ ). Moreover, all CCI curves for the Sokal, Euro, and EUTOS scores were relatively stable after 2 years of imatinib treatment.

Only 236 patients (32.6%) whose samples were analyzed in three laboratories with the standardized quantitative real-time RT-PCR methodology, were available for the analysis of CCI by the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months of imatinib therapy (Fig. 2D). Table I summarizes the characteristics of these 236 patients. Patients with *BCR-ABL1* transcript levels  $\leq 10\%$  ( $n = 151$ ) had significantly higher CCI than patients with *BCR-ABL1* transcript levels  $> 10\%$  ( $n = 85$ ) at both 3 and 5 years after starting imatinib therapy—84.6% versus 62.8% ( $P = 0.003$ ) and 94.3% versus 57.1% ( $P = 0.005$ ), respectively. Interestingly, the CCI curves by the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months appeared to diverge in time. Thus, the difference between the CCI curves corresponding to the *BCR-ABL1* transcript levels observed at 5 years after initiating imatinib therapy was the greatest among all considered risk stratifications (37.2%). These results indicate low probability of later loss of CCgR on TKI treatment as well as a high probability of being leukemia-free in later periods for patients with *BCR-ABL1* transcript levels  $\leq 10\%$  at 3 months.

Only 281 patients (38.9%) with cytogenetic test results at 3 months of imatinib therapy were available for the analysis of CCI by the achievement of CCgR at 3 months (Fig.

2E). Table I shows the characteristics of these patients. Obviously, when considering risk stratification according to the achievement of CCgR at 3 months after initiating imatinib treatment, the CCI curve began at probability 1 (100%) in patients who achieved CCgR at 3 months ( $n = 112$ ). During the ensuing period, CCI decreased slowly for patients in CCgR at 3 months whereas CCI rapidly increased for patients without CCgR at 3 months. Therefore, the convergence of both curves resulted in a statistically significant difference in CCI estimates at 3 years after starting imatinib therapy—88.5% in patients who achieved CCgR at 3 months versus 65.1% in patients without CCgR at 3 months ( $P = 0.004$ )—and statistically not significant difference at 5 years—82.4% in patients with CCgR at 3 months versus 69.5% in patients without CCgR at 3 months ( $P = 0.151$ ).

**CLFS according to risk stratifications**

To evaluate whether the prognostic scores as well as the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months of imatinib therapy can be used for outcome prediction in patients who achieved CCgR at any time, we compared the CLFS curves according to the prognostic categories (Fig. 3, Table III). Only 553 patients (76.5%) who achieved at least one CCgR during the treatment course were available for the CLFS calculation. All four risk stratifications resulted in statistically insignificant differences in CLFS both at 3 and 5 years after achieving the first CCgR.

Considering the Sokal score (Fig. 3A), the estimated CLFS at 3 years after achieving the first CCgR was 91.3%, 86.9%, and 82.8% in the low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients, respectively ( $P = 0.096$ ). At 5 years, the estimated CLFS was 86.2%, 90.8%, and 86.6% in the low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients, respectively ( $P = 0.410$ ). As for the Euro score (Fig. 3B), the CLFS estimates at 3 years after achieving the first CCgR reached 88.5%, 87.8% and 87.2% in the low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients, respectively ( $P = 0.819$ ). At 5 years, the CLFS estimates were 91.8%, 84.5% and 87.0% in the low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients, respectively ( $P = 0.192$ ). In case of EUTOS score (Fig. 3C), statistically not significant differences in the CLFS were observed at both 3 and 5 years after achieving the first CCgR as well—88.2% versus 86.8% ( $P = 0.817$ ) and 88.7% versus 84.4% ( $P = 0.592$ ), respectively.

Regarding the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months of imatinib therapy, only 170 patients were available for CLFS analysis due to the limited availability of standardized real-time RT-PCR methodology (Fig. 3D). At 3 years after

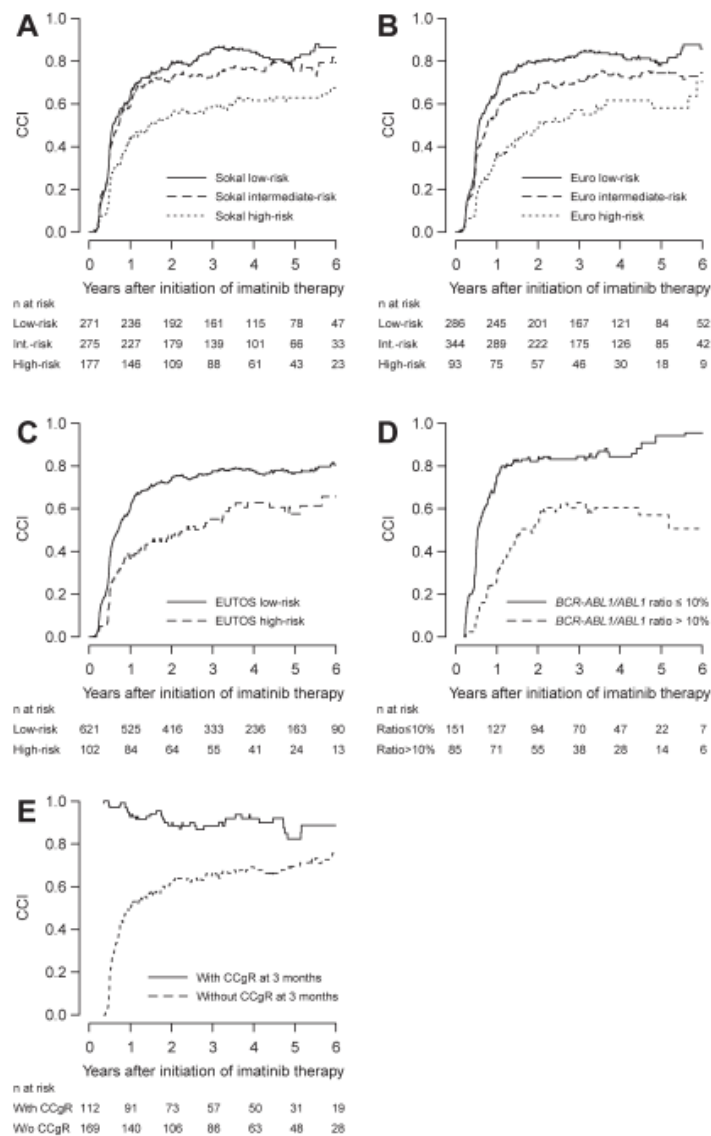


Figure 2. Current cumulative incidence (CCI) estimates, reflecting the probability that a patient is alive and in any CCgR after initiating imatinib therapy, for CP-CML patients treated with first-line imatinib according to the considered risk stratifications. A: CCI by the Sokal score,  $n = 723$ . B: CCI by the Euro score,  $n = 723$ . C: CCI by the EUTOS score,  $n = 723$ . D: CCI by the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months of imatinib therapy,  $n = 236$ . E: CCI by the achievement of CCgR at 3 months of imatinib therapy,  $n = 281$ .

achieving the first CCgR, estimated CLFS reached similar values in patients with *BCR-ABL1* transcript levels  $\leq 10\%$  and in patients with *BCR-ABL1* transcript levels  $> 10\%$ —91.3% and 88.1%, respectively ( $P = 0.679$ ). The seemingly larger difference in CLFS at 5 years after achieving the first CCgR—98.2% and 64.0% in patients with *BCR-ABL1* transcript levels  $\leq 10\%$  and  $> 10\%$ , respectively—appeared to be not statistically significant as well ( $P = 0.326$ ). To summarize, CLFS analysis indicates that all four considered risk stratifications are not predictive for the probability of being alive and in CCgR in time in patients who achieved at least one CCgR.

### OS according to risk stratifications

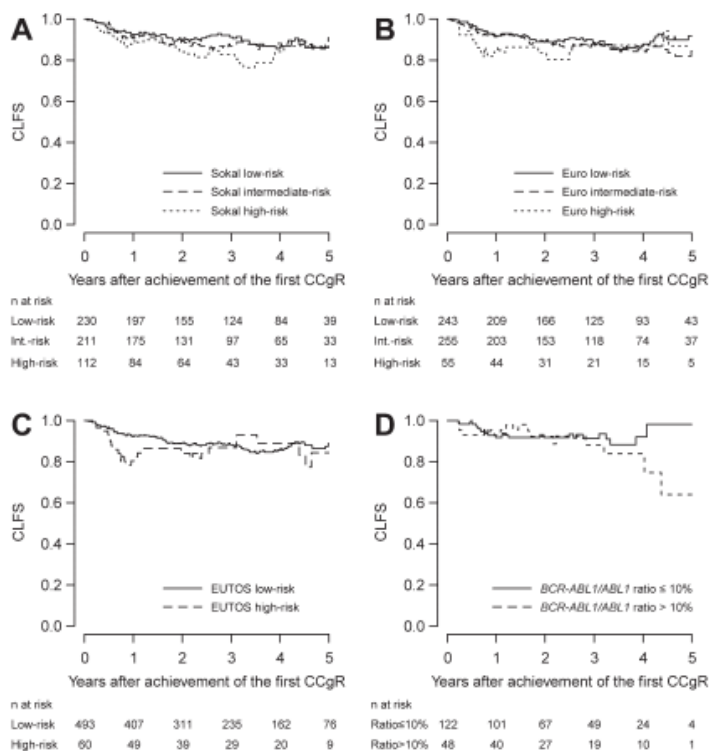
Finally, the impact of the Sokal, Euro and EUTOS scores as well as the level of treatment response at 3 months of imatinib therapy on the OS was evaluated (Fig. 4). All five risk stratifications correlated with the OS in such manner that the high-risk patients had worse OS than the low-risk patients (Table IV). The stratifications according to the Sokal and Euro scores resulted in a statistically significant difference in the OS ( $P = 0.028$  and  $P = 0.002$ , respectively). Similarly, both stratifications reflecting the level of response at 3 months of imatinib therapy, the *BCR-ABL1* transcript levels and the achievement of CCgR, also



**TABLE II. Current Cumulative Incidence (CCI) Estimates for All Consecutive CP-CML Patients Treated With First-Line Imatinib According to the Considered Risk Stratifications**

CCI in time	1-Year (%)	<i>P</i>	2-Year (%)	<i>P</i>	3-Year (%)	<i>P</i>	4-Year (%)	<i>P</i>	5-Year (%)	<i>P</i>	6-Year (%)	<i>P</i>
<b>Sokal score (n = 723)</b>												
Low risk	63.2	<0.001	78.6	<0.001	85.7	<0.001	84.3	<0.001	80.6	0.006	86.3	0.008
Intermediate risk	58.9		70.7		73.2		76.9		75.5		79.3	
High risk	43.3		55.0		59.2		61.5		62.9		67.6	
<b>Hasford score (n = 723)</b>												
Low risk	65.2	<0.001	79.8	<0.001	83.9	<0.001	83.1	0.001	78.1	0.007	85.9	0.045
Intermediate risk	55.4		67.2		70.8		73.4		74.4		74.7	
High risk	35.8		48.6		57.1		61.6		58.1		70.4	
<b>EUTOS score (n = 723)</b>												
Low risk	60.0	<0.001	73.7	<0.001	77.5	<0.001	77.8	0.010	76.4	0.007	80.6	0.034
High risk	36.7		46.0		55.1		62.8		57.6		65.7	
<b>BCR-ABL1 transcript levels (n = 236)</b>												
Less than 10%	75.1	<0.001	82.2	<0.001	84.6	0.003	84.5	0.008	94.3	0.005	95.6	0.005
More than 10%	26.5		53.7		62.8		60.6		57.1		50.7	
<b>Achievement of the first CCgR<sup>a</sup> at 3 months (n = 281)</b>												
Yes	92.7	<0.001	88.6	0.001	88.5	0.004	91.8	0.007	82.4	0.151	88.7	0.131
No	50.1		62.1		65.1		69.1		69.5		75.5	

<sup>a</sup> CCgR indicates complete cytogenetic response.



**Figure 3.** Current leukemia-free survival (CLFS) estimates, reflecting the probability that a patient is alive and in any CCgR after achieving the first CCgR, for consecutive CP-CML patients treated with first-line imatinib who achieved at least one CCgR according to the considered risk stratifications. A: CLFS by the Sokal score, n = 553. B: CLFS by the Euro score, n = 553. C: CLFS by the EUTOS score, n = 553. D: CLFS by the BCR-ABL1 transcript levels at 3 months of imatinib therapy, n = 170.

showed a statistically significant impact on the OS ( $P=0.018$  and  $P=0.019$ , respectively). No statistical significance with respect to OS was proven for the EUTOS score ( $P=0.142$ ).

**Discussion**

Introduction of TKIs has dramatically influenced the therapeutic guidelines and recommendations for CML patients in the last decade. The main reason is that the availability

**TABLE III. Current Leukemia-Free Survival (CLFS) Estimates for Consecutive CP-CML Patients Treated With First-Line Imatinib who Achieved At Least One CCgR According to the Considered Risk Scores**

CLFS in time	1-Year (%)	<i>P</i>	2-Year (%)	<i>P</i>	3-Year (%)	<i>P</i>	4-Year (%)	<i>P</i>	5-Year (%)	<i>P</i>
Sokal score ( <i>n</i> = 553)										
Low risk	92.0	0.402	89.5	0.253	91.3	0.096	85.7	0.506	86.2	0.410
Intermediate risk	90.6		89.2		86.9		88.1		90.8	
High risk	88.8		84.6		82.8		84.1		86.6	
Euro score ( <i>n</i> = 553)										
Low risk	91.4	0.115	88.9	0.328	88.5	0.819	86.8	0.731	91.8	0.192
Intermediate risk	91.7		89.0		87.8		85.4		84.5	
High risk	84.0		83.5		87.2		87.2		87.0	
EUTOS score ( <i>n</i> = 553)										
Low risk	92.1	0.010	89.0	0.337	88.2	0.817	85.7	0.654	88.7	0.592
High risk	80.4		84.0		86.8		89.0		84.4	
BCR-ABL1 transcript levels ( <i>n</i> = 170)										
Less than 10%	91.8	0.829	91.8	0.935	91.3	0.679	92.1	0.401	98.2	0.326
More than 10%	93.0		92.3		88.1		83.9		64.0	

of multiple TKIs enables a patient, who does not achieve or loses remission, to be potentially successfully treated with another TKI. Such remarkable progress requires more precise survival measures since we need to be able to account for multiple disease-free periods during the treatment course of a CML patient. The outcome assessment in CML patients with regard to multiple disease remissions in time has been recently addressed in the works of Al-Kali et al. [2], Pavlik et al. [1], and Marin et al. [3] using the concept of the so-called current survival measures. Using data of all consecutive adult CP-CML patients treated with first-line imatinib in the Czech Republic and Slovakia in the period 2000–2011, we analyzed the current survival measures, denoted here as CCI and CLFS, according to the standard prognostic scores, the Sokal, Euro and EUTOS scores, and the level of treatment response at 3 months of imatinib therapy.

Our study confirmed a statistically significant association between the considered risk stratifications of CP-CML patients and CCI, which reflects the probability of being alive and in CCgR after initiating imatinib therapy (Fig. 2). However, we found a different prognostic value for the considered risk stratifications with respect to CCI. Regarding the Sokal, Euro, and EUTOS scores, the resulting CCI curves for individual risk groups were relatively stable after 2 years of imatinib therapy for all these scores, clearly separating the high-risk group from others. Moreover, despite the fact that the EUTOS score was previously shown to be superior to the Sokal and Euro scores in its prognostic ability [7], our results indicate that the Sokal, Euro and EUTOS scores perform comparably well in stratifying CP-CML patients according to CCI.

The observation that achievement of an early response is an important determinant for the outcome in CP-CML patients treated with first-line TKIs is not new; several authors have previously shown the importance of early response with respect to OS and progression-free survival [3,10,11,20–22]. In this study, our analysis showed that patients who did not achieve CCgR and patients with *BCR-ABL1* transcript levels > 10% at 3 months of imatinib therapy had lower CCI compared with patients who achieved a 3-month CCgR or patients with *BCR-ABL1* transcript levels ≤ 10% at 3 months, respectively. Interestingly, however, the CCI curves corresponding to patients with and without CCgR at 3 months of imatinib therapy slowly converged in time, whereas the CCI curves corresponding to patients with *BCR-ABL1* transcript levels > 10% and ≤ 10% did not. This is concordant with the results of Marin et al. [3], where the *BCR-ABL1* transcript levels were found as the most accurate for predicting the outcome of CP-CML patients treated with TKIs. Regarding our analysis, the 5-year CCI in patients

with *BCR-ABL1* transcript levels ≤ 10% (*n* = 151) and > 10% (*n* = 85) was 94.3% and 57.1%, respectively. These results indicate that a significant proportion of patients, in whom treatment with imatinib as well as the second-generation TKIs is not fully successful, still exist several years after starting imatinib therapy.

The Sokal, Euro and EUTOS scores as well as the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months of imatinib therapy were found to have no statistically significant impact on CLFS (Fig. 3), which estimates the probability of being alive and in CCgR after achievement of the first CCgR and is calculated using a subset of patients who achieved at least one CCgR during the treatment course. What is also important is the fact that the 5-year CLFS was above 80% in all risk groups defined according to the Sokal, Euro, and EUTOS prognostic scores (Table III). As in previous studies, this indicates that treatment with first-line imatinib as well as the second-generation TKIs as second-line therapy is expected to perform well in patients who achieved at least one CCgR during the treatment course [23–25]. Furthermore, the prognosis is expected to be good irrespective of the starting prognostic risks.

The trends in CCI according to the risk stratifications were also reflected in OS (Fig. 4). Moreover, all considered stratifications except the EUTOS score were proven to be significantly associated with the OS. These results indicate that the level of treatment response at 3 months is important for the long-term outcome in CML patients and show that the standard prognostic scores, the Sokal and Euro score, are still valid with respect to OS even in the era of modern TKI therapy. Regarding the stratification of CML patients according to the *BCR-ABL1* transcript levels (using 10% threshold), our findings are consistent with the published literature as this stratification was recently found to influence OS in CML patients treated with both first-line imatinib [3,10] and second-line TKIs [25].

This study has several strengths and limitations. Its main strength stems from the fact that the data set used in this study includes all patients treated with first-line imatinib in the Czech Republic and Slovakia since 2000. In the Czech Republic and Slovakia the administration of TKI therapy is limited to specialized hematology centers and the TKIs are reimbursed only when prescribed in one of these centers. Therefore, our results reflect real-life treatment of CP-CML patients in the target population. On the other hand, the use of real-life data implies limitations regarding the availability of some information. This is especially true for cytogenetic and molecular examinations at 3 months of imatinib therapy that were not available in some patients due to changes in the therapeutic recommendations for CML patients since the introduction of imatinib into clinical

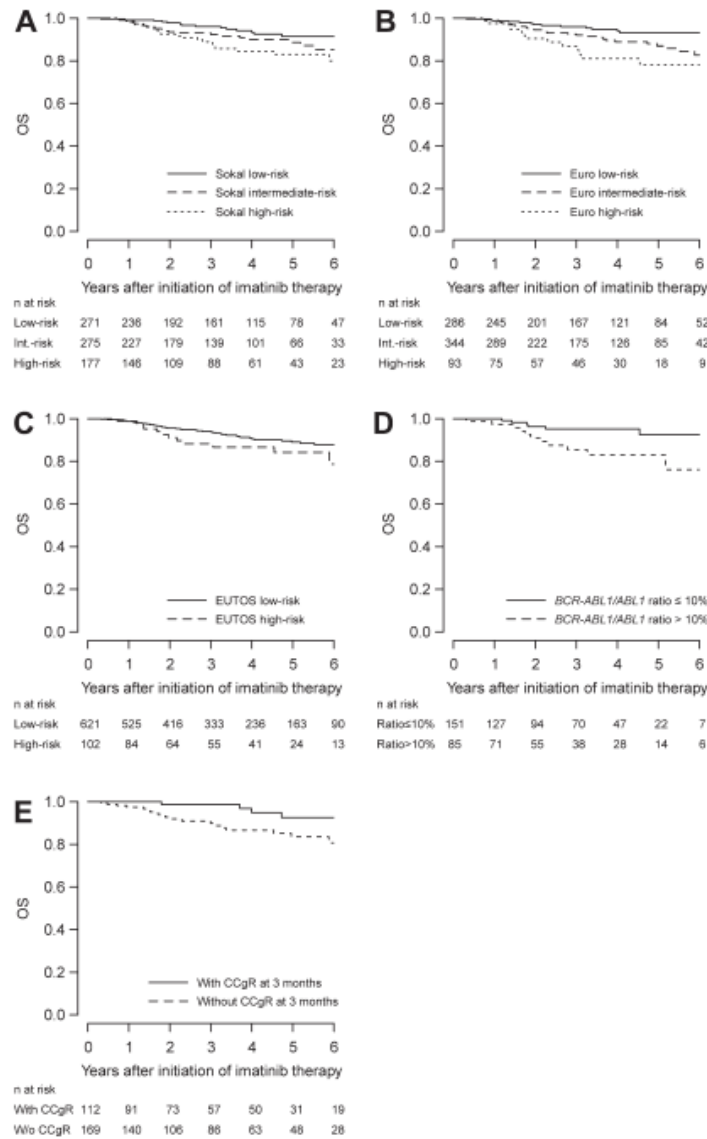


Figure 4. Overall survival (OS) of consecutive CP-CML patients treated with first-line imatinib according to the considered risk stratifications. A: OS by the Sokal score,  $n = 723$ . B: OS by the Euro score,  $n = 723$ . C: OS by the EUTOS score,  $n = 723$ . D: OS by the *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months of imatinib therapy,  $n = 236$ . E: OS by the achievement of CCgR at 3 months of imatinib therapy,  $n = 281$ .

practice. It inevitably resulted in an analysis by the *BCR-ABL1* transcript levels and the achievement of CCgR at 3 months on approximately one third of all patients. However, these patient subgroups were shown to be representative of the whole data set with respect to all patients' characteristics (Table I) as well as the patient outcomes (data not shown); therefore, the results regarding *BCR-ABL1* transcript levels and achievement of CCgR at 3 months of imatinib therapy can be considered as valid.

In conclusion, we found statistically significant association between all five considered risk stratifications, the Sokal, Euro and EUTOS scores, the *BCR-ABL1* transcript

levels at 3 months of imatinib therapy, and the achievement of CCgR at 3 months, and CCI, the current survival measure estimating the probability of being alive and in CCgR in time. Thus, we documented that CCI reflects the standard prognostic classifications in CML. Interestingly, the largest difference between the CCI curves at 5 years after initiating imatinib therapy was observed for the stratification according to the *BCR-ABL1* transcript levels (10% threshold was used). Thus, the examination of *BCR-ABL1* transcript levels performed at 3 months after starting imatinib may be used for early identification of patients who are likely to perform poorly with imatinib therapy. With the

TABLE IV. Overall Survival (OS) for Consecutive CP-CML Patients Treated With First-Line Imatinib According to the Considered Risk Stratifications

OS in time	1-Year (%)	2-Year (%)	3-Year (%)	4-Year (%)	5-Year (%)	6-Year (%)
Sokal score ( $n = 723$ , $P = 0.028$ )						
Low risk	99.2	97.8	96.1	94.1	91.4	91.4
Intermediate risk	98.3	93.6	93.0	89.9	88.7	85.2
High risk	98.7	92.6	88.9	84.5	83.0	80.0
Euro score ( $n = 723$ , $P = 0.002$ )						
Low risk	98.9	97.1	96.0	94.8	93.2	93.2
Intermediate risk	99.0	94.5	92.6	88.9	87.0	82.7
High risk	97.6	90.4	87.0	81.1	78.1	78.1
EUTOS score ( $n = 723$ , $P = 0.142$ )						
Low risk	98.7	95.6	94.1	90.9	89.1	87.7
High risk	98.9	91.1	88.3	86.6	84.2	78.6
BCR-ABL1 transcript levels ( $n = 236$ , $P = 0.018$ )						
Less than 10%	100.0	96.4	95.2	95.2	92.6	92.6
More than 10%	97.4	91.1	85.4	83.1	83.1	76.2
Achievement of CCgR <sup>a</sup> at 3 months ( $n = 281$ , $P = 0.019$ )						
Yes	100.0	96.7	98.7	96.8	92.6	92.6
No	97.5	91.9	89.9	86.7	83.6	80.8

<sup>a</sup> CCgR indicates complete cytogenetic response.

exception of the EUTOS score, all considered risk stratifications were also found to significantly influence OS. On the other hand, CLFS analysis showed that the considered risk stratifications are not predictive for the probability of being alive and in CCgR in patients who achieved at least one CCgR. Therefore, our results indicate that the treatment with current TKI therapy is expected to perform well in patients who achieved CCgR during the treatment course, and that once the CCgR is achieved, the prognosis is good irrespective of the starting prognostic risks.

## References

- Pavlik T, Janoušová E, Pospíšil Z, et al. Estimation of current cumulative incidence of leukaemia-free patients and current leukaemia-free survival in chronic myeloid leukaemia in the era of modern pharmacotherapy. *BMC Med Res Methodol* 2011;11:140.
- Al-Kali A, Kantarjian H, Shan J, et al. Current event-free survival after sequential tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2011;117:327–335.
- Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, et al. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 2012;30:232–238.
- Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien SG, et al. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. *Blood* 2004;104:1979–1988.
- Press RD, Love Z, Tronnes AA, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood* 2006;107:4250–4256.
- de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: Incidence of sustained response in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008;26:3358–3363.
- Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: The EUTOS score. *Blood* 2011;118:686–692.
- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984;63:789–799.
- Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:850–858.
- Hanfstain B, Müller MC, Hehlmann R, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia* 2012;26:2096–2102.
- Klamova H, Machova Polakova K, Muzik J, et al. Evaluation of 5-year imatinib treatment of 458 patients with CP-CML in routine clinical practice and prognostic impact of different BCR-ABL cut-off levels. *Cancer Med* 2013;2:216–225.
- Faber E, Muzik J, Koza V, et al. Treatment of consecutive patients with chronic myeloid leukaemia in the cooperating centres from the Czech Republic and the whole of Slovakia after 2000—A report from the population-based CAM-ELIA Registry. *Eur J Haematol* 2011;87:157–168.
- Zackova D, Klamova H, Dusek L, et al. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials? *Am J Hematol* 2011;86:318–321.
- Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;27:6041–6051.
- Guilhot J, Baccarani M, Clark RE, et al. Definitions, methodological and statistical issues for phase 3 clinical trials in chronic myeloid leukemia: A proposal by the European LeukemiaNet. *Blood* 2012;119:5963–5971.
- Klein JP, Szydlo R, Craddock C, Goldman J. Estimation of current leukemia-free survival following donor lymphocyte infusion therapy for patients with leukemia who relapse after allografting: application of a multistate model. *Stat Med* 2000;19:3005–3016.
- Klein JP, Logan B, Harhoff M, Andersen PK. Analyzing survival curves at a fixed point in time. *Stat Med* 2007;26:4505–4519.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: Review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108:28–37.
- Müller MC, Erben P, Saglio G, et al. European LeukemiaNet harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 347 international laboratories. *Leukemia* 2008;22:96–102.
- Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev* 2006;20:29–41.
- Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Jones D, et al. Delayed achievement of cytogenetic and molecular response is associated with increased risk of progression among patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase receiving high-dose or standard-dose imatinib therapy. *Blood* 2009;113:6315–6321.
- Jabbour E, Kantarjian H, O'Brien SG, et al. The achievement of an early complete cytogenetic response is a major determinant for outcome in patients with early chronic phase chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2011;118:4541–4546.
- Miljkovic D, Nicholson E, Apperley JF, et al. Early prediction of success or failure of treatment with second-generation tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2010;95:224–231.
- Jabbour E, Kantarjian H, O'Brien SG, et al. Predictive factors for outcome and response in patients treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib failure. *Blood* 2011;117:1822–1827.
- Miljkovic D, Apperley JF, Gerrard G, et al. Responses to second-line tyrosine kinase inhibitors are durable: An intention-to-treat analysis in chronic myeloid leukemia patients. *Blood* 2012;119:1838–1843.

#### 4.4.3. Příloha 10

Zackova D<sup>✉\*</sup>, Klamova H<sup>✉</sup>, Muzik J, Cmunt E, Racil Z, Machova Polakova K, Dvořáková D, Jurcek T, Razga F, Cetkovsky P, Dusek L, Mayer J. Efficacy and tolerance of dasatinib after imatinib failure or intolerance for patients with chronic myeloid leukemia treated in three different hospitals compare well with results achievable in formal clinical trials. *Leukemia & Lymphoma*. 2013;54(10):2310-2313. (*✉obě autorky se na rukopisu podílely stejným dílem, \*uchazečka je první i korespondující autorkou*)

IF = 2,605 v roce 2013; ONCOLOGY Q2

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Analýze podrobena 106 pacientů s CML (74 v CP, 15 v AP a 17 v BP) léčených dasatinibem ve druhé linii v době od 11/2005 do 12/2011 ve 3 centrech zúčastněných v databázi INFINITY
- Pro pacienty v CP byla 2letá pravděpodobnost dosažení CHR 93 %, CCyR 60 % a MMR 51 % v AP/BC byly 2leté kumulativní incidence CHR, CCyR a MMR 50 %, 19 % a 9 %
- Pro pacienty v CP byla 2letá pravděpodobnost přežití bez události následující: OS 92 %, TFS 95 %, PFS 89 %, ATFS 68 %, FFS 63 % a TFFS 61 %. Analogické hodnoty pro pacienty v AP/BP byly 39 %, 53 %, 40 %, 28 %, 19 % a 19 %
- Pleurální výpotky, coby nejsledovanější NÚ dasatinibu, byly přítomny u 26 % pacientů v CP a 28 % v AP/BP
- Naše analýza potvrdila dobrou účinnost a bezpečnost dasatinibu ve druhé linii u pacientů léčených převážně mimo rámec klinických studií
- Kvalitní a kvalifikovaná centralizovaná péče v ČR umožňuje dosažení nejen velmi dobrých léčebných výsledků, ale také vedení detailní databáze schopné evidovat všechny důležité události a mezníky léčby. Ty potom slouží ke kompozici analýz typu FFS, TFFS či ATFS, které sice ve většině reportů ze studií nenajdeme, ale které umožňují reálněji posoudit pozici příslušného léku v klinické praxi.

LETTER TO THE EDITOR

## Efficacy and tolerance of dasatinib after imatinib failure or intolerance for patients with chronic myeloid leukemia treated in three different hospitals compare well with results achievable in formal clinical trials

Daniela Zackova<sup>1</sup>, Hana Klamova<sup>2</sup>, Jan Muzik<sup>3</sup>, Eduard Cmun<sup>4</sup>, Zdenek Racil<sup>1,5</sup>, Katerina Machova Polakova<sup>2</sup>, Dana Dvorakova<sup>1,5</sup>, Tomas Jurcek<sup>1</sup>, Filip Razga<sup>1</sup>, Petr Cetkovsky<sup>2</sup>, Ladislav Dusek<sup>3</sup> & Jiri Mayer<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno and Masaryk University, Brno, Czech Republic, <sup>2</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic, <sup>3</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic, <sup>4</sup>General University Hospital, Prague, Czech Republic and <sup>5</sup>Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dasatinib, a second-generation tyrosine kinase inhibitor, has proved its efficacy in clinical trials in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia (CML) of all phases [1–5]. However, the data relating to dasatinib use in daily clinical practice are still scarce [6,7]. Moreover, there are recognized differences between patients in clinical trials and those treated outside the trials, making the extrapolation of trial results to an entire population difficult and sometimes impossible [8,9]. Furthermore, significant variability exists among study end point definitions, which makes comparison among clinical trial results relatively burdensome. Another aggravating issue is the potential for data unavailability when study subjects are taken off a particular study protocol [10].

In the Czech Republic, where care of patients with CML is specifically centralized among only seven specialized institutions, favorable conditions exist to obtain informative and comprehensive real-life data, as we previously detailed [11]. To ascertain dasatinib therapeutic efficacy and safety in a second-line setting outside of clinical trials, we performed the analysis recorded in this article.

We analyzed data of 106 consecutive adult patients with CML of all phases who were treated with dasatinib from November 2005 to December 2011 at three hematological centers participating in database INFINITY (tyrosine kinase inhibitors in the first and following CML treatment). The database design was approved by the ethics committee at each center, and all patients were required to give written informed consent to data collection. In general, patients were considered resistant or intolerant to previous therapy according to similar criteria used in phase II trials with dasatinib [1–4]. A minority of patients ( $n = 18$ ) were included in clinical trials CA180-034 and CA180-035.

Chronic phase (CP), accelerated phase (AP), blast crisis (BC) and treatment responses were defined according to valid recommendations [12]. Hematologic responses in AP and BC were evaluated according to criteria used in phase II trials [3,4]. Cytogenetic and molecular analyses were performed as previously published [11]. Dasatinib toxicity was assessed by the Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0. Overall survival (OS) was defined as the time from the beginning of dasatinib treatment until death from any cause regardless of dasatinib discontinuation. Transformation-free survival (TFS) was defined as survival without evidence of AP or BC or death during dasatinib therapy. Progression-free survival (PFS) for patients in CP was defined as the time from the beginning of dasatinib therapy until loss of complete hematologic response (CHR), loss of major cytogenetic response (MCgR), progression to AP or BC, or an increasing white blood cell count in patients who never achieved CHR, or to death during dasatinib therapy [1,2]. With PFS for patients in AP/BC, progression was defined as an absence of blast reduction over 4 weeks after receiving the maximum dose of dasatinib, loss of hematologic response, progression to BC, or death from any cause [3,4]. Failure-free survival (FFS) in addition to progression events also included loss of complete cytogenetic response (CCgR), second-line therapy failure by the provisional definition [12], and dasatinib discontinuation for toxicity. Total failure-free survival (TFFS) was defined similarly to FFS and furthermore included dasatinib discontinuation for any reason. Alternative treatment-free survival (ATFS) was established during our previous analysis and used in the same manner here, i.e. ATFS was defined as the time since the start of dasatinib therapy to change to any alternative treatment or death from any cause during dasatinib therapy [11]. Survival probabilities

Daniela Zackova and Hana Klamova contributed equally to this manuscript.

Correspondence: Daniela Zackova, MD, Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno and Masaryk University, I. P. Pavlova 20, 602 00 Brno, Czech Republic. Tel: +420-532-233-642. Fax: +420-532-233-603. E-mail: dzackova@fnbrno.cz

Received 9 November 2012; revised 6 January 2013; accepted 28 January 2013

were estimated using the Kaplan-Meier method. Patients who underwent stem cell transplant were censored in all the above-mentioned analyses with the exception of ATFS. The probabilities of treatment responses were estimated using the cumulative incidence method with consideration of competing risks [13].

In total, we analyzed data of 106 patients with CML (74 in CP, 15 in AP and 17 in BC at the start of dasatinib administration) treated with dasatinib for resistance or intolerance to imatinib. Important patient and disease characteristics, as well as some features of dasatinib therapy, are listed in Table I. The median follow-up on dasatinib was 28 months for patients in CP (range, 0.2-71) and 10 months for patients in AP/BC (range, 0.2-72). Overall, 26 (35%) of patients in CP and 28 (87%) of patients in AP/BC permanently discontinued dasatinib therapy. In CP, the most frequent cause was dasatinib intolerance ( $n = 18$ ). On the other hand, progression to AP/BC was the main reason for dasatinib termination in the group of patients with advanced disease ( $n = 11$ ). Progressive disease was the main cause of death (including

deaths after dasatinib discontinuation): in total, nine (12%) patients in CP and 25 (78%) patients in AP/BC died. In CP, no patient died during dasatinib therapy.

Dasatinib efficacy is presented in Figure 1. Cumulative incidences of responses to dasatinib in CP are shown in Figure 1(A), and in AP/BC in Figure 1(B). In CP, the 2-year cumulative incidence of CHR was 93%, MCgR 69%, CCgR 60%, major molecular response (MMoR) 51% and complete molecular response (CMoR) 30%. For our patients in AP/BC, the 2-year cumulative incidence of CHR was 50%, MCgR 31%, CCgR 19%, MMoR 9% and CMoR 6%. Significantly, in CP, 60%, 18% and 11% of patients were in CHR, MCgR and CCgR, respectively, at the start of dasatinib. The equivalent rates of CHR, MCgR and CCgR for patients in AP were 21%, 0% and 0% and for patients in BC 6%, 12% and 6%, respectively. Figures 1(C) and 1(D) show comprehensive sets of survival analyses for patients in CP and AP/BC, respectively. In CP, estimated OS, TFS, PFS, ATFS, FFS and TFFS at 2 years were 92%, 95%, 89%, 68%, 63% and 61%, respectively. Estimated 2-year probability of OS, TFS, PFS, ATFS, FFS and TFFS in

Table I. Patient, disease and dasatinib therapy characteristics ( $n = 106$ ).

Characteristic	Median [range] or No. (%)	
	CP ( $n = 74$ )	AP/BC ( $n = 32$ )
Age at diagnosis (years)	51 [19-75]	55 [21-71]
Male	31 (42%)	11 (34%)
Female	43 (58%)	21 (66%)
Sokal risk group - low (only for CP at diagnosis)	22 (32%)	3 (12%)
Sokal risk group - intermediate (only for CP at diagnosis)	13 (19%)	7 (28%)
Sokal risk group - high (only for CP at diagnosis)	25 (36%)	8 (32%)
Sokal risk group - unknown (only for CP at diagnosis)	9 (13%)	7 (28%)
Time from diagnosis of CML to start of dasatinib (months)	34 [2-175]	58 [2.4-166]
Prior treatment with imatinib	74 (100%)	31 (97%)
Duration of prior imatinib therapy (months)	25 [0.6-75]	34 [0.8-70]
Duration of imatinib > 3 years	22 (30%)	13 (43%)
Maximum dose of imatinib > 400 mg/day	37 (50%)	20 (67%)
Best response to prior imatinib		
CHR	66 (89%)	22 (73%)
PCgR	12 (16%)	2 (7%)
CCgR	22 (30%)	6 (20%)
Prior SCT	5 (7%)	3 (9%)
Prior Interferon- $\alpha$	27 (36%)	19 (59%)
Age at start of dasatinib (years)	55 [19-79]	59 [27-76]
Reasons for dasatinib therapy		
Resistance/intolerance	54 (72%)/14 (18%)	29 (91%)/2 (6%)
Hematologic resistance/relapse	16 (24%)	27 (86%)
Cytogenetic resistance/relapse	36 (55%)	2 (7%)
Intolerance	12 (18%)	2 (7%)
Resistance + intolerance	2 (3%)	0
Other	8 (10%)*	1 (3%)†
Starting daily dose of dasatinib		
< 100 mg	16 (22%)	4 (12%)
100 mg	49 (66%)	6 (19%)
> 100 mg	9 (12%)	22 (69%)
Mean daily dose of dasatinib (mg)	79 [19-144]	77 [32-162]
Dose modification		
No change	27 (36.5%)	8 (25%)
Dose modified	47 (63.5%)	24 (75%)
Reduced	29 (39%)	15 (47%)
Increased	23 (31%)	9 (28%)
Interrupted	24 (32%)	17 (53%)
Hospitalization due to adverse events	17 (23%)	19 (59%)

CP, chronic phase; AP, accelerated phase; BC, blast crisis; CML, chronic myeloid leukemia; CHR, complete hematologic response; PCgR, partial cytogenetic response; CCgR, complete cytogenetic response; SCT, stem cell transplant; MMoR, major molecular response; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

\*Other reasons: molecular relapse after SCT performed for imatinib resistance ( $\times 4$ ), loss of MMoR in patient in CP after successful therapy for BC ( $\times 1$ ), loss of MMoR + imatinib-resistant mutations ( $\times 2$ ), loss of CCgR only by FISH in a patient on interferon- $\alpha$  after imatinib-intolerance ( $\times 1$ ).

†Other reason: central nervous system (CNS) relapse after SCT ( $\times 1$ ).

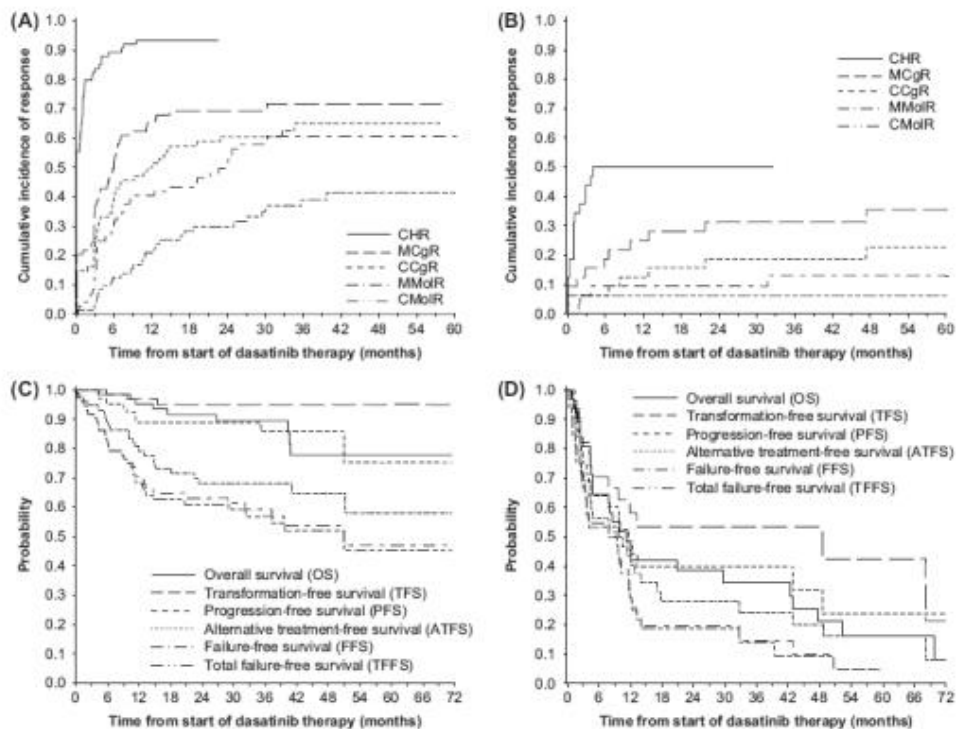


Figure 1. (A) Cumulative incidence of responses to dasatinib in CP. The 2-year cumulative incidence of CHR was 93%, MCgR 69%, CCgR 60%, MMolR 51% and CMolR 30%. (B) Cumulative incidence of responses to dasatinib in AP/BC. The 2-year cumulative incidence of CHR was 50%, MCgR 31%, CCgR 19%, MMolR 9% and CMolR 6%. (C) Survival analyses in CP ( $n = 74$ ). Estimated overall survival (OS), transformation-free survival (TFS), progression-free survival (PFS), alternative treatment-free survival (ATFS), failure-free survival (FFS) and total failure-free survival (TFFS) at 2 years were 92%, 95%, 89%, 60%, 63% and 61%, respectively. (D) Survival analyses in AP/BC ( $n = 32$ ). Estimated 2-year probability of OS, TFS, PFS, ATFS, FFS and TFFS was 39%, 53%, 40%, 28%, 19% and 19%, respectively.

AP/BC was 39%, 53%, 40%, 28%, 19% and 19%, respectively. All analyses, except OS, notably took into account events only during dasatinib therapy.

Non-hematological toxicities of all grades occurred in 67.5% of patients in CP and 81% of patients in AP/BC, with 24% and 28% of patients experiencing adverse events of grade 3/4. Pleural effusions were present in 26% of patients in CP and 28% of patients in AP/BC, with grade 3/4 occurrence in 8% and 9%, respectively. Incidence of hematological toxicity increased from CP to BC, with grade 3/4 of thrombocytopenia, neutropenia and anemia numbering 18%, 15% and 12% in CP, 73%, 60% and 53% in AP, and 82%, 71% and 41% in BC, respectively.

When comparing our results with published real-life data, information is available only about patients in CP. Recent Italian multi-centric analysis included 125 patients with CP-CML treated with dasatinib for imatinib resistance or intolerance. Despite a median age of 70 years and a longer period from diagnosis to initial dasatinib use (median 76 months), dasatinib was highly effective, with MCgR, CCgR and MMolR achievement in 59%, 49% and 31%, and with 2-year OS and event-free survival (EFS, defined similarly to TFFS in our report) reaching 93% and 61%, respectively [7].

These results correspond with data presented in our study, although achieved by older patients with a disease duration median more than twice as long. This can be partially explained by a smaller proportion of patients with high Sokal score compared to our group (15% vs. 36%). Another Italian real-life based analysis reported on 114 patients with imatinib-resistant/intolerant CP-CML with similar median age and high-risk patient proportion to our patients. In spite of frequent dasatinib dose reductions in the Italian cohort (54% of patients), treatment efficacy was encouraging [6]. With only 12-month data available, cumulative incidences of CHR, CCgR and MMolR in comparison to our 12-month estimation were almost equivalent: 94% vs. 93%, 51% vs. 51%, and 32% vs. 40%, with 12-month OS 93% vs. 95%.

When indirectly comparing real-life data to trial results, the cohort of 166 patients with CP-CML treated with 100 mg of dasatinib once daily in the frame of a dose-optimization study appears to be the most suitable [14]. With 2-year rates of CHR, CCgR and MMolR of 92%, 50% and 37%, and OS and PFS 91% and 80%, respectively, we recognize that all cited real-life results, including ours, are comparable, and in some areas even better than referenced trial results. Also, incidences of grade 3/4 neutropenia and



thrombocytopenia in all real-life reports, including ours, were significantly lower with respect to the cited study, perhaps because of more flexible dosing management in clinical practice [6,7]. Concerning our time-to-event analyses, the only clinical trial evaluating the composite end point of dasatinib efficacy and tolerance – time to treatment failure (TTF), defined as TFFS in our report, was the START-R trial [15]. For 101 patients with imatinib-resistant CP-CML treated with dasatinib, the 2-year TTF was 62%, almost identical to our patients' TFFS (61%).

A lower number of patients in advanced phase were evaluated together, so we were not able to convincingly compare their results to those of clinical trials.

In summary, we have confirmed both the efficacy and safety of dasatinib in patients with CML in different stages when generally treated outside of clinical trials. Well-managed centralized care of patients with CML permits treatment event monitoring and composite end-point analyses, such as FFS, TFFS or ATFS, which can reveal particular therapy status in a more detailed and realistic manner.

### Acknowledgements

In particular, we thank Gabriela Vankova, Alexandra Oltova, Jana Brezinova and Kyra Michalova for cytogenetic analyses and data-managers Blanka Dobesova and Jana Rysava for data collection. We also thank Rich Zimmerman for his English text review and corrections.

**Potential conflict of interest:** This work was supported by CELL - The Czech Leukemia Study Group for Life. Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at [www.informahealthcare.com/lal](http://www.informahealthcare.com/lal).

### References

- [1] Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M, et al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood* 2007;109:2303-2309.
- [2] Kantarjian H, Pasquini R, Hamerschlak N, et al. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after

failure of first-line imatinib: a randomized phase 2 trial. *Blood* 2007; 109:5143-5150.

[3] Guilhot F, Apperley J, Kim DW, et al. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood* 2007;109:4143-4150.

[4] Cortes J, Rousselot P, Kim DW, et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood* 2007;109:3207-3213.

[5] Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26:3204-3212.

[6] Visani G, Breccia M, Gozzini A, et al. Dasatinib, even at low doses, is an effective second-line therapy for chronic myeloid leukemia patients resistant or intolerant to imatinib. Results from a real life-based Italian multicenter retrospective study on 114 patients. *Am J Hematol* 2010;85:960-963.

[7] Latagliata R, Breccia M, Castagnetti F, et al. Dasatinib is safe and effective in unselected chronic myeloid leukaemia elderly patients resistant/intolerant to imatinib. *Leuk Res* 2011;35:1164-1169.

[8] Rohrbacher M, Berger U, Hochhaus A, et al. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia* 2009;23:602-604.

[9] Mengis C, Aebi S, Tobler A, et al. Assessment of differences in patient populations selected for excluded from participation in clinical phase III acute myelogenous leukemia trials. *J Clin Oncol* 2003;21:3933-3939.

[10] Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, et al. Impact of treatment end point definitions on perceived differences in long-term outcome with tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:3173-3178.

[11] Zackova D, Klamova H, Dusek L. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: can we compare real life data to the results from clinical trials? *Am J Hematol* 2011;86:318-321.

[12] Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;27:6041-6051.

[13] Pffirmann M, Hochhaus A, Lausker M, et al. Recommendations to meet statistical challenges arising from endpoints beyond overall survival in clinical trials on chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2011;25:1433-1438.

[14] Shah NP, Kim DW, Kantarjian H, et al. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica* 2010;95:232-240.

[15] Kantarjian H, Pasquini R, Lévy V, et al. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer* 2009;115:4136-4147.

#### 4.4.4. Příloha 11

Zackova D.\*, Klamova H., Belohlavkova P., Stejskal L., Necasova T., Semerad L., Weinbergerova B., Srbova D., Voglova J., Cicatkova P., Sustkova Z., Hornak T., Baranova J., Prochazkova J., Mayer J. Dasatinib Treatment Long-Term Results among Imatinib-Resistant/Intolerant Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia are Favourable in Daily Clinical Practice. *Leukemia & Lymphoma*. 2020 Oct 6:1-9. doi: 10.1080/10428194.2020.1827242. Epub ahead of print. PMID: 33021423. (*\*uchazečka je první i korespondující autorkou*)

IF v 2019 = 2,969; HEMATOLOGY Q2, ONCOLOGY Q3

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- 118 pacientů (60 mužů a 58 žen, mediánu věku 60 let v době zahájení terapie) v CP CML, léčených dasatinibem ve druhé linii v letech 2006 až 2019
- Odhadované kumulativní incidence CCyR, MMR a MR4.0 v 5 letech byly 78 % (95% CI: 69-85), 68 % (95% CI: 58-76) a 48 % (95% CI: 37-57) a odhadované OS, PFS, EFS, ATFS, FFS a TFFS v 5 letech od zahájení léčby dasatinibem bylo následující: 86% (95% CI: 79-94), 85% (95% CI: 78-93), 83% (95% CI: 76-92), 53% (95% CI: 44-65), 43% (95% CI: 34-56) a 39% (95% CI: 30-51)
- Jak OS, tak EFS byly signifikantně lepší u pacientů, kteří dosáhli ve 3 měsících od zahájení terapie tzv. časně molekulární odpovědi, tj. poklesu hladiny transkriptů *BCR-ABL1*  $\leq 0,1$  %
- Pleurální výpotky se vyskytly u 29 % pacientů a byly zodpovědné za 30 % případů trvalého ukončení terapie dasatinibem
- Unikátní analýza incidence klinických nehematologických NÚ v čase ukázala, že i po letech terapie jsou tyto přítomny u téměř poloviny léčených pacientů
- Potvrzena výborná dlouhodobá účinnost a snášenlivost léčby dasatinibem ve 2. linii v podmínkách každodenní praxe realizované v rámci kvalitní centralizované péče.

## Dasatinib treatment long-term results among imatinib-resistant/intolerant patients with chronic phase chronic myeloid leukemia are favorable in daily clinical practice

Daniela Zackova<sup>a</sup>, Hana Klamova<sup>b</sup>, Petra Belohlavkova<sup>c</sup>, Lukas Stejskal<sup>d</sup>, Tereza Necasova<sup>e</sup>, Lukas Semerad<sup>a</sup>, Barbora Weinbergerova<sup>a</sup>, Dana Srbova<sup>b</sup>, Jaroslava Voglova<sup>c</sup>, Petra Cikatkova<sup>a</sup>, Zuzana Sustkova<sup>a</sup>, Tomas Hornak<sup>a</sup>, Jana Baranova<sup>e</sup>, Jirina Prochazkova<sup>a</sup> and Jiri Mayer<sup>a,f</sup>

<sup>a</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno and Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>b</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Praha, Czech Republic; <sup>c</sup>4th Department of Internal Medicine – Hematology, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>d</sup>Department of Hematooncology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic; <sup>e</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Ltd., Brno, Czech Republic; <sup>f</sup>Central European Institute of Technology, Brno, Czech Republic

### ABSTRACT

To evaluate long-term real-life results of dasatinib therapy among chronic phase chronic myeloid leukemia patients resistant or intolerant to imatinib, we retrospectively analyzed data of 118 patients treated in centers participating in the database INFINITY. With median follow-up of 37 months, estimated 5-year cumulative incidences of complete cytogenetic and major molecular responses were 78% and 68%, respectively. The estimated 5-year probability of overall survival (OS) and event-free survival (EFS) were 86% and 83%, respectively. Both OS and EFS were significantly improved among patients with *BCR-ABL1* transcript level  $\leq 10\%$  at 3 months. Dasatinib toxicity was tolerable however persistent in almost half our patients, even after years of therapy. Pleural effusion occurred in 29% of patients and was responsible for 30% of dasatinib discontinuations. Our results confirmed very good efficacy and acceptable toxicity of dasatinib in second line setting and support the evidence and importance of high-quality real-life CML patient management.

### ARTICLE HISTORY

Received 29 March 2020  
Revised 11 September 2020  
Accepted 13 September 2020

### KEYWORDS

Chronic myeloid leukemia;  
chronic phase; imatinib;  
dasatinib; second line; daily  
clinical practice



### Introduction


The introduction of imatinib, the first approved tyrosine kinase inhibitor (TKI), has considerably changed the prognosis of chronic myeloid leukemia (CML) patients, particularly when diagnosed in chronic phase (CP). The estimated overall survival (OS) rate of CP-CML patients treated with imatinib treatment in the first line during a pivotal IRIS trial was 83% at 10 years, despite treatment discontinuation with approximately 50% of patients for imatinib resistance and/or intolerance [1]. This well-shaped OS curve therefore affirms both imatinib efficacy as well as a significant salvage effect provided by second line therapy with second generation TKIs.

Dasatinib, a second generation TKI which is *in vitro* 325 times more potent against unmutated Bcr-Abl tyrosine kinase than imatinib and also active against the majority of imatinib-resistant Bcr-Abl kinase

domain (KD) mutations, entered second line setting clinical practice based on phase II registration trials START-C and START-R [2–4]. Approximately, 50% and 40% of CP-CML patients from both trials reached complete cytogenetic response (CCyR) and major molecular response (MMR) after 2 years of follow-up, respectively. Given the prerequisite of life long TKIs administration in a vast majority of CML patients, there is a strong demand for high-quality long-term data. However, no information is presently available detailing the long-term outcome of patients enrolled in these trials.

The only clinical trial using second generation TKIs in a second line setting and reporting on long-term outcome of participating patients is a phase III study CA180-034 [5,6]. A seven year analysis of this trial uniquely represents the longest inclusive follow-up of any second generation TKI study [7]. Similarly,

CONTACT Daniela Zackova  Zackova.Daniela@fnbrno.cz  Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, Brno 625 00, Czech Republic

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

**Table 1.** Patient, disease, and treatment characteristics (*n* = 118).

Characteristic	Median [range] or <i>N</i> (%)
Age at diagnosis (years)	56 [18–79]
Male	60 (51%)
Female	58 (49%)
Sokal risk group – low	35 (30%)
Sokal risk group – intermediate	26 (22%)
Sokal risk group – high	43 (37%)
Sokal risk group – unknown	13 (11%)
Duration of prior imatinib therapy (months)	28 [0.2–119]
Duration of imatinib > 3 years	42 (36%)
Prior SCT	3 (3%)
Prior interferon- $\alpha$	28 (24%)
Time from CML diagnosis to dasatinib start (months)	31 [2–178]
Age at start of dasatinib (years)	60 [19–83]
Reasons for dasatinib therapy	
Resistance/intolerance/combination	87 (74%)/24 (20%)/7 (6%)
Hematologic resistance/relapse	15 (13%)
Cytogenetic resistance/relapse	49 (42%)
Molecular resistance, mutations <sup>a</sup>	23 (19%)
Hematological intolerance	1 (1%)
Non-hematological intolerance	23 (19%)
Combination of resistance + intolerance	7 (6%)
Cytogenetic resistance + hematological intolerance	3
Cytogenetic resistance + non-hematol. intolerance	2
Hematologic resistance + non-hematol. intolerance	1
Cytogen. resistance + non-hemat.+hemat.intoler.	1
Starting daily dose of dasatinib	
<100 mg	49 (42%)
100 mg	56 (47%)
>100 mg	5 (4%)
Unknown	8 (7%)
Dasatinib dose modification	
No change	26/111 <sup>b</sup> (23%)
Dose modification	85/111 (77%)
Reduction	70/111 (63%)
Increase	53/111 (48%)
Interruption	48/111 (43%)
Mean dasatinib daily dose – all patients (mg)	70 [28–122]
Mean dasatinib daily dose – in pts. with dose reduction	
Before dose reduction (mg)	100 [60–140]
After dose reduction (mg)	60 [20–100]

CML: chronic myeloid leukemia; SCT: stem cells transplantation.

<sup>a</sup>Mutations without loss of complete cytogenetic response or complete hematologic response: F359I, Y253H, V379I, K419E, and H396P.

<sup>b</sup>In seven patients information about dasatinib dose was unknown.

analogous long-term data from daily clinical practice are scarce as well. Despite encouraging signals of comparable or even better results achieved in CML patients treated outside clinical trials [8–13], there is still need for high-quality long-term data from daily clinical practices, since a significant amount of published real-life analyses disclosed considerable pitfalls in terms of incomplete or missing data, only partial coverage of a targeted patient population, and financial constraints leading to premature closure of real-life registries, etc. [14–16].

In the Czech Republic, where rare disease care has been specifically centralized into a limited number of highly professional well-equipped centers and detailed regularly validated data about all comprehensive CML patients have been collected into a database INFINITY, analogous TKI therapy efficacy and toxicity in daily clinical practice and clinical trials was reported with a

shorter follow-up [17–19]. To evaluate long-term efficacy and safety of dasatinib therapy in a second-line setting outside clinical trials, a retrospective analysis was carried out and results are detailed herein.

## Materials and methods

We retrospectively analyzed data of 118 consecutive adult CP-CML patients treated with dasatinib due to imatinib resistance or intolerance from April 2006 to August 2019 at four hematological centers connected with an INFINITY database. All patients included in the database were required to give written informed consent to data collection. Resistance and/or intolerance to imatinib were judged according to criteria similar to the phase III trial, although the reasons for dasatinib therapy also reflected particular center policy and individual physician decision. Cytogenetic analyses

were performed as previously published [17]. An optimized multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was adopted from Cross et al. to determine the type of *BCR-ABL1* transcript [20]. Real-time quantitative PCR (RQ RT-PCR), standardized within the international program EUTOS for CML [21], was performed according to Europe Against Cancer recommendations [22,23]. Mutational analyses were undertaken using direct sequencing method according to respective recommendations [24]. Treatment responses were defined according to valid recommendations [25]. The first achievement of particular treatment response over time was analyzed using cumulative incidence curves indicating treatment response velocity [26]. Patients with baseline responses were not excluded from response rate calculations. Permanent discontinuation of dasatinib and death were identified as competing risks for treatment response assessment. Dasatinib toxicity was assessed by the Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0. Overall survival was defined as the time from dasatinib initiation until death from any cause regardless of dasatinib discontinuation, and progression-free survival (PFS) was identified as survival without progression to accelerated phase (AP) or blast phase (BP) or death again regardless of dasatinib discontinuation [27]. In all other survival analyses, only events during dasatinib therapy were taken into account. Event-free survival (EFS) was defined as the period from dasatinib initiation until loss of complete hematologic response (CHR), loss of major cytogenetic response (MCyR), progression to AP or BP, or an increasing white blood cell count in patients without baseline CHR, or death; failure-free survival (FFS) in addition to progression events also included loss of CCyR, failure criteria according to valid recommendations [25], and dasatinib discontinuation due to intolerance. Total failure-free survival (TFFS) in addition to events included in FFS also counted dasatinib discontinuation for any reason. Finally, alternative treatment-free survival (ATFS) was defined as the time from dasatinib initiation to change to any alternative treatment, or death from any cause during dasatinib therapy [17]. Survival probabilities were estimated using the Kaplan–Meier method. Estimates for specific time points were accompanied by 95% confidence intervals (CIs). OS and EFS landmark analyses were performed according to early molecular response (EMR), i.e. the level of *BCR-ABL1* transcripts on the International Scale (IS) after 3 months on dasatinib. Survival curves were compared using a log-rank test and Gray's test in the case of competing risks.

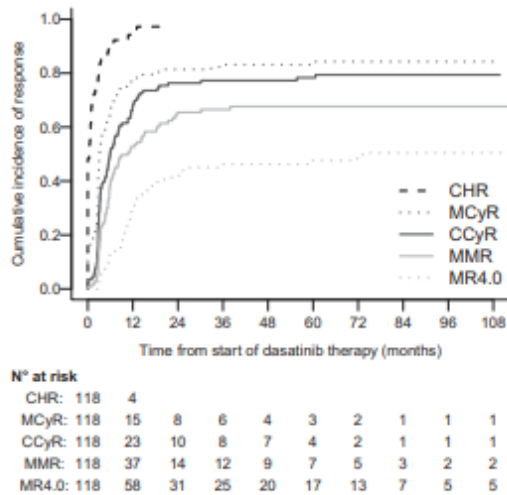
## Results

### *Patient, disease, and dasatinib therapy characteristics*

We analyzed data of 118 CP-CML patients resistant or intolerant to previous imatinib therapy, treated with dasatinib in second line setting. The median follow-up time with dasatinib therapy was 37 months (range 0.2–163). The reason for dasatinib second-line therapy was resistance to imatinib in 87 (74%), intolerance in 24 (20%), and a combination in seven (6%) of patients, respectively. Further imatinib resistance specifications and intolerance patterns as well as other patient, disease and dasatinib treatment characteristics are listed in Table 1.

At the time of dasatinib therapy initiation, mutational analysis was performed in 48 patients (41%). *Bcr-Abl* KD mutations were detected in 25/48 evaluated patients (52%). Mutation type description in each particular patient as well as subsequent treatment outcome is presented in Online Supporting Information, including Online Supplementary Figure S1 (Fig. S1). During dasatinib therapy, newly emerged or reemerged mutations were detected in eight patients. Mutations and patient outcome details are also outlined in Online Supporting Information.

Overall, 56 (47%) patients permanently discontinued dasatinib therapy at a median time of 21 months (range, 0.2–123). The main reason for terminating dasatinib therapy was intolerance in 34/56 (60%) patients: hematological in five (8%) patients, non-hematological in 28 (50%) patients, and combination of both types of toxicities in one (2%) patient, respectively. The most frequent type of intolerance leading to dasatinib permanent discontinuation was pleural effusion (PE) in 17 patients (61% of patients stopping due to non-hematological intolerance and 30% from all dasatinib withdrawals). Resistance or failure of dasatinib therapy led to dasatinib termination in 13 (23%) of patients: Progression to AP or BP in two patients, hematologic resistance in two patients, and cytogenetic resistance in nine patients, respectively. With three patients (5%), the reason for ceasing dasatinib was death. With seven (12%) remaining patients there were other reasons for dasatinib discontinuation: Allogeneic stem cells transplantation (SCT) ( $n=1$ ), switch to palliative therapy ( $n=1$ ), loss to follow-up ( $n=1$ ), enrolling in a discontinuation trial ( $n=3$ ), and pregnancy in one patient, respectively. In total, 44/56 (79%) patients who had permanently discontinued dasatinib received subsequent therapy reflecting its availability, approval, and reimbursement status:



**Figure 1.** Cumulative incidence of responses to dasatinib after imatinib failure or intolerance ( $n=118$ ). The estimated 5-year cumulative incidence of major cytogenetic response (MCyR) was 83% (95% confidence interval (CI): 75–89), complete cytogenetic response (CCyR) 78% (95% CI: 69–85), major molecular response (MMR) 68% (95% CI: 58–76), and MR4.0 48% (95% CI: 37–57), respectively.

nilotinib ( $n=29$ ), imatinib ( $n=5$ ), bosutinib ( $n=2$ ), ponatinib ( $n=1$ ), hydroxyurea ( $n=4$ ), interferon- $\alpha$  ( $n=1$ ), and SCT ( $n=2$ ), respectively. With 11/118 (9%) patients, progression to advanced phase occurred: BP in four patients and AP in seven patients with subsequent progression into BP in five of them. With three patients, progression occurred on dasatinib therapy at 11, 26, and 84 months since dasatinib treatment initiation, respectively, and with eight patients after a median of 9 months since dasatinib discontinuation (range 0.7–115). All but one patient died due to CML progression as of the last data analysis. There were 23 (19%) deaths among analyzed patients during the entire follow-up. Eleven patients died from CML activity/progression, while with 10 patients, reasons were non-CML related, and with two patients, cause of death was unknown.

### Dasatinib efficacy

Dasatinib efficacy expressed by cumulative incidences of treatment responses was as follows: the 1-year cumulative incidence of CHR 94% (95% CI: 87–97), the estimated 5-year cumulative incidence of MCyR 83% (95% CI: 75–89), CCyR 78% (95% CI: 69–85), MMR 68% (95% CI: 58–76), and MR4.0, defined as *BCR-ABL1* transcript level  $\leq 0.01\%$  (IS), 48% (95% CI: 37–57),

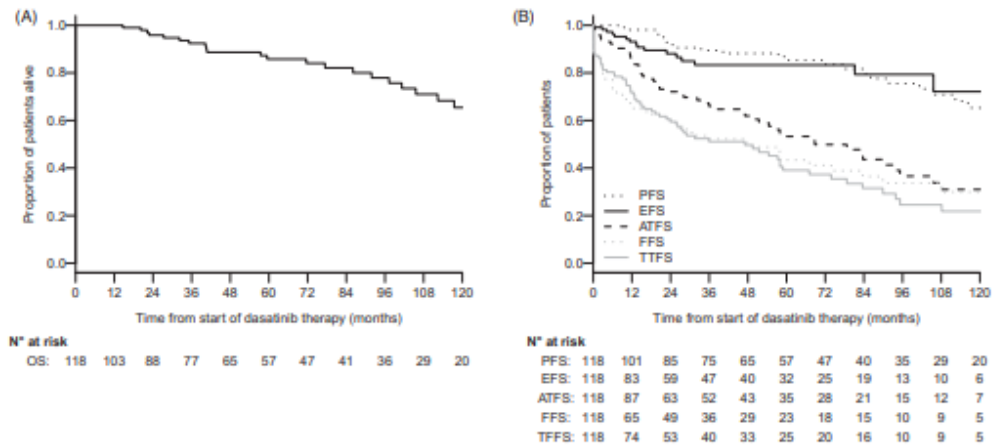
respectively (Figure 1). At the time of dasatinib initiation, CHR was already present in 52%, MCyR in 16%, CCyR in 4%, and MMR in 1% of patients, respectively. Despite dasatinib dose reduction and/or temporary treatment interruption in virtually 2/3 of evaluable patients, cytogenetic and molecular responses were maintained or improved in 89% and 90% of them, respectively (Online Supporting Information). Subgroup analyses of cumulative incidences of CCyR and MMR according to the reason for dasatinib therapy revealed statistically significant difference for both CCyR and MMR in favor of imatinib-intolerant ( $n=24$ ) vs. -resistant ( $n=87$ ) patients (the 4-year estimation;  $p$  value=.013 and .032, respectively) (Online Supplementary Fig. S2).

Survival analyses are presented in Figure 2. Estimated 5-year OS was 86% (95% CI: 79–94) (Figure 2(A)), and estimated probabilities of PFS, EFS, ATFS, FFS, and TFFS at 5 years were 85% (95% CI: 78–93), 83% (95% CI: 76–92), 53% (95% CI: 44–65), 43% (95% CI: 34–56), and 39% (95% CI: 30–51), respectively (Figure 2(B)). The 5-year estimation of OS, PFS, and EFS for patients with imatinib-resistance vs. imatinib-intolerance showed no statistical difference between either group in all three parameters, respectively (Online Supplementary Fig. S3).

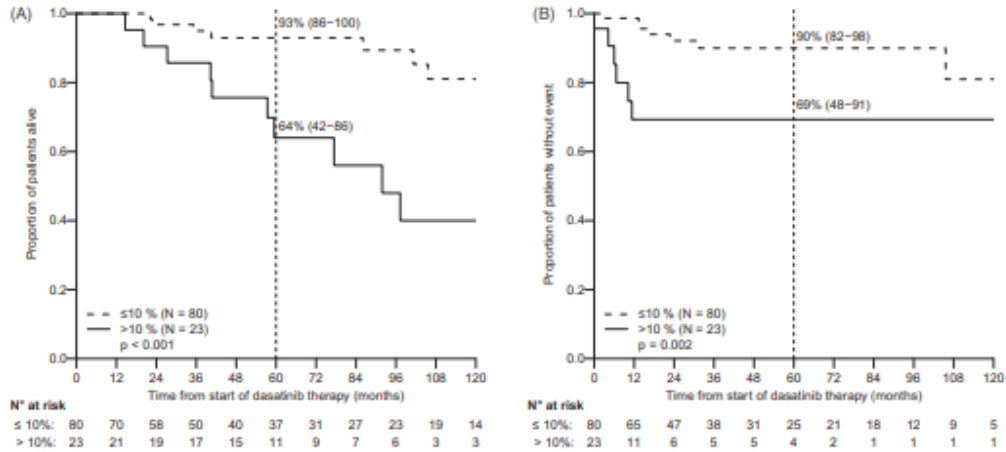
Landmark analyses for OS and EFS according to EMR achievement were performed, as demonstrated in Figure 3. For both OS and EFS, estimated 5-year survival rates were significantly improved for patients with *BCR-ABL1* (IS) transcript level  $\leq 10\%$  at 3 months compared to those with transcript levels  $>10\%$  at this time point. Five-year OS estimate for patients with *BCR-ABL1* (IS) transcript level  $\leq 10\%$  at 3 months was 93% (95% CI: 86–100) vs. 64% (95% CI: 42–86) for patients with  $>10\%$ , respectively ( $p$  value<.001) (Figure 3(A)). Five-year EFS estimate for patients with *BCR-ABL1* (IS) transcript level  $\leq 10\%$  at 3 months was 90% (95% CI: 82–98) vs. 69% (95% CI: 48–91) for patients not achieving EMR milestone, respectively ( $p$  value=.002) (Figure 3(B)).

### Dasatinib safety

During dasatinib therapy, non-hematological toxicity of any type and grade was present in 81 (69%) patients. Particular adverse events (AEs) occurring in  $\geq 5\%$  of dasatinib treated patients are listed in Table 2. The most frequent as well as pivotal non-hematological AE was PE occurring altogether in 34 (29%) patients. Pleural effusion was also responsible for 30% of all dasatinib withdrawals. PE incidence was not



**Figure 2.** Survival analyses of CP-CML patients treated with dasatinib after imatinib failure or intolerance. (A) Overall survival (OS). The estimated 5-year OS was 86% (95% confidence interval (CI): 79–94). (B) Time-to-event analyses: progression-free survival (PFS), event-free survival (EFS), alternative treatment-free survival (ATFS), failure-free survival (FFS), and total failure-free survival (TFFS). The estimated probabilities of PFS, EFS, ATFS, FFS, and TFFS at 5 years were 85% (95% CI: 78–93), 83% (95% CI: 76–92), 53% (95% CI: 44–65), 43% (95% CI: 34–56), and 39% (95% CI: 30–51), respectively.



**Figure 3.** Kaplan-Meier's landmark analyses according to *BCR-ABL1* transcript level at 3 months for (A) overall survival (OS) and (B) event-free survival (EFS). For both OS and EFS, estimated 5-years survival rates were significantly better for patients who achieved *BCR-ABL1* (International Scale, IS) transcript levels  $\leq 10\%$  at 3 months compared to those with  $>10\%$  at the same time point.

restricted to the initials years of therapy. Actually, patients had also been experiencing PE after extended periods of time: From all 34 PE cases, 16 (47%) occurred up to 2 years from dasatinib initiation, 11 (32%) during the 3rd and 4th year of therapy, four (12%) during the 5th and 6th year, and finally three (9%) patients suffered from PE first occurrence even after 7 years of dasatinib treatment. Pleural effusion cumulative incidence is highlighted in Figure S4

(Online Supplementary Fig. S4). Possible risk factors for PE development are summarized in Table S1 (Online Supplementary Tab. S1). In spite of the drug's temporary interruption and/or dose reduction, PE recurred in 21 (62%) of patients. In our cohort, no patient developed pulmonary hypertension. Arterial ischemic events occurred only in two (2%) patients. Regarding hematological toxicity, anemia, thrombocytopenia, and neutropenia of all grades were present

**Table 2.** Clinical non-hematological toxicity of dasatinib therapy (occurring in  $\geq 5\%$  of patients).

Adverse event	Total, N (%)	Grade 1/2, N (%)	Grade 3/4, N (%)
Pleural effusion	34 (29%)	20 (17%)	14 (12%)
Infection	29 (25%)	24 (20%)	5 (4%)
Fatigue	25 (21%)	24 (20%)	1 (1%)
Dyspnea	18 (15%)	15 (12%)	3 (3%)
Musculoskeletal pain	16 (14%)	13 (11%)	3 (3%)
Skin rash	13 (11%)	13 (11%)	0
Peripheral edemas	12 (10%)	12 (10%)	0
Fevers without infection	9 (8%)	8 (7%)	1 (1%)
Diarrhea	8 (7%)	5 (4%)	3 (3%)
Nausea and vomiting	7 (6%)	7 (6%)	0
Dyspepsia	6 (5%)	6 (5%)	0
Headache	6 (5%)	5 (4%)	1 (1%)

in 65%, 55%, and 41% of patients, respectively, with only 4%, 7%, and 8% of patients reaching grade 3–4, respectively.

Regarding clinical non-hematological dasatinib intolerance, a unique analysis of incidence in time was carried out (Table 3). Although mostly of low to moderate intensity, clinical non-hematological toxicity was even present after years of therapy in almost half of treated patients.

## Discussion

In our retrospective analysis, we confirmed excellent and durable efficacy of dasatinib among CP-CML patients with whom previous imatinib therapy failed or was not tolerated. With estimated 5-year cumulative incidence of CCyR 78%, MMR 68%, and MR4.0 48%, and estimated 5-year OS 86%, PFS 85%, and EFS 83%, respectively, our real-life results rather resemble outcomes of patients treated with dasatinib in a first line than in a second line setting [28]. Nevertheless, in addition to the most commonly used survival analyses, our comprehensive data also enabled calculation of more realistic composite endpoint analyses, such as ATFS, FFS, and TFFS, with estimated 5-years probability reaching 53%, 43%, and 39%, respectively. We believe that our landmark analyses of OS and EFS according to *BCR-ABL1* transcript levels at 3 months has, for the first time in a real-life second line setting, confirmed significantly better results in the case of EMR achievement, i.e. *BCR-ABL1* transcript levels  $\leq 10\%$  at this time point. Dasatinib treatment safety was satisfactory and anticipated with PE confirmed as a pivotal AE – affecting altogether 29% of patients even after several years of successful therapy, reoccurring in 62% of patients in spite of dose reduction, and leading to permanent dasatinib discontinuation in almost 1/3 of cases. Although cumulative incidence of other non-hematological AE ranged between 1 and 25%, our analysis of incidence over time revealed AE

persistence for a long period, although intensity was mainly low to moderate grade.

In the phase III clinical trial CA180-034 offering the longest published experience with dasatinib in a second line setting, during a 37 month dasatinib therapy analogous median duration with patients randomized for a 100 mg QD starting dose ( $n = 167$ ), 7-year rates for MMR, MR4.0, OS, and PFS in the study were as follows: 46%, 29%, 65%, and 42%, respectively [7]. Our analysis recorded 7-year estimated rates of MMR, MR4.0, OS, and EFS (defined similarly as PFS in the study) 68% (95% CI: 58–76), 50% (95% CI: 40–60), 82% (95% CI: 74–91), and 79% (95% CI: 69–91), respectively. Being aware that it is virtually impossible to compare the aforementioned study with our analysis outcome, we can only speculate whether inferior results achieved in the study were at least partially due to a more advanced disease stage among the study patients with longer CML duration until the start of dasatinib therapy (median of 55 vs. 31 months with our patients) or a higher proportion of patients more extensively pretreated before dasatinib therapy in the study (46% vs. 36% of patients treated with imatinib  $>3$  years, and 52% vs. 24% of patients treated with interferon- $\alpha$  before imatinib, respectively). Of note, mean daily dasatinib dose median was 99 mg in the study vs. only 70 mg in our patients, implicating very good efficacy even with lower than standard doses as previously indicated [29,30]. The long-term clinical benefit of EMR achievement in terms of significantly better OS and PFS was demonstrated in the study as well as in our analysis (7-years OS and PFS rates for patients in the study with *BCR-ABL1* (IS) transcript levels  $\leq 10\%$  at 3 months were 72% and 56% vs. 56% and 21% for those with levels  $>10\%$ , respectively;  $p$  value = .0374 for OS and  $\leq .0001$  for PFS). Regarding safety, the spectrum of most frequently reported AE did not differ significantly between the study and our analysis; however, the proportion of patients affected by particular AE of any grade was higher in the study than what we reported, such as in case of infection (67% vs. 25%), fatigue (37% vs. 21%), rash (33% vs. 11%), or musculoskeletal pain (37% vs. 14%), respectively. By contrast, PE incidence was almost the same (28% vs. 29%) as well as the finding that cumulative PE incidence increased over time. Interestingly, in the study, only 7% of patients with PE permanently discontinued dasatinib therapy vs. 30% in our analysis (and 61% from all the patients with PE). Satisfactorily, arterial ischemic event incidence was low both in the study and in our analysis (4% vs. 2%, respectively). Regarding overall discontinuation rate with a median



**Table 3.** Incidence of clinical non-hematological toxicities of dasatinib in time (summary by patients in time).

Grade/year after dasatinib initiation	Year 1 (N = 117)	Year 2 (N = 92)	Year 3 (N = 72)	Year 4 (N = 53)	Year 5 (N = 39)
1	17 (14%)	8 (8%)	5 (7%)	3 (6%)	3 (8%)
2	26 (22%)	19 (20%)	17 (24%)	15 (28%)	11 (28%)
3	16 (14%)	10 (12%)	6 (8%)	4 (8%)	2 (5%)
4	1 (1%)	0	0	0	0
Total	60 (51%)	37 (40%)	28 (39%)	22 (42%)	16 (41%)

follow-up of 37 months, 78% vs. 47% of patients terminated dasatinib therapy in the study vs. our analysis. While the main reason for study treatment discontinuation was a switch to commercially available dasatinib (32%) and then intolerance (30%), 60% of patients stopped treatment after intolerance with our real-life cohort. The rate of patients terminating dasatinib treatment due to resistance in the study and in our report was nearly equal (21% vs. 23%, respectively).

The longest observation of patients treated with dasatinib in a second line setting outside clinical trials was published by Tiribelli et al. [12]. Authors retrospectively analyzed 163 patients treated with dasatinib ( $n = 95$ ) and nilotinib ( $n = 68$ ) in 10 Italian hematologic centers. With a median follow-up of 48 months and focusing only on patients treated with dasatinib, rates of CCyR, MMR, and MR4.0 were 77%, 60%, and 41%, respectively. Excellent treatment responses achieved in daily clinical practice were crowned with notable long-term outcomes of 5-year OS, PFS, and time to treatment failure (TTF; defined as our FFS) rates 88%, 86%, and 59%, respectively. Looking at estimated 5-year survival probabilities in our analysis, with OS, PFS, and FFS rates 86%, 85%, and 43%, the outcomes reported by Italian colleagues were comparable or even better than with our patients. This statistic could have resulted from the lower Italian cohort proportion with high risk Sokal score at diagnosis compared to our patients (20% vs. 37%, respectively), shorter duration of previous treatment with imatinib (a median of 19 vs. 28 months, respectively), or a higher proportion of patients starting dasatinib therapy with a dose of 100 mg QD (83% vs. 48%, respectively). Nevertheless, the dasatinib dose was permanently reduced in about 1/3 of Italian patients due to AE, while treatment response was maintained with 90% of them, similarly as with our patients. With Italian patients, rates of CCyR and MMR were higher in patients switched to dasatinib due to imatinib-intolerance than -resistance, again in concordance with our results. Similar comparison for survival analyses, showing no significant difference between both of our patient groups, was not presented in the Italian report. Comparable to our data, Tiribelli et al. reported 42% of patients

permanently stopping dasatinib therapy (vs. 47% in our cohort) with PE responsible for 25% of all discontinued cases (PE incidence was not reported). Overall, intolerance was the leading cause for dasatinib discontinuation with both the Italian cohort and our patients as well (55% vs. 60%, respectively).

In conclusion, consistent with long-term real-life data from Italy, we have confirmed excellent efficacy of dasatinib administered after resistance or intolerance of previous imatinib therapy in daily clinical practice. This phenomenon can be at least partially explained by the quality of centralized care of CML patients in the Czech Republic in accordance with findings from a large German CML IV study indicating significantly improved outcome of CML patients treated in academic centers vs. other types of hospitals [31]. Another point potentially responsible for improved real-life results is the possibility of more flexible dose management outside the stringent rules of clinical trial protocol. Moreover, our detailed regularly validated database facilitates collection of all important events during and even after treatment protocol. Therefore, along with traditional survival estimates, composite endpoints analyses, such as FFS or ATFS can also be created in order to reflect particular therapy position more realistically.

With excellent survival probability even in a subsequent line setting and given the lifelong character of CML treatment, the toxicity issue has become highly relevant. Whereas therapy with nilotinib has been associated with increased incidence of ischemic arterial events even in a first line setting, our data confirmed very low incidence of such events during long-term dasatinib administration in accordance with both phase III clinical trial results and the large analysis of pooled clinical trial data of more than 2700 dasatinib-treated patients [32,33]. Nevertheless, consistent with our results, intolerance was repeatedly reported as a main reason for permanent discontinuation of second line TKI therapy, particularly in real-life conditions [9,12,34,35]. We also confirmed an important phase III study determination about increasing PE cumulative incidence over time. Since PE incidence in our analysis supported by other published real-life reports [36–38] corresponded to data from the phase III trial,

proportion of patients ceasing treatment permanently due to PE was higher outside the trial [12,36,37]. Our unique analysis of AE incidence in time confirmed their durability. These findings support the importance of high-quality real-life data focusing not only on standard efficacy measurements, but also on long-term tolerance evaluation, with implications to AEs awareness and optimal management including proper patient selection and applicable drug dose adjustment.

### Acknowledgements

In particular, we thank data-managers Radek Minarik, Jana Rysava, Katerina Khaddourova, Jana Kralova, Eva Valouskova, and Martina Januskova for data collection. We also thank Rich Zimmerman for his English text review and corrections.

### Disclosure statement

D.Z. served on a speakers bureau for Bristol Myers Squibb and Angelini, as a member of Advisory board for Novartis and Incyte, and as a consultant for Angelini. J.M. received research funding from Novartis, Bristol Myers Squibb and Angelini, and serves on a speakers bureau for Novartis and Bristol Myers Squibb. Other authors declare no potential conflict of interest.

### Funding

This work was supported by the CzeCh Leukemia Study Group for Life - CELL and by the Masaryk University under Grant No. MUNI/A/1395/2019.

### References

- [1] Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, et al. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2017;376(10):917–927.
- [2] Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia.* 2008;22(6):1200–1206.
- [3] Kantarjian H, Pasquini R, Lévy V, et al. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer.* 2009;115(18):4136–4147.
- [4] Hochhaus A, Müller MC, Radich J, et al. Dasatinib-associated major molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following imatinib failure: response dynamics and predictive value. *Leukemia.* 2009;23(9):1628–1633.
- [5] Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3204–3212.
- [6] Shah NP, Kim DW, Kantarjian H, et al. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica.* 2010;95(2):232–240.
- [7] Shah NP, Rousselot P, Schiffer C, et al. Dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant chronic-phase, chronic myeloid leukemia patients: 7-year follow-up of study CA180-034. *Am J Hematol.* 2016;91(9):869–874.
- [8] Yilmaz M, Kantarjian H, Jabbour E, et al. Similar outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib in or out of clinical trials. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013;13(6):693–699.
- [9] Castagnetti F, Di Raimondo F, De Vivo A, et al. A population-based study of chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib in first line. *Am J Hematol.* 2017;92(1):82–87.
- [10] Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, et al. Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry. *Leukemia.* 2017;31(3):593–601.
- [11] Cory-Makhoul P, Gardembas M, Coiteux V, et al. Nilotinib after imatinib first-line: a real-life longitudinal cohort of patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase. *Br J Haematol.* 2018;180(3):356–364.
- [12] Tiribelli M, Bonifacio M, Binotto G, et al. Excellent outcomes of 2G-TKI therapy after imatinib failure in chronic phase CML patients. *Oncotarget.* 2018;9(18):14219–14227.
- [13] Geelen IGP, Thielen N, Janssen JJWM, et al. Treatment outcome in a population-based, 'real-world' cohort of patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2017;102(11):1842–1849.
- [14] Kizaki M, Okamoto S, Tauchi T, et al. Current and future perspectives on the TARGET system: the registration system for Glivec established by the JSH. *Int J Hematol.* 2008;88(4):409–417.
- [15] Shepherd P, Dhanapala C, Maguire C, et al. Successful use of National Cancer Registry data to monitor the effective use of imatinib for treating chronic myeloid leukaemia. *Scott Med J.* 2008;53(3):8–12.
- [16] Henk HJ, Woloj M, Shapiro M, et al. Real-world analysis of tyrosine kinase inhibitor treatment patterns among patients with chronic myeloid leukemia in the United States. *Clin Ther.* 2015;37(1):124–133.
- [17] Zackova D, Klamova H, Dusek L, et al. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: can we compare real life data to the results from clinical trials? *Am J Hematol.* 2011;86(3):318–321.
- [18] Zackova D, Klamova H, Muzik J, et al. Efficacy and tolerance of dasatinib after imatinib failure or intolerance for patients with chronic myeloid leukemia treated in three different hospitals compare well with results achievable in formal clinical trials. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(10):2310–2313.

- [19] Faber E, Mužík J, Koza V, et al. Treatment of consecutive patients with chronic myeloid leukaemia in the cooperating centres from the Czech Republic and the whole of Slovakia after 2000 – a report from the population-based CAMELIA Registry. *Eur J Haematol.* 2011;87(2):157–168.
- [20] Cross NC, Melo JV, Feng L, et al. An optimised multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in hematological disorders. *Leukemia.* 1994;8:186–189.
- [21] Müller MC, Cross NC, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia.* 2009;23(11):1957–1963.
- [22] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program”. *Leukemia.* 2003;17(12):2474–2486.
- [23] Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, et al. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer Program. *Leukemia.* 2003;17(12):2318–2357.
- [24] Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood.* 2011;118(5):1208–1215.
- [25] Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013;122(6):872–884.
- [26] Pffirmann M, Hochhaus A, Lauseker M, et al. Recommendations to meet statistical challenges arising from endpoints beyond overall survival in clinical trials on chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011;25(9):1433–1438.
- [27] Guilhot J, Baccarani M, Clark RE, et al. Definitions, methodological and statistical issues for phase 3 clinical trials in chronic myeloid leukemia: a proposal by the European LeukemiaNet. *Blood.* 2012;119(25):5963–5971.
- [28] Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, et al. Final 5-year study results of DASISION: the Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol.* 2016;34(20):2333–2340.
- [29] Visani G, Breccia M, Gozzini A, et al. Dasatinib, even at low doses, is an effective second-line therapy for chronic myeloid leukemia patients resistant or intolerant to imatinib. Results from a real life-based Italian multicenter retrospective study on 114 patients. *Am J Hematol.* 2010;85(12):960–963.
- [30] Naqvi K, Jabbour E, Skinner J, et al. Early results of lower dose dasatinib (50 mg daily) as frontline therapy for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Cancer.* 2018;124(13):2740–2747.
- [31] Hehlmann R, Lauseker M, Saußele S, et al. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia.* 2017;31(11):2398–2406.
- [32] Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia.* 2016;30(5):1044–1054.
- [33] Saglio G, Le Coutre P, Cortes J, et al. Evaluation of cardiovascular ischemic event rates in dasatinib-treated patients using standardized incidence ratios. *Ann Hematol.* 2017;96(8):1303–1313.
- [34] Suh KJ, Lee JY, Shin DY, et al. Analysis of adverse events associated with dasatinib and nilotinib treatments in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients outside clinical trials. *Int J Hematol.* 2017;106(2):229–239.
- [35] Hehlmann R, Cortes JE, Zyczynski T, et al. Tyrosine kinase inhibitor interruptions, discontinuations and switching in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia in routine clinical practice: SIMPLICITY. *Am J Hematol.* 2019;94(1):46–54.
- [36] Iurlo A, Galimberti S, Abruzzese E, et al. Pleural effusion and molecular response in dasatinib-treated chronic myeloid leukemia patients in a real-life Italian multicenter series. *Ann Hematol.* 2018;97(1):95–100.
- [37] Gora-Tybor J, Medras E, Calbecka M, et al. Real-life comparison of severe vascular events and other non-hematological complications in patients with chronic myeloid leukemia undergoing second-line nilotinib or dasatinib treatment. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(8):2309–2314.
- [38] Fox LC, Cummins KD, Costello B, et al. The incidence and natural history of dasatinib complications in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2017;1(13):802–811.

## 5. Výzkum mechanismů rezistence k inhibitorům tyrozinkináz a jejich intolerance

### 5.1. Mechanismy rezistence k TKI

I přes neoddiskutovatelný úspěch spojený se zavedením imatinibu do léčby pacientů s CML nezanedbatelná část pacientů (cca 30 %) požadované léčebné odpovědi nedosáhne (primární rezistence) či nabytou léčebnou odpověď ztratí (získaná či sekundární rezistence) [57]. Rezistenci na TKI lze klasifikovat dle úrovně nedosažené či naopak ztracené léčebné odpovědi jako hematologickou, cytogenetickou či molekulární. Z hlediska mechanismů vzniku ji lze dále dělit na *BCR-ABL1* závislou (asi 50-60 % případů) či rezistenci nezávislou na aktivitě *BCR-ABL1* (40-50% případů).

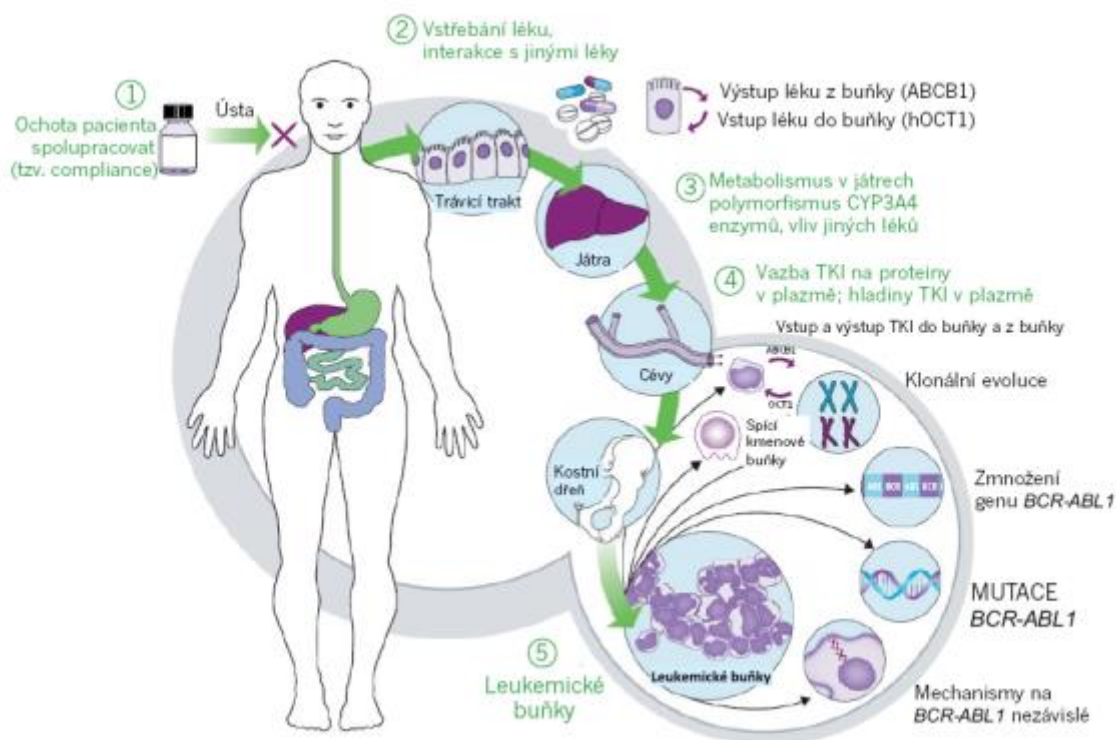
Nejčastějšími příčinami ***BCR-ABL1* závislé rezistence** jsou:

- Mutace Bcr-Abl kinázové domény
- Amplifikace genu *BCR-ABL1*
- Overexprese transkriptu *BCR-ABL1*

Mechanismy rezistence na ***BCR-ABL1* nezávislé** zahrnují:

- Non-compliance (neochotu pacienta spolupracovat)
- Poruchu na úrovni vstřebávání léku z trávicího traktu
- Sníženou dostupnost léku v plazmě na vrub odchylek ve vazbě TKI na plazmatické bílkoviny, interakcí s jinými léky při jejich přeměně v játrech či variability enzymatického systému CYP3A4 v játrech
- Změny na úrovni transportu léku do buňky a z buňky
- Klonální evoluci (vznik přídatných cytogenetických abnormalit v Ph-pozitivních buňkách)
- Aktivaci alternativních drah přenosu signálu v buňce
- Perzistenci leukemických kmenových buněk (leukemia stem cells, LSCs)[57,58].

Přehledně jsou mechanismy rezistence k imatinibu a potažmo k dalším TKI znázorněny na obrázku 7 (Obrázek 7).



**Obrázek 7.** Mechanismy rezistence k imatinibu. Upraveno dle [58].

Vysvětlivky: ABCB1, ATB-binding competitor B1; hOCT1, human organic cation transporter 1; CYP3A4, cytochrome P450 izoenzym 4A; AGP, kyselý  $\alpha$ -1-glykoprotein

Rezistence na TKI je multifaktoriální proces, kdy se i přes pokročilé znalosti o řadě mechanismů jejího vzniku asi v 50 % případů nepodaří příčinu odhalit. V míře klinického významu, tj. dopadu na další osud pacientů, a také v možnostech případného léčebného ovlivnění existují mezi jednotlivými mechanismy značné rozdíly.

**Ochota pacienta spolupracovat (compliance, adherence kléčebnému režimu)** se ukázala být pro účinnost léčby TKI naprosto klíčovým faktorem. Klinické studie prokázaly asociaci mezi adherencí k terapii a udržení léčebné odpovědi či naopak významnou souvislost mezi non-compliance a zvýšeným rizikem selhání terapie [34,35]. Potvrdilo se rovněž, že non-compliance je u pacientů s CML poměrně častým jevem [60]. Velké mezinárodní dotazníkové šetření u více než 2540 pacientů z 63 zemí, organizované a realizované představiteli patientských podpůrných organizací včetně pacientů samotných

poukázalo na fakt, že uspokojivý management NÚ a pocit dobré informovanosti svým ošetřujícím lékařem jsou velmi důležitými faktory podporujícími vysokou míru adherence k léčbě [37].

*Porucha vstřebávání TKI z trávicího traktu* může být vzácnější příčinou nedostupnosti léku v plazmě v případě některých onemocnění, jako např. střevních zánětů či stavu po resekci žaludku.

*Snížená dostupnost imatinibu v plazmě* může být důsledkem sníženého vstřebávání z trávicího traktu, změny jeho metabolismu v játrech, či jeho zvýšenou vazbou na bílkoviny v plazmě. V některých studiích byly vyšší plazmatické hladiny imatinibu, nebo lépe střední minimální plazmatické koncentrace ( $C_{\text{trough}}$ ), asociovány s lepší léčebnou odpovědí [61-63], v jiných se analogická souvislost nepotvrdila [64,65]. Podobně rozporuplné výsledky byly zaznamenány i v případě nilotinibu [66,67] a dasatinibu [68,69]. Vzhledem k tomu, že se imatinib v plazmě váže na bílkoviny – albumin a kyselý  $\alpha$ -1-glykoprotein (AGP), byl zvažován vliv zvýšené vazby imatinibu na případnou rezistenci. Rovněž zde byly reportovány rozporuplné výsledky, které předpokládanou roli AGP v rozvoji rezistence na imatinib nepodpořily [70,71]. Na úrovni metabolismu v játrech může nastat nežádoucí ovlivnění dostupnosti imatinibu v důsledku kompetice o enzymatický systém cytochromu P450, zejména pak jeho část CYP3A4, s jinými léky.

*Změny v intracelulární dostupnosti imatinibu* mohou být způsobeny odchylkami v aktivitě či expresi bílkovin, které jsou součástí buněčné membrány a zajišťují transport imatinibu do buňky nebo ho z buňky odčerpávají. Snížená aktivita či exprese influxního proteinu zvaného human organic cation transporter-1 (hOCT-1) či naopak zvýšená aktivita či exprese efluxních proteinů, reprezentovaných proteinem zvaným ATB-binding competitor B1 (ABCB1), známým též pod názvem P-glykoprotein 1 (multi drug resistance, MDR-1) a dále proteinem zvaným breast cancer resistance protein (ABCG2), byly intenzivně studovány [72-76]. Pozornost byla věnována také klinickému významu změn v transportních mechanismech, resp. jejich vlivu na léčebnou odpověď [77-80], a stejně tak vlivu genetických variant transportních mechanismů účinnost imatinibu [81-84]. Otázka klinického významu a využití měření exprese, resp. funkce transportních systémů v klinické praxi, mimo jiné značně

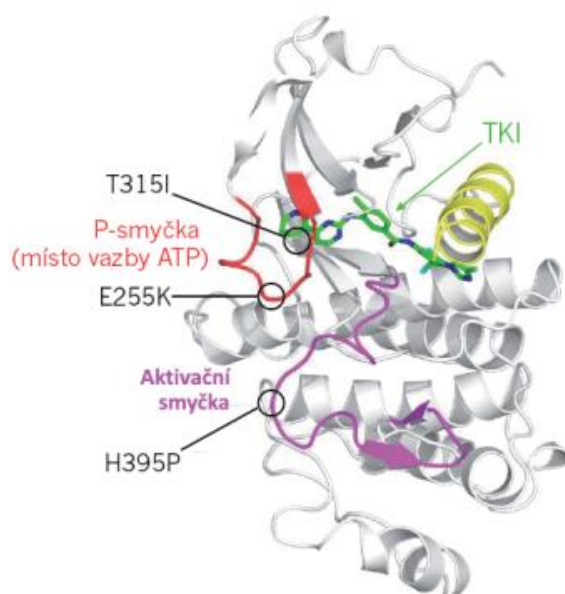
ovlivněných výběrem buněčné populace/linie, je diskutabilní, závěry studií a anlyz nejsou jednoznačné.

**Klonální evoluce** je definována jako objevení se přídatných cytogenetických změn v Ph-pozitivních buňkách v průběhu léčby. Výskyt těchto změn je vysoký zejména u imatinib-rezistentních pacientů v pokročilých fázích CML (až u 80 % pacientů v AP/BP). Byla prokázána asociace klonální evoluce s horší léčebnou odpovědí i přežitím u pacientů léčených imatinibem [85,86]. Z hlediska vlivu na prognózu rozdělil Wang a kol. přídatné cytogenetické abnormality na ty s relativně příznivou prognózou, tj. +8, -Y a přídatný Ph chromosom (+Ph), a prognosticky nepříznivé abnormality, zahrnující i(17)(q10), -7/7q- a 3q26.2 [87]. V nedávné analýze 1510 pacientů v CP CML léčených v rámci studie CML IV byly na základě vlivu na prognózu zařazeny do vysoce rizikové kategorie i abnormality +8 a +Ph [88].

**Amplifikace genu BCR-ABL1, případně overexprese BCR-ABL1 transkriptu** jsou dalšími mechanismy, které se mohou podílet na vzniku rezistence na imatinib, například v primitivních kmenových CML buňkách. V klinické praxi je však jejich výskyt řídký.

**Mutace BCR-ABL1 kinázové domény** představují nejčastější a též nejlépe prostudovaný mechanismus rezistence na TKI. V současné době je popsáno téměř 100 typů mutací, které se vyskytují u 40-90 % pacientů rezistentních na imatinib. Výskyt mutací narůstá s pokročilostí CML, zatímco v CP se pohybuje kolem 30 %, v lymfoblastickém zvratu se vyskytují mutace až u 85 % imatinib-rezistentních pacientů [89,90]. Mutace mohou být přítomny na různých místech BCR-ABL1 – některé jsou sice vzdálené od místa vazby TKI, ale ovlivní konformaci proteinu, a tak vazbu TKI znemožní, jiné jsou přímo v místě vazby TKI, jako např. polyrezistentní mutace T315I, na kterou jsou rezistentní všechny dostupné TKI vyjma ponatinibu (Obrázek 8) [91]. Klinický význam, resp. prognostická závažnost výskytu jednotlivých mutací se různí. Pro klinickou praxi je důležitý zejména fakt, že mutaci můžeme detekovat a v případě jejího potvrzení můžeme účinně změnit dosavadní léčbu. Klinické studie s TKI 2. generace do značné míry potvrdily *in vitro* data, kdy mutace T315I/A, F317I/L/V/C a V299L vykazovaly nízkou citlivost na dasatinib, mutace T315I, Y253H, E255K/V a F359V/C na nilotinib a T315I, V299 a E255 na bosutinib, což se projevilo i horší léčebnou odpovědí na příslušné TKI [92,93]. Záchyt některé z těchto tzv. klinicky relevantních mutací u rezistentních

pacientů může napomoci v rozhodování o volbě vhodného alternativního přípravku z řady vyšších generací TKI (Tabulka 3) [94].



**Obrázek 8.** Mechanismus působení mutací *BCR-ABL1* kinázové domény na účinek inhibitorů tyrozinkináz (TKI). Upraveno dle [91].

Šedá spirála znázorňuje Bcr-Abl tyrozinkinázu zaujímající prostorovou konformaci umožňující navázání TKI (zelenomodře). Mutace H395P je příkladem změny v tzv. aktivační smyčce, která právě kontroluje prostorovou konformaci tyrozinkinázy. Mutace E255K je lokalizována v P-smyčce, v místě vazby fosfátu, kde mutace snižuje flexibilitu této oblasti. Mutace T315I je lokalizovaná v oblasti, kam se váže TKI, přímo tedy zabraňuje jeho vazbě.

**Tabulka 3.** Doporučení pro možnosti léčby v případě identifikace vybraných mutací Bcr-Abl1. Upraveno dle [94].

Mutace	Doporučení pro výběr TKI
Y253H, E255K/V, F359V/C/I	Dasatinib, bosutinib <sup>‡</sup> nebo ponatinib
F317L/V/I/C, T315A	Nilotinib, bosutinib <sup>‡</sup> nebo ponatinib
V299L	Nilotinib nebo ponatinib
T315I	Ponatinib

<sup>‡</sup>data stran mutací asociovaných s klinickou rezistencí na bosutinib *in vivo* jsou omezená. Dle některých *in vitro* dat může být mutace E255K a do menší míry i E255V málo citlivá na léčbu bosutinibem



**Somatické mutace** v genech asociovaných s leukemií, např. ASXL1, DNMT3A, TET2, IDH1, RUNX1 jsou v poslední době studovány co do prognostického významu i u pacientů s CML jako potenciální mechanismus *BCR-ABL1* nezávislé rezistence [95]. Dosavadní výsledky jsou rozporuplné, v některých případech byl jejich výskyt asociován s rezistencí na TKI nezávislou na *BCR-ABL1* [96], v jiných případech vztah k rezistenci nebyl prokázán [97].

**Aktivace alternativních drah přenosu buněčného signálu** se může podílet na vzniku rezistence na *BCR-ABL1* nezávislé. Přenosu signálu v buňce se účastní řada bílkovin, např. Src kinázy, jejichž zvýšená aktivita byla prokázána u imatinib-rezistentních pacientů [98]. Dalším příkladem *BCR-ABL1* nezávislé signalizace je zvýšená aktivita dráhy RAF/MEK/ERK prokázána v souvislosti s rezistencí/perzistencí leukemických kmenových buněk [99] či aktivace signální dráhy PI3K/AKT/mTOR [100].

**Přežívání leukemických kmenových buněk** navzdory jinak účinné terapii TKI je mechanismem intenzivně studovaným nejen v souvislosti s rezistencí a případnou progresí onemocnění, ale také v souvislosti s vysazováním TKI coby mechanismem zodpovědným za perzistenci minimální zbytkové choroby nedetekovatelné tradičními metodami molekulárního monitoringu. LSCs disponují řadou vlastností a interakcí s okolním mikroprostředím, které umožňují jejich přežívání, například rezistencí vůči vlivu všech TKI, zejména ve stavu klidu (quiescence), a nezávislostí na *BCR-ABL1* signalizaci v otázce přežití a sebeobnovy [18,101]. Vývoj léčebných možností zacílených přímo na eradikaci LSCs je vysoce žádoucím, avšak náročným procesem, komplikovaným mimo jiné i velmi obtížnou detekcí LSCs v období remise z důvodu jejich nízkého zastoupení i nelehkého odlišení od zdravých hematopoetických buněk [102].

Rezistence k léčbě TKI nejen brání dosažení optimálních léčebných výsledků u nezanedbatelného podílu pacientů, ale ve své nezávažnější formě – progresi do pokročilých fází onemocnění – představuje významné riziko morbidity a mortality, zkracuje přežití, a tedy významně negativně ovlivňuje prognózu svých nositelů. Jak již bylo předesláno výše, nejenže v asi polovině rezistentních případů zůstává mechanismus vzniku neobjasněn, a tudíž bez možnosti cíleného léčebného zásahu, ale i v situacích, kdy se nám podaří mechanismus vzniku rezistence identifikovat, narážíme na rozporuplná data, a to nejen stran klinického významu daného mechanismu a jeho vztahu k léčebné odpovědi a prognóze pacientů, ale i co se týče

metodologických diskrepancí a nemožnosti reprodukovat vědecké výsledky jiných pracovních skupin.

V našem laboratorním a klinicko-laboratorním týmu jsme se zaměřili hned na několik mechanismů, které brání optimálnímu léčebnému efektu TKI. Problematiku intracelulární a plazmatické dostupnosti imatinibu jsme nahlédli jednak z hlediska metodologického, a jednak ve smyslu ověření jejich vztahu k léčebné odpovědi. Nevynechali jsme ani nejčastější mechanismus rezistence na TKI v podobě mutací *BCR-ABL1*, u kterých jsme prověřovali jejich význam a monitorování v podmínkách každodenní klinické praxe. A pozornost jsme soustředili také na LSCs, které jsou již jen z hlediska identifikace velmi problematické, ale jejichž léčebné ovlivnění by mohlo znamenat skutečné a tolik žádoucí úplné vyléčení z leukemie. Jednotlivá témata a jejich řešení budou představena formou komentovaných publikačních výstupů v následujících kapitolách.

## 5.2. Problematika plazmatické a intracelulární dostupnosti imatinibu v klinické praxi

*Hodnocení exprese transportních proteinů imatinibu hOCT1 a ABCB1 a jejího významu pro predikci léčebné odpovědi.* Na rozdíl od entuziastických literárních dat, prokazujících korelaci předléčebné mRNA exprese/aktivity obou transportérů imatinibu, tj. hOCT1 a ABCB1, s dalším osudem pacientů [77-80] či naopak tento vztah vylučujících [103], naše analýzy a jejich výsledky poukázaly na řadu nesrovnalostí, které znemožňují opakování závěrů publikovaných analýz, a na to konto i jejich správnou interpretaci. Jednalo se zejména o častou záměnu odlišných metodických přístupů, jakými jsou měření mRNA exprese příslušných proteinů na straně jedné a měření funkční aktivity transportérů na straně druhé, dále o zohlednění vlivu příslušné buněčné populace užití k měření exprese/aktivity na konečné výsledky, a v neposlední řadě o správnou definici cílové skupiny pacientů určených k analýze – pacienti nepředléčení *versus* pacienti zatížení různou intenzitou a délkou předchozí léčby. Dle našeho zjištění uvedené faktory znemožňují kvalifikaci obou imatinibových transportérů jako vhodných markerů predikujících budoucí léčebnou odpověď.

K tématu odchylek v plazmatické a intracelulární dostupnosti imatinibu na vrub změněné exprese transportních membránových proteinů hOCT1 a ABCB1 se obrací následující původní práce, publikované v impaktovaných zahraničních časopisech:

- Racil Z, Razga F, Buresova L, Jurcek T, Dvorakova D, Zackova D, Timilsina S, Cetkovsky P, Mayer J. The assessment of human organic cation transporter 1 (hOCT1) mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia is affected by the proportion of different cells types in the analyzed cell population. *American Journal of Hematology*. 2010;85(7):525-528; IF = 3,576 v roce 2010; HEMATOLOGY Q2; 8 citací ve WOS, bez autocitací (publikace je součástí kapitoly 5.7. Přílohy ke kapitole 5 jako Příloha 12).
- Racil Z, Razga F, Polakova KM, Buresova L, Polivkova V, Dvorakova D, Zackova D, Klamova H, Cetkovsky P, Mayer J. Assessment of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) mRNA expression in patients with de novo chronic myelogenous leukemia: the role of different cell types. *Leukemia & Lymphoma*. 2011;52(2):331-334; IF = 2,580 v roce 2011; ONCOLOGY Q2; 5 citací ve WOS, bez autocitací (publikace je součástí kapitoly 5.7. Přílohy ke kapitole 5 jako Příloha 13).
- Razga F, Racil Z, Machova Polakova K, Buresova L, Klamova H, Zackova D, Dvorakova D, Polivkova V, Cetkovsky P, Mayer J. The predictive value of human organic cation transporter 1 and ABCB1 expression levels in different cell populations of patients with de novo chronic myelogenous leukemia. *Internal Journal of Hematology*. 2011;94(3):303-306; IF = 1,268 v roce 2011; HEMATOLOGY Q4; 8 citací ve WOS.

**Měření plazmatických a intracelulárních hladin imatinibu a jejich význam v klinické praxi.** Neméně kontroverzní téma plazmatických a intracelulárních hladin imatinibu se stalo východiskem pro multicentrickou studii s 228 zařazenými pacienty s CML léčenými imatinibem v podmínkách každodenní klinické praxe, ve které jsme neprokázali statisticky významný rozdíl ani v plazmatických hladinách imatinibu ani v jeho intracelulárních koncentracích měřených během 1. měsíce léčby u pacientů, u nichž bylo či naopak nebylo dosaženo v pozdějším sledování optimální léčebné odpovědi. Na základě našich výsledků ani tyto markery nepovažujeme za vhodné prediktory následné léčebné odpovědi a rovněž jejich rutinní monitorování s případnou následnou modifikací dávkování imatinibu nedoporučujeme. Výsledky našich měření byly publikovány v práci:

- Racil Z, Razga F, Klamova H, Voglova J, Belohlavkova P, Malaskova L, Potesil D, Muzik J, Zackova D, Polakova KM, Zdrahal Z, Malakova J, Suttnar J, Dyr J, Mayer J. No clinical evidence for performing trough plasma and intracellular imatinib concentrations monitoring in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Hematological Oncology*. 2014;32(2):87-93. Erratum in: *Hematological Oncology*. 2014;32(3):168; IF = 3,084 v roce 2014; ONCOLOGY Q2; 3 citace ve WOS (práce je uvedena v kapitole 5.7. Přílohy ke kapitole 5 jako Příloha 14).

Uchazečka se dále autorsky podílela na studii vedené z centra ve FN HK, kdy byla u 112 pacientů s CML testována asociace polymorfismů 8 genů pro enzymy zapojené do metabolismu imatinibu a pro jeho buněčné transportéry s plazmatickými hladinami léku a léčebnou odpovědí. Vztah studovaných polymorfismů k hladinám imatinibu nebyl prokázán, pouze statisticky hraničně nesignifikantní asociace polymorfismu genu pro efluxní protein ABCG2 a dosažení MMR ve 12 měsících ( $p = 0,06$ ) a vliv polymorfismu genu pro CYP3A5\*3 na dosažení CCyR v 6 měsících ( $p = 0,06$ ). Výsledky studie byly publikovány v práci:

- Belohlavkova P, Vrbacky F, Voglova J, Racil Z, Zackova D, Hrochova K, Malakova J, Mayer J, Zak P. The significance of enzyme and transporter polymorphisms for imatinib plasma levels and achieving an optimal response in chronic myeloid leukemia patients. *Archives of Medical Science*. 2018;14(6):1416-1423; IF = 2,380 v roce 2018; MEDICINE, GENERAL & INTERNAL Q2; 2 citace ve WOS.

### 5.3. Detekce a monitorování mutací Bcr-Abl1 kinázové domény v klinické praxi

Jak již bylo zmíněno, mutace Bcr-Abl1 kinázové domény jsou nejčastějším a nejlépe prostudovaným mechanismem rezistence na TKI a jejich detekce má zásadní dopad na klinickou praxi, kdy je změna dosavadní léčby zpravidla nevyhnutelná. S tím souvisí nutnost správného načasování vyšetření, stejně jako jeho dostatečná kvalita a citlivost. Na našem pracovišti je mutační analýza prováděna mezinárodně doporučovanou metodou Sangerova sekvenování, jehož citlivost se pohybuje kolem 20 % a které umožňuje detekovat všechny klinicky relevantní mutace [104]. V poslední době vystupuje do popředí nejen výzkumného zájmu, ale i praktického využití metoda tzv. sekvenování nové generace (next generation

sequencing, NGS), která je citlivější než Sangerovo sekvenování (citlivost kolem 3 %), a tudíž umožní zachytit klinicky relevantní mutace dříve než Sangerova metoda [105]. V recentních mezinárodních doporučeních ELN pro management pacientů s CML figuruje NGS jako doporučovaná metoda detekce mutací KD u pacientů neodpovídajících adekvátně na terapii TKI [94].

Metodicky orientovaná práce našeho kolektivu představující jedno-běžový amplifikační protokol NGS na platformě Illumina, který nabízí robustní a efektivní časnou detekci *BCR-ABL1* mutací s únosným detekčním limitem 3 % tzv. variant allele frequency (VAF), byla nedávno publikována v časopisu *British Journal of Haematology* (IF = 5,518 v 2019; HEMATOLOGY Q1) pod názvem „Novel Illumina-based next generation sequencing approach with one-round amplification provides early and reliable detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia“ a je uvedena jako Příloha 15 v kapitole 5.7. Přílohy ke kapitole 5. Metodou NGS bylo umožněno časně detekovat mutace *BCR-ABL1* KD u 8 z 11 testovaných pacientů (73 %), přičemž u 4 z 11 (36 %) dokonce pod limitem 3 % VAF. Průměrný rozdíl mezi detekcí pomocí NGS a Sangerovy metody byl 14 měsíců (rozmezí 1-33 měsíců) a mutace u 50 % pacientů při selhání terapie byly detekovány pomocí NGS o 2 roky dříve než Sangerovou sekvenační metodou. Analýzu NGS jsme použili též k detekci *BCR-ABL1* mutací v CD34+ kmenových a progenitorových buňkách u pacientů s nově zjištěnou CML a výsledky naší práce jsme zveřejnili v roce 2014 v časopise *American Journal of Hematology* (IF = 3,798 v roce 2014; HEMATOLOGY Q1) pod názvem „BCR-ABL1 kinase domain mutational analysis of CD34+ stem/progenitor cells in newly diagnosed CML patients by next-generation sequencing. *American Journal of Hematology*. 2014; 89(10):1016-1017“.

Naše zkušenosti s monitorováním mutací *BCR-ABL1* v každodenní klinické praxi, spojené se studiem vlivu podávané léčby na selekci a proliferaci mutovaných klonů a zhodnocením klinického významu detekovaných mutací, jsme zúročili v práci nazvané „Role of Treatment in the Appearance and Selection of BCR-ABL1 Kinase Domain Mutations“, publikované v časopisu *Molecular Diagnosis & Therapy* v roce 2012 (IF v 2012 1,692; GENETICS & HEREDITY Q3). V témže časopise i témže roce byla uveřejněna práce věnovaná významu časně detekce nejzávažnější mutace T315I, a též volbě vhodného kompartmentu k získání vzorku pro detekci právě pro případ této mutace, nazvaná „Analysis of Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain,

Using Direct Sequencing: Detection of the T315I Mutation in Bone Marrow CD34+ Cells of a Patient with Chronic Myelogenous Leukemia 6 Months Prior to its Emergence in Peripheral Blood“. Negativní prognostický vliv mutace T315I a též přídatných genomických aberací jsme potvrdili analýzou 26 rezistentních pacientů s CML léčených na našem pracovišti, jejichž výsledky jsme publikovali v původní práci nazvané „The BCR-ABL1 T315I mutation and additional genomic aberrations are dominant genetic lesions associated with disease progression in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to tyrosine kinase inhibitor therapy“ v časopisu *Leukemia and Lymphoma* v roce 2013 (IF v 2012 IF = 2,605 v roce 2013; HEMATOLOGY Q2, ONCOLOGY Q3). Prospektivní sledování výskytu mutace T315I v selekovaných CD34+ buňkách u pacientů s nově diagnostikovanou CML vyústilo v uveřejnění našich výsledků v práci nazvané „Prospective analysis of low-level BCR-ABL1 T315I mutation in the CD34(+) cells of patients with *de novo* chronic myeloid leukemia“, publikované rovněž v časopise *Leukemia and Lymphoma* v roce 2014 (IF = 2,891 v roce 2014; ONCOLOGY Q2).

Kompletní seznam původních prací, obracejících se k tématu mutací *BCR-ABL1* a nesoucích spoluautorský podíl uchazečky je následující (řazeno vzestupně chronologicky):

- Poláková KM, Polívková V, Rulcová J, Klamová H, Jurcek T, Dvoráková D, Zácková D, Pospíšil Z, Mayer J, Moravcová J. Constant BCR-ABL transcript level  $\geq 0.1\%$  (IS) in patients with CML responding to imatinib with complete cytogenetic remission may indicate mutation analysis. *Experimental Hematology*. 2010;38(1):20-26; IF = 3,198 v roce 2010; HEMATOLOGY Q2; 6 citací ve WOS či Scopus, bez autocitací.
- Razga F, Jurcek T, Jeziskova I, Zackova D, Dvorakova D, Borsky M, Mayer J, Racil Z. Analysis of Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain, Using Direkt Sequencing: Detection of the T315I Mutation in Bone Marrow CD34+ Cells of a Patient with Chronic Myelogenous Leukemia 6 Months Prior to its Emergence in Peripheral Blood. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2012;16(3):163-166; IF = 1,692 v roce 2012; GENETICS & HEREDITY Q3; 1 citace ve WOS či Scopus, bez autocitací.
- Razga F, Jurcek T, Zackova D, Dvorakova D, Toskova M, Jeziskova I, Mayer J, Racil Z. Role of Treatment in the Appearance and Selection of BCR-ABL1 Kinase Domain Mutations. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2012;16(4):251-259; IF = 1,692 v roce 2012; GENETICS & HEREDITY Q3, 3 citace ve WOS či scopus, bez autocitací.

- Malcikova J, Razga F, Jurcek T, Dvorakova D, Zackova D, Toskova M, Sebejova L, Smardova J, Oltova A, Vankova G, Jurackova L, Trbusek M, Pospisilova S, Mayer J, Racil Z. The BCR-ABL1 T315I mutation and additional genomic aberrations are dominant genetic lesions associated with disease progression in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leukemia & Lymphoma*. 2013;54(9):2083-2087; IF = 2,605 v roce 2013; HEMATOLOGY Q2, ONCOLOGY Q3.
- Jurcek T, Razga F, Mazancova P, Musilova M, Dvorakova D, Borsky M, Zackova D, Dobesova B, Semerad L, Mayer J, Racil Z. Prospective analysis of low-level *BCR-ABL1* T315I mutation in CD34+ cells of patients with *de novo* chronic myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2014;55(8):1915-1917; IF = 2,891 v roce 2014; ONCOLOGY Q2, 2 citace ve Scopus, bez autocitací.
- Musilova M, Razga F, Jurcek T, Jeziskova I, Borsky M, Nemethova V, Zackova D, Culen M, Dvorakova D, Mayer J, Racil Z. BCR-ABL1 kinase domain mutational analysis of CD34+ stem/progenitor cells in newly diagnosed CML patients by next-generation sequencing. *American Journal of Hematology*. 2014;89(10):1016-1017; IF = 3,798 v roce 2014, HEMATOLOGY Q1, 2 citace ve Scopus, bez autocitací.
- Romzova M., Smitalova D, Tom N., Jurcek T., Culen M., Zackova D., Mayer J., Racil Z. Novel Illumina-based next generation sequencing approach with one-round amplification provides early and reliable detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*. 2020;189(3):469-474; IF = 5,518 v 2019/2020; HEMATOLOGY Q1 (práce uvedena jako Příloha 15 v kapitole 5.7. Přílohy ke kapitole 5.).

#### 5.4. Další mechanismy rezistence a jejich výzkum

Intenzivní globální úsilí věnované výzkumu LSCs a jejich perzistenci coby nejen významného mechanismu rezistence nezávislé na *BCR-ABL1* signalizaci, ale i faktoru zodpovědného za přítomnost minimální zbytkové nemoci u pacientů po vysazení TKI, je komplikováno velmi obtížnou detekcí a separací LSCs od fyziologických kmenových krvetvorných buněk (hematopoetic stem cells, HSCs). V rámci snah o jejich odlišení jsou studovány a využívány povrchové molekuly aberantně exprimované u LSCs jako např. CD33, CD123, IL1RAP, CD26 a

CD25. Ve výzkumu vedeném v kooperaci s etablovanou pracovní skupinou rakouských kolegů pod vedením prof. Petera Valenta jsme se zaměřili na povrchový marker CD26, který jsme potvrdili jako vhodný prostředek k odlišení LSCs od fyziologických HSCs u neselektovaných pacientů s CML. Prokázali jsme také korelaci množství CD26+ LSCs s odpovědí na léčbu TKI, konkrétně s dosažením MMR ve 12. měsíci od zahájení terapie, nikoliv však s odpovědí v 18. měsíci. Výsledky našeho výzkumu byly uveřejněny v práci:

- Culen M, Borsky M, Nemethova V, Razga F, Smejkal J, Jurcek T, Dvorakova D, Zackova D, Weinbergerova B, Semerad L, Sadovnik I, Eisenwort G, Herrmann H, Valent P, Mayer J, Racil Z. Quantitative assessment of the CD26+ leukemic stem cell compartment in chronic myeloid leukemia: patient-subgroups, prognostic impact, and technical aspects. *Oncotarget*. 2016;7(22):33016-33024; IF = 5,168 v roce 2016; ONCOLOGY Q1; 14 citací ve WOS či Scopus, bez autocitací (práce je součástí kapitoly 5.7. Přílohy ke kapitole 5 a podkapitoly 5.7.5. Příloha 16.).

V rámci výzkumného projektu podpořeného Agenturou pro zdravotnický výzkum České republiky (AZV ČR), nazvaného „Identifikace nových možností léčby chronické myeloidní leukemie pomocí systematické analýzy BCR-ABL interaktomu“ (registrační číslo 15-34405A), byla uchazečka v roli spoluřešitelky zapojena do výzkumných snah o charakteristiku interaktomu Bcr-Abl1, zahrnujícího stabilně i tranzientně asociované proteiny, a objasnění protein-proteinových interakcí, zodpovědných za přežívání *BCR-ABL1* pozitivních buněk. Vyvrcholením 5 let trvajícího výzkumu se stala publikace, recentně uvedená v prestižním časopise *Cellular and Molecular Life Sciences* (IF = 6,494 v roce 2019; BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY Q1). Prokázali jsme, že zatímco terapie TKI inhibuje aktivitu Bcr-Abl1 tyrozinkinázy jako enzymu, nenarušuje vazby, které má tyrozinkináza s ostatními proteiny v „core signálním komplexu“, a sice s CRKL, SHC1, GRB2, SOS1, cCBL, p85a-PI3K, STS1 a SHIP2. Na to konto může docházet k Bcr-Abl signalizaci „inaktivované“ Bcr-Abl1 kinázy, dovolující přežití nádorových buněk a zakládající potenciální relaps onemocnění. Kromě charakteristiky jednotlivých mezi-proteinových interakcí jsme specifikovali příslušné domény Bcr-Abl1 kinázy účastnící se signalizace. Naše výsledky významně přispěly k porozumění struktury a dynamiky Bcr-Abl interaktomu coby důležitých aspektů pro vývoj cílené léčby s ambicí úplné eradikace leukemie. Práce autorů:



- Gregor T, Bosakova MK, Nita A, Abraham SP, Faflek B, Cernohorsky NH, Rynes J, Foldynova-Trantirkova S, Zackova D, Mayer J, Trantirek L, Krejci P. Elucidation of protein interactions necessary for the maintenance of the BCR-ABL signaling complex. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020;77(19):3885-3903; s IF = 6,496 v roce 2019/2020; BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY Q1; je 2x citována ve WOS a uvedena jako Příloha 17 v rámci kapitoly 5.7. Přílohy ke kapitole 5.

## 5.5. Intolerance TKI

Otázka dobré snášenlivosti TKI, respektive NÚ léčby nabývá v kontextu dlouhodobé až celoživotní terapie pacientů, jejichž očekávaná délka života koresponduje s přežíváním celé populace, na stále větším významu. V obecné rovině lze říci, že většina NÚ se vyskytuje relativně časně po zahájení léčby, jsou mírné až střední intenzity a postupem času odezní buď spontánně či za přispění podpůrných opatření. A i přesto, že některé NÚ při léčbě imatinibem, jako např. únava, svalové bolesti a křeče, periferní otoky či zažívací potíže, provázejí pacienty po celou dobu terapie a prokazatelně narušují kvalitu jejich života, je právě tento lék v kontextu dlouhodobého sledování považován za bezpečný přípravek, vhodný i pro pacienty starší či zatížené přidruženými onemocněními [19]. Na druhou stranu v poslední době narůstá evidence poměrně závažných projevů intolerance spojených s léčbou zejména TKI vyšších generací, které původně unikly pozornosti klinických studií buď v důsledku absence preklinických dat či nedostatečného odhadu. Příkladem takových NÚ jsou pleurální výpotky a PAH při léčbě dasatinibem či rozvoj hyperglykémie a hyperlipidémie provázející léčbu nilotinibem, a zejména pak arteriální uzávěry popisované ve zvýšené míře jak při léčbě nilotinibem, tak především ponatinibem, který byl na vrub alarmujícího výskytu cévních NÚ dokonce dočasně stažen z amerického trhu a byly pozastaveny probíhající klinické studie [20-22,54,106-108]. Podobně, jako je tomu v případě hodnocení účinnosti léčby TKI, tak i údaje o NÚ získané v klinických studiích se mohou značně lišit od situace v reálné klinické praxi. Navíc je kromě závažného až život ohrožujícího charakteru zmíněných NÚ přitěžujícím faktorem pro jejich zvládnutí a prevenci fakt, že etiopatogenetické mechanismy vedoucí k jejich vzniku a rozvoji nebyly dosud objasněny.

Kromě mapování výskytu NÚ léčby TKI v podmínkách každodenní klinické praxe, jehož výsledky byly v rámci analýz účinnosti a tolerance léčby imatinibem a dasatinibem uchazečkou z pozice první a korespondující autorky publikovány a jsou uvedeny a okomentovány jako přílohy předkládané habilitační práce (Přílohy č. 8, 10 a 11 v rámci kapitoly 4.4. Přílohy ke kapitole 4), jsme se zaměřili právě na výzkum etiopatogeneze poruchy glukozové tolerance a metabolismu lipidů, které provázejí léčbu nilotinibem a které mohou hrát roli v genezi či akceleraci zmiňovaných cévních NÚ.

## 5.6. Poruchy metabolismu glukózy a lipidů při léčbě nilotinibem

Kromě NÚ, jakými jsou průjem, nevolnost, zvracení, exantém, svědění, únava, bolesti hlavy, periferní otoky či vypadávání vlasů, jsou pro léčbu nilotinibem typické laboratorní NÚ charakteru elevace bilirubinu, transamináz, pankreatické amylázy a lipázy, hypofosfatémie, a především pak hyperglykémie a hyperlipidémie. Ve studii ENESTnd výskyt hyperglykémie u pacientů léčených nilotinibem v obou dávkovacích schématech, tj. 300 mg 2x denně a 400 mg 2x denně, významně převyšoval výskyt u pacientů léčených imatinibem 400 mg 1x denně: 49,8 % (7,2 % gr. 3/4) a 52,7 % (6,9 % gr. 3/4) vs. 30,7 % (0,4 % gr. 3/4). Analogicky tomu bylo při porovnání výskytu hypercholesterolémie (27,6 % a 26,7 % vs. 3,9 %) [21]. S cílem poodhalit etiopatogenezi nilotinibem indukované poruchy glukozové tolerance a dyslipidémie jsme zrealizovali pilotní studii nazvanou ENIGMA, která u 10 pacientů nově léčených nilotinibem vyústila ve zjištění, že léčba nilotinibem vede k signifikantní hyperinzulinémii, postreceptorové inzulinové rezistenci a hypoadiponektinémii, což u jedinců s preexistující poruchou B buněk pankreatu vede k manifestní poruše glukozové tolerance až rozvoji diabetu mellitu (DM). Zmíněné mechanismy navíc hrají klíčovou roli i v rozvoji dyslipidémie a jsou potenciálním akcelerátorem aterosklerozy. Výsledky pilotního projektu, ve kterém jsme jako první rozkryli podstatu poruchy metabolismu glukózy při léčbě nilotinibem, byly za velkého zájmu odborné veřejnosti publikovány v práci:

- Racil Z, Razga F, Drapalova J, Buresova L, Zackova D, Palackova M, Semerad L, Malaskova L, Haluzik M, Mayer J. Mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2013;98(10):e124-6; IF

v roce 2013 = 5,868; HEMATOLOGY Q1. Práce je uvedena a okomentována jako Příloha 18 v kapitole 5.7. Přílohy ke kapitole 5.

Publikace se dočkala značného citačního ohlasu: v databázích WOS či Scopus je uvedeno 48 citací (bez autocitací), včetně začlenění naší práce do dvou významných mezioborových prací: *state-of-the-art* review autorů Li W, Croce K, Steensma DP et al., nazvaného „Vascular and Metabolic Implications of Novel Targeted Cancer Therapies Focus on Kinase Inhibitors” a publikovaného v roce 2015 v *Journal of the American College of Cardiology* (IF 17,759 v roce 2015, JCR kategorie CARDIAC & CARDIOVASCULAR SYSTEMS Q1; 65 citací ve WOS), a dále článku, nazvaného “Cardio-Oncology: Vascular and Metabolic Perspectives: A Scientific Statement From the American Heart Association”, reprezentujícího vědecké stanovisko *the American Heart Association* k nově se rekrutující disciplíně kardio-onkologie a publikovaného v roce 2019 v časopisu *Circulation* (IF v 2019 23,603, JCR kategorie CARDIAC & CARDIOVASCULAR SYSTEMS a PERIPHERAL VASCULAR DISEASE Q1; 22 citací ve WOS) [109,110].

Na pilotní projekt navázala multicentrická studie s mezinárodním přesahem a ambicí potvrdit výše uvedené závěry na větším počtu pacientů, a také porovnat laboratorní nálezy indukované léčbou nilotinibem s případnými změnami provázejícími léčbu dalšími dostupnými TKI, tedy imatinibem a dasatinibem. Do studie bylo zařazeno celkem 94 pacientů léčených nilotinibem (n = 51), imatinibem (n = 28) a dasatinibem (n = 15). Signifikantní vzestup glykémie na lačno byl zaznamenán u 45 % pacientů po 3 i 12 měsících (M) léčby nilotinibem. Již při zahájení terapie nilotinibem byl zjištěn nový DM či pre-DM u 22 %, který u 91 % pacientů přetrvával v M3 terapie a u 64 % i v M12 podávání nilotinibu. Dalších 18 % pacientů vyvinulo DM ve 3. měsíci terapie a 19 % v měsíci dvanáctém. Porucha metabolismu glukózy byla konstatována u 37 % pacientů ve 3. měsíci a u 43 % pacientů ve 12. měsíci podávání nilotinibu. Signifikantně elevovaná inzulinémie v M3 přetrvávala i v M12 a nárůst inzulinové rezistence byl patrný u 71 % pacientů. Nepotvrdilo se však zjištění z pilotní studie, a sice že na rozvoj inzulinové rezistence má vliv rychlý pokles adiponektinu. U všech pacientů léčených nilotinibem sice adiponektin klesá, ale subanalýza dle linie léčby ukázala, že adiponektin klesá jen ve 2. linii léčby a že jde *de facto* o spontánní pokles původně zvýšeného adiponektinu po předchozí

terapii imatinibem. Léčba nilotinibem byla také asociována s nárůstem tělesné hmotnosti, obvodu břicha a BMI v M12.

Podle předpokladu mělo podání dasatinibu u 15 pacientů ve vztahu k metabolismu glukózy neutrální efekt, léčba imatinibem však přinesla kontroverzní výsledky. Imatinib neovlivnil glykémii na lačno ani inzulinovou rezistenci a zvýšil senzitivitu k inzulinu, což může být vysvětleno nárůstem koncentrace adiponektinu. Pro izolovaný vzestup hladiny glukózy v M3 a M12 však není vysvětlení. U 11/28 pacientů, kteří na počátku terapie jevíli poruchu glukozové tolerance, došlo téměř u poloviny ke zlepšení parametrů v M3 a M12. Co se týče metabolismu lipidů, dle očekávání došlo při léčbě nilotinibem k rozvoji dyslipidémie, kdežto léčba imatinibem vedla k poklesu hladiny cholesterolu a léčba dasatinibem byla ve vztahu k lipidovému metabolismu neutrální.

Prospektivní studie potvrdila rychlý rozvoj inzulinové rezistence a kompenzatorní hyperinzulinémie coby mechanismu poruchy metabolismu glukózy u pacientů s CML léčených nilotinibem, v kontrastu s pacienty léčenými imatinibem či dasatinibem. Spolu s dyslipidemií a centrální obezitou tak nilotinib vede ke vzniku latentního metabolického syndromu, který zvyšuje riziko vzniku cévních NÚ. Naše výsledky silně podporují potřebu adekvátního monitoringu glukozového a lipidového metabolismu v průběhu podávání nilotinibu. Výše uvedené závěry byly publikovány v práci:

- Racil Z, Koritakova E, Sacha T, Klamova H, Belohlavkova P, Faber E, Rea D, Malaskova L, Prochazkova J, Zackova D, Voglova J, Wąclaw J, Cetkovsky P, Zak P, Mayer J. Insulin resistance is an underlying mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy. *American Journal of Hematology*. 2018;93(10):E342-E345; IF v roce 2018 = 6,137; HEMATOLOGY Q1, která je spolu s komentářem k dispozici coby Příloha 19 v rámci kapitoly 5.7. Přílohy ke kapitole 5.

Spolu s kolegy z dalších 3 center v ČR jsme se dále specificky zaměřili na poruchy metabolismu lipidů v prospektivní studii u pacientů s nově zjištěným onemocněním. Celkem bylo hodnoceno 57 pacientů následně léčených nilotinibem (n = 23) a imatinibem (n = 34). Pacienti směřující k léčbě nilotinibem byli významně mladší, s méně komorbiditami a s nižším kardiovaskulárním (KV) rizikovým skóre oproti pacientům zahajujícím léčbu imatinibem. Již v době diagnózy užívalo statiny či splňovalo kritéria pro jejich nasazení 53 % pacientů. Ve

skupině léčené nilotinibem jsme pozorovali po 6 měsících od zahájení terapie statisticky významný nárůst celkového a LDL-cholesterolu oproti vstupním hodnotám. Ve skupině léčené imatinibem naopak významně vzrostl HDL-cholesterol a klesla hladina triglyceridů. Podíl pacientů s nárůstem KV skóre však byl analogický v obou skupinách a žádný z pacientů léčených imatinibem toto riziko nesnížil – protektivní vliv imatinibu na KV riziko tak nebyl prokázán. I přes rychlé změny v lipidovém metabolismu v obou léčebných skupinách nedocházelo ke změnám KV rizika či novým indikacím k terapii statiny v průběhu prvního roku léčby. Závěry našeho výzkumu byly recentně publikovány v práci:

- Horňák T, Semerád L, Žáčková D, Weinbergerová B, Šustková Z, Procházková J, Bělohávková P, Stejskal L, Rohoň P, Faber E, Žák P, Mayer J, Ráčil Z. Analysis of serum lipids, cardiovascular risk, and indication for statin use during nilotinib and imatinib therapy in de novo CML patients - results from real-life prospective study. *Leukemia & Lymphoma*. 2020;61(2):494-496; IF v roce 2019/2020 = 2,969; HEMATOLOGY Q2, ONCOLOGY Q3; práce je součástí kapitoly 5.7. Přílohy ke kapitole 5 jako Příloha 20.

## 5.7. Přílohy ke kapitole 5

### 5.7.1. Příloha 12

Racil Z, Razga F, Buresova L, Jurcek T, Dvorakova D, Zackova D, Timilsina S, Cetkovsky P, Mayer J. The assessment of human organic cation transporter 1 (hOCT1) mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia is affected by the proportion of different cells types in the analyzed cell population. *American Journal of Hematology*. 2010; 85(7):525-528.

IF = 3,576 v roce 2010; HEMATOLOGY Q2; 8 citací ve WOS, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Hodnoceny rozdíly v expresi mRNA lidského organického kationického transportéru (hOCT1) v různých buněčných populacích u zdravých dobrovolníků (n = 66) a pacientů s nově zjištěnou CML (n = 23), změny v expresi mRNA během prvních 6 měsíců léčby imatinibem a vztah mezi mRNA hOCT1 expresí a podílem nezralých myeloidních buněk a hladinou *BCR-ABL1* transkriptů coby nepřímých markerů leukemické nálože
- Exprese hOCT1 mRNA byla signifikantně vyšší ve frakci polymorfonukleárních buněk než buněk mononukleárních, z toho důvodu je celková exprese hOCT1 mRNA ve všech leukocytech dominantně ovlivněna podílem polymorfonukleárních buněk
- Exprese hOCT1 mRNA ve všech buněčných frakcích byla vždy signifikantně nižší u pacientů s nově zjištěnou CML ve srovnání se zdravými dobrovolníky. Vzhledem k vymizení tohoto rozdílu po zahájení terapie imatinibem se dá předpokládat, že mRNA exprese je ovlivněna mírou leukemické nálože a léčebným zásahem
- Z výše uvedeného plyne, že hodnocení hOCT1 mRNA exprese ve frakci všech leukocytů v periferní krvi je kontroverzní a že exprese spíše koreluje s aktuálním diferenciálním rozpočtem leukocytů a leukemickou náloží v době testování, než aby byla považována za prognostický faktor hodný korelace s budoucí odpovědí pacientů s CML na podávanou terapii

Conflict of interest: Nothing to report.  
Published online 24 March 2010 in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com).  
DOI: 10.1002/ajh.21720

## References

- Chilosi M, Zinzani PL, Poletti V. Lymphoproliferative lung disorders. *Semin Respir Crit Care Med* 2005;26:490–501.
- Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* 1972;29:252–260.
- Clagett OT, Allen TH, Payne WS, et al. The surgical treatment of pulmonary neoplasms: A 10-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1964;48:391–400.
- Lhoste RJ, Filippis DA, Lieberman PH, et al. Primary pulmonary lymphomas: A clinicopathologic analysis of 36 cases. *Cancer* 1984;54:1397–1406.
- Zinzani PL, Martelli M, Poletti V, et al. Practice guidelines for the management of extranodal non-Hodgkin's lymphomas of adult non-immunodeficient patients. I. primary lung and mediastinal lymphomas. A project of the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 2008;93:1364–1371.
- Hu YH, Hsiao LT, Yang CF, et al. Prognostic factors of Chinese patients with primary pulmonary non-Hodgkin's lymphoma: The single-institute experience in Taiwan. *Ann Hematol* 2009;88:839–846.
- Kim JH, Lee SH, Park J, et al. Primary pulmonary non-Hodgkin's lymphoma. *Jpn J Clin Oncol* 2004;34:510–514.
- Bae YA, Lee KS, Han J, et al. Marginal zone B-cell lymphoma of bronchus-associated lymphoid tissue: Imaging findings in 21 patients. *Chest* 2008;133:433–440.
- Ngeow JY, Quek RH, Ng DC, et al. High SUV uptake on FDG-PET/CT predicts for an aggressive B-cell lymphoma in a prospective study of primary FDG-PET/CT staging in lymphoma. *Ann Oncol* 2009;20:1543–1547.
- Yang DH, Min JJ, Jeong YY, et al. The combined evaluation of interim contrast-enhanced computerized tomography (CT) and FDG-PET/CT predicts the clinical outcomes and may impact on the therapeutic plans in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol* 2009;88:425–432.
- Ferraro P, Trastek VF, Adlakha H, et al. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the lung. *Ann Thorac Surg* 2000;69:993–997.
- Cordier JF, Chailleux E, Lauque D, et al. Primary pulmonary lymphomas. A clinical study of 70 cases in nonimmunocompromised patients. *Chest* 1993;103:201–208.
- Vanden Eynden F, Fadel E, de Perrot M, et al. Role of surgery in the treatment of primary pulmonary B-cell lymphoma. *Ann Thorac Surg* 2007;83:236–240.
- Tamura A, Komatsu H, Yanai N, et al. Primary pulmonary lymphoma: Relationship between clinical features and pathologic findings in 24 cases. The Japan National Chest Hospital Study Group for Lung Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1995;25:140–152.
- Zinzani PL, Tani M, Gabriele A, et al. Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT-type of the lung: Single-center experience with 12 patients. *Leuk Lymphoma* 2003;44:821–824.
- Wannesson L, Cavalli F, Zucca E. Primary pulmonary lymphoma: Current status. *Clin Lymphoma Myeloma* 2005;6:220–227.
- Cadranel J, Wislez M, Antoine M. Primary pulmonary lymphoma. *Eur Respir J* 2002;20:750–762.
- Zinzani PL, Poletti V, Zompatori M, et al. Bronchus-associated lymphoid tissue lymphomas: An update of a rare extranodal maltoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007;7:566–572.
- Zucca E, Conconi A, Pedrinis E, et al. Nongastric marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 2003;101:2489–2495.
- Migkou M, Dimopoulos MA, Gavriatopoulou M, et al. Applications of monoclonal antibodies for the treatment of hematological malignancies. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:207–220.
- Zhou X, Hu W, Qin X. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: Implications for therapy. *Oncologist* 2008;13:954–966.
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, et al. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 1971;31:1860–1861.
- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993;329:987–994.
- Chan JK. The new World Health Organization classification of lymphomas: The past, the present and the future. *Hematol Oncol* 2001;18:129–150.
- Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999;17:1244.
- Grillo-Lopez AJ, Cheson BD, Horning SJ, et al. Response criteria for NHL: Importance of 'normal' lymph node size and correlations with response rates. *Ann Oncol* 2000;11:399–408.

## The assessment of human organic cation transporter 1 (*hOCT1*) mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia is affected by the proportion of different cells types in the analyzed cell population

Zdenek Racil,<sup>1\*</sup> Filip Razga,<sup>1</sup> Lucie Buresova,<sup>2</sup> Tomas Jurcek,<sup>1</sup> Dana Dvorakova,<sup>1</sup> Daniela Zackova,<sup>1</sup> Shira Timilsina,<sup>3</sup> Petr Cetkovsky,<sup>4</sup> and Jiri Mayer<sup>1</sup>

The monitoring of *hOCT1* mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia (CML) was used for predicting the response to imatinib treatment. However, different cell populations from patients who received various degrees of pretreatment were used for this analysis. Therefore, several biases in the results and their interpretation may arise. We investigated *hOCT1* mRNA expression in different cell populations of peripheral blood (PB) from healthy volunteers and in imatinib naïve de novo CML patients by analyzing changes in *hOCT1* mRNA expression during the first 6 months of imatinib therapy. The *hOCT1* mRNA expression was significantly higher in PB polymorphonuclears compared to mononuclears. The *hOCT1* mRNA expression in total PB leukocytes is, therefore, preferentially determined by the percentage of polymorphonuclears. Expression in each analyzed group of cells was always significantly lower in imatinib naïve de novo CML patients compared to healthy volunteers. This difference disappeared after the initiation of imatinib therapy, suggesting that CML tumor burden and the degree of pretreatment at the time of monitoring were both influencing factors.

Imatinib (IMA) uptake is predominantly mediated by human organic cation transporter 1 (*hOCT1*) [1]. Decreased expression or function of this protein can lead to a reduction of the intracellular concentration of IMA and, there-

fore, lead to pharmacokinetic resistance to the drug [1,2]. There are several data suggesting a correlation between *hOCT1* activity/expression and the therapeutic outcome of CML patients treated with IMA [3–5]. Unfortunately, this issue has several uncertainties in the literature that may lead to the misinterpretation of previously reported data and the interpretation of future studies. First, *hOCT1* activity, which is measured by a functional assay [1,2], must be clearly differentiated from mRNA expression monitoring [1,3–5]. Second, the cell populations used for analysis vary widely in cell type, especially in studies that monitor mRNA *hOCT1* expression [1,3–5]. Furthermore, while some studies have monitored a well-defined group of patients with de novo chronic phase CML [3], others make analyses on heterogeneous study populations that contain pretreated patients [4,5].

We investigated differences in *hOCT1* mRNA expression in different cell populations of PB leukocytes (LEU) from healthy volunteers and patients with de novo CML, a change in *hOCT1* mRNA expression during the first 6 months of IMA treatment, and the relationship between *hOCT1* mRNA expression and the percentage of immature myeloid cells as well as *BCR/ABL* transcript levels in PB (as indirect markers of disease burden).

The *hOCT1* mRNA expression was measured in PB LEU ( $n = 66$ ), PB PMNC ( $n = 35$ ), and PB MNC ( $n = 33$ ) from 66 healthy volunteers. Figure 1 summarizes these results and clearly shows a wide range of *hOCT1*

letters

mRNA expression in total LEU as well as in PMNC and MNC. The *hOCT1* mRNA expression was significantly higher in PMNC compared to MNC. Therefore, the total LEU *hOCT1* mRNA expression was preferentially determined by the percentage of PMNC in the total LEU.

Analogous measurements were performed in 23 patients with IMA naïve de novo CML. Similarly, a large distribution of expression was seen from individual groups of cells (Fig. 1). Total *hOCT1* mRNA expression in PB LEU was again significantly influenced by the PMNC *hOCT1* mRNA expression and PMNC percentage. The large variability in the percentage of PMNC from total LEU in patients with IMA naïve de novo CML (median: 75%; range: 33–93%) is, therefore, an important factor in the marked variability seen in *hOCT1* mRNA expression in total LEU at the time of CML diagnosis. In addition, the *hOCT1* mRNA expression from each analyzed group of cells was always significantly lower in IMA naïve de novo CML patients compared to healthy volunteers (Fig. 1). This suggested that CML cells have an additional effect on the observed *hOCT1* mRNA expression level.

The *hOCT1* mRNA expression was detected in total LEU and in MNC at monthly intervals from IMA naïve de novo CML patients from the time of diagnosis until the 6th month of IMA therapy. The median *hOCT1* mRNA

expression level from total LEU was significantly lower in the CML patients at the time of diagnosis compared to median expression levels in healthy individuals (Fig. 1;  $P < 0.001$ ; nonparametric Mann Whitney test). However, after 1 month of IMA treatment, the median *hOCT1* mRNA expression level in total LEU significantly increased ( $P = 0.031$ ; nonparametric Wilcoxon test) and reached the expression levels from healthy volunteers. Therefore, the previously described difference in expression level disappeared during this observation period ( $P = 0.769$ ; nonparametric Mann Whitney test) (Fig. 2A). The same finding of *hOCT1* mRNA expression was seen in the MNC samples from patients under the same criteria (Figs. 1 and 2B).

The lower *hOCT1* mRNA expression level in LEU from IMA naïve de novo CML patients compared to healthy volunteers as well as its progressive increase after the start of IMA therapy could be explained by the initial presence and subsequent gradual disappearance of tumor cells from the measured cell population. To confirm this hypothesis, we performed an analysis on the relationship of *hOCT1* expression with the percentage of immature myeloid cells in the LEU samples (as a marker of disease burden) obtained from IMA naïve de novo CML patients. In addition, because of the fact that a majority of patients did not have immature myeloid cells present in PB LEU samples after the first month of IMA therapy, we analyzed the dependence of LEU *hOCT1* mRNA expression on the amount of *BCR/ABL* transcripts from these samples. We found a statistically significant relationship between *hOCT1* mRNA expression level and the percentage of immature myeloid cells at the time of diagnosis as well as the *BCR/ABL* transcript level at the first month after the start of IMA treatment (Fig. 3A,B).

Very limited data concerning *hOCT1* mRNA expression in different cell populations exist to date [6–8]. Bazeos et al. reported a higher *hOCT1* mRNA expression level in PB PMNC compared to MNC from healthy individuals [6]. In this study, we have enhanced these findings and described the difference in expression level in IMA naïve de novo CML patients as well.

Our finding of lower *hOCT1* mRNA expression in total LEU from IMA naïve de novo CML patients that quickly reached the expression levels of healthy volunteers is in accordance with observations from Bazeos et al. [6]. However, the authors from that study assumed that this finding was related to the achievement of a complete cytogenetic response. According to our findings, the increase in *hOCT1* mRNA expression after the start of IMA treatment was not caused by the suppression of inhibitory effects of the *BCR/ABL* oncogene, as suggested by Bazeos et al., but rather was due to a significant effect of the lower *hOCT1* mRNA expression in immature myeloid cells (mostly CML tumor cells), which rapidly disappeared from the PB within the first month of IMA therapy.

Several studies have monitored *hOCT1* mRNA expression in the MNC fraction of the leukocytes [3,9]. However, the MNC is composed of several types of cells (including immature myeloid precursors, mostly tumor cells in CML patients). Although not analyzed, because of a low number of available samples for *hOCT1* mRNA measurement in MNC (required for statistical significance), we expected that the impact of the cell composition found in total leukocytes on the *hOCT1* mRNA expression results would be similar when measured in MNC. Therefore, it is not surprising that Labussiere et al. and White et al. did not dem-

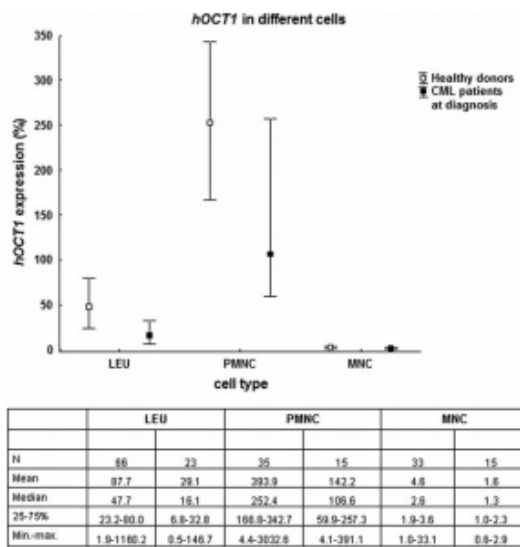


Figure 1. The *hOCT1* mRNA expressions (median, 25–75% quartiles) in total leukocytes (LEU), polymorphonuclear cells (PMNC), and mononuclear cells (MNC) in healthy volunteers and in imatinib naïve de novo CML patients.

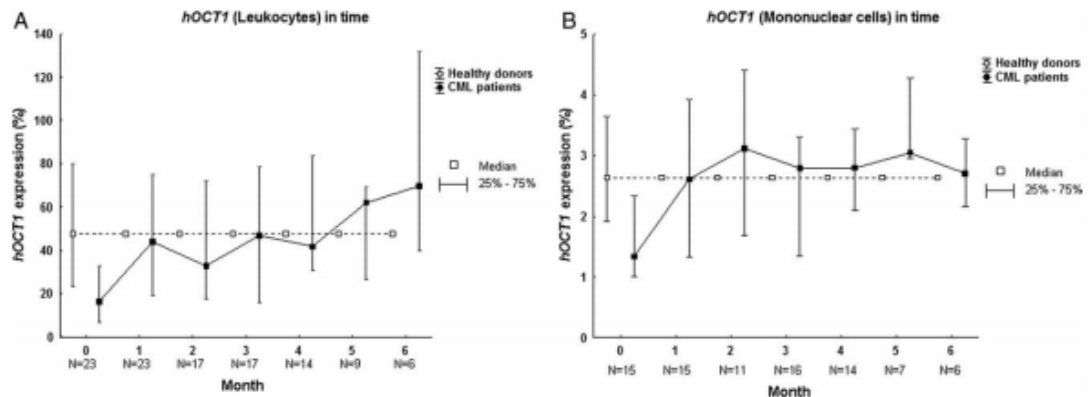


Figure 2. The *hOCT1* mRNA expression level in total leukocytes (A) and mononuclear cells (B) in IMA naïve de novo CML patients before the start of IMA treatment (month 0) and during the first 6 months of IMA therapy as well as a comparison of *hOCT1* expression in analogous cell populations in healthy volunteers.



letters

mRNA expression in total LEU as well as in PMNC and MNC. The *hOCT1* mRNA expression was significantly higher in PMNC compared to MNC. Therefore, the total LEU *hOCT1* mRNA expression was preferentially determined by the percentage of PMNC in the total LEU.

Analogous measurements were performed in 23 patients with IMA naïve de novo CML. Similarly, a large distribution of expression was seen from individual groups of cells (Fig. 1). Total *hOCT1* mRNA expression in PB LEU was again significantly influenced by the PMNC *hOCT1* mRNA expression and PMNC percentage. The large variability in the percentage of PMNC from total LEU in patients with IMA naïve de novo CML (median: 75%; range: 33–93%) is, therefore, an important factor in the marked variability seen in *hOCT1* mRNA expression in total LEU at the time of CML diagnosis. In addition, the *hOCT1* mRNA expression from each analyzed group of cells was always significantly lower in IMA naïve de novo CML patients compared to healthy volunteers (Fig. 1). This suggested that CML cells have an additional effect on the observed *hOCT1* mRNA expression level.

The *hOCT1* mRNA expression was detected in total LEU and in MNC at monthly intervals from IMA naïve de novo CML patients from the time of diagnosis until the 6th month of IMA therapy. The median *hOCT1* mRNA

expression level from total LEU was significantly lower in the CML patients at the time of diagnosis compared to median expression levels in healthy individuals (Fig. 1;  $P < 0.001$ ; nonparametric Mann Whitney test). However, after 1 month of IMA treatment, the median *hOCT1* mRNA expression level in total LEU significantly increased ( $P = 0.031$ ; nonparametric Wilcoxon test) and reached the expression levels from healthy volunteers. Therefore, the previously described difference in expression level disappeared during this observation period ( $P = 0.769$ ; nonparametric Mann Whitney test) (Fig. 2A). The same finding of *hOCT1* mRNA expression was seen in the MNC samples from patients under the same criteria (Figs. 1 and 2B).

The lower *hOCT1* mRNA expression level in LEU from IMA naïve de novo CML patients compared to healthy volunteers as well as its progressive increase after the start of IMA therapy could be explained by the initial presence and subsequent gradual disappearance of tumor cells from the measured cell population. To confirm this hypothesis, we performed an analysis on the relationship of *hOCT1* expression with the percentage of immature myeloid cells in the LEU samples (as a marker of disease burden) obtained from IMA naïve de novo CML patients. In addition, because of the fact that a majority of patients did not have immature myeloid cells present in PB LEU samples after the first month of IMA therapy, we analyzed the dependence of LEU *hOCT1* mRNA expression on the amount of *BCR/ABL* transcripts from these samples. We found a statistically significant relationship between *hOCT1* mRNA expression level and the percentage of immature myeloid cells at the time of diagnosis as well as the *BCR/ABL* transcript level at the first month after the start of IMA treatment (Fig. 3A,B).

Very limited data concerning *hOCT1* mRNA expression in different cell populations exist to date [6–8]. Bazeos et al. reported a higher *hOCT1* mRNA expression level in PB PMNC compared to MNC from healthy individuals [6]. In this study, we have enhanced these findings and described the difference in expression level in IMA naïve de novo CML patients as well.

Our finding of lower *hOCT1* mRNA expression in total LEU from IMA naïve de novo CML patients that quickly reached the expression levels of healthy volunteers is in accordance with observations from Bazeos et al. [6]. However, the authors from that study assumed that this finding was related to the achievement of a complete cytogenetic response. According to our findings, the increase in *hOCT1* mRNA expression after the start of IMA treatment was not caused by the suppression of inhibitory effects of the *BCR/ABL* oncogene, as suggested by Bazeos et al., but rather was due to a significant effect of the lower *hOCT1* mRNA expression in immature myeloid cells (mostly CML tumor cells), which rapidly disappeared from the PB within the first month of IMA therapy.

Several studies have monitored *hOCT1* mRNA expression in the MNC fraction of the leukocytes [3,9]. However, the MNC is composed of several types of cells (including immature myeloid precursors, mostly tumor cells in CML patients). Although not analyzed, because of a low number of available samples for *hOCT* mRNA measurement in MNC (required for statistical significance), we expected that the impact of the cell composition found in total leukocytes on the *hOCT* mRNA expression results would be similar when measured in MNC. Therefore, it is not surprising that Labussiere et al. and White et al. did not dem-

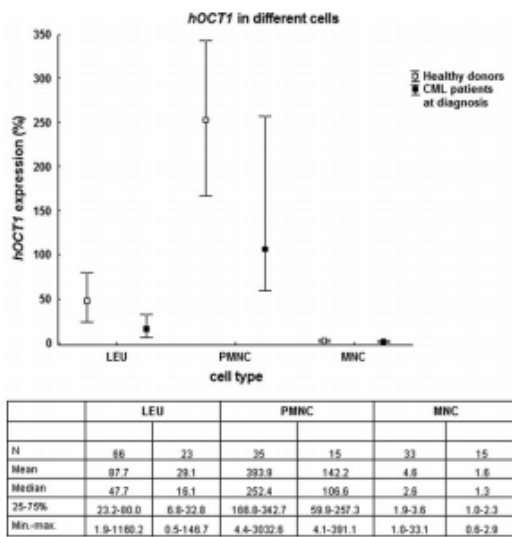


Figure 1. The *hOCT1* mRNA expressions (median, 25–75% quartiles) in total leukocytes (LEU), polymorphonuclear cells (PMNC), and mononuclear cells (MNC) in healthy volunteers and in imatinib naïve de novo CML patients.

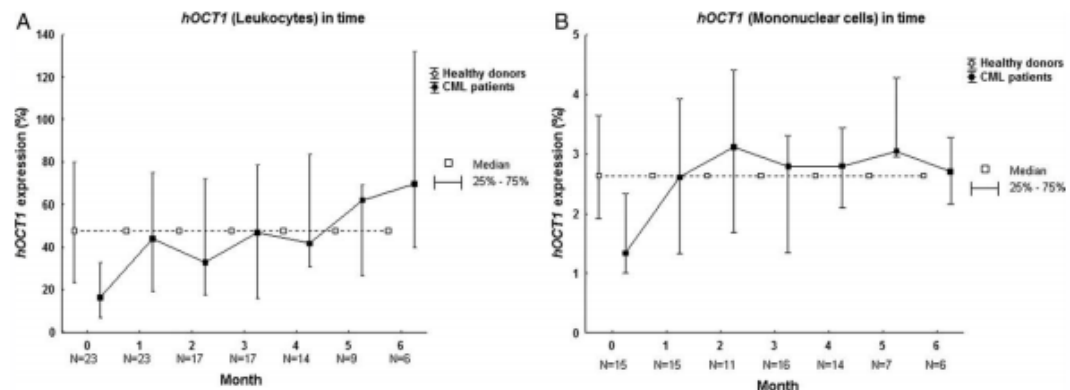


Figure 2. The *hOCT1* mRNA expression level in total leukocytes (A) and mononuclear cells (B) in IMA naïve de novo CML patients before the start of IMA treatment (month 0) and during the first 6 months of IMA therapy as well as a comparison of *hOCT1* expression in analogous cell populations in healthy volunteers.

## letters

To ensure reproducibility, all samples were performed and analyzed in duplicate. To obtain robust results, a cDNA from the KCL-22 cell line (DSMZ, Braunschweig, Germany), which has low *hOCT1* mRNA expression, was used as an internal control for *hOCT1* and *GUS* assessment. In addition, cDNA from the K562 cell line (DSMZ, Braunschweig, Germany) was used as an internal control *BCR/ABL* quantification.

For all statistical analyses, the software Statistica, version 9.0 (StatSoft, Tulsa, USA) and R (R Development Core Team, Auckland, New Zealand) were used.

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine Hemato-Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; <sup>2</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>3</sup>School of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; <sup>4</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic;

Zdenek Racil and Filip Razga contributed equally to this work. Contract grant sponsor: CELL – The Czech Leukemia Study Group for Life. Contract grant number: MSM0021622430.

\*Correspondence to: Zdenek Racil, Department of Internal Medicine Hemato-Oncology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, Brno 625 00 Czech Republic

E-mail: zracil@fnbrno.cz

Conflict of interest: Nothing to report.

Published online 24 March 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/ajh.21722

## References

1. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: Implications for drug resistance. *Blood* 2004;104:3739–3745.
2. White DL, Saunders VA, Dang P, et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): Reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 2006;108:697–704.
3. White DL, Saunders VA, Dang P, et al. Most CML patients who have a sub-optimal response to imatinib have low OCT-1 activity: Higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* 2007;110:4064–4072.
4. Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, et al. *hOCT 1* and resistance to imatinib. *Blood* 2005;106:1133–1134.
5. Wang L, Giannoudis A, Lane S, et al. Expression of the uptake drug transporter *hOCT1* is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:258–264.
6. Bazeos A, Marin D, Gerrard G, et al. BCR-ABL1 Oncogene Down-regulates the Expression of OCT1 in CML. *ASH Annu Meet Abstr* 2009;114:3248.
7. Engler JR, Frede A, Zannettino ACW, et al. Reduced Activity of the OCT-1 Protein in Primitive CML Cells: A Likely Determinant of Stem Cell Resistance in Imatinib Treated CML Patients. *ASH Annu Meet Abstr* 2008;112:196.
8. Jiang X, Zhao Y, Smith C, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 2007;21:926–935.
9. Labussiere H, Hayette S, Chabane K, et al. Pharmacogenomic Factors Such as the Expression of Imatinib Transporters (OCT-1, ABCB-1 and ABCG-2) at Diagnosis, OCT-1 SNPs, and Steady-State Imatinib and Desmethyl-imatinib Trough Plasma Levels in De Novo Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia, May Influence Disease Response to Imatinib. *ASH Annu Meet Abstr* 2008;112:2643.
10. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17:2474–2486.
11. Gabert J, Beillard E, Van Der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—A Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318–2357.

# Informational needs assessment of non-Hodgkin lymphoma survivors and their physicians

Daphne R. Friedman,<sup>1\*</sup> April D. Coan,<sup>2</sup> Sophia K. Smith,<sup>3</sup> James E. Herndon II,<sup>4</sup> and Amy P. Abernethy<sup>5</sup>

Cancer Survivorship Care Plans (SCPs) are a recommended part of medical care for cancer survivors. We sought to identify the medical and psychosocial informational needs of non-Hodgkin lymphoma survivors and their physicians in cancer survivorship care to be included in SCPs. Questionnaires were mailed to eligible lymphoma survivors and their physicians, querying their preferences about informational needs in SCPs. The survivor cohort had a median age at diagnosis of 62, with 57% Female, 87% White, and 76% from North Carolina. The physician cohort was comprised of oncologists (27%) and nononcologists (73%), and 86% practiced in North Carolina. Greater than 60% of both survivors and physicians preferred an oncologist and primary care provider manage cancer survivorship care. The most highly rated informational needs were medical issues, although there were differences between survivors and physicians for many of the informational needs queried. There was higher concordance between patient and physician responses for medical issues (63 to 100%) compared to psychosocial issues (25 to 63%). Important components of SCPs for lymphoma survivors and their physicians may go unrecognized. Tailoring SCPs to patient or physician users may better accommodate the differences in need for particular cancer survivorship care information.

As cancer is becoming more treatable and curable, the numbers of cancer survivors is increasing [1]. Medical complications, long-term and late effects of therapy, and psychosocial difficulties are among the issues with which cancer survivors must live [2–4].

In recognition of this, SCPs were recommended, in the first comprehensive manner, by the Institute of Medicine [5]. Several templates exist (e.g. American Society of Clinical Oncology [6], Lance Armstrong Foundation/OncoLink [7], and Journey Forward [8]), but patients criticize these tem-

plates as being too technical, lacking personalization, and being deficient in resource and wellness guides [2,9]. Barriers to development and implementation of these care plans include difficulty in identifying evidence-based components [10], insufficient reimbursement for record abstraction [11], lack of specific medical knowledge by primary care physicians (particularly regarding hematologic malignancies) [12], and poor communication between oncologists and primary care physicians [5,13].

Despite a growing body of literature regarding SCPs, the oncology community has not fully recognized that cancer survivors, oncologists, and primary care providers have varying levels of knowledge and different experiences, and thus may have different informational needs regarding cancer survivorship care [2]. By focusing survivorship care based on prioritized needs, cancer survivors may be more receptive to receiving continued medical care in all areas.

To address these issues, we focused on a group of survivors who are treated in a standardized manner, but who are often left out of the SCP development discussions, specifically survivors of diffuse large B-cell lymphoma, the most common type of non-Hodgkin lymphoma. We aimed to (1) identify the most important informational needs of survivors and their treating physicians responsible for cancer survivorship care, (2) define the effect of demographic factors on informational needs, and (3) assess how closely the informational needs of individual survivors link to that of their physicians.

A total of 178 surveys were mailed to cancer survivors. Fourteen were excluded because of death (4) or returned mail (10). Sixty-seven of the 164 potential respondents responded, resulting in an overall response rate of 41%. Seventy-eight surveys were mailed to physicians. Two were excluded because of returned mail. Twenty-two of the 76 potential participants responded, resulting in an overall response rate of 29%. Baseline character-

### 5.7.2. Příloha 13

Racil Z, Razga F, Polakova KM, Buresova L, Polivkova V, Dvorakova D, Zackova D, Klamova H, Cetkovsky P, Mayer J. Assessment of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) mRNA expression in patients with de novo chronic myelogenous leukemia: the role of different cell types. *Leukemia & Lymphoma*. 2011; 52(2):331-334.

IF = 2,580 v roce 2011; ONCOLOGY Q2; 5 citací ve WOS, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Analyzovány byly rozdíly v expresi ABCB1 mRNA v různých frakcích leukocytů v periferní krvi u zdravých dobrovolníků (n = 76) a pacientů s nově zjištěnou CML (n = 38) a vztah exprese ABCB1 mRNA a podílů jednotlivých frakcí na celkovém rozpočtu leukocytů
- Exprese ABCB1 mRNA v mononukleárních buňkách byla signifikantně vyšší než v buňkách polymorfonukleárních, a dále ve všech frakcích leukocytů pak signifikantně vyšší u zdravých dobrovolníků ve srovnání s pacienty s *de novo* CML
- Byla pozorována statisticky významná pozitivní korelace mezi podílem lymfocytů v celkovém rozpočtu leukocytů a ABCB1 mRNA expresí, a naopak negativní korelace mezi podílem nezralých myeloidních buněk a expresí tohoto genu
- U pacientů s *de novo* CML nebyla shledána žádná korelace předléčebných mediánů ABCB1 mRNA hladin hodnocených v celkové frakci leukocytů s následně dosaženou či naopak nedosaženou CCyR či MMR
- Vzhledem k závislosti ABCB1 mRNA exprese na podílech jednotlivých buněčných frakcí v celkovém rozpočtu leukocytů a na celkové leukemické náloži je nezbytným předpokladem úvah o možném využití tohoto markeru coby prognostického faktoru následné léčebné odpovědi získání optimální buněčné populace pro vlastní analýzu

LETTER TO THE EDITOR

**Assessment of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 1 (*ABCB1*) mRNA expression in patients with *de novo* chronic myelogenous leukemia: the role of different cell types**

ZDENEK RACIL<sup>1\*</sup>, FILIP RAZGA<sup>1\*</sup>, KATERINA MACHOVA POLAKOVA<sup>2</sup>,  
LUCIE BURESOVA<sup>3</sup>, VACLAVA POLIVKOVA<sup>2</sup>, DANA DVORAKOVA<sup>1</sup>,  
DANIELA ZACKOVA<sup>1</sup>, HANA KLAMOVA<sup>2</sup>, PETR CETKOVSKY<sup>2</sup>, & JIRI MAYER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, <sup>2</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic, and <sup>3</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic

(Received 30 August 2010; revised 7 October 2010; accepted 14 October 2010)

The *ABCB1* gene encodes P-glycoprotein, a member of the multi-drug resistance protein subfamily B, which plays a role in the cell efflux of imatinib mesylate (IMA). Although some conflicting results have been reported, it is generally accepted that overexpression of the *ABCB1* gene leads to the up-regulation of P-glycoprotein (i.e. *ABCB1*) and the subsequent increase of IMA efflux, which has been postulated to be an important mechanism of drug resistance in CML [1]. Despite an abundance of literature that discusses *ABCB1* biology, only limited data exist that have explored the relationship between *ABCB1* expression or activity and the prediction of treatment response in patients with chronic myelogenous leukemia (CML) [2–5]. While Labussiere *et al.* found an association between *ABCB1* mRNA baseline levels and treatment response (defined as the rate of major molecular response at 12 months) [4], others did not confirm this relationship [2,3,5], and interestingly did not find a statistically significant change in *ABCB1* mRNA expression at the time of imatinib failure or suboptimal response [2,5]. Moreover, this issue includes several more uncertainties in the literature that may lead to the misinterpretation of previously reported data as well as to the incorrect interpretation of future studies. First, the measurement of *ABCB1* activity [6] must be clearly differentiated from *ABCB1* mRNA expression ana-

lysis [1–4,6]. Second, the cell populations used in previous analyses have varied widely in cell type [1–6]. Furthermore, while some studies have monitored a well-defined group of patients diagnosed with *de novo* chronic phase CML [4], other studies have analyzed heterogeneous populations of patients who exhibit more advanced disease [3] or have been pretreated [2]. Therefore, the variability in both cell populations and patient cohorts that have been analyzed make it difficult to interpret the results from these previous studies.

In this study, we investigated differences in *ABCB1* mRNA expression measured in peripheral blood (PB) leukocytes (LEU) as well as polymorphonuclear (PMNCs) and mononuclear cells (MNCs) of PB LEU obtained from healthy volunteers ( $n = 76$ ) and patients with *de novo* CML ( $n = 38$ ). In addition, we analyzed the relationship between the percentage of individual cells that comprise the total LEU count and *ABCB1* mRNA expression assessed from the total LEU.

PB samples were obtained, processed, and analyzed as previously described [7] at two institutions: the University Hospital Brno (Center I) and the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague (Center II). TaqMan Gene Expression Assays (product number Hs0167802\_m1 at Center I, product number Hs00184491\_m1 at Center II;

Correspondence: Zdenek Racil, MD, PhD, Department of Internal Medicine Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Jihlava 20, 625 00 Brno, Czech Republic. Tel: +420-532233642. Fax: +420-532233603. E-mail: zracil@fnbrno.cz  
\*Zdenek Racil and Filip Razga contributed equally to this manuscript.

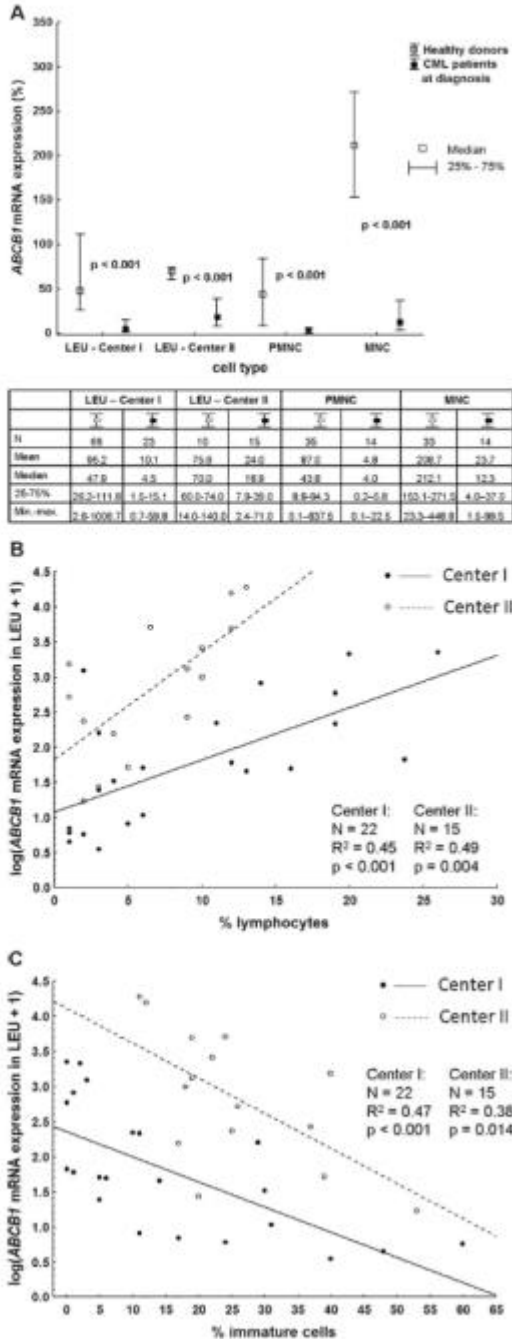
Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA) were used according to the manufacturer's recommendations. The final *ABCB1* mRNA expression

level was calculated using the following formula:  $ABCB1^{(absolute\ copies)}/GUS^{(absolute\ copies)} * 100\%$ .

The assessment of *ABCB1* mRNA expression was performed in PB LEU ( $n=76$ ), PB PMNCs ( $n=35$ ), and PB MNCs ( $n=33$ ) obtained from 76 healthy volunteers. Figure 1(A) summarizes these results and clearly shows a wide range of *ABCB1* expression in all cell populations. *ABCB1* mRNA level was significantly higher in MNCs compare to PMNCs ( $p < 0.001$ ). These results suggest that the *ABCB1* mRNA expression level used as a prognostic factor should always be assessed in relation to the cell type in which expression was measured.

Analogous measurements were performed in 38 patients with *de novo* CML. Similarly, a large distribution of *ABCB1* mRNA expression was found in these individual groups of cells, although to a lesser extent than in healthy volunteers [Figure 1(A)]. *ABCB1* mRNA expression was also significantly higher in MNCs compared to PMNCs ( $p < 0.003$ ). Furthermore, the *ABCB1* mRNA expression in each of the analyzed groups of cells was always significantly lower in the patients with *de novo* CML compared to healthy volunteers [Figure 1(A)]. These data suggest that CML cells have an additional effect on the observed levels of *ABCB1* mRNA expression.

The microscopic evaluation of the composition of PMNC and MNC fractions [7] revealed that the MNC portion contained not only lymphocytes and monocytes, as expected, but also contained immature myeloid cells (blasts, myelocytes, promyelocytes, and metamyelocytes). Therefore, we analyzed the relationship between *ABCB1* mRNA expression in the total LEU population and the percentages of the individual cellular components. As shown in Figures 1(B) and 1(C), we observed a statistically significant positive relationship between the percentage of lymphocytes in the total LEU and *ABCB1* mRNA expression (Center I,  $p < 0.001$ ; Center II,  $p = 0.004$ ) [Figure 1(B)]. Conversely, we also observed a statistically significant negative relationship between the percentage of immature myeloid cells and expression of this gene (Center I,  $p < 0.001$ ; Center II,  $p = 0.014$ ) [Figure 1(C)]. These relation-



Leuk Lymphoma Downloaded from informahealthcare.com by 83.208.123.99 on 12/09/10  
For personal use only.

Figure 1. (A) *ABCB1* mRNA expression (median, 25–75% quartiles) in total leukocytes (LEU), polymorphonuclear cells (PMNC), and mononuclear cells (MNC) from healthy volunteers and patients with *de novo* CML. Exponential relationship of *ABCB1* mRNA expression in total leukocytes (LEU) and the percentage of lymphocytes (B) and immature cells (C) at the time of diagnosis in patients with *de novo* CML (results from Centers I and II are presented separately). In regression analysis (to achieve exponential fit), the *ABCB1* transcript level was transformed by adding one and taking the natural logarithm (log denotes natural logarithm).

ships were confirmed by independent measurements taken from both participating centers.

The presented data clearly indicate that one of the main reasons for the discrepancies among studies analyzing *ABCB1* mRNA expression in patients with CML may be due to the heterogeneity within the patient groups and various cell populations used for the analyses. Moreover, we have also shown that the actual composition of the analyzed samples (i.e. the percentage of different cell types that are represented in PB LEU, which is highly variable among patients with CML at the time of diagnosis [data not shown]) significantly affects the final result of *ABCB1* mRNA expression assessment. Therefore, the lack of any relationship between *ABCB1* mRNA expression and treatment response in previously reported studies [1–3] of IMA-naïve patients with CML could be explained by the following hypotheses: (a) in studies that have analyzed patient groups with higher incidences of advanced stages of CML, the results could be affected by the high proportion of immature myeloid cells in the analyzed sample, resulting in lower *ABCB1* mRNA expression, and (b) in studies that have analyzed pretreated patients (e.g. patients treated with hydroxyurea or interferon- $\alpha$ ), the *ABCB1* transcript level may be affected by a decrease in the percentage of immature myeloid cells and a higher percentage of lymphocytes.

Thus, it is not surprising that also in our study (even we had only a short observational period) we did not find any difference between medians of *ABCB1* pretreatment levels assessed in total LEU from patients with *de novo* CML with and without complete cytogenetic response (CCyR) (Center I, 4.7% vs. 4.4%,  $p = 1.000$ ; Center II, 17.8 vs. 18.9,  $p = 1.000$ ) or with and without major molecular response (MMoR) (Center I, 4.5% vs. 4.5%,  $p = 0.930$ ; Center II, 12.2% vs. 21.5%,  $p = 0.776$ ) at the 6th month of IMA therapy. Similarly, there was no difference between these medians when *ABCB1* expression was measured in MNC cells (CCyR vs. no CCyR: Center I, 11.0% vs. 11.0%,  $p = 1.000$ ; MMoR vs. no MMoR: Center I, 20.0% vs. 9.9%,  $p = 0.758$ ).

Moreover, an increased level of *ABCB1* mRNA during IMA therapy has been suggested to correlate with a higher probability of IMA failure [2] or a higher risk of developing *BCR/ABL* domain mutations [3]. However, it could be alternatively hypothesized that *ABCB1* mRNA expression levels during a failure of IMA treatment could still be affected by the differential count of PB LEU or the percentage of different cell types present in the total cell population, similar to that observed in our study with samples from IMA-naïve patients with CML.

One last important consideration that must be noted is the lack of standardization in molecular

approaches for monitoring of *ABCB1* expression, an issue previously described for *BCR/ABL* monitoring. The wide range of techniques currently applied make it difficult to compare the results of different studies performed in different laboratories. For example, although the *ABCB1* expression data shown in this study were measured using the same method at two different study centers, the assessed *ABCB1* mRNA expression was slightly different [Figure 1(C)], despite having the same trend and a similar statistical significance. These results clearly indicate the need for assay standardization in order to minimize inter-study variation and allow for accurate conclusions to be drawn.

In summary, we have shown that *ABCB1* mRNA transcript levels are significantly higher in PB MNCs than in PB PMNCs and are lower in patients with *de novo* CML compared to healthy individuals. Moreover, we have demonstrated the importance of the cell composition of analyzed samples in *ABCB1* mRNA expression analysis. Our data may suggest that it is necessary to obtain an optimal cell population for *ABCB1* mRNA expression assessment in order to identify the true relationship between *ABCB1* mRNA expression and treatment outcome in future studies.

#### Acknowledgements

We would like to acknowledge the laboratory of Dana Mikulenkova (Center II) for microscopic evaluation and blood count estimation.

**Declaration of interest:** This study was supported by The Czech Leukemia Study Group for Life (CELL), MSM0021622430, and MZOUHK2005.

#### References

1. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 2004;104:3739–3745.
2. Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, Pirmohamed M, Wang L, Clark RE. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* 2005;106:1133–1134; author reply 1134.
3. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:258–264.
4. Labussiere H, Hayette S, Chabane K, et al. Pharmacogenomic factors such as the expression of imatinib transporters (OCT-1, ABCB-1 and ABCG-2) at diagnosis, OCT-1 SNPs, and steady-state imatinib and desmethyl-imatinib trough plasma levels in *de novo* chronic phase chronic myelogenous leukemia, may influence disease response to imatinib. *Blood* 2008;112(Suppl. 1): Abstract 2643.
5. Iraci N, Soverini S, Gherardi S, et al. Expression profiling of ABC transporter genes in chronic myeloid leukemia (CML)

4 *Letter to the Editor*

- and responsiveness to imatinib. *Blood* 2008;112(Suppl. 1): Abstract 3193.
6. Hatzileremia S, Jordanides NE, Holyoake TL, Mountford JC, Jorgensen HG. Inhibition of MDRI does not sensitize primitive chronic myeloid leukemia CD34+ cells to imatinib. *Exp Hematol* 2009;37:692-700.
  7. Racil Z, Razga F, Buresova L, et al. The assessment of human organic cation transporter 1 (hOCT1) mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia is affected by the proportion of different cells types in the analyzed cell population. *Am J Hematol* 2010;85:525-528.

### 5.7.3. Příloha 14

Racil Z, Razga F, Klamova H, Voglova J, Belohlavkova P, Malaskova L, Potesil D, Muzik J, Zackova D, Polakova KM, Zdrahal Z, Malakova J, Suttnar J, Dyr J, Mayer J. No clinical evidence for performing trough plasma and intracellular imatinib concentrations monitoring in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Hematological Oncology*. 2014;32(2):87-93. Erratum in: *Hematol Oncol*. 2014;32(3):168.

IF = 3,084 v roce 2014; ONCOLOGY Q2; 3 citace ve WOS, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Analyzovány byly vzorky 228 pacientů s CML léčených imatinibem v podmínkách každodenní klinické praxe ve 3 centrech specializované hematologické péče (FN Brno, ÚHKT Praha, FN Hradec Králové)
- Neprokázan statisticky významný rozdíl ani v plazmatických hladinách imatinibu ( $C_{\text{trough}}$ ) měřených v průběhu 1. měsíce a 1. roku léčby, ani v jeho intracelulárních koncentracích měřených během 1. měsíce léčby u pacientů, u nichž bylo či naopak nebylo dosaženo v pozdějším sledování optimální léčebné odpovědi
- Byla shledána korelace  $C_{\text{trough}}$  imatinibu a plazmatických koncentrací  $\alpha$ -1-kyselého glykoproteinu
- Na základě výsledků analýzy nelze označit plazmatické ani intracelulární koncentrace imatinibu za vhodné prediktory následné léčebné odpovědi a rovněž jejich rutinní monitorování s následnou případnou modifikací dávkování imatinibu nelze doporučit
- Pro správnou interpretaci výsledků měření plazmatických hladin imatinibu je nutné zohlednit i plazmatické koncentrace  $\alpha$ -1-kyselého glykoproteinu a v případě hodnocení intracelulárních koncentrací imatinibu je vhodné upřednostnit kompartment kostní dřeně před leukocyty periferní krve



Original Research Article

## No clinical evidence for performing trough plasma and intracellular imatinib concentrations monitoring in patients with chronic myelogenous leukaemia

Zdenek Racil<sup>1,2,6†\*</sup>, Filip Razga<sup>1,10†</sup>, Hana Klamova<sup>3</sup>, Jaroslava Voglova<sup>4</sup>, Petra Belohlavkova<sup>4</sup>, Ludmila Malaskova<sup>5</sup>, David Potesil<sup>6</sup>, Jan Muzik<sup>7</sup>, Daniela Zackova<sup>1,2</sup>, Katerina Machova Polakova<sup>3</sup>, Zbynek Zdrahal<sup>6,8</sup>, Jana Malakova<sup>9</sup>, Jiri Suttnar<sup>3</sup>, Jan Dyr<sup>3</sup> and Jiri Mayer<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>IV. Department of Internal Medicine — Hematology, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>6</sup>CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>7</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>8</sup>National Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>9</sup>Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>10</sup>Department for Biomaterials Research, Polymer Institute of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

\*Correspondence to:  
Zdenek Racil, MD, PhD,  
Department of Internal Medicine,  
Hematology and Oncology,  
University Hospital Brno, Jihlavská  
20, 602 00 Brno, Czech Republic.  
E-mail: zracil@fnbrno.cz  
†Zdenek Racil and Filip Razga  
equally contributed to the  
manuscript.

### Abstract

This multicentre study focused on monitoring imatinib mesylate (IMA) trough plasma ( $C_{\text{trough}}$ ) and intracellular (IMA  $C_{\text{intrac}}$ ) concentrations in 228 chronic myelogenous leukaemia patients. The median of measured IMA  $C_{\text{trough}}$  in our patient group was 905.8 ng/ml (range: 27.7–4628.1 ng/ml). We found a correlation between IMA  $C_{\text{trough}}$  and alpha 1-acid glycoprotein plasma concentrations ( $rS=0.42$ ;  $p < 0.001$ ). All other analysed parameters revealed only weak (gender, dose of IMA per kg) or not significant (age, albumin, creatinine plasma concentration or body mass index) impact on measured IMA  $C_{\text{trough}}$ . The IMA  $C_{\text{trough}}$  decreased during the first 6 months and significantly increased later during treatment. The IMA  $C_{\text{trough}}$  at the first month of therapy did not differ between patients with and without an optimal response at the 12th ( $p=0.724$ ) and 18th month ( $p=0.135$ ) of therapy. There were no significant differences in medians of IMA  $C_{\text{trough}}$  between both groups measured during the first year of treatment. The IMA  $C_{\text{intrac}}$  during the first month were not different between patients with and without an optimal response at the 6th ( $p=0.273$ ) and the 12th month ( $p=0.193$ ) of therapy. Our data obtained from real life clinical practice did not find a benefit of routine and regular IMA  $C_{\text{trough}}$  nor IMA  $C_{\text{intrac}}$  therapeutic drug monitoring in chronic myelogenous leukaemia patients or for subsequent adjustments of the IMA dose based on these results. Moreover, actual alpha 1-acid glycoprotein plasma concentration should be used for proper interpretation of IMA  $C_{\text{trough}}$  results. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

**Keywords:** CML; imatinib; plasma concentration; cell-associated concentration

Received: 25 June 2013  
Accepted: 24 July 2013

### Introduction

Imatinib mesylate (IMA) has dramatically changed the prognosis of patients with chronic myelogenous leukaemia (CML) [1]. Unfortunately, to date, a significant portion of *de novo* CML patients either do not have an optimal response or subsequently fail IMA therapy [1].

Among several causes of IMA resistance, pharmacokinetic parameters have been discussed as important factors

that can significantly decrease the anti-cancer efficacy of the drug [2]. Recent reports have suggested that treatment response in CML patients could be affected by variation of trough IMA plasma concentration (IMA  $C_{\text{trough}}$ ) [2–9]. However, there are substantial heterogeneities among these studies, predominantly in (i) the cohort of CML patients receiving different lengths of IMA therapy at the time of sampling; (ii) the number of samples per patients and (iii) the different parameters/criteria used for the assessment of treatment

outcome. Moreover, there are also data in the literature that disprove these correlations between IMA  $C_{\text{trough}}$  and patient outcome [10–12]. Thus, it is very difficult to evaluate the benefits of IMA  $C_{\text{trough}}$  monitoring in a daily clinical practice. Furthermore, because of technical aspects, there are limited data analyzing the role of IMA concentration directly measured in primary targets, such as hematopoietic cells [IMA intracellular concentration (IMA  $C_{\text{intrac}}$ ) or better termed the 'cell-associated amount', as the drug may bind to the cell membrane or to cytoplasmic proteins], and its correlation with IMA  $C_{\text{trough}}$  as well as with the treatment outcome [8,13].

Thus, the aims of our study were as follows: (i) to analyze results from IMA  $C_{\text{trough}}$  in routine clinical practice in three hematological centres in the Czech Republic; (ii) to assess the changes of IMA  $C_{\text{trough}}$  during the first year of IMA therapy; (iii) to correlate results of IMA  $C_{\text{trough}}$  obtained not only at the first month but also during the first year of IMA therapy, with treatment outcome based on European LeukemiaNet (ELN) 2009 criteria and (iv) to analyze the correlation of IMA  $C_{\text{intrac}}$  assessed at the first month of treatment with IMA  $C_{\text{trough}}$ , as well as with the treatment outcome based on the previously mentioned ELN definitions.

## Methods

### Patients, patients groups and definition of treatment response

Patients with CML treated with IMA between May 2008 and April 2012 at three hematological centres in Czech Republic (Masaryk University, University Hospital Brno, University Hospital Hradec Kralove and Institute of Hematology and Blood Transfusion Prague) were included in this study. Patients receiving regimens other than once daily IMA dosing, patients receiving concomitant medication possibly affecting IMA  $C_{\text{trough}}$  or IMA  $C_{\text{intrac}}$  and patients with probable poor drug adherence were excluded from all analyses. Because monitoring of IMA  $C_{\text{trough}}$  was a part of the routine monitoring where patients informed consent was not required, the monitoring of IMA  $C_{\text{intrac}}$  was performed after the signing of informed consent. The study was approved by institutional review board.

For baseline pharmacokinetic analysis, data from all patients receiving 400 mg once daily at the time of sampling were used. For exposure/response analysis, only data from newly diagnosed CML patients with regular sampling for IMA  $C_{\text{trough}}$  assessment at months 1, 3, 6, 9 and 12 were used (regardless of IMA dosing). Measurement of IMA  $C_{\text{intrac}}$  at month 1 of IMA therapy was also performed for a subset of these *de novo* CML patients.

All patients had regular hematological, cytogenetic and molecular monitoring performed as recommended by ELN for the management and definition of treatment response in patients with CML [14]. These recommendations were also

used for all the analyses of the relationships between pharmacokinetic parameters and treatment outcome.

### Sampling

Peripheral blood samples for IMA  $C_{\text{trough}}$  (5 ml) as well as for IMA  $C_{\text{intrac}}$  (5 ml) were collected before the morning IMA intake and 24+2 h after the last IMA dose. In cases where the sample for IMA  $C_{\text{trough}}$  was obtained outside of this period (18.8% of samples), a conversion of the results based on a previously published formula [15] was performed.

### Detection methods

The IMA  $C_{\text{trough}}$  was measured at all the centres using liquid chromatography and tandem mass spectrometry with deuterated IMA as the internal standard. The assay was fully validated with a detection limit of 10 ng/ml.

The IMA  $C_{\text{intrac}}$  detection was only performed at one center (University Hospital Brno). For IMA  $C_{\text{intrac}}$  assessment, peripheral blood samples were processed using Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Isolated mononuclear cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline supplemented with foetal bovine serum. Cell-associated IMA [after addition of internal standard ( $D_8$ -IMA) and cell lysis] was extracted using a liquid-liquid extraction procedure (hexan:ethylacetate; 3:7). Extracted IMA was quantified by nanoscale liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometer (nanoLC-MS/MS system). The nanoLC-MS/MS system consisted of EASY-nLC (Proxeon, now part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and HCT ultra PTM discovery system (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). The final IMA  $C_{\text{intrac}}$  was calculated as nanograms of IMA related to  $1 \times 10^6$  cells counted after cell isolation using Vacutainer tubes.

### Statistical methods

Spearman correlation was used to evaluate the relationship between IMA  $C_{\text{trough}}$  and dose of IMA per kg as well as plasma concentrations of alpha 1-acid glycoprotein (AGP), albumin and creatinine. The Wilcoxon paired test was used to compare IMA  $C_{\text{trough}}$  between months 1, 3, 6, 9 and 12. The Mann-Whitney test was used to compare IMA  $C_{\text{trough}}$  between male patients and female patients and between groups with optimal and not optimal treatment response. Categorical data were compared by the Pearson's chi-squared test. Statistical analysis was carried out with IBM SPSS Statistics 20 software (IBM Corp., 2011). A  $p$  value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Analysis of all measured imatinib trough plasma concentrations

We analysed 780 samples obtained from 228 patients [128 (56%) male patients/100 (44%) female patients] with the median age 56 years (range: 20–82), the median weight 81 kg (range: 36–140) and the median body mass index 27.4 (range: 14.6–49.7) receiving IMA 400 mg once daily during the entire study period. One hundred seventy-five patients received IMA as the first line treatment, and 53 patients received IMA as the second or subsequent line treatment. The median time from the start of IMA treatment to the sampling was 29.6 months (range: 0.3–106.6), and the median number of samples per patient was 2 (range: 1–17). The median IMA  $C_{\text{trough}}$  in our patient group was 905.8 ng/ml (range: 27.7–4628.1). The distribution of the measured results is shown in Table 1. The AGP plasma concentrations was simultaneously analysed in 441 (56.4%) samples with the median concentration 1.00 g/l (range: 0.53–2.33).

In this cohort, correlations between IMA  $C_{\text{trough}}$  and simultaneously measured AGP plasma concentrations ( $rS = 0.42$ ;  $p < 0.001$ ) was observed. Weak correlation was also identified between IMA  $C_{\text{trough}}$  and dose of IMA per kg ( $rS = 0.19$ ;  $p < 0.001$ ). Finally, significantly higher IMA  $C_{\text{trough}}$  was detected in female patients compare with the male patients (mean IMA  $C_{\text{trough}}$  1097 vs 959 ng/ml;  $p < 0.01$ ). However, except AGP, all the previously mentioned correlations and differences were weak and thus with only limited clinical relevance. We did not find a relationship between IMA  $C_{\text{trough}}$  and age ( $rS = 0.08$ ,  $p = 0.03$ ), body mass index ( $rS = -0.02$ ;  $p = 0.68$ ), albumin ( $rS = -0.03$ ;  $p = 0.20$ ) or creatinine plasma levels ( $rS = 0.00$ ;  $p = 0.96$ ).

### Imatinib trough plasma concentrations during the first year of therapy

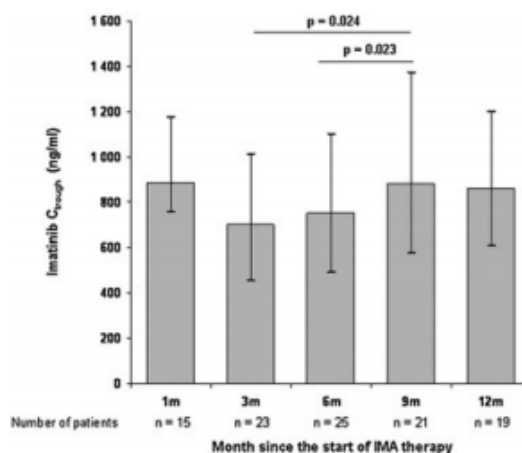
We analysed the data from the subset of 25 out of 228 patients who had received 400 mg of IMA once daily during the entire study period and who were prospectively monitored during the first year of IMA therapy at the 1st, 3rd, 6th, 9th and 12th month of IMA treatment. In this period, we identified a substantially decreased IMA  $C_{\text{trough}}$  during the first 6 months after the start of IMA therapy, which was in contrast to the significant increase in IMA  $C_{\text{trough}}$

observed in the later period (Figure 1). The initial decline of IMA  $C_{\text{trough}}$  could be at least partially explained by significant decrease in AGP plasma concentration between the first and the third month of therapy ( $p = 0.036$ ). No other factor was identified.

### Imatinib trough plasma concentrations after the first month of therapy and their association with the treatment outcome at the 12th and 18th month

Thirty-five patients (median age: 58 years) with newly diagnosed CML (Sokal risk groups: high, 25.7%; intermediate, 48.6%; low, 22.9% and unknown, 2.9%) had the IMA  $C_{\text{trough}}$  assessed at the first month of IMA therapy. We did not identify any significant difference in the medians of IMA  $C_{\text{trough}}$  or the categorical distribution of results measured at this time point between patients with an optimal treatment response and patients with suboptimal treatment response or therapy failure at the 12th and 18th month (Tables 2 and 3).

These findings were not influenced by the possible IMA dose change during the analysed period, because similar results were obtained when only a subset of 20 patients with a permanent dose of IMA 400 mg/day during the entire



**Figure 1.** Time trends in measured imatinib trough plasma concentration (IMA  $C_{\text{trough}}$ ) (bars and whiskers represent median and quartiles) — patients treated with imatinib at 400 mg daily over the entire course of study

**Table 1.** Distribution of measured imatinib trough plasma concentrations

n measures	Median (min–max) of IMA $C_{\text{trough}}$ (ng/ml)	<400	<600	<800	<1000	<1200	≥1200
780	905.8 (27.7–4628.1)	53 (6.8%)	145 (18.6%)	310 (39.7%)	455 (58.3%)	576 (73.8%)	204 (26.2%)

**Table 2.** Comparison of medians of imatinib trough plasma concentrations measured at the first month of therapy based on treatment outcome at the 12th and 18th month of therapy

	N	Median (min–max) IMA C <sub>trough</sub> (ng/ml)	p-value <sup>a</sup>
<b>ELN response 12M</b>			
Optimal	27	829.3 (399.2–8905.5)	0.724
Suboptimal + failure	8	1 003.6 (14.2–2669.4)	
<b>ELN response 18M</b>			
Optimal	14	856.8 (399.2–8905.5)	0.155
Suboptimal + failure	11	1 034.6 (553.3–3 074.9)	

ELN; European LeukemiaNet. IMA C<sub>trough</sub>; imatinib trough plasma concentrations.

<sup>a</sup>Mann–Whitney test.

**Table 3.** Categorical distribution of imatinib trough plasma concentrations measured at the first month of therapy based on treatment outcome at the 12th and 18th month of therapy based on European Leukemia Net 2009 recommendations

	IMA C <sub>trough</sub> (ng/ml)			Total (%)	p-value <sup>a</sup>
	≤600 (%)	>600–1000 (%)	>1000 (%)		
<b>ELN response 12M</b>					
Suboptimal + failure	1 (14.3)	3 (23.1)	4 (26.7)	8 (22.9)	0.999
Optimal	6 (85.7)	10 (76.9)	11 (73.3)	27 (77.1)	
Total	7 (100.0)	13 (100.0)	15 (100.0)	35 (100.0)	
<b>ELN response 18M</b>					
Suboptimal + failure	1 (25.0)	2 (28.6)	4 (66.7)	7 (41.2)	0.456
Optimal	3 (75.0)	5 (71.4)	2 (33.3)	10 (58.8)	
Total	4 (100.0)	7 (100.0)	6 (100.0)	17 (100.0)	

ELN; European LeukemiaNet. IMA C<sub>trough</sub>; imatinib trough plasma concentrations.

<sup>a</sup>Fisher's exact test.

treatment period was analysed. In this subset of patients, the difference in the medians of IMA C<sub>trough</sub> measured at the first month was not significant between both patient outcome groups evaluated at the 12th and 18th month ( $p=0.379$  and  $0.315$ , respectively; Table S1). Similarly, no significant difference was observed for the categorical distribution of the results ( $p=0.326$  and  $0.392$ , respectively; Table S2).

#### Imatinib trough plasma concentrations during the first year of therapy and their association with treatment outcome at the 12th and 18th month

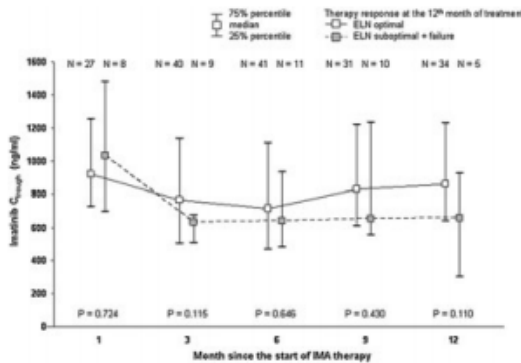
We analysed the differences in IMA C<sub>trough</sub> measured during the entire first year of IMA therapy in patients with and without optimal therapy outcome at the 12th and 18th month of IMA treatment. Similar to our previous findings, there were no significant differences in the medians of IMA C<sub>trough</sub> measured at the 3rd, 6th, 9th and 12th month of therapy between patients with and without optimal outcome evaluated at the abovementioned time points (Figures 2 and 3). This was not influenced by a possible dose change during therapy, as similar findings were observed when the same analysis was

performed only for patients with permanent IMA 400 mg/day dosing (Figures S1 and S2).

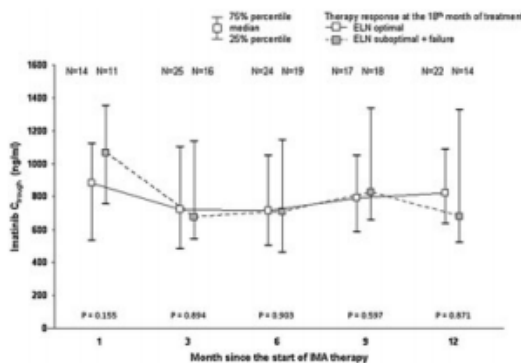
#### Analysis of intracellular imatinib concentrations measured at the first month of imatinib therapy and their association with treatment outcome at the 6th and 12th month

Twenty-six patients with newly diagnosed chronic phase had the IMA C<sub>intrac</sub> measured at the first month after initiation of treatment. All but three patients received IMA 400 mg/day once at the time of measurement (one patient received 600 mg/day, and two patients received 300 mg/day, respectively). The median measured IMA C<sub>intrac</sub> was 0.903 ng/10<sup>6</sup> cells (range: 0.290–3.150). The corresponding median of the IMA C<sub>trough</sub> was 852.0 ng/ml (range: 333.0–2777.0). We found a correlation between IMA C<sub>intrac</sub> and IMA C<sub>trough</sub> ( $rS=0.72$ ;  $p<0.001$ ) (Figure 4).

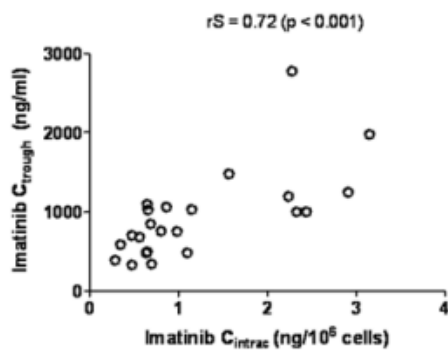
We did not identify the differences in IMA C<sub>intrac</sub> measured at the first month of IMA therapy between patients with and without optimal treatment outcome (according to ELN criteria) at the 6th ( $p=0.273$ ) and 12th month ( $p=0.193$ ) of IMA therapy. The outcome at the 18th month of therapy was not evaluated because of a low number of evaluable patients.



**Figure 2.** Differences in medians of measured imatinib trough plasma concentrations (IMA C<sub>trough</sub>) during the first year of imatinib therapy between patients with and without an optimal treatment outcome at the 12th month of therapy



**Figure 3.** Differences in medians of measured imatinib trough plasma concentrations (IMA C<sub>trough</sub>) during the first year of imatinib therapy between patients with and without an optimal treatment outcome at the 18th month of therapy



**Figure 4.** Correlation between intracellular (IMA C<sub>intrac</sub>) and plasma (IMA C<sub>trough</sub>) imatinib concentrations simultaneously measured at the first month of imatinib therapy

**Discussion**

Our multicentre analysis of the large population of CML patients did not find evidence for routine imatinib therapeutic drug monitoring in daily clinical practice. It has been recently shown that there may be a threshold for optimal and non-optimal responses to IMA in CML patients with an IMA C<sub>trough</sub> of 1000 ng/ml [2–4,6,7,9]. However, in studies where information about the distribution of measured IMA C<sub>trough</sub> is available, more than half of the samples had an IMA C<sub>trough</sub> below this threshold [4,9]. This does not correspond with the relatively low percentage of patients with non-optimal treatment response to IMA on the basis of the clinical studies as well as the data from real life practice [1,16]. The explanation for this discrepancy could be due to many factors affecting IMA concentration in the plasma compartment at the time of sampling, which may not correlate with the tissue distribution of this drug.

In our homogenous study, population of patients receiving IMA 400 mg/day actual AGP (as major IMA binding protein) concentration was identified as a factor affecting measured IMA C<sub>trough</sub>. This supports published data [13], and therefore, the true measured total IMA C<sub>trough</sub> must be correlated in every individual patient with an actual AGP concentration to deduce the actual free concentration of IMA responsible for final cellular disposition of the drug [13]. Note that the AGP plasma concentration could change during the time, which would affect the measured IMA C<sub>trough</sub> results as well as the pharmacokinetic distribution of the drug. For example, a higher AGP concentration, which is frequently detected during active malignant disease, could temporarily increase the measured total IMA C<sub>trough</sub> [17]. Therefore, in studies performing early IMA C<sub>trough</sub> assessment after the first month of IMA therapy, a higher AGP concentration could artificially increase the measured IMA C<sub>trough</sub> and subsequently modify the study results.

Besides AGP, we and others also found daily IMA dose and being a female as less important additional factors affecting the IMA C<sub>trough</sub> [9,13]. Taken together, the previously mentioned factors and their combination result in high intra-patient variability of the IMA C<sub>trough</sub>, which

Moreover, the very important factor that could influence treatment decisions guided by a single IMA C<sub>trough</sub> is the time point of sample collection. In our subset of patients with *de novo* CML who were permanently treated with IMA 400 mg/day and who were monitored during the first years of therapy, we found a spontaneous and a significant increase in the measured IMA C<sub>trough</sub> between the sixth and ninth month of treatment following its initial decline (Figure 1). Therefore, sampling performed during this later period could lead to substantially different results and thus to a different treatment decision compared with the studies using early IMA C<sub>trough</sub> assessment (e.g. Larson *et al.* [4]). Note that a similar study was also performed by Guillot

et al. who analysed IMA  $C_{\text{trough}}$  over the first year of therapy. In contrast to our results, they did not find substantial changes over the monitoring time [7]; however, in this particular study, IMA dose modification was allowed. Finally, it must also be highlighted that different studies correlating IMA  $C_{\text{trough}}$  with treatment outcome have used considerably different definitions for therapy response [3,7,9], which often do not reflect common criteria used in clinical practice [14].

Substantial heterogeneity arises from all of the previously mentioned factors, and thus, it is difficult to accept the hypothesis of predicting treatment outcome on the basis of single IMA  $C_{\text{trough}}$  measurements assessed in a heterogeneous patient population. Our study confirmed this assumption, as we did not find a correlation between IMA  $C_{\text{trough}}$  obtained at a defined time point (after the first month of IMA therapy) and treatment outcome based on the ELN criteria used in clinical practice [complete cytogenetic response (CCyR) at the 12th month and major molecular response at the 18th month of therapy]. Thus, we could not confirm the results of the two larger studies by Guilhot et al. and Larson et al., which were only comparable to our analysis [4,7]. The possible impact of dose modification (that was allowed in both of the mentioned studies) on our findings was excluded by the subanalysis on patients receiving permanent 400 mg/day dosing, which also confirmed the lack of a correlation between IMA  $C_{\text{trough}}$  and the treatment outcome. Moreover, the study by Guilhot et al. does not provide data on molecular response at the 18th month, and the study by Larson et al. only provides data on the cumulative incidence of cytogenetics as well as molecular events. Thus, our data support the results from a limited number of studies that also did not find any predictive value of IMA  $C_{\text{trough}}$  measurement [10–12]. In addition, our results from the first month analysis were strongly supported by additional regular three-month measurements of IMA  $C_{\text{trough}}$  during the first year of CML therapy, which also did not identify any difference in IMA  $C_{\text{trough}}$  at every time point between patients with and without an optimal therapy response based on ELN criteria.

The present study also assessed the IMA  $C_{\text{intrac}}$  performed at the same time point as IMA  $C_{\text{trough}}$  — after the first month of IMA therapy. Similarly to Widmer et al. [13], we found a correlation between IMA  $C_{\text{intrac}}$  and IMA  $C_{\text{trough}}$ ; and therefore, it is not surprising that IMA  $C_{\text{intrac}}$  (similarly to IMA  $C_{\text{trough}}$ ) does not predict treatment outcome.

Very recently, Zhong et al. published an analysis that proved significantly higher IMA  $C_{\text{intrac}}$  measured in bone marrow cells in patients with a CCyR compared with those without a CCyR [8,13]. However, this bone marrow IMA  $C_{\text{intrac}}$  did not correlate with plasma IMA  $C_{\text{trough}}$ . Although bone marrow cells are the desired target compartment for IMA, this approach seems to be more adequate than measuring plasma IMA  $C_{\text{trough}}$  and peripheral blood IMA  $C_{\text{intrac}}$ . Therefore, the lack of a correlation between measured IMA concentrations and the treatment outcome found in our study as well as others could also be explained by the assessment of

IMA concentrations in inadequate compartments, such as plasma or peripheral blood cells.

In conclusion, our data obtained from real life clinical practice did not find a benefit of routine regular IMA  $C_{\text{trough}}$  therapeutic drug monitoring in CML patients or for subsequent adjustments of the IMA dose on the basis of these results. We believe that IMA  $C_{\text{trough}}$  measurement should be part of an armamentarium for the clinical decisions in daily routine practice only in patients who do not achieve the expected response, those with severe adverse events or in cases where a lack of compliance is suspected. Furthermore, on the basis of our study as well as previously published results, if laborious assessment of IMA  $C_{\text{intrac}}$  is performed, then it should focus on the bone marrow compartment rather than on peripheral blood leukocytes, where it lacks correlation with treatment outcome.

### Conflict of interest

Z.R., D.Z., H.K., J.V., P.B. received travel grants from Novartis and BMS and serve on a speakers bureau for Novartis and BMS; F.R. received travel grants from Novartis and BMS; JM received research and travel grants from Novartis and BMS and serves on a speakers bureau for Novartis and BMS; K.M.P. received research grants from Novartis, BMS, Roche, travel grants from Novartis and BMS and serves on a speakers bureau for Novartis and BMS; all other authors declare no competing financial interests.

### Acknowledgements

This work was supported by the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL), by the Central European Institute of Technology (CEITEC) — CZ.1.05/1.1.00/02.0068 and Ministry of Health of the Czech Republic (MH CZ-DRO) (FNBr, 65269705).

### References

- Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; **23**: 1054–1061.
- Takahashi N, Miura M. Therapeutic drug monitoring of imatinib for chronic myeloid leukemia patients in the chronic phase. *Pharmacology* 2011; **87**: 241–248.
- Picard S, Titier K, Etienne G, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; **109**: 3496–3499.
- Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008; **111**: 4022–4028.
- Singh N, Kumar L, Meena R, Velpandian T. Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukaemia: comparing plasma levels of responders and non-responders. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; **65**: 545–549.
- Sohn SK, Oh SJ, Kim BS, et al. Trough plasma imatinib levels are correlated with optimal cytogenetic responses at

- 6 months after treatment with standard dose of imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011; **52**: 1024–1029.
7. Guilhot F, Hughes TP, Cortes J, *et al.* Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity trial. *Haematologica* 2012; **97**: 731–738.
  8. Zhong JS, Meng FY, Xu D, Zhou HS, Dai M. Correlation between imatinib trough concentration and efficacy in Chinese chronic myelocytic leukemia patients. *Acta Haematol* 2012; **127**: 221–227.
  9. Bouchet S, Titier K, Moore N, *et al.* Therapeutic drug monitoring of imatinib in chronic myeloid leukemia: experience from 1216 patients at a centralized laboratory. *Fundam Clin Pharmacol* 2012. DOI: 10.1111/fcp.12007. [Epub ahead of print].
  10. Forrest DL, Trainor S, Brinkman RR, *et al.* Cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia are correlated with Sokal risk scores and duration of therapy but not trough imatinib plasma levels. *Leuk Res* 2009; **33**: 271–275.
  11. Yoshida C, Komeno T, Hori M, *et al.* Adherence to the standard dose of imatinib, rather than dose adjustment based on its plasma concentration, is critical to achieve a deep molecular response in patients with chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2011; **93**: 618–623.
  12. Faber E, Friedecky D, Micova K, *et al.* Imatinib trough plasma levels do not correlate with the response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia in routine clinical setting. *Ann Hematol* 2012; **91**: 923–929.
  13. Widmer N, Decosterd LA, Csajka C, *et al.* Population pharmacokinetics of imatinib and the role of alpha-acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol* 2006; **62**: 97–112.
  14. Baccarani M, Cortes J, Pane F, *et al.* Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 6041–6051.
  15. Wang Y, Chia YL, Nedelman J, Schran H, Mahon FX, Molimard M. A therapeutic drug monitoring algorithm for refining the imatinib trough level obtained at different sampling times. *Ther Drug Monit* 2009; **31**: 579–584.
  16. Zackova D, Klamova H, Dusek L, *et al.* Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: can we compare real life data to the results from clinical trials? *Am J Hematol* 2011; **86**: 318–321.
  17. Huang Z. Effect of alpha-1-acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Curr Drug Metab* 2013; **14**: 226–238.

#### 5.7.4. Příloha 15

Romzova M., Smitalova D, Tom N., Jurcek T., Culen M., Zackova D., Mayer J., Racil Z. Novel Illumina-based next generation sequencing approach with one-round amplification provides early and reliable detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*. 2020;189(3):469-474.





IF = 5,518 v 2019/2020; HEMATOLOGY Q1

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Práce představující jedno-běhový amplifikační protokol sekvenování příští generace (NGS) na platformě Illumina, který nabízí robustní a efektivní časnou detekci mutací *BCR-ABL1* kinázové domény (KD) s únosným detekčním limitem 3 % *variant allele frequency* (VAF)
- Metodou NGS bylo umožněno časně detekovat mutace *BCR-ABL1* KD u 8 z 11 testovaných pacientů (73 %), přičemž u 4 z 11 (36 %) dokonce pod limitem 3 % VAF
- Průměrný rozdíl mezi detekcí pomocí NGS a Sangerovy metody byl 14 měsíců (rozmezí: 1-33 měsíců) a mutace u 50 % pacientů při selhání terapie byly detekovány pomocí NGS o 2 roky dříve než Sangerovou sekvenační metodou
- Představený NGS protokol na platformě Illumina je robustním a efektivním nástrojem k detekci mutací v celém *BCR-ABL1* regionu a lze ho doporučit pro užití do standardní klinické praxe



## Novel Illumina-based next generation sequencing approach with one-round amplification provides early and reliable detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia

Marianna Romzova,<sup>1,2</sup>   
 Dagmar Smitalova,<sup>1,3</sup>   
 Tomáš Jurček,<sup>3,4</sup>   
 Daniela Zacková,<sup>4</sup>   
 Jiri Mayer<sup>1,3,4</sup> and  
 Zdeněk Ráčil<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine, Central European Institute of Technology, Masaryk University, <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, <sup>3</sup>Department of Internal medicine, Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University and <sup>4</sup>Internal Hematology and Oncology Clinic, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

Received 30 July 2019; accepted for publication 16 October 2019

Correspondence: Marianna Romzova, Department of Molecular Medicine, Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 753/5, building A35, 625 00 Brno, Czech Republic.  
 E-mail: marianna.romzova@ceitec.muni.cz

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) significantly improve management of chronic myeloid leukaemia (CML). The ability of TKIs to bind directly to the kinase domain (KD) of the Bcr-Abl1 oncoprotein causes eradication of leukaemic cells (Deininger *et al.*, 1997). Nevertheless, the occurrence of mutations in TKI binding sites can lead to treatment resistance (Hochhaus *et al.*, 2002). Sanger sequencing (Sanger) remains the golden standard for BCR-ABL1 KD mutation detection, with a sensitivity limit of ~20% variant allele frequency (VAF). Next-generation sequencing (NGS) as an alternative method can provide enhanced sensitivity and earlier mutation detection. The NGS platform used most frequently for BCR-ABL1 KD sequencing is 454 from Roche (Basel, Switzerland) (Machova Polakova *et al.*, 2015; Baer *et al.*, 2016; Soverini *et al.*, 2016; Erbilgin *et al.*, 2019). The use of Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) technology and the widely implemented Illumina (San Diego, CA, USA) platform has

### Summary

The occurrence of mutations in the BCR-ABL1 kinase domain (KD) can lead to treatment resistance in chronic myeloid leukaemia patients. Nowadays, next-generation sequencing (NGS) is an alternative method for the detection of kinase domain mutations, compared to routinely used Sanger sequencing, providing a higher sensitivity of mutation detection. However, in the protocols established so far multiple rounds of amplification limit reliable mutation detection to approximately 5% variant allele frequency. Here, we present a simplified, one-round amplification NGS protocol for the Illumina platform, which offers a robust early detection of BCR-ABL1 KD mutations with a reliable detection limit of 3% variant allele frequency.

**Keywords:** next generation sequencing, illumina, BCR-ABL1, kinase domain mutation, TKI resistance.

been reported by fewer authors to date (Eyal *et al.*, 2013; Deininger *et al.*, 2016; Kizilors *et al.*, 2019). The majority of NGS protocols for BCR-ABL1 sequencing on these platforms employ a semi-nested/nested polymerase chain reaction (PCR), or amplification of multiple overlying amplicons spanning across the whole KD region. Multiple rounds of amplification can however lead to multiplication of PCR-mediated errors, limiting reliable mutation detection to approximately 5% VAF (Soverini *et al.*, 2013; Potapov & Ong, 2017).

The aim of this study was to establish a highly sensitive protocol for BCR-ABL1 KD sequencing on the Illumina NGS platform using one round of amplification, suitable for clinical practice.

### Materials and methods

Eleven CML patients treated at the University Hospital Brno were selected for this study. Patients were chosen based on

## Short Report

positivity for *BCR-ABL1* KD mutations, which were detected by routine Sanger. The characteristics of these patients are summarized in Table S1. In total, 31 samples were obtained as follows: 16 samples collected at the time of mutation detection (Sanger-positive), eight samples obtained before mutation detection (Sanger-negative), and seven samples collected at the time of CML diagnosis (Dx). In addition six samples collected from healthy volunteers were used as negative controls. Informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by an institutional ethical committee in agreement with the Declaration of Helsinki. The sample processing and storage, as performed routinely by diagnostic laboratories, are described in Data S1. Sequencing of a complementary DNA (cDNA) region corresponding to *BCR-ABL1* KD using Sanger was performed in all CML samples as previously described (Poláková *et al.*, 2010), using primers listed in Data S1, Table SII. Illumina-based NGS sequencing and data analysis using an in-house bioinformatics pipeline were performed in CML samples and healthy controls according to the workflow described in Data S1, Figure S1.

## Results

Next-generation sequencing analysis of six healthy controls revealed only low-level single-nucleotide variants (SNVs), most likely attributable to reverse transcription (RT) or PCR enzyme-induced errors ( $n = 21$ ; VAF max = 0.27%; coverage from 3 920 to 38 509).

In 16 clinical samples (Sanger-positive) from 11 CML patients, NGS analysis confirmed the presence of all KD mutations previously detected by Sanger (20/20), and the VAFs (>18%) assessed by the two methods showed high correlation ( $R^2 = 0.945$ ; Fig 1A). However, NGS also identified the presence of KD mutations below the Sanger detection limit in these samples, and also in eight clinical samples preceding Sanger detection (Sanger-negative). Mutations below the Sanger detection limit were additionally verified in replicates or in later follow-up samples as described below. Finally, NGS analysis detected two KD mutations (F359I: 0.95% VAF; T315I: 0.54% VAF) in two out of seven diagnostic (Dx) samples. Both mutations were also detected at high levels in Sanger-positive samples from the same patients. The complete mutation profiles of the tested CML patients are summarized in Fig 2 and Figure S2.

NGS analysis performed on clinical samples (four independent runs) was set to trace the mutations down to 0.1% VAF. However, at low VAF levels a considerable amount of background SNVs was observed alongside these mutations. To establish a reliable detection limit for our protocol, we tested the specificity and variability of mutation detection between independent measurements. We calculated the percentage of confirmed mutations among all SNVs detected across clinical samples at VAF levels below the Sanger detection limit (Fig 1B; Table SIII). A specificity of 100% was observed at VAF levels above 3%, where all detected SNVs

represented confirmed mutations. Further assessment of the detection limit was performed by repeated sequencing of 10/31 clinical samples. Samples were selected based on *BCR-ABL1* transcript levels (high: 98%; low: 1%) and presence of mutations with VAF above and below the Sanger detection limit (18% VAF). The samples were sequenced repeatedly from the same cDNA as well as newly transcribed cDNA.

The mutations above the Sanger detection limit were detected in all tested replicates with no background (100% sensitivity and specificity) independently of *BCR-ABL1* transcript levels (1–98%). Below the Sanger detection limit, reliable detection was observed down to 3% VAF (100% specificity and sensitivity). Detection of mutations below 3% VAF showed sensitivity below 94% and specificity below 67%. Data are summarized in Fig 1 and Table SIII. Mutations below 3% VAF which could not be verified originated from the clinical samples with low *BCR-ABL1* transcript levels (1–5%), from the blast crisis and diagnostic samples. Nevertheless, there was no overall correlation between *BCR-ABL1* transcript levels and the rate of background variants in clinical samples (Figure S3).

Due to the variability in clinical samples, we performed additional NGS validation on T315I and F317L mutations dilution series and *BCR-ABL1* dilution series (described in Data S1). Like in the clinical samples, 100% detection sensitivity was observed down to 3% VAF level. Below this level (1% and 0.3% mutation dilutions), the sensitivity was decreased to 75% (3/4 replicates). Variability in measured VAFs between replicates was not affected by mutation dilution; rather, it was introduced by RT or sequencing (26% of total variation,  $P = 0.04$ ) (Figure S4A; Table SIVA). Detection of T315I and F317L mutations at 3% VAF dilution was however limited by *BCR-ABL1* transcript levels. While in samples with 45% of *BCR-ABL1*, we detected both mutations in all replicates, in samples containing 1% or less *BCR-ABL1* transcript, detection sensitivity was 50% or less, with significantly high discordance of measured VAFs (Figure S4B; Table SIVB), probably due to the overall high dilution of the mutant allele to  $3 \times 10^{-4}$  in the sample.

Of note, to estimate the effect of different post-PCR NGS workflows on the detection limit, we tested alternative library preparation kits, which employ enzymatic DNA or PCR product fragmentation: 2S Turbo DNA Library Kit (Swift Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) and Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). *BCR-ABL1* dilution series (5%–0.5% *BCR-ABL1*), prepared as described in Data S1, Figure S4, was used to compare various methods of fragmentation and its effect on VAF detection. Mechanical shearing with AFA Fiber microtubes (Covaris, Woburn, MA, USA) (used in our protocol) rendered the most robust method, showing the smallest variability between replicate measurements and the highest sensitivity (Data S1, Figure S5).

Overall, NGS provided earlier detection of *BCR-ABL1* KD mutations in 8/11 (73%) tested CML patients, in 4/11 (36%) patients even below 3% VAF. The average difference between NGS and Sanger detection was 14 months (min–max: 1–33 months). Except for two mutations already detected at

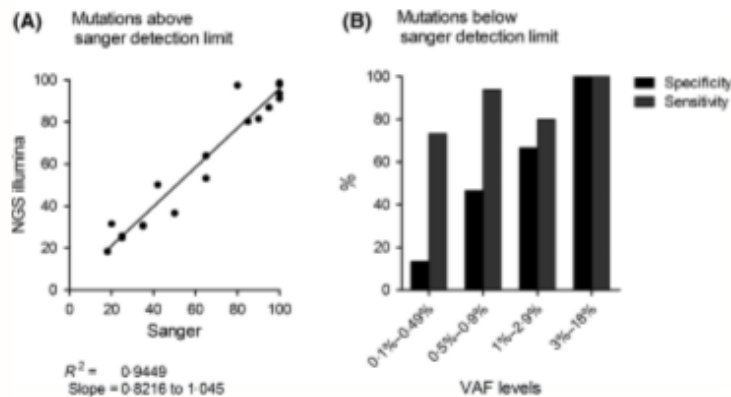


Fig 1. An overview of mutations detected by NGS at different VAF levels. (A) The graph shows the high correlation between VAF levels determined by Sanger and NGS sequencing, as indicated by  $R^2$  and slope (95% confidence interval). (B) The graph shows specificity and sensitivity of Illumina-based NGS analysis. The percentage of confirmed mutations among all SNVs detected across clinical samples at VAF levels below Sanger detection limit is shown by black bars. The detection sensitivity among various replicates of reverse transcription and sequencing runs is shown by grey bars. The specificity and sensitivity of 100% were observed at VAF levels above 3%.

diagnosis in 2/7 (28%) patients, the remaining mutations were captured during earlier follow-up. At these time points, patients had already fulfilled criteria for warning or failure according to the European Leukemia Net 2013 recommendations (Baccarani *et al.*, 2013). In addition, in 4/11 (36%) patients, NGS identified seven mutations below the Sanger detection limit that reoccurred in several consecutive follow-up samples. Of these, only one mutation later reached the VAF threshold of 3% (F359C: 6.3% VAF).

## Discussion

Distinguishing background SNVs from low-level mutations represents a major concern for NGS data analysis. This is especially important for *BCR-ABL1* KD mutation monitoring, regardless of sequencing platform, due to transcript amplification (Potapov & Ong, 2017). For this reason, previous studies, which used the Roche NGS platform, suggested setting the VAF limit between 1% and 5% (Machova Polakova *et al.*, 2015; Soverini *et al.*, 2016; Erbilgin *et al.*, 2019). In our study, we adopted Q5 polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) for amplification of *BCR-ABL1* KD, which is currently the most accurate PCR polymerase (280 times more accurate than "reference" *Taq* polymerase) (Potapov & Ong, 2017). In addition, we implemented high-fidelity AccuScript (Agilent, Santa Clara, CA, USA) in a reverse transcription step, reported to be up to four to seven times more accurate than previously used RT enzymes (Arezi & Hogrefe, 2007). Employment of the above-mentioned high-fidelity enzymes together with only one round of PCR amplification and mechanical PCR product fragmentation using AFA Fiber microtubes, has led to detection of no background SNVs at VAF levels above 3%. Validation on dilution series also confirmed reliable and sensitive mutation detection above 3% VAF, which we consequently set

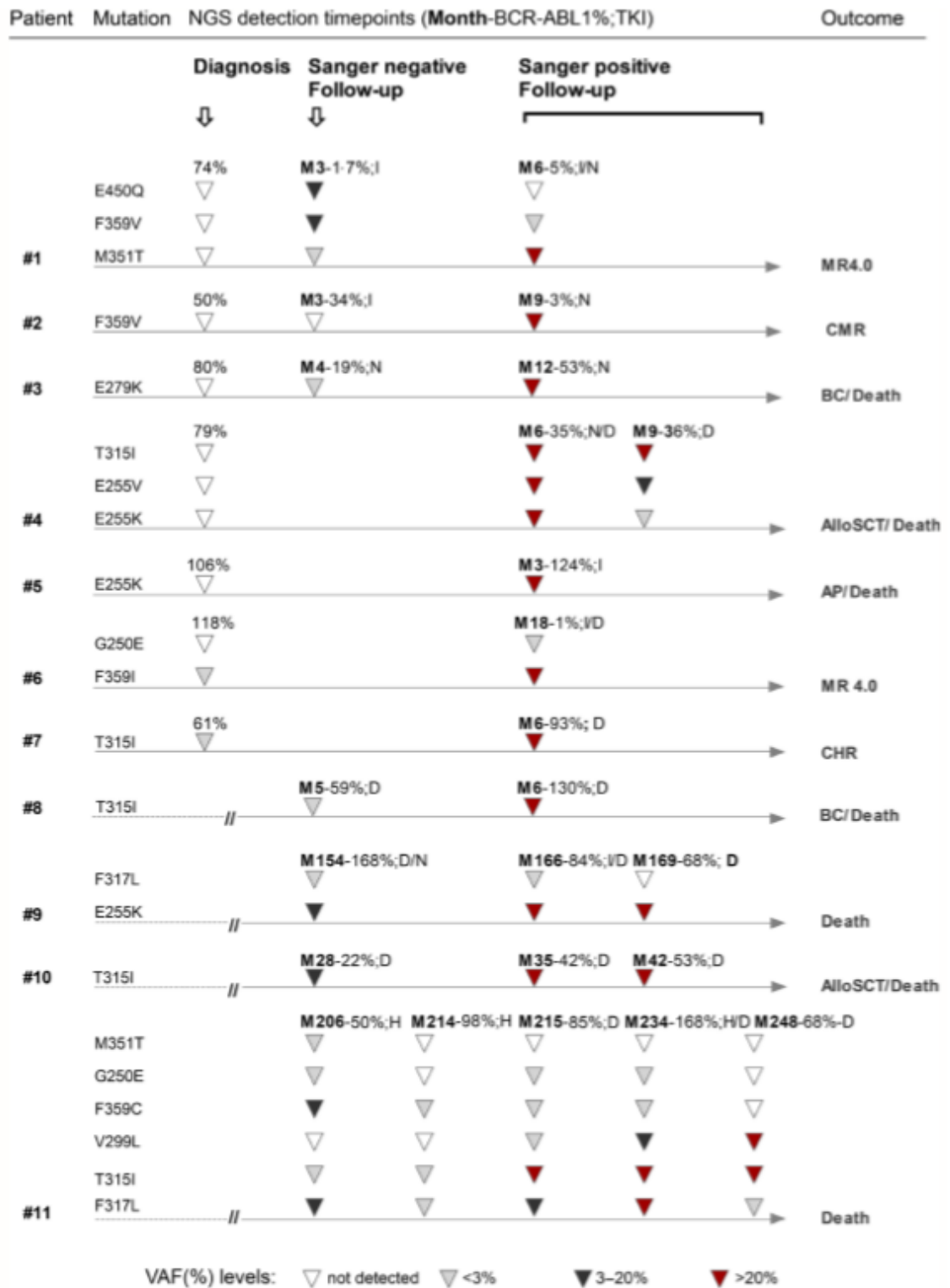
as the clinically relevant threshold. Using the 3% VAF threshold may also prevent SNV misidentification due to other potential technical issues, including sequencing index contaminations, low coverage, or diverse RNA quality of clinical samples that could occur if NGS were implemented into routine diagnostics.

Our Illumina-based NGS protocol still provided sensitive detection of low-level mutations (below 3% VAF), but required replicate measurements for their confirmation. More importantly, clinical relevance of such low-level mutations may vary, as suggested by others (Soverini *et al.*, 2013; Kizilors *et al.*, 2019). Therefore, in clinical testing, low-level mutations should mainly be verified in the next or an additional follow-up sample before making a therapeutic decision.

In comparison to other described Illumina-based NGS protocols (Eyal *et al.*, 2013; Kizilors *et al.*, 2019), we decided to implement mechanical shearing of one long PCR product in our NGS workflow, to ensure the most homogenous amplicon fragmentation and to reduce fragment loss which may occur while using alternative enzymatic digestion. Despite that enzymatic digestion is slightly more time- (1–3 h shorter) and cost-effective, we showed that it directly affects the sensitivity and reproducibility of mutation detection, especially at low VAF and *BCR-ABL1* transcript levels. Of note, even higher sensitivity could be achieved with duplex sequencing; however, this method requires DNA as input material and might be less time/cost-effective, since there are no commercially available kits so far (Schmitt *et al.*, 2015).

In conclusion, our Illumina-based NGS protocol provides a robust and effective mutation analysis of a whole *BCR-ABL1* KD region that could be used in standard clinical practice. Using a 3% VAF cut-off in this protocol provided more than two years of earlier detection of *BCR-ABL1* KD mutations in 50% of the CML patients in treatment failure, in comparison to routinely used Sanger sequencing.

Short Report



**Fig 2.** Overview of mutations retrospectively detected by Illumina-based NGS protocol in 11 CML patients. The figure shows mutation profiles of 11 CML patients detected in retrospectively selected samples from diagnosis and follow-up. Samples at diagnosis were collected prior to treatment administration, and the numbers above triangles indicate only *BCR-ABL1* ratios. In follow-up samples, the numbers above triangles indicate month of the follow-up, *BCR-ABL1* ratio, and treatment at the time of sampling. Empty triangles indicate samples with no detected mutations, light grey triangles indicate mutations detected at VAF <3%, dark grey triangles represent mutations at 3–20% VAF levels, and red triangles indicate mutations detected by both NGS and Sanger. *BCR-ABL1* %, *BCR-ABL1* to *ABL1* ratio %; TKI, tyrosine kinase inhibitors; I, imatinib; N, nilotinib; D, dasatinib; H, hydroxyurea; X/Y, switch of tyrosine kinase inhibitor X to Y; NGS, next generation sequencing; Sanger, Sanger sequencing; VAF, variant allele frequency; M, month of follow-up; CHR, complete hematologic response; BC, blast crisis; AP, accelerate phase; MR, molecular response, CMR, complete molecular response; AlloSCT, stem cell transplantation. [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### Author contributions

MR performed the study design, did the analyses and wrote the manuscript, DS performed NGS analyses, NT established the bioinformatics pipeline and performed mutation calling, TJ performed routine *BCR-ABL1* screening and Sanger sequencing, JM and DZ provided clinical information and consulting, and MC and ZR co-authored the study design and granted clinical consulting.

### Funding

This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, Grant No. 17-30397A.

### Conflicts of interest

MR, DS, NT, TJ, MC, JM, and ZR have no competing interests. DZ serves as a consultant for Novartis and Bristol-Myers Squibb.

### Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Data S1.** Supplementary data.

**Table S1.** Characteristics of CML patients.

**Table S2.** Primer sequences.

**Table S3.** Summary of NGS validation in clinical samples.

**Table S4.** Sources of variability in NGS workflow tested on dilution series.

**Fig S1.** Flowchart of in-house bioinformatics pipeline.

**Fig S2.** Mutational profile of CML patient 11 determined by NGS and Sanger.

**Fig S3.** Correlation of *BCR-ABL1* transcript levels with percentage of background SNVs.

**Fig S4.** Validation of NGS in dilution series.

**Fig S5.** Effect of various methods of fragmentation on VAF detection in samples with low *BCR-ABL1* transcript levels.

### References

- Azezi, B. & Hogrefe, H.H. (2007) *Escherichia coli* DNA polymerase III  $\epsilon$  subunit increases Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase fidelity and accuracy of RT-PCR procedures. *Analytical Biochemistry*, **360**, 84–91.
- Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T.P., Kantarjian, H.M., Kim, D., Larson, R.A., Lipton, J.H., Martinelli, G., Mayer, J., Martin, G.M., Steegmann, J., Goldman, J.M. & Hehlmann, R. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, **122**, 872–884.
- Baer, C., Kern, W., Koch, S., Nadarajah, N., Schindela, S., Megendorfer, M., Haferlach, C. & Haferlach, T. (2016) Ultra-deep sequencing leads to earlier and more sensitive detection of the tyrosine kinase inhibitor resistance mutation T315I in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, **101**, 830–838.
- Deininger, M.W.N., Goldman, J.M., Lydon, N. & Melo, J.V. (1997) The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of *BCR-ABL*-positive cells. *Blood*, **90**, 3691–3698.
- Deininger, M.W., Hodgson, J.G., Shah, N.P., Cortes, J.E., Kim, D.W., Nicolini, F.E., Talpaz, M., Baccarani, M., Müller, M.C., Li, J., Parker, W.T., Lustgarten, S., Clackson, T., Haluska, F.G., Guilhot, F., Kantarjian, H.M., Soverini, S., Hochhaus, A., Hughes, T.P., Rivera, V.M. & Branford, S. (2016) Compound mutations in *BCR-ABL1* are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP-CML patients. *Blood*, **127**, 703–712.
- Erbilgin, Y., Eskazan, A.E., Hatirnaz Ng, O., Salihoglu, A., Elverdi, T., Firtina, S., Tasar, O., Merican, S., Sisko, S., Khodzhaev, K., Ongoren, S., Ar, M.C., Baslar, Z., Soysal, T., Sayitoglu, M. & Ozbek, U. (2019) Deep sequencing of *BCR-ABL1* kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia patients with resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*, **60**, 200–207.
- Eyal, E., Tohami, T., Amir, A., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Volchek, Y., Nagler, A., Rechavi, G. & Amariglio, N. (2013) Detection of *BCR-ABL1* mutations in chronic myeloid leukaemia by massive parallel sequencing. *British Journal of Haematology*, **160**, 477–486.
- Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A.S., La Rosée, P., Müller, M.C., Lahaye, T., Hanfstein, B., Schoch, C., Cross, N.C.P., Berger, U., Gachaidmeier, H., Druker, B.J. & Hehlmann, R. (2002) Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*, **16**, 2190–2196.
- Kizilors, A., Crisà, E., Lea, N., Passera, R., Mian, S., Anwar, J., Best, S., Nicolini, F.E., Ireland, R., Aklouri, M., Pocock, C., Corbett, T., Gale, R., Bart-Smith, E., Weston-Smith, S., Wykes, C., Kulasekararaj, A., Jackson, S., Harrington, P., McLornan, D., Raj, K., Pagliuca, A., Muftic, G.J. & de Lavallade, H. (2019) Effect of low-level *BCR-ABL1* kinase domain mutations identified by next-generation sequencing in patients with chronic myeloid leukaemia: a population-based study. *The Lancet Haematology*, **6**, e276–e284.
- Machova Polakova, K., Kubvat, V., Benesova, A., Linhartova, J., Klamova, H., Jarskova, M., de Benedittis, C., Haferlach, T., Baccarani, M., Martinelli, G., Stopka, T., Ernst, T., Hochhaus, A., Kohlmann, A. & Soverini, S. (2015) Next-generation deep sequencing improves detection of *BCR-ABL1* kinase domain mutations emerging under tyrosine kinase inhibitor treatment of chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **141**, 887–899.

## Short Report

- Poláková, K.M., Polvková, V., Rulcová, J., Klamová, H., Jurček, T., Dvořáková, D., Žáčková, D., Pospíšil, Z., Mayer, J. & Moravcová, J. (2010) Constant BCR-ABL transcript level  $\geq 0.1\%$  (IS) in patients with CML responding to imatinib with complete cytogenetic remission may indicate mutation analysis. *Experimental Hematology*, **38**, 20–26.
- Potapov, V. & Ong, J.L. (2017) Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PLoS ONE*, **12**, e0169774.
- Schmitt, M.W., Fox, E.J., Prindle, M.J., Reid-Bayliss, K.S., True, L.D., Radich, J.P. & Loeb, L.A. (2015) Sequencing small genomic targets with high efficiency and extreme accuracy. *Nature Methods*, **12**, 423–425.
- Soverini, S., De Benedittis, C., Polakova, K.M., Brouckova, A., Horner, D., Iacono, M., Castagnetti, F., Gugliotta, G., Palandri, F., Papayannidis, C., Iacobucci, I., Venturi, C., Bochicchio, M.T., Klamova, H., Cattina, F., Russo, D., Bressiani, P., Binotto, G., Giannini, B., Kohlmann, A., Haferlach, T., Roller, A., Rosti, G., Cavo, M., Baccarani, M. & Martinelli, G. (2013) Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain. *Blood*, **122**, 1634–1648.
- Soverini, S., De Benedittis, C., Polakova, K.M., Linhartova, J., Castagnetti, F., Gugliotta, G., Papayannidis, C., Mancini, M., Klamova, H., Salvucci, M., Crugnola, M., Iurlo, A., Albano, F., Russo, D., Rosti, G., Cavo, M., Baccarani, M. & Martinelli, G. (2016) Next-generation sequencing for sensitive detection of BCR-ABL1 mutations relevant to tyrosine kinase inhibitor choice in imatinib-resistant patients. *Oncotarget*, **7**, 21982–21990.

### 5.7.5. Příloha 16

Culen M, Borsky M, Nemethova V, Razga F, Smejkal J, Jurcek T, Dvorakova D, Zackova D, Weinbergerova B, Semerad L, Sadovnik I, Eisenwort G, Herrmann H, Valent P, Mayer J, Racil Z. Quantitative assessment of the CD26+ leukemic stem cell compartment in chronic myeloid leukemia: patient-subgroups, prognostic impact, and technical aspects. *Oncotarget*. 2016;7(22):33016-33024.

IF = 5,168 v roce 2016; ONCOLOGY Q1; 14 citací ve WOS, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Skupina 31 neselektovaných pacientů s CML byla podrobena flowcytometrické analýze povrchového markeru CD26, popsaného jako vhodného parametru k odlišení LSCs od HSCs
- Podíl CD26+ LSCs a CD26- HSCs varíroval mezi jednotlivými analyzovanými pacienty a podíl CD26+ buněk koreloval s množstvím leukocytů v periferní krvi
- Prokázali jsme také negativní korelaci množství CD26+ LSCs s odpovědí na léčbu TKI, konkrétně s dosažením MMR ve 12. měsíci od zahájení terapie, nikoliv však s odpovědí v 18. měsíci. Rovněž nebyl prokázán vztah mezi podílem CD26+ kmenových buněk a stratifikací pacientů dle rizikových skóre dle Sokala, Hasforda či EUTOS
- Povrchový marker CD26 byl naší analýzou potvrzen jako vhodný prostředek k odlišení LSCs od fyziologických HSCs u neselektovaných pacientů s CML coby základního předpokladu pro další postupy směřující k eradikaci leukemických kmenových buněk a úplnému vyléčení z leukemie

## Quantitative assessment of the CD26+ leukemic stem cell compartment in chronic myeloid leukemia: patient-subgroups, prognostic impact, and technical aspects

Martin Culen<sup>1,\*</sup>, Marek Borsky<sup>1,2,\*</sup>, Veronika Nemethova<sup>2,3</sup>, Filip Razga<sup>2,3</sup>, Jiri Smejkal<sup>2</sup>, Tomas Jurcek<sup>1,2</sup>, Dana Dvorakova<sup>1,2</sup>, Daniela Zackova<sup>1,2</sup>, Barbora Weinbergerova<sup>2</sup>, Lukas Semerad<sup>1,2</sup>, Irina Sadovnik<sup>4</sup>, Gregor Eisenwort<sup>4,5</sup>, Harald Herrmann<sup>4,5</sup>, Peter Valent<sup>4,5</sup>, Jiri Mayer<sup>1,2,6</sup>, Zdenek Racil<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Polymer Institute of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

<sup>4</sup>Department of Internal Medicine I, Division of Haematology and Hemostaseology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

<sup>5</sup>Ludwig Boltzmann Cluster Oncology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

<sup>6</sup>Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno, Czech Republic

\*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Zdenek Racil, email: zracil@fnbrno.cz

Keywords: CML, LSC, DPPIV/CD26, FISH, FACS

Received: December 17, 2015

Accepted: April 10, 2016

Published: April 29, 2016

### ABSTRACT

Little is known about the function and phenotype of leukemic stem cells (LSCs) in chronic myeloid leukemia (CML) or about specific markers that discriminate LSCs from normal hematopoietic stem cells (HSCs). CD26 has recently been described as a specific marker of CML LSCs. In the current study, we investigated this marker in a cohort of 31 unselected CML patients. *BCR/ABL1* positivity was analyzed in highly enriched stem cell fractions using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and reverse transcription PCR (RT-PCR). The proportion of CD26<sup>+</sup> LSCs and CD26<sup>+</sup> HSCs varied considerably among the patients analyzed, and the percentage of CD26<sup>+</sup> cells correlated with leukocyte count. The CD26 expression robustly discriminated LSCs from HSCs. This required a strict gating of the stem cell compartment. Thus, in patients with very low LSC or HSC numbers, only the highly sensitive RT-PCR method discriminated between clonal and non-clonal cells, while a robust FISH analysis required larger numbers of cells in both compartments. Finally, our data show that the numbers of CD26<sup>+</sup> CML LSCs correlate with responses to treatment with *BCR-ABL1* inhibitors.

### INTRODUCTION

The *BCR-ABL1* oncogene is a driver of initiation and progression in chronic myeloid leukemia (CML) [1]. The tyrosine kinase inhibitors (TKIs) directed against the *BCR-ABL1* oncoprotein have proven to be successful in the treatment of CML. Today, CML patients benefit from long-term responses induced by imatinib and other *BCR-ABL1* TKIs [2, 3]. However, leukemic stem cells (LSCs) often survive TKI therapy and may be responsible for treatment failure and relapse [4, 5]. The LSC resistance to TKIs can result from acquired mechanisms, such as the

selection of subclones with mutations in the *BCR-ABL1* oncogene, or may involve intrinsic mechanisms, such as LSC dormancy [6–8]. Moreover, increasing evidence suggests an important role of the microenvironment in LSC resistance [3, 9].

Current research in CML has focused on the identification and characterization of LSCs. This might enable eradication of LSCs and provide a curative therapy in CML. However, the identification of LSCs and their separation from normal hematopoietic stem cells (HSCs) in CML is challenging, since both populations reside in the same compartment phenotypically defined as

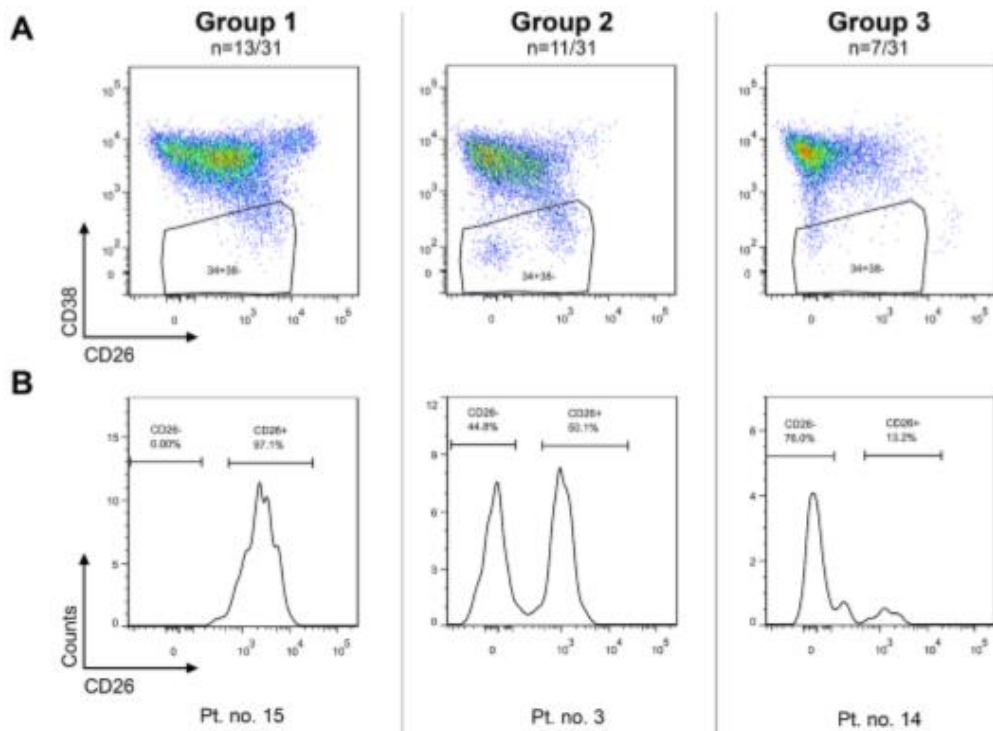


CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> [10]. Recently, several groups have reported on more or less specific LSC markers and LSC-related light scatter properties in CML [10–16]. One of such markers appears to be IL-1RAP, while another is CD26, which is also known as dipeptidylpeptidase IV (DPPIV). This functionally relevant cell surface antigen as well as IL-1RAP is specifically expressed on CML LSCs, but not on HSCs [10]. LSC-specific markers, such as IL-1RAP or CD26, may also represent suitable targets for anti-LSC therapy as well as potential prognostic markers [17]. More recent data suggest that the levels of CD26 on CML LSCs may vary from patient to patient [10, 17]. The aim of this study was to investigate whether CD26<sup>-</sup> LSC and CD26<sup>+</sup> HSC populations can be identified and discriminated from each other in an unselected cohort of patients with *de novo* chronic phase (CP) CML. Specifically, we determined whether these two stem cell (SC) populations exclusively contain clonal or non-clonal cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and reverse transcription PCR (RT-PCR) analysis. Furthermore, we compared the light-scatter properties of CD26<sup>-</sup> and CD26<sup>+</sup> SCs. Finally, we asked whether the numbers of CD26<sup>-</sup> CML LSCs correlate with treatment responses in CML patients of this study.

## RESULTS

### CML patients can be divided into three groups based on the percentage of CD26<sup>+</sup> SCs

The CD26 expression on CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> cells was analyzed using flow cytometry in bone marrow samples of 31 patients. The CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> compartment represents a stem cell-enriched fraction which is known to contain the most primitive blood cells, comprising true stem cells as well as multipotent progenitor cells [18, 19]. In this article, the CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> compartment is simply referred to as the “stem cells (SCs)”. The investigated CD26<sup>-</sup> and CD26<sup>+</sup> SC populations were well identifiable, although they varied in size among patients and were sometimes very small or even missing in some sets of the patients (Figures 1–2). Overall, three patterns of expression of CD26 on SCs were observed and the patients were categorized into 3 groups accordingly: Group 1 was characterized by a dominant CD26<sup>-</sup> SC population, Group 2 by similar ratio of CD26<sup>-</sup> and CD26<sup>+</sup> SCs, and Group 3 by a dominant CD26<sup>+</sup> SC compartment (Table 1).



**Figure 1:** CP CML patients can be categorized into 3 groups based on CD26 expression pattern on CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> SCs. Group 1: dominant CD26<sup>-</sup> SC population; Group 2 – comparable numbers (percentages) of CD26<sup>-</sup> and CD26<sup>+</sup> SC populations; Group 3 – minor population of CD26<sup>-</sup> SCs. The results for one representative patient per group are shown as dot plots (upper series) (A) and corresponding histograms (lower series) (B). Pt. no. – patient number.

**Table 1: Delineation of 3 CML patient groups based on the percentage of CD26<sup>+</sup> SCs**

Group	Patient numbers	% CD26 <sup>+</sup> cells of CD45 <sup>+</sup> 34 <sup>+</sup> 38 <sup>-</sup> SCs	Proportion of SC populations
1	13/31 (42%)	75–100	dominant CD26 <sup>+</sup>
2	11/31 (36%)	25–75	similar ratio of CD26 <sup>+</sup> and CD26 <sup>-</sup>
3	7/31 (22%)	0–25	dominant CD26 <sup>-</sup>

*n* – number of patients, Pt. no. – patient number.

**FISH analysis suggests the presence of LSCs in various SC compartments**

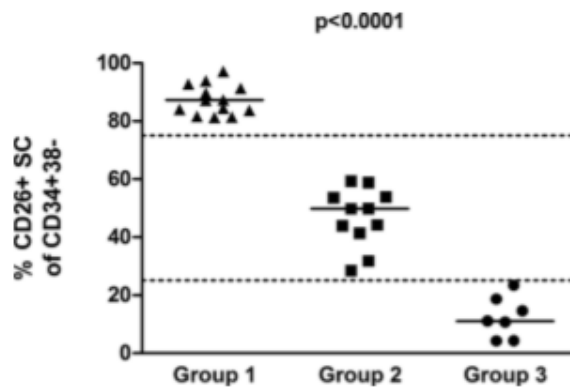
We initially applied FISH analysis in order to confirm the clonal origin of CD26<sup>+</sup> SC population. A fraction of at least 1000 cells obtained by fluorescence-activated cell sorting (FACS) was required to analyze approximately 100 cells by FISH. Due to the general rarity of CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> SCs [median: 1.8 SCs per 10<sup>4</sup> of all analyzed cells; interquartile range (IQR): 1.0–2.9, *n* = 27], it was not possible to obtain the required cell numbers for FISH analysis in cases with very small populations of CD26<sup>+</sup> or CD26<sup>-</sup> SC (Group 3 and 1, respectively). Thus, to analyze most of our patients, we applied broader gates that included the strict CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> SCs [defined by fluorescence minus one (FMO) control] and also a portion of CD38<sup>dim</sup> cells. This yielded CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-dim</sup>26<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-dim</sup>26<sup>-</sup> cell fractions, further addressed as “broader CD26<sup>+</sup> fraction” and “broader CD26<sup>-</sup> fraction”. The CD38<sup>dim</sup> region was expected to carry a mixture of LSCs, normal HSCs as well as more mature precursor cells (CD34<sup>+</sup> progenitor cells). This approach allowed us to perform FISH analysis in 26/31 patients. In 5/31 patients, we were unable to isolate enough cells for FISH analysis.

In all 26 analyzed patients, almost all cells in the broader CD26<sup>+</sup> fractions were *BCR-ABL1*<sup>+</sup> by FISH (median: 99.0%; IQR: 97.8–100.0) (Figure 3). As expected, we also detected *BCR-ABL1*<sup>+</sup> cells in the

broader CD26<sup>-</sup> fractions. Here, the median percentage of *BCR-ABL1*<sup>+</sup> cells was low in the patients who carried a considerable CD26<sup>-</sup> SC population, i.e. Group 2 and 3 – 8.0% (IQR: 3.8–30.0%) and 2.5% (IQR: 1.5–6.8%), respectively. No *BCR-ABL1*<sup>+</sup> cells were detected in the CD26<sup>-</sup> fraction of only three patients from Group 2 and 3. In contrast, in Group 1, where almost no CD26<sup>-</sup> SCs were previously detected and a significant contamination of CD38<sup>dim</sup> (clonal) cells was expected, most of the cells in the broader CD26<sup>-</sup> fraction were *BCR-ABL1*<sup>+</sup> (median: 99.0%; IQR: 82.3–100.0). For control purposes, we also analyzed the CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> cells (further addressed as “purified progenitor fraction”) in 29/31 patients and found that this fraction contained high numbers (percentages) of *BCR-ABL1*<sup>+</sup> cells (median: 99.0%; IQR: 95.0–100.0).

**RT-PCR analysis confirms that CD26 staining can safely discriminate between LSCs and HSCs in all three groups of CML patients**

In 3 patients analyzed by FISH (1 patient per group), we also performed a more detailed assessment of the distribution of leukemic versus normal cells in the whole CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup> compartment using an RT-PCR analysis. We focused on verifying the *BCR-ABL1* negativity of CD26<sup>-</sup> SCs, which could not be fully proven by FISH. In these experiments, CD26<sup>+</sup> and CD26<sup>-</sup> cells of the CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup> compartment were FACS-purified into 3–5 subfractions



**Figure 2: Percentage of CD26<sup>+</sup> cells in the CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> SC population for the 3 patient groups, as determined by flow cytometry (*p* < 0.0001; Kruskal-Wallis; ANOVA).**

(Figure 4) based on their increasing CD38 expression. Each subfraction contained variable numbers of cells ranging from 5 to 20 per one well/reaction. Using this method we were able to a) analyze even very strictly gated populations of CD38<sup>-</sup> SCs (matching FMO control for CD38), without any possible contamination of CD38<sup>dim</sup> cells; b) map the CD38<sup>dim</sup> region for the distribution of *BCR/ABL*<sup>+</sup> cells. The method was capable of detecting a positive signal from as little as one cell, as demonstrated in positive control wells (see methods section).

All of the CD26<sup>+</sup> subfractions were proven to be *BCR-ABL*<sup>+</sup> irrespective of CD38 expression. In contrast, the CD26<sup>-</sup> subfractions which corresponded to strictly CD38<sup>-</sup> gated cells contained only *BCR-ABL* negative cells, and the positivity started to “occur” only in subfractions with CD38<sup>dim</sup> expression, which supposedly contained the leukemic CD34<sup>+</sup> progenitor cells (subfractions no. 3–5; Figure 4).

### CD26<sup>+</sup> SCs show low forward scatter (FSC)

In order to verify alternative options for identifying and separating LSCs and HSCs, we performed additional visualization of the CD26<sup>+</sup> SC population in FSC histograms (Figure 5). The FSC<sup>low</sup> population perfectly matched the CD26<sup>+</sup> SC population, which was nicely demonstrated in Group 2 and 3 patients. In Group 1 patients who virtually lacked CD26<sup>+</sup> SCs, the FSC<sup>low</sup> population was also absent (Figure 5).

### Correlation of the percentage of CD26<sup>+</sup> SCs with clinical parameters in CML patients

We further assessed whether the percentage of CD26<sup>+</sup> SCs and the resulting group categorization correlated with clinical or prognostic parameters in our CML patients (Table 2). A statistically significant difference was found between the mean white blood counts (WBC) at the time of diagnosis among the 3 groups ( $n = 31, p < 0.001$ ; Kruskal-Wallis; ANOVA). In particular, as expected, patients with higher WBC were found to have

higher levels (percentages) of CD26<sup>+</sup> SCs within the total SC compartment. We also correlated response to imatinib with the percentage of CD26<sup>+</sup> SCs in a homogeneous subgroup of first-line imatinib-treated patients ( $n = 15$ ). In these patients, achievement of major molecular response (MMR) at month 12 ( $n = 15$ ) was significantly different among the 3 groups, with the best response seen in Group 3 patients ( $p < 0.05$ ; Fisher’s exact test). However, no such relationship was found at month 18, when 12/13 patients had already achieved MMR ( $p = 0.54$ ; Fisher’s exact test; 2/15 patients were not analyzed at this time point). None of the 15 patients were switched from imatinib during these follow-up periods. No relationship was found between the patient groups defined by percentages of CD26<sup>+</sup> SCs and risk stratification according to Hasford ( $n = 23, p > 0.05$ ; Fisher’s exact test), Sokal ( $n = 24, p > 0.05$ ; Fisher’s exact test), or EUTOS ( $n = 24, p > 0.05$ ; Chi-square test) score. Also, no statistically significant difference was found between the frequency of either all [Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) grade 0–5] or severe (CTCAE grade 3–5) hematological toxicities developed during the first year of TKI therapy among the 3 patient groups ( $n = 25, p > 0.1$ ; Fisher’s exact test).

## DISCUSSION

Recently, Herrmann et al. analyzed various surface antigens that were formerly hypothesized to define CML LSCs [17]. CD26 was reported to provide the highest specificity, which was confirmed by a series of thorough experiments including long-term culture-initiating cell (LTC-IC) and xenotransplantation assays. In the current study, we complemented these results by demonstrating the general applicability of this concept in CP CML patients. We also defined 3 patient groups based on different percentage of CD26<sup>+</sup> cells in the stem cell-enriched compartment.

Clear identification of the CD26<sup>+</sup> and CD26<sup>-</sup> SC populations was possible in each patient, even when one of the populations was almost missing. A quantitative analysis of CD26<sup>+</sup> SCs enabled us to

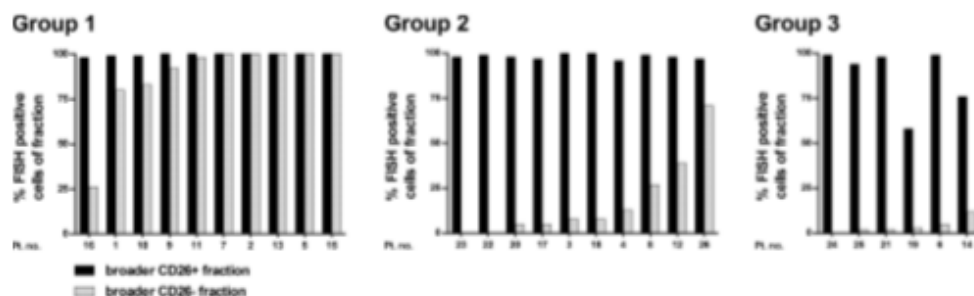
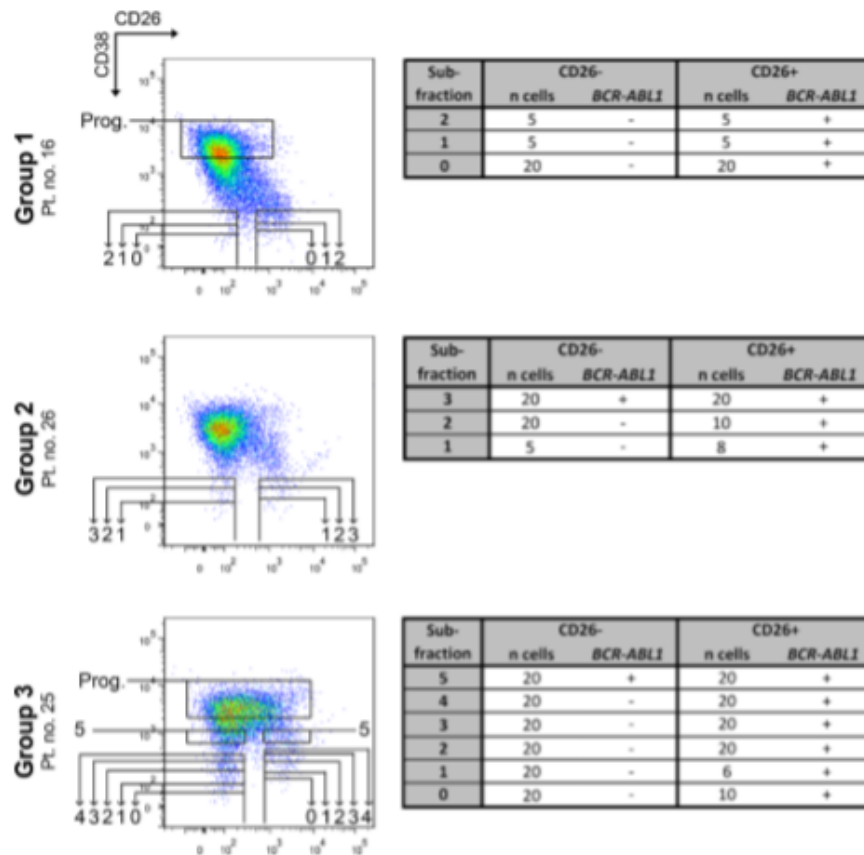


Figure 3: *BCR-ABL*<sup>1</sup> positivity assessed by FISH in FACS-purified broader (CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>dim</sup>) CD26<sup>+</sup> and CD26<sup>-</sup> fractions; shown separately for Group 1, 2, and 3. Pt. no. – patient number.

categorize our CML patients into 3 groups. A similar patient distribution was formerly proposed by Janssen et al., who used light scatter properties to define the LSCs and HSCs [15]. In their study, 15/40 (37.5%) patients were found to carry only an LSC population (defined by higher CD34/CD45 expression and higher FSC/SSC characteristics), which corresponds to our Group 1 (42%); 25/40 patients had a varying ratio of both LSC and HSC populations (cells with lower CD34/CD45 expression, but defined by higher or lower FSC/SSC characteristics, respectively), which corresponds to our Group 2 and 3. Similarly, we found that the FSC- and CD26-based identification of HSCs matched. Although, the CD26 expression alone perfectly distinguished LSCs from HSCs, as demonstrated using the RT-PCR analysis, we propose that the combination

with FSC might offer improved resolution. This might be important in problematic cases or during initial optimization experiments. Nevertheless, caution must be taken, since various red cell lysis reagents affect light scatter properties differently.

In order to determine the clonality of the stem-cell enriched fractions, we applied a robust FISH analysis and a broader gating strategy. This enabled us to analyze most of our patients, but resulted in a contamination of the CD26<sup>-</sup> and CD26<sup>+</sup> SC compartments with clonal cells from the CD38<sup>dim</sup> region. This produced positive signals in the broader CD26<sup>-</sup> fractions, most notably in Group 1 patients who only carried minor CD26<sup>-</sup> SC populations. The existence of clonal cells in regions with higher CD38 expression was also supported by the fact that almost all CD38<sup>+</sup> cells among all patients were found to be clonal.



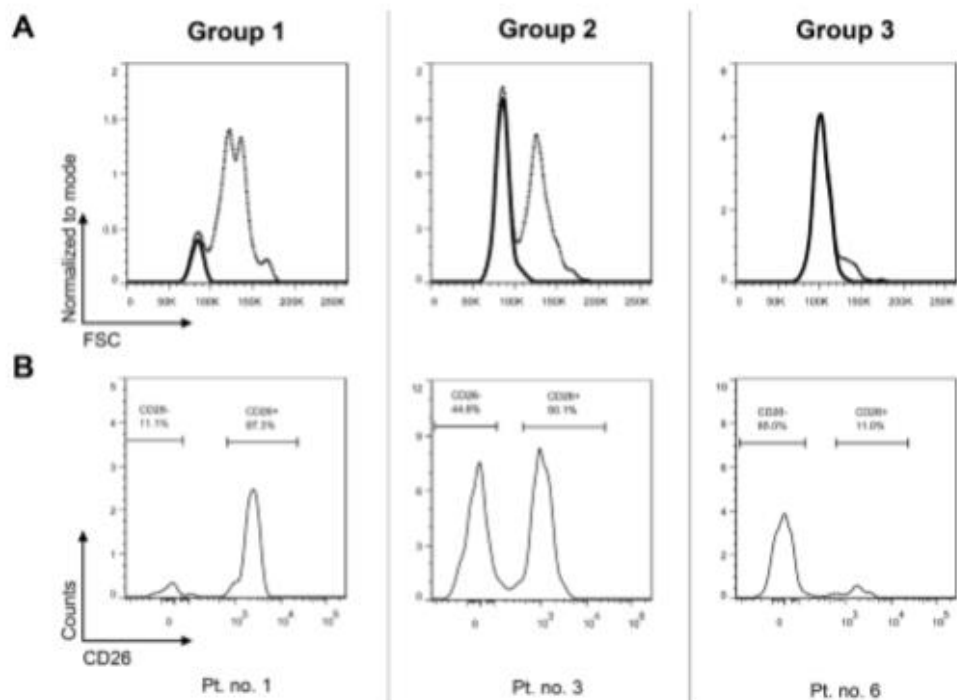
**Figure 4: RT-PCR analysis of FACS-purified subfractions from the CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup> cell compartment.** The subfractions numbered 0–4 contain all cells below the corresponding horizontal line. Thus, each superior subfraction also nests all previous subfractions and provides their partial repetition. Subfraction no. 5 and progenitor subfraction contain only cells from the indicated box. Subfraction no. 1 represents CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> SCs gated according to fluorescence minus one control for the CD38 antigen. Subfraction no. 0 represents even stricter gating and was isolated only if possible. Individual subfractions 0–5 were sorted and analyzed 1–2×, always with the same cell number and identical results from both analyses. Tables show the number of FACS-purified cells per one analysis and the *BCR-ABL1* status of each subfraction: (-) – negative, (+) – positive, n – number of, Prog. – more mature progenitor cells, Pt. no. – patient number.

In summary, the FISH analysis confirmed that the CD26<sup>-</sup> fraction contains almost exclusively clonal cells in all patients analyzed and that the CD26<sup>-</sup> fraction represents predominantly normal HSCs in Group 2 and 3 (without a dominant CD26<sup>-</sup> LSC fraction). However, the method did not prove CD26 expression to be a fully discriminatory marker and was unsuitable for analysis of Group 1 patients with minor CD26<sup>-</sup> SC fractions.

In order to analyze small, strictly gated fractions, and clearly prove the discriminatory value of CD26, we analyzed one representative patient from each group using a sensitive RT-PCR method. While the analyzed patients showed FISH positivity in the broader CD26<sup>-</sup> fraction, no leukemic cells were found by RT-PCR in CD26<sup>-</sup> subfractions with strict CD38<sup>-</sup> expression. The RT-PCR analysis thus proved that CD26 is a specific marker for CML LSCs and confirmed a crucial role of the proper CD38<sup>-</sup> SC gating. In patient no. 26, the method showed that *BCR/ABL1*+ cells might already occur in the CD38<sup>dim</sup> region close to the CD38<sup>-</sup> gate. This particular patient showed high *BCR/ABL1*+ contamination in FISH analysis when using the broader gating strategy, which demonstrates that inaccurate CD38<sup>-</sup> gating is likely to result in contamination by leukemic CD34<sup>+</sup> progenitor cells from the CD38<sup>dim</sup> region. This pitfall might be easily

prevented by adhering to the FMO control for CD38 when modifying or setting-up a new protocol. The position of CD38<sup>-</sup> gate should not change for consistently processed and analyzed samples.

The proposed patient categorization raises the question if it reflects the actual clinical status or if it has a predictive value. We suggest that a larger LSC pool would produce larger quantities of clonal descendant cells. In line with this, we showed that WBC significantly differed among our 3 groups, with Group 1 patients having the highest WBC counts and the most CD26<sup>-</sup> LSCs, which also corresponds with a previous report [10]. When looking at treatment response, we found a statistically significant difference among the 3 groups in achievement of MMR at month 12, but not month 18. Janssen et al. reported that patients without residual HSCs were less likely to achieve MMR at month 18 [15]. These results indicate a relationship between the initial number of LSCs and longer time to achieve an MMR. In regard to prognostic scores, Janssen et al. found that patients with residual HSCs showed significantly better EUTOS and EURO-scores [15]. In contrast, we found no such relationship for our 3 groups, and similarly no correlation was previously found when considering only the percentage of CD26<sup>-</sup> SCs [17].



**Figure 5: CD26<sup>-</sup> SC population in CP CML is defined by low FSC.** Upper row shows FSC histograms (dashed line) for the entire SC population (CD45<sup>+</sup> 34<sup>+</sup> 38<sup>-</sup>), with the CD26<sup>-</sup> SC population highlighted as a solid line (A). The CD26<sup>-</sup> SC populations were gated from CD26 SC expression histograms in the lower row of identical patients (B). Pt. no. – patient number.

**Table 2: Differences in clinical and prognostic data among the 3 patient groups**

	Group 1	Group 2	Group 3
<b>WBC</b> (mean $\pm$ SD, 10 <sup>9</sup> /L; $p < 0.001$ )	230.7 $\pm$ 142.5	105.6 $\pm$ 72.1	27.9 $\pm$ 9.7
<b>Hasford score</b> (n patients per Low/Int/Hi risk group; $p > 0.05$ )	4/5/2	3/3/1	0/5/0
<b>Sokal score</b> (n patients per Low/Int/Hi risk group; $p > 0.05$ )	3/5/3	4/3/1	1/4/0
<b>EUTOS score</b> (n patients per Low/Hi risk group; $p > 0.05$ )	8/3	6/2	3/2
<b>Achievement of MMR on imatinib at M12</b> (n patients; $p < 0.05$ )	0/3 (0%)	3/6 (50%)	6/6 (100%)
<b>Achievement of MMR on imatinib at M18</b> (n patients; $p > 0.05$ )	3/3 (100%)	3/4 (75%)	6/6 (100%)

Hi – high; Int – intermediate; M – month; n – number.

The CD26/DPPiV is a multifunctional protein expressed in many tissues and cell types. This limits the potential for LSC eradication through CD26 targeting [20]. However, inhibition of CD26 by vildagliptin reduced SCID repopulating activity of CML LSC cells [10]. Moreover, in two diabetic CML patients treated with nilotinib, *BCR/ABL1* transcript level decreased after the start of gliptin therapy [10]. The potential of combined TKI and gliptin therapy for LSC eradication deserves further investigation, as gliptins are relatively safe and well characterized drugs, already widely used in treatment of diabetes.

In this study we confirmed that CD26 staining can accurately discriminate between LSCs and HSCs in all CML CP patients, which is of great clinical and diagnostic value. Additional studies are now required to determine whether the percentage of CD26<sup>+</sup> SCs and the LSC/HSC proportion is of prognostic significance regarding survival and progression-free survival. In addition, further studies will be required to explore whether LSC phenotyping can be employed as a follow-up parameter in poorly responding or relapsing patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and sample collection

Bone marrow samples were collected from treatment-naïve, newly diagnosed CP CML patients. The patients' characteristics are shown in Table S1. Written informed consent was provided by all patients. The study was approved by the local ethics committee of the Medical University of Vienna or ethics committee of University Hospital Brno, in accordance with the Declaration of Helsinki.

### Immunophenotyping

Immunophenotyping and FACS-purification were performed on a FACSaria III instrument (BD Biosciences, USA) and FACSDiVa 6 software using the lyse wash method. Fresh or cryopreserved leukocytes were used. Cells were either used as unprocessed cells or as cells depleted of granulocytes by anti-CD15 magnetic-activated cell sorting (MACS). Cells were stained with the following anti-human monoclonal antibodies (mAb): CD34-PE (8G12), CD34-FITC (8G12), CD26-PE (M-A261) (BD Biosciences, USA), CD45-PE-Cy7 (HI30), CD38-FITC (HIT2), CD26-APC (BA5b) (Life Technologies, USA), and CD38-PerCP-Cy5.5 (HIT2) (eBioscience, USA). The samples were immunophenotyped by one of two mAb sets: CD26-APC, CD34-PE, CD38-FITC, CD45-PE-Cy7 or CD26-PE, CD34-FITC, CD38-PerCP-Cy5.5, CD45-PE-Cy7. No changes in the proportion of CD26<sup>+</sup> and CD26<sup>-</sup> SCs (within the CD45<sup>+</sup>34<sup>-</sup>38<sup>-</sup> compartment) were observed for fresh versus thawed samples or with regard to the different sample processing methods used, when compared directly or upon overall comparison of differently processed/stained samples (Figure S1).

### Flow cytometry analysis

Flow cytometry analysis and quantification of CD26<sup>+</sup> and CD26<sup>-</sup> SCs were performed using FlowJo software (gating strategy shown in Figure S2). The position of the CD45<sup>+</sup>34<sup>-</sup>38<sup>-</sup> SC gate was set according to FMO control for the CD38 antigen, i.e. a sample was stained with all other antibodies except CD38, thus revealing the fluorescence spread in this channel and the correct position for the CD38<sup>-</sup> gate (Figure S2). The proportion (%) of CD26<sup>+</sup> and CD26<sup>-</sup> SCs was

calculated from distinct populations in histograms, while non-specific CD26<sup>dim</sup> cells were considered as a grey zone and were excluded from the fractions to be sorted and analyzed. Due to the exclusion of these grey-zone-cells, the percentages of clearly CD26<sup>+</sup> and clearly CD26<sup>-</sup> SCs do not add up to 100% and represent fractions suitable for FACS-purification. The number of CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> events acquired ranged from 45 to 469 (median = 179, *n* = 31). There was no statistically significant difference between the number of CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> events acquired among the 3 patient groups (*n* = 31, *p* = 0.61; Kruskal-Wallis; ANOVA).

### FACS sorting

Different gating strategies for FACS-purification were applied for FISH and RT-PCR.

For FISH analyses, we obtained CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> <sup>dim</sup>26<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> <sup>dim</sup>26<sup>-</sup> cell fractions (broader CD26<sup>+</sup> fraction and broader CD26<sup>-</sup> fraction) as well as CD45<sup>+</sup>34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> cells (purified progenitor fraction). The gating strategy was patient dependent (Figure S3). Due to the low yields of the broader CD26<sup>+</sup> and CD26<sup>-</sup> fractions, the purity of sorting was assessed on the purified progenitor fractions (identical sorting process) and reached a purity of 99.2 ± 0.7% [mean ± standard deviation (SD), *n* = 13].

FACS-purified subfractions containing limited cell numbers (described in Results) were analyzed by direct nested RT-PCR (see below). Wells with no sorted cells were included in each PCR run as a no template control. The purified progenitor cells served as positive controls for both the FACS process and the PCR amplification (separate wells of 1–20 cells; in total: 8 × 1 cell, 9 × 5 cells, 5 × 10 cells, 6 × 20 cells). False negativity was obtained in 2/28 of these positive control wells (7%; two separate runs)

### FISH analysis

FACS-purified cells were fixed by methanol-acetic acid solution (3:1; fixative solution). FISH analysis was performed on interphase nuclei to detect the *BCR-ABL1* fusion using the XL *BCR-ABL1* plus probe (MetaSystems, Germany). Whole volume of fixative solution (15–20 µl) with resuspended cells was spotted drop-wise onto a minimal slide area and let dry on a heater-plate at 56°C for 20 min. Hybridization with the FISH probe was performed according to the manufacturer recommendations with the following modifications: 7 µl of probe mixture was applied on slide; slides were washed in a 0.4X SSC/0.3% NP-40 solution (Abbott molecular, USA) at 73.5°C for 4 min; next slides were washed in 2X SSC/0.1% NP-40 solution (Abbott molecular, USA) at room temperature for 2 min. Fluorescence signals were evaluated using a Nikon Eclipse E80i fluorescence microscope and documented with LUCIA FISH software (Laboratory Imaging, Czech Republic).

### RT-PCR analysis

FACS-purified subfractions containing limited cell numbers (as low as one cell) were analyzed for *BCR-ABL1* positivity by direct nested reverse transcription PCR. Primers were used according to a previously published method [21]. Initially, cells were lysed using guanidine thiocyanate, followed by three quick freeze-thaw cycles at -80°C. The first-step of the nested RT-PCR was performed using the AffinityScript One-Step RT-PCR Kit (Agilent Technologies, USA) and included a single-tube reverse transcription and the first PCR round [22]. The resulting PCR product was purified with a mixture of Exo I and FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase at a ratio of 1:2 (Fermentas – Thermo Fisher Scientific, USA). The purified PCR product was diluted 100× in RNase-free water. For a second amplification, the HotStar Taq DNA Polymerase Kit (Qiagen, Germany) was used. Amplification products from both PCR rounds were visualized using a QX DNA Screening Kit on a QIAxcel Advanced instrument and analyzed using QIAxcel ScreenGel software (all Qiagen, Germany).

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Kamila Brazdova and Barbora Kantorova (Masaryk University and Faculty Hospital Brno) for providing the cell-processing protocol for RT-PCR.

### CONFLICTS OF INTEREST

P.V. has received research funding and honoraria from BMS, Novartis and Ariad. The other authors have no conflict of interest to disclose in this study.

### GRANT SUPPORT

The work was supported by the project “Employment of Best Young Scientists for International Cooperation Empowerment” (CZ.1.07/2.3.00/30.0037) co-financed from the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic; as well as the Austrian Science Fund, SFB F4704-B20.

### REFERENCES

1. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:441–453.
2. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, Goldman JM, Muller MC, Radich JP, Rudoltz M, Mone M, Gathmann I, Hughes TP, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009; 23: 1054–1061.

3. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med.* 2001; 344: 1031–1037.
4. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 *in vitro*. *Blood.* 2002; 99:319–325.
5. Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL, Arber DA, Slovak ML, Forman SJ. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood.* 2003; 101:4701–4707.
6. Preuner S, Mitterbauer G, Mannhalter C, Herndlhofer S, Sperr WR, Valent P, Lion T. Quantitative monitoring of BCR/ABL1 mutants for surveillance of subclone-evolution, -expansion, and -depletion in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer.* 2012; 48:233–236.
7. Gruber FX, Ernst T, Porkka K, Engh RA, Mikkola I, Maier J, Lange T, Hochhaus A. Dynamics of the emergence of dasatinib and nilotinib resistance in imatinib-resistant CML patients. *Leukemia.* 2012; 26:172–177.
8. Pellicano F, Mukherjee L, Holyoake TL. Concise review: cancer cells escape from oncogene addiction: understanding the mechanisms behind treatment failure for more effective targeting. *Stem Cells.* 2014; 32:1373–1379.
9. Crews LA, Jamieson CH. Chronic myeloid leukemia stem cell biology. *Curr Hematol Malig Rep.* 2012; 7:125–132.
10. Herrmann H, Sadovnik I, Cerny-Reiterer S, Rulicke T, Stefanzi G, Willmann M, Hoermann G, Bilban M, Blatt K, Herndlhofer S, Mayerhofer M, Streubel B, Sperr WR, et al. Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2014; 123:3951–3962.
11. Jaras M, Johnels P, Hansen N, Agerstam H, Tsapogas P, Rissler M, Lassen C, Olofsson T, Bjerrum OW, Richter J, Fioretos T. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:16280–16285.
12. Florian S, Sonneck K, Hauswirth AW, Krauth MT, Schernthaner GH, Sperr WR, Valent P. Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38– stem cells in various myeloid malignancies. *Leukemia Lymphoma.* 2006; 47:207–222.
13. Durig J, Rosenthal C, Elmaagacli A, Heyworth C, Halfmeyer K, Kasper C, Novotny J, Dührsen U. Biological effects of stroma-derived factor-1 alpha on normal and CML CD34+ haemopoietic cells. *Leukemia.* 2000; 14:1652–1660.
14. Peled A, Hardan I, Trakhtenbrot L, Gur E, Magid M, Darash-Yahana M, Cohen N, Grabovsky V, Franitza S, Kollet O, Lider O, Alon R, Rechavi G, et al. Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells.* 2002; 20:259–266.
15. Janssen JJ, Deenik W, Smolders KG, van Kwijk BJ, Pouwels W, Kelder A, Cornelissen JJ, Schuurhuis GJ, Ossenkoppele GJ. Residual normal stem cells can be detected in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients by a new flow cytometric approach and predict for optimal response to imatinib. *Leukemia.* 2012; 26:977–984.
16. Landberg N, Hansen N, Askmyr M, Agerstam H, Lassen C, Rissler M, Hjorth-Hansen H, Mustjoki S, Jaras M, Richter J, Fioretos T. IL1RAP expression as a measure of leukemic stem cell burden at diagnosis of chronic myeloid leukemia predicts therapy outcome. *Leukemia.* 2015; 30:255–258.
17. Valent P, Sadovnik I, Racil Z, Herrmann H, Blatt K, Cerny-Reiterer S, Eisenwort G, Lion T, Holyoake T, Mayer J. DPPIV (CD26) as a novel stem cell marker in Ph+ chronic myeloid leukaemia. *Eur J Clin Invest.* 2014; 44:1239–1245.
18. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell Stem Cell.* 2007; 1:635–645.
19. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 2015; 125:2605–2613.
20. Boonacker E, Van Noorden CJF. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol.* 2003; 82:53–73.
21. Lion T, Gaiger A, Henn T, Horth E, Haas OA, Geissler K, Gadner H. Use of quantitative polymerase chain reaction to monitor residual disease in chronic myelogenous leukemia during treatment with interferon. *Leukemia.* 1995; 9: 1353–1360.
22. Stahlberg A, Bengtsson M. Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Methods.* 2010; 50:282–288.



### 5.7.6. Příloha 17

Gregor T, Bosakova MK, Nita A, Abraham SP, Fafílek B, Cernohorsky NH, Rynes J, Foldynova-Trantírková S, Zacková D, Mayer J, Trantírek L, Krejčí P. Elucidation of protein interactions necessary for the maintenance of the BCR-ABL signaling complex. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020;77(19):3885-3903.

IF = 6,496 v roce 2019/2020; BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY Q1; 2 citace ve WOS, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Experimentální práce podpořená grantem AZV ČR pod číslem NV15-34405A prokázala, že zatímco terapie TKI inhibuje aktivitu Bcr-Abl1 tyrozinkinázy jako enzymu, nenarušuje vazby, které má tyrozinkináza s ostatními proteiny v „core signálním komplexu“, a sice s CRKL, SHC1, GRB2, SOS1, cCBL, p85a-PI3K, STS1 a SHIP2. Na to konto může docházet k Bcr-Abl signalizaci „inaktivované“ Bcr-Abl1 kinázy, dovolující přežití nádorových buněk a zakládající potenciální relaps onemocnění
- Kromě charakterizace jednotlivých mezi-proteinových interakcí uvnitř Bcr-Abl1 „core signálního komplexu“ byly specifikovány příslušné domény Bcr-Abl1 kinázy účastnící se signalizace
- Výsledky analýzy významně přispěly k porozumění struktury a dynamiky Bcr-Abl interaktomu coby důležitých aspektů pro vývoj cílené léčby s ambicí úplné eradikace leukemie



## Elucidation of protein interactions necessary for the maintenance of the BCR–ABL signaling complex

Tomas Gregor<sup>1,2,3</sup> · Michaela Kunova Bosakova<sup>2,3,4</sup> · Alexandru Nita<sup>2,5</sup> · Sara P. Abraham<sup>2</sup> · Bohumil Fafílek<sup>2,3,4</sup> · Nicole H. Cernohorsky<sup>2</sup> · Jan Rynes<sup>1</sup> · Silvie Foldynova-Trantirkova<sup>1</sup> · Daniela Zackova<sup>6</sup> · Jiri Mayer<sup>6</sup> · Lukas Trantírek<sup>1</sup> · Pavel Krejci<sup>2,3,4</sup>

Received: 26 June 2019 / Revised: 5 November 2019 / Accepted: 26 November 2019  
© Springer Nature Switzerland AG 2019

### Abstract

Many patients with chronic myeloid leukemia in deep remission experience return of clinical disease after withdrawal of tyrosine kinase inhibitors (TKIs). This suggests signaling of inactive BCR–ABL, which allows the survival of cancer cells, and relapse. We show that TKI treatment inhibits catalytic activity of BCR–ABL, but does not dissolve BCR–ABL core signaling complex, consisting of CRKL, SHC1, GRB2, SOS1, cCBL, p85a-PI3K, STS1 and SHIP2. Peptide microarray and co-immunoprecipitation results demonstrate that CRKL binds to proline-rich regions located in C-terminal, intrinsically disordered region of BCR–ABL, that SHC1 requires pleckstrin homology, src homology and tyrosine kinase domains of BCR–ABL for binding, and that BCR–ABL sequence motif located in disordered region around phosphorylated tyrosine 177 mediates binding of three core complex members, i.e., GRB2, SOS1, and cCBL. Further, SHIP2 binds to the src homology and tyrosine kinase domains of BCR–ABL and its inositol phosphatase activity contributes to BCR–ABL-mediated phosphorylation of SHC1. Together, this study characterizes protein–protein interactions within the BCR–ABL core complex and determines the contribution of particular BCR–ABL domains to downstream signaling. Understanding the structure and dynamics of BCR–ABL interactome is critical for the development of drugs targeting integrity of the BCR–ABL core complex.

**Keywords** BCR–ABL · Chronic myeloid leukemia · Signaling · Protein complex

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03397-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Lukas Trantírek  
lukas.trantirek@ceitec.muni.cz

✉ Pavel Krejci  
krejcip@med.muni.cz

<sup>1</sup> Central European Institute of Technology, Masaryk University, 62500 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 62500 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital, 65691 Brno, Czech Republic

<sup>4</sup> Institute of Animal Physiology and Genetics of the CAS, 60200 Brno, Czech Republic

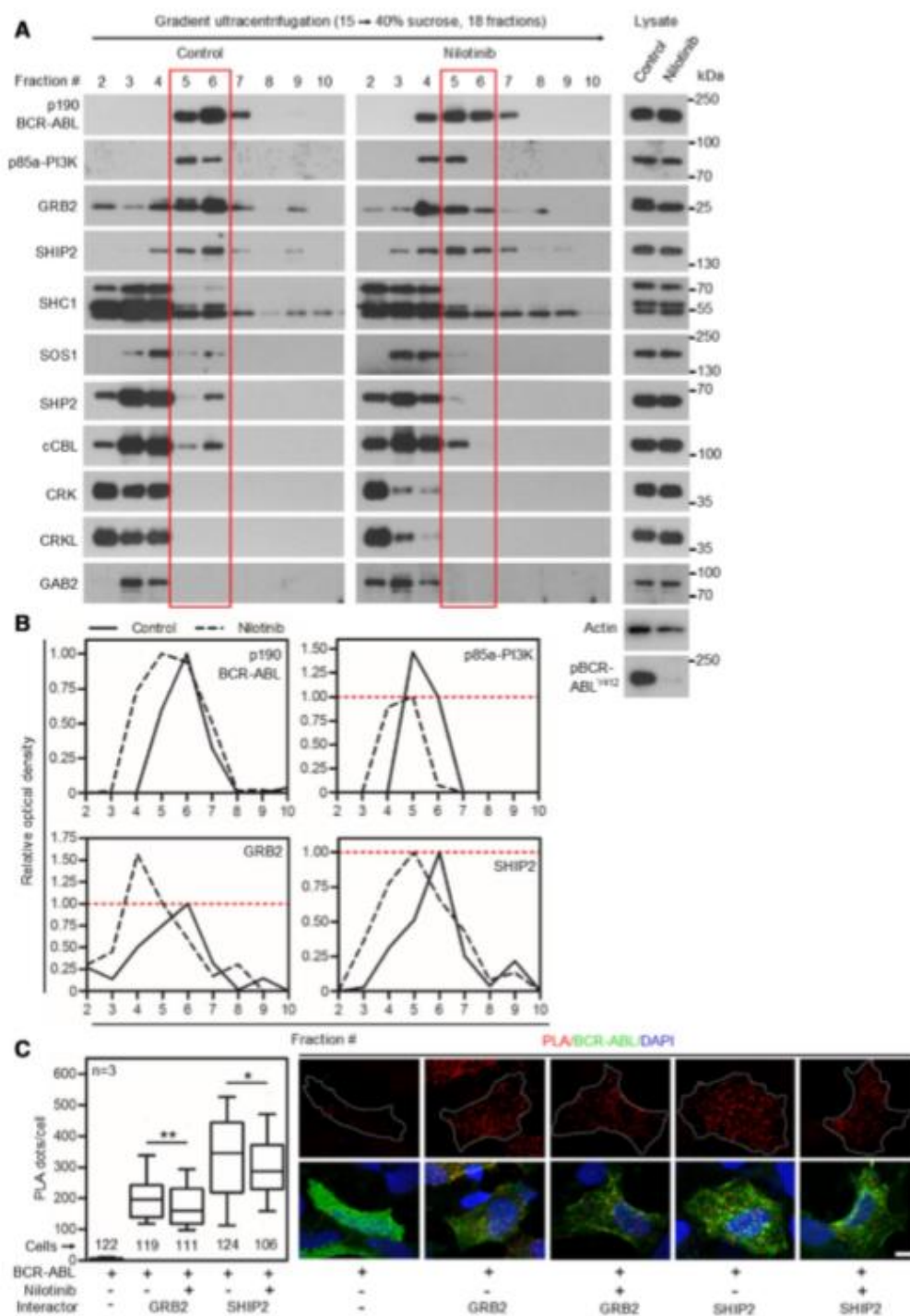
<sup>5</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS, 16610 Prague, Czech Republic

<sup>6</sup> Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Masaryk University Hospital, 62500 Brno, Czech Republic

### Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder defined by the  $t(9;22)(q34;q11)$  translocation, which creates fusion protein containing part of the breakpoint cluster region (*BCR*) gene joined with the *ABL* gene, which encodes a tyrosine kinase. The resulting oncogene has a constitutive tyrosine kinase activity caused by oligomerization of the BCR, leading to autophosphorylation and activation of ABL kinase [1]. Two major isoforms of BCR–ABL are known, p190 and p210, that differ in 501 aa BCR region containing double homology and pleckstrin homology domains present only in p210 [2].

The BCR–ABL is necessary and sufficient to maintain CML, as the acquisition of active BCR–ABL generates a lethal leukemia in mice [3]. At the cellular level, BCR–ABL transforms cells by increasing proliferation and survival, and decreasing dependency on extracellular signals delivered by cytokines and growth factors [4]. This is mediated by



**Fig. 1** Nilotinib causes partial dissolution of BCR-ABL signaling complex. **a** 293T cells were transfected with p190 BCR-ABL, native cell lysates were subjected to ultracentrifugation in the 15–40% sucrose gradient, and collected fractions were analyzed by western blot. The presence of BCR-ABL signal in more than one fraction suggests the existence of complexes of different compositions. Note the various degrees of co-sedimentation of BCR-ABL with p85a-PI3K, GRB2, SHIP2, SHC1, SOS1, SHP2 and cCBL; no co-sedimentation with CRK, CRKL or GAB2 was found. Inhibition of BCR-ABL kinase activity with 100 nM nilotinib resulted in a shift of a fraction of the BCR-ABL complexes towards lighter fractions, suggesting partial dissolution of the BCR-ABL signaling complex. **b** The western blot analysis of proteins co-sedimenting with BCR-ABL (p85a-PI3K, GRB2 and SHIP2) was quantified as described in “Materials and methods”. Note that portion of GRB2, but not SHIP2 or p85a-PI3K dissociated from the BCR-ABL complex after nilotinib treatment. Data represent a single experiment out of three independent experiments carried out. The fractions containing most of the p190 BCR-ABL are highlighted in red. Phosphorylation (p) at ABL Y412 was used to determine the degree of BCR-ABL inhibition using nilotinib; actin serves as a loading control in total cell lysates used for ultracentrifugation. **c** Cells were transfected with FLAG-tagged p190 BCR-ABL, V5-tagged GRB2 or SHIP2, treated with nilotinib, and subjected to PLA. The antibodies against protein tags were used in PLA (red); cABL antibody was used to counterstain the transfected cells (green). Cells transfected with BCR-ABL and an empty vector serve as the negative control. Number of PLA dots per cell was calculated and graphed (10–90 percentile). Statistically significant differences were highlighted (Student's *t* test with Welch's correction for unequal variances; \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01). Scale bars, 10 μm

the activation of large amounts of signaling intermediates, including members of RAS-ERK-MAP kinase pathway involved in cell proliferation, AKT signaling conferring resistance to apoptosis, and STAT signaling contributing to cytokine independence [5–7].

Suppression of BCR-ABL tyrosine kinase activity with small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) has greatly improved CML prognosis, effectively turning once lethal leukemia into the chronic condition. Imatinib was the first TKI approved for CML, which represented a major therapeutic breakthrough [8]. Over a decade of clinical experience with imatinib demonstrated an estimated 85% survival rate for the first-line treatment patients. Failed imatinib response often involves *BCR-ABL* gene amplification, increased expression or occurrence of mutations causing imatinib resistance [9, 10]. This was overcome by the development of second-generation TKIs, nilotinib and dasatinib, which inhibit BCR-ABL with greater efficiency than imatinib, and target imatinib-resistant BCR-ABL mutants [11, 12]. Nilotinib and dasatinib provide a significant improvement in CML treatment over imatinib, inducing 2-year complete cytogenetics response in ~40% of imatinib-resistant patients [13]. Unfortunately, in many CML patients who failed to respond to imatinib, a T315I substitution in the BCR-ABL's kinase domain occurs. T315I targets the gate-keeper residue controlling access

to the hydrophobic cavity adjacent to the ATP-binding site, which is important for the proper TKI binding [14]. The resistance BCR-ABL-T315I to TKIs was successfully addressed by the development of ponatinib, which induces complete cytogenetic response in 46% of patients resistant to both nilotinib and dasatinib [15].

The TKI therapy generates impressive results in CML treatment; however, it fails primarily in three areas. First, some CML patients remain resistant to TKIs, suggesting that BCR-ABL tyrosine kinase activity is not necessary for CML persistence in these patients [16]. Second, resistance to TKIs eventually develops in significant percentage of CML cases. Novel mutations in BCR-ABL, resistant even to ponatinib, have been described, including the dual mutations affecting one BCR-ABL allele [17]. Third, TKIs suppress but not eradicate CML. The slowly proliferating cancer stem cells are poorly targeted [18], and capable to recapitulate CML even after the period of deep molecular remission. In TKI discontinuation trials, a return of clinical CML after TKI withdrawal is observed in ~50% of patients in deep remission [19], suggesting that blockade of BCR-ABL kinase activity by TKIs alone is not sufficient to cure CML. This together with side effects and high economic costs of the life-long TKI therapy necessitates the development of conceptually novel treatments for CML. First, we need to completely understand the mechanics of BCR-ABL signaling, as the BCR-ABL may play other roles beyond the constitutively active tyrosine kinase. The protein-protein interactions within the BCR-ABL signaling complex may remain preserved when its kinase activity is inhibited, leading to residual signaling sufficient for long-term survival of CML cells.

The main downstream signaling pathways utilized by BCR-ABL to regulate cell functions are well established. In contrast, the composition of BCR-ABL interactome, i.e., the pool of proteins associating directly with BCR-ABL, is only beginning to emerge. Active BCR-ABL auto-phosphorylates on tyrosines 177, 1127 and 1294 (Y245 and Y412, cABL1b numbering) [20] and others, providing docking sites for proteins containing SH3 and PTB domains. Several such proteins have been identified, which form a core complex of direct BCR-ABL interactors. These include adapters GRB2, CRK-I and SHC1, adapter/phosphatase SHIP2, p85a subunit of the lipid kinase PI3K (p85a-PI3K), ubiquitin ligase cCBL and phosphatase STS1 [21]. Currently, the nature of binding interfaces and protein-protein interactions in the BCR-ABL signaling complex remains unclear. Yet these interactions hold a key to the understanding of the structure of the BCR-ABL core complex. This study was carried out to map the protein-protein interactions within the BCR-ABL signaling complex in detail, and elucidate the dynamics of the BCR-ABL signaling complex in the active and TKI-inhibited state of BCR-ABL.

## Results and discussion

### Inhibition of BCR–ABL kinase activity does not dissolve the BCR–ABL signaling complex

TKIs inhibit kinase activity of BCR–ABL but their effect on protein–protein interactions within the BCR–ABL core signaling complex (referred here as ‘core complex’) is not known. TKIs may not interfere with all protein–protein interactions within the BCR–ABL signaling complex, particularly those not mediated by phosphorylated tyrosine motifs, leaving the BCR–ABL complex partially intact. We asked whether the inhibition of BCR–ABL kinase activity results in the disintegration of the core complex. We expressed p190 BCR–ABL in 293T cells and separated the native BCR–ABL complexes by ultracentrifugation in 15–40% sucrose gradient. Treatment by 100 nM nilotinib leads to complete inhibition of BCR–ABL kinase activity, evidenced by the lack of autophosphorylation at Y412 (Fig. 1a). Inhibition of BCR–ABL kinase activity resulted in a partial shift in the BCR–ABL complexes towards lighter sucrose fractions, suggesting partial but not complete dissociation of the core complex (Fig. 1a; BCR–ABL blot). The members of core complex p85a-PI3K, GRB2, SHIP2, SHC1, SOS1 and cCBL [21] co-sedimented with BCR–ABL in sucrose gradient (Fig. 1a). No co-sedimentation was found with CRK, CRKL or GAB2, suggesting transient interaction not lasting through the experimental procedure.

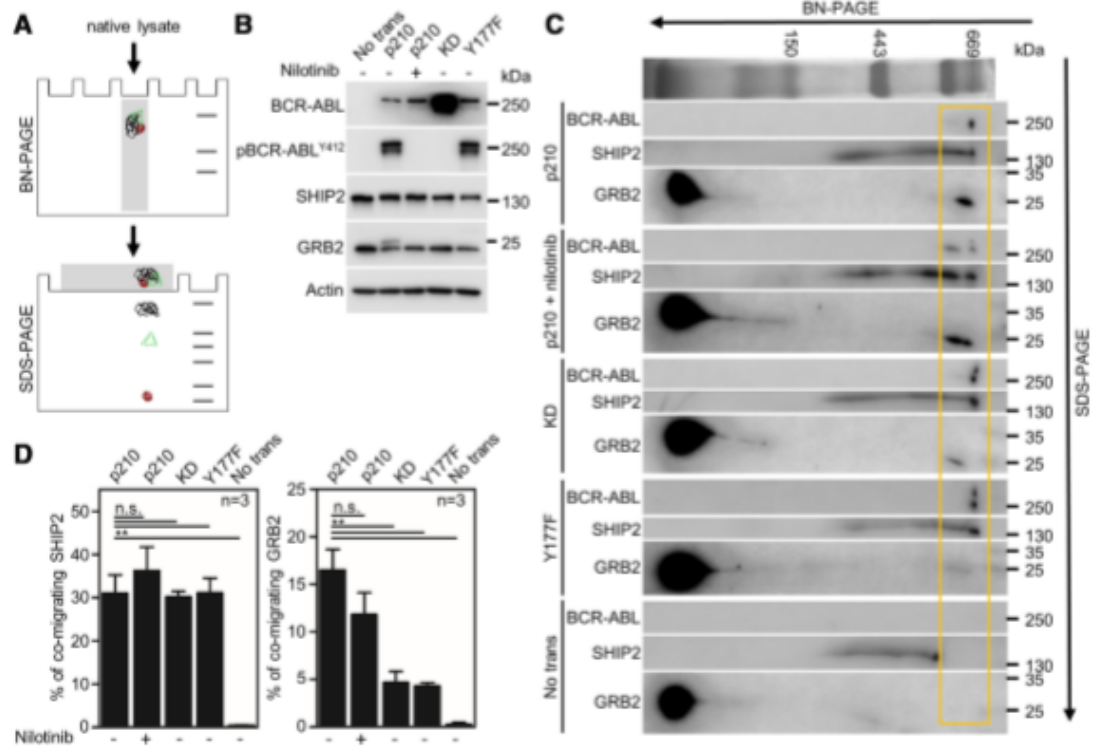
Despite complete inhibition of the BCR–ABL activity, nilotinib did not cause exclusion of any of the endogenously expressed interactors from the co-sedimentation with BCR–ABL. Quantification of western blot analysis of proteins saturated on BCR–ABL, i.e., those which majority in 293T cells co-sedimented with BCR–ABL (p85a-PI3K, GRB2 and SHIP2) shows that portion of GRB2, but not SHIP2 nor p85a-PI3K dissociated from BCR–ABL after nilotinib treatment (Fig. 1b), suggesting only partial dissolution of BCR–ABL signaling complex in 293T cells treated with nilotinib. Similar data were obtained in 293T cells transfected with p210 BCR–ABL, and in K562 cells, a permanent cell line established from CML patient, which expresses endogenous BCR–ABL (Figs. S1, S2). Figure 1a shows a reduction in the BCR–ABL co-sedimentation with SHP2 and cCBL, induced by nilotinib. These changes may represent variability of the particular experiment because we were not able to replicate these results in cells expressing p210 BCR–ABL and in K562 cells (Figs. S1, S2). The association of BCR–ABL with GRB2 and SHIP2 in 293T cells expressing p190 BCR–ABL was probed by proximity ligation assay (PLA). In PLA analyses, nilotinib caused a statistically significant decrease in BCR–ABL interaction

with co-transfected GRB2 or SHIP2, but more than 80% of the interaction was preserved for both partners, when compared to active BCR–ABL (Fig. 1c).

Next, the blue-native (BN)-PAGE was used to probe the composition of BCR–ABL complex in 293T cells (Fig. 2a). The protein lysates of 293T cells expressing p210 BCR–ABL were resolved by BN-PAGE to separate protein complexes, which were then analyzed by second-dimension SDS-PAGE to obtain their individual components (Fig. 2b, c). Immunoblotting revealed ~600-kDa protein complex containing BCR–ABL, SHIP2 and GRB2 (Fig. 2c). Quantification of the percentage of bound GRB2 and SHIP2 shows that inhibition of BCR–ABL catalytic activity with nilotinib did not inhibit SHIP2 association with BCR–ABL, while causing only weak reduction of GRB2 association (Fig. 2d). Approximately 30% of GRB2 still associated with BCR–ABL containing Y177F substitution, which is known to disable the GRB2-binding motif on BCR–ABL [22, 23]. Similar data were obtained with kinase-dead (KD) BCR–ABL mutant K271H [24].

Finally, immunoprecipitation was used to address the composition of BCR–ABL complex. 293T cells were transfected by p190 or p210 BCR–ABL and association with endogenously expressed SOS1, SHIP2, cCBL, SHC1 and p85a-PI3K was probed by co-immunoprecipitation. All studied interactors co-immunoprecipitated with both variants of BCR–ABL (Fig. 3a). Nilotinib reduced this association, but significant amounts of SOS1, SHIP2, cCBL and SHC1 still co-immunoprecipitated with BCR–ABL; no association of p85a-PI3K was found in cells treated with nilotinib (Fig. 3a, green arrows). Because endogenous STS1 was not expressed in 293T cells, and endogenous CRKL did not co-immunoprecipitate with BCR–ABL, a transient co-transfection of STS1 and CRKL constructs followed by immunoprecipitation was used to probe their interaction with BCR–ABL. Nilotinib suppressed, but did not abrogate STS1 and CRKL interaction with BCR–ABL (Fig. 3b, c; green arrows); similar results were obtained in experiments probing STS1 and CRKL association with KD BCR–ABL (Fig. 3b, c; right panels, blue arrows). The other known BCR–ABL interactors, such as adapters NCK1 and NCK2 [25, 26], also associated with nilotinib-inhibited BCR–ABL (Fig. S3A).

An endogenous GRB2 is difficult to detect in BCR–ABL immunocomplexes, due to co-migration with IgL in SDS-PAGE. Since transgenic GRB2 migrated above IgL, and could be detected by western blot, we transfected GRB2 into 293T cells and probed association with BCR–ABL by GRB2 immunoprecipitation. Figure 3d shows a significant association of GRB2 with BCR–ABL, kinase inactive due to nilotinib treatment (left panel, green arrows) or KD mutation (right panel, blue arrows).



**Fig. 2** SHIP2 and GRB2 associate with kinase-inactive BCR-ABL. **a** Scheme of used experimental procedure comprising native lysis, blue-native (BN)-PAGE, SDS-PAGE and western blot. The three members of protein complex are highlighted in color. **b** Cell lysates of 293T cells transfected with p210 BCR-ABL, KD, kinase-dead BCR-ABL; Y177, BCR-ABL Y177F mutant. The inhibition of BCR-ABL kinase activity by nilotinib is demonstrated by the lack of autophosphorylation (p) at Y412. Actin serves as loading control. No

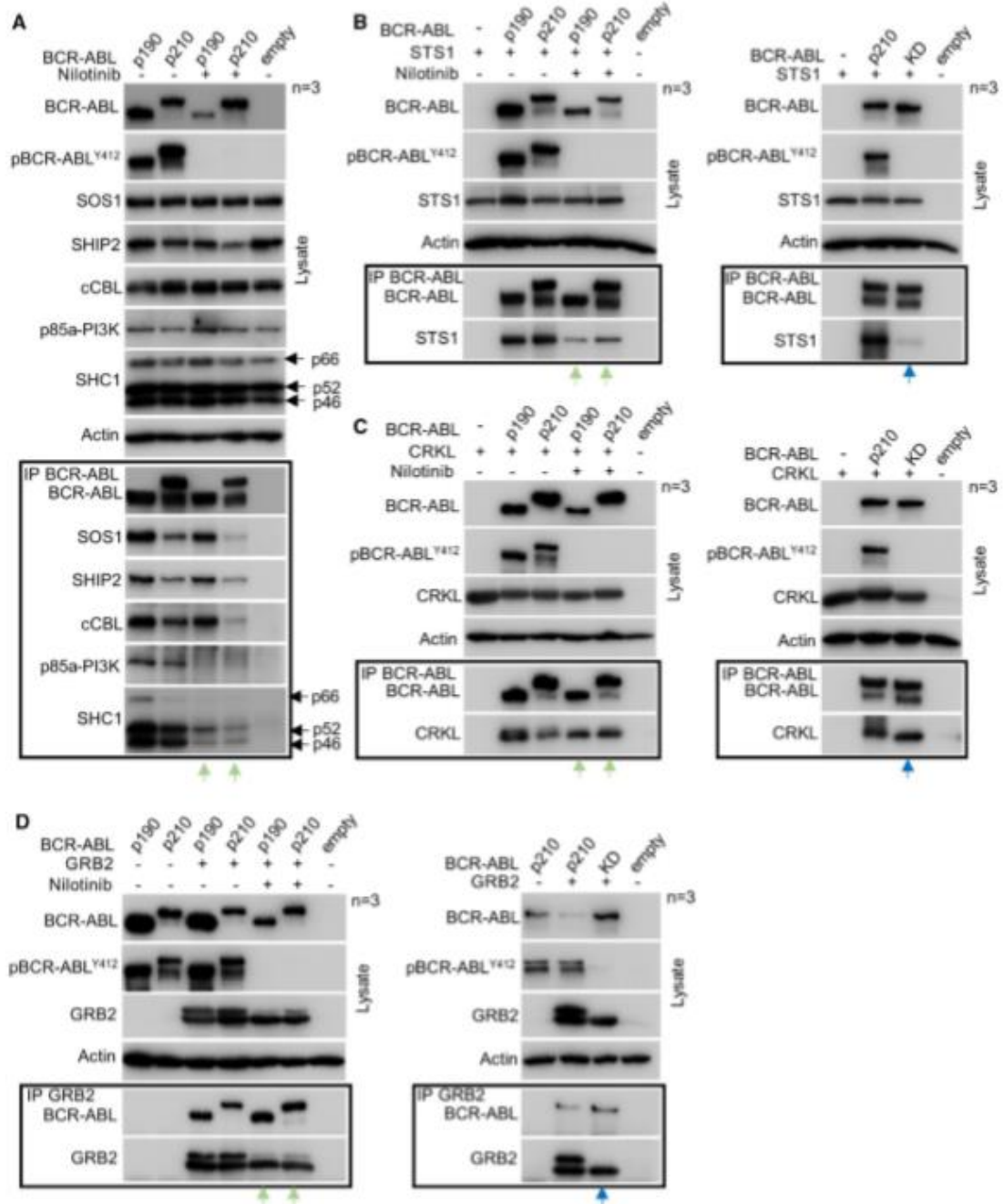
trans, non-transfected cells. **c** Merged second dimension BN-PAGE blots of cells transfected with BCR-ABL variants. The membranes have been probed sequentially for BCR-ABL, SHIP2 and GRB2, the BCR-ABL/SHIP2/GRB2 complexes are highlighted by yellow box. **(D)** Quantification of the percentage of bound GRB2 and SHIP2 to the BCR-ABL. Statistically significant differences are highlighted (Student's *t* test, \*\**p* < 0.01; n.s., not significant). Data are representative of three independent experiments

### Interaction of GRB2 with BCR-ABL

Secondary structure of p210 BCR-ABL features seven folded regions, namely the N-terminal coiled-coil (CC), double homology (DH), pleckstrin homology (PH), src homology domains SH3 and SH2, tyrosine kinase (TK) and F-actin binding (FAB) domains. Further, three intrinsically disordered regions (IDRs) are located between CC and DH (IDR1), PH and SH3 (IDR2), and TK and FAB domains (IDR3) (Figs. 4, 5a). To gain insight into the binding mode between BCR-ABL and its core complex partners, we used PepStar™ peptide microarray technology to mimic the interaction interface of BCR-ABL. To generate the peptide library, the BCR-ABL sequence was translated into 773 overlapping (with a sliding window of three amino acids) peptides (Fig. 5b). To account for the possibility of protein binding to phosphorylated sites in

BCR-ABL, phosphorylated peptides' analogs (corresponding to the known phosphorylation sites in BCR-ABL) were also included in the library. 13-mer peptides were spotted on microscopic glass plates in a form of microarrays, which were subsequently incubated with interacting protein of interest, and analyzed as described in "Materials and methods" (Fig. 5b). The peptide microarray approach is primarily suited for the identification of binding sites in intrinsically disordered regions (IDR) of a protein or binding sites that, despite being located in folded regions, have the characteristic of solvent-exposed linear motifs protruding from the structure. The peptide microarray approach was combined with conventional co-immunoprecipitation experiments, using a library of mutated and truncated (regional deletion) BCR-ABL constructs (Fig. 4).

Microarray data indicated that GRB2 binds to Y177 in BCR-ABL, and that this interaction is highly specific



for phosphorylated version of Y177; the same Y177 peptides lacking the phosphorylation showed no interaction with GRB2 (Fig. 5c). These results agree with previously

published work [22, 23] and showed that GRB2 binds directly to Y177. Furthermore, microarrays revealed two additional potential binding sites (labeled G2 and

**Fig. 3** The BCR-ABL signaling complex is preserved after nilotinib treatment. 293T cells were transfected with p190 and p210 BCR-ABL alone (a) or together with STS1 (b), CRKL (c) and GRB2 (d). BCR-ABL was immunoprecipitated (IP) and binding of interaction partners was analyzed by western blot. The SHC1 isoforms are indicated (p46, p52, p66). Empty, transfection with empty plasmid. BCR-ABL kinase activity was determined by detecting autophosphorylation (p) at Y412. Note the co-immunoprecipitation of SOS1, SHIP2, cCBL, SHC1, STS1, CRKL and GRB2 with BCR-ABL in cells treated with nilotinib (green arrows). Also note the co-immunoprecipitation of STS1, CRKL, and GRB2 with kinase-dead (KD) BCR-ABL (blue arrows). Data are representative of three independent experiments ( $n=3$ ). Actin serves as a loading control in cell lysates used for IP

G3) in IDR3 and at the interface between IDR3 and FAB domain, respectively (Figs. 5c; S4A). To verify these binding sites, we generated several truncated or mutated variants of p210 BCR-ABL (Fig. 4), and probed association of selected variants with V5-tagged GRB2 in 293T cells. Y177F substitution, mimicking non-phosphorylated Y177, completely abolished BCR-ABL binding to GRB2, as did deletion of N-terminal part of BCR-ABL containing Y177 (BCR-ABL-BT) (Fig. 5d; arrows). Interaction of KD BCR-ABL with GRB2 was largely limited, but still detectable.

The Y177 is known to be autophosphorylated by active BCR-ABL. However, Y177 can also be phosphorylated in trans by Src tyrosine kinases in KD BCR-ABL [27]. The phosphorylation of Y177 by other tyrosine kinases may thus allow GRB2 binding to TKI-inhibited BCR-ABL as shown by Fig. 3d. Deletion of IDR3 or FABD did not affect GRB2 binding (BCR-ABL- $\Delta$ IDR3; Fig. 5d). These data demonstrate that IDR3 or FAB domain is not essential for GRB2 association with BCR-ABL (Fig. 5h). The observation that GRB2 did not bind to construct expressing only IDR3 sequence (Fig. S3B, blue arrows) suggested that the binding sites identified by microarrays were either false positives or genuine binding sites, but too weak to sustain the stable interaction. Previous in vitro study [28] described three proline-rich GRB2-binding sites in IDR3 region: PR1 (aa 1425–1433), PR2 (aa 1466–1476) and PR3 (aa 1509–1517). Notably, we observed positive microarray signals for all these three binding sites. However, these binding sites were formally excluded from our analysis as they were defined by less than three consecutive peptides providing above-threshold signal, a stringent criterion used for interpretation of our microarray data. For the same reason, we did not consider at first binding sites in IDR1 (353–365) and IDR3 (1661–1676) that contained PxxxR motif similar to consensus binding motif of GRB2 C-terminal SH3 domain PxxxRxxKP [29] (Fig. S4B, Table S3; g4–g9). Despite their formal exclusion in the process of microarray data interpretation, all these

sites still need to be considered as candidate interaction sites.

Altogether, in agreement with previous studies, we show that GRB2 is direct interactor of BCR-ABL, and highlight the critical role of Y177 in mediating this interaction (Fig. 5h). We also confirmed the GRB2 association with PR regions in the IDR3 domain of BCR-ABL suggested before [29]. We further demonstrate that the latter interactions are not sufficient to mediate GRB2 association to BCR-ABL in the absence of phosphorylation at Y177.

### Interaction of cCBL with BCR-ABL

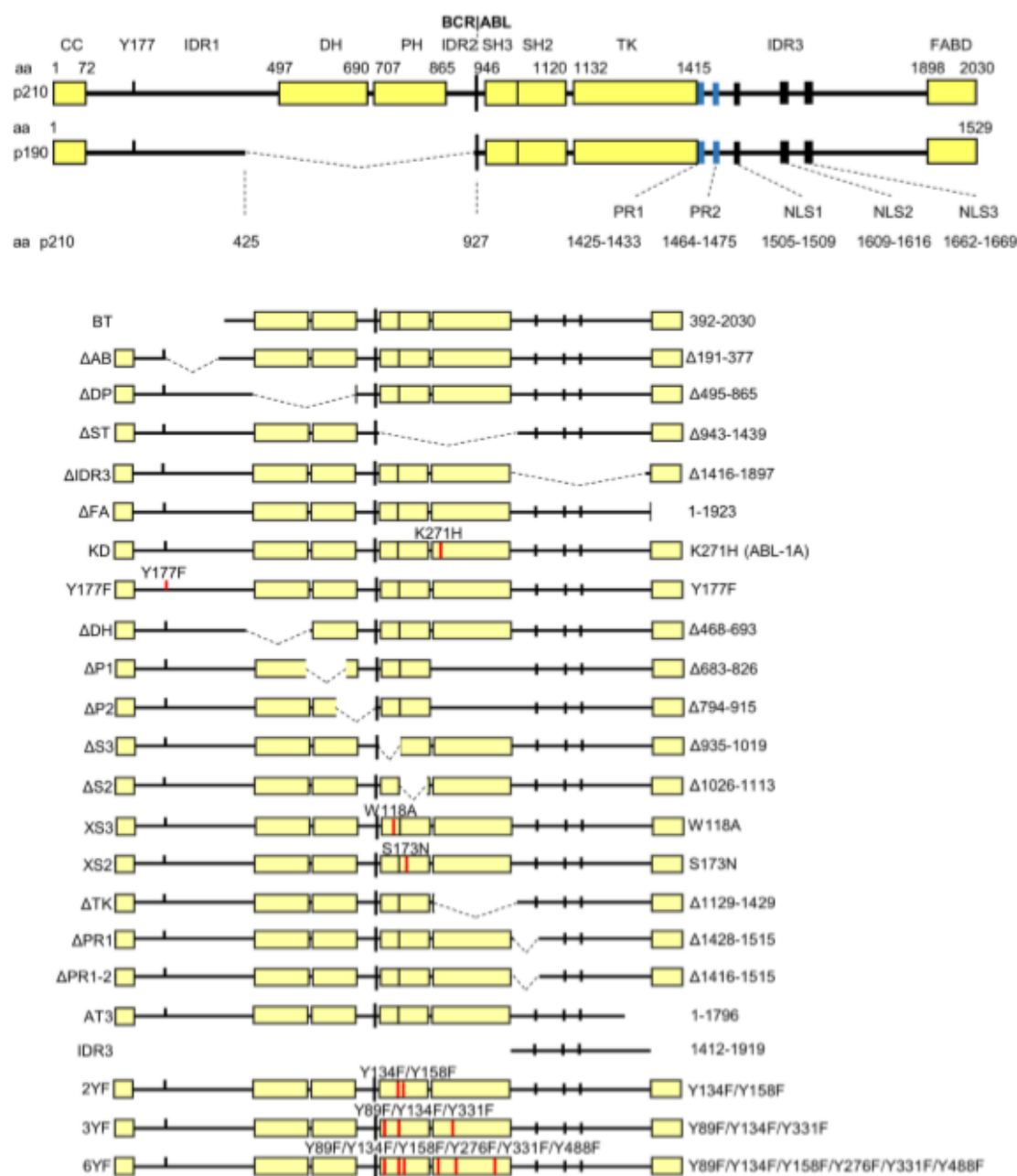
cCBL is an E3 ubiquitin ligase known to negatively regulate receptor tyrosine kinase (RTK) signaling [30]. It can also act as an adaptor protein recruiting PI3K towards active RTKs, which mediates the activation of PI3K-AKT pathway [31]. For cCBL, the peptide microarray data yielded no potential binding sites despite extensive optimization and use of two different recombinant cCBL proteins (Fig. S5). Co-immunoprecipitation of endogenous cCBL with BCR-ABL revealed that Y177F substitution or elimination of N-terminal region containing Y177 (BCR-ABL-BT) almost entirely abolished cCBL interaction with BCR-ABL (Fig. 5e). These data mirrored the GRB2 interaction data (Fig. 5d), suggesting that cCBL might bind BCR-ABL indirectly, i.e., via GRB2 (Fig. 5h). This explanation is supported by the observation of interaction between cCBL and GRB2 [32–35]. As demonstrated by GST-SH2 pulldown assays, cCBL has capacity to directly bind to SH2 domain of BCR-ABL [36]. However, deletion of BCR-ABL SH2 or triple mutant containing Y177F,  $\Delta$ SH2 and  $\Delta$ PR1/PR2 was found to lower, but not to completely abolish cCBL binding to BCR-ABL in 32D cells [37]. In support of these data, we show that the deletion of SH2 domain does not abrogate cCBL binding (Fig. 5f).

Taken together, our data indicate that cCBL binding to BCR-ABL is indirect, and is likely mediated by GRB2 binding to (auto)phosphorylated Y177 (Fig. 5h). Similar data were obtained for the other GRB2 partner, the SOS1 [38–41], which required both Y177 motif and kinase activity of BCR-ABL for association (Fig. 5f).

### Interaction of SHC1 with BCR-ABL

SHC1 is signaling adapter known to bind phosphotyrosines on various RTKs [42]. For SHC1, the peptide microarray data showed eleven putative binding sites. None of the identified binding sites contained phosphotyrosine(s) (Fig. S6; Table S4), suggesting an artifact because it is unlikely that protein with validated phosphotyrosine binding capacity would bind to such extent to non-phosphorylated sequences while omitting binding to their phosphorylated counterparts. In line with this discrepancy, deletion of





**Fig. 4** The variants of p210 BCR-ABL used in the study. Schematic representation of p190 and p210 BCR-ABL. All truncated or point-mutated p210 BCR-ABL constructs contain N-terminal FLAG epitope. The amino acid substitutions are indicated in red; *CC* coiled-coil domain, *DH* double homology domain, *PH* pleckstrin homology domain, *SH3*, *SH2* Src homology domain, *TK* tyrosine kinase

domain, *IDR* intrinsically disordered region, *FABD* F-actin binding domain, *NLS* nuclear localization signal, *PR* proline-rich region. The numbering of BCR-ABL domains follows the total protein length (2030 aa in p210), numbering of individual residues is relative to the position of given amino acid in the individual sequence of BCR or cABL1b, with the exception of K271H, which is based on cABL1a

IDR3, comprising of six putative SHC1-binding sites indicated by the microarray did not compromise SHC1 interaction with BCR-ABL (Fig. 5e), which marks the putative binding sites from microarray as false positives. The KD BCR-ABL, BCR-ABL- $\Delta$ ST variants did not bind SHC1, indicating that SHC1 binding depends on BCR-ABL kinase activity (Fig. 5e, blue arrows). Observation that deletion of TK domain almost entirely abolished SHC1 binding only corroborates this interpretation (Fig. 5f, blue arrows). Further, SHC1 did not interact with BT construct that lacks CC domain. This can be explained by a decrease in BCR-ABL kinase activity resulting from loss of CC domain, which is vital for oligomerization and subsequent activation of catalytically active BCR-ABL [43].

Deletion of PH domain decreased SHC1 association by ~30% (Fig. 5f, g). To evaluate the binding within the SH-TK region more precisely, we used individual deletions of SH3, SH2 and TK domains, as well as W118A substitution, which disables SH3 ability to bind proline-rich motifs (BCR-ABL-XS3) and S173N substitution, which disables the SH2 ability to bind phosphotyrosine motifs (BCR-ABL-XS2) [44, 45] (Fig. 4). Removal of TK domain abolished the interaction almost completely. The individual deletions  $\Delta$ SH3 and  $\Delta$ SH2 also decreased the SHC1 binding by ~30% (Fig. 5f, g), but their inactivation by point mutations (W118A or S173N) produced no effect.

Overall, our data suggest that BCR-ABL kinase activity is necessary for SHC1 binding. SH3 and SH2 domains appear to partially contribute to SHC1 binding, as well as PH domain (Figs. 5h, 6f). However, SHC1 binds less only to PH mutant, but not to BCR-ABL that lacks the whole DH-PH domain. It remains unclear whether PH domain is a direct binding site, as PH domains are known to target proteins to plasma membrane, it seems more plausible that the decreased interaction is caused by altered localization of the  $\Delta$ PH construct. Experiments carried out below indicate that SHC1 can bind also indirectly to BCR-ABL via SHIP2.

### Interaction of CRKL with BCR-ABL

CRKL adapter is a major substrate of BCR-ABL that is heavily phosphorylated in CML cells [46–48]. For CRKL, the microarray data indicated four potential binding sites, all localized into structured regions of BCR-ABL. These sites included phosphopeptides with tyrosines Y89 (C1), Y134 (C2), and Y331 (C3) in SH3 domain, SH3-SH2 linker, and TK domain, respectively. The fourth binding site was found in FAB domain (C4) (Figs. 6a, S7; Table S5). Previous studies showed that CRK binds to proline-rich motifs APELPT-KTR (PR1) and EPAVSPLLPRK (PR2) in IDR3 motif of cABL [28]. In the microarray, the peptides corresponding to the PR1 and PR2 sites were also positive (Fig. 6a, c5, c6, blue bars; Table S5). However, these sites were formally

not considered as binding sites because they were defined by less than three consecutive peptides providing above-threshold signal.

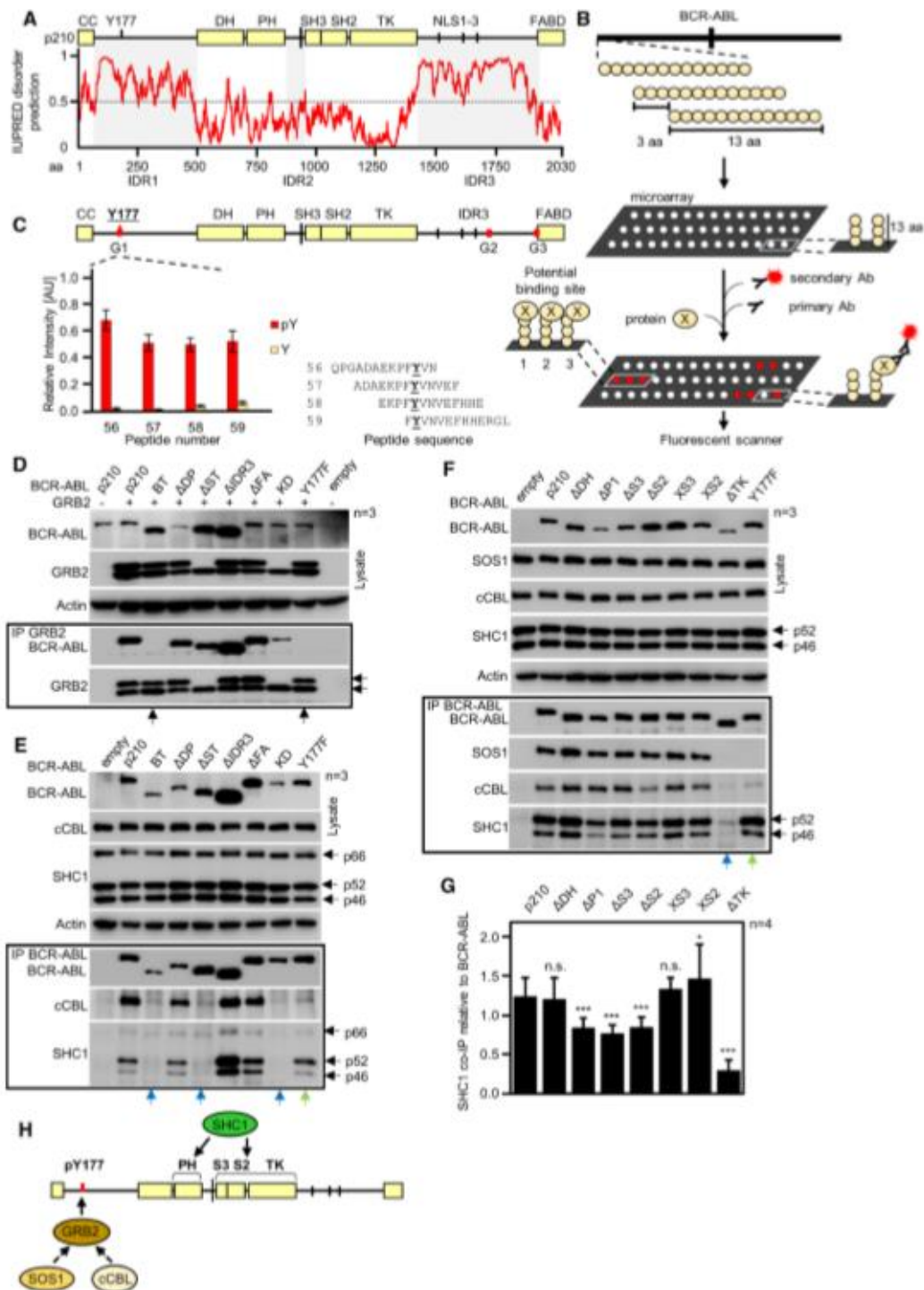
Next, we co-expressed CRKL along with BCR-ABL variants, and used co-immunoprecipitation to probe the interaction. Deletion of IDR3 domain (involving PR1 and PR2) eliminated binding to CRKL (Fig. 6b). Deletion of SH3-SH2-TK domains (BCR-ABL- $\Delta$ ST) also abolished interaction with CRKL. However, the fact that this deletion includes the PR1 site complicates interpretation. To narrow down the binding interface in IDR3, we used BCR-ABL constructs lacking both PR1 and PR2 sites ( $\Delta$ PR1,  $\Delta$ PR1-2); CRKL binding on these mutants was reduced by 40–50% (Fig. 6b, c; arrows).

To assess the importance of phosphorylated tyrosines Y89, Y134 (localized in SH3 domain) and Y331 for interaction between CRKL and BCR-ABL, the triple mutant with all three tyrosines changed for phenylalanines was generated (BCR-ABL-3YF). Binding of this mutant to CRKL was not affected (Fig. 6b), which is at variance with the microarray data (Figs. 6a, S7; Table S5). However, an individual deletion of SH3 and SH2 domains had small but significant effect on CRKL binding, which was reduced by 10–20% (Fig. 6b, c), suggesting contribution of SH domains to CRKL binding. Removal of BCR-ABL TK domain (involving also PR1) showed significant reduction in CRKL binding, comparable to removal of PR1 and PR1-2 (Fig. 6b). The interaction with FAB domain, identified by microarray, was not confirmed by co-immunoprecipitation (Fig. 6b, c). Altogether, we confirm CRKL as a direct BCR-ABL interactor (Fig. 6f). Furthermore, we provide support for involvement of proline-rich motifs PR1 and PR2 in BCR-ABL interaction with CRKL, as suggested before for CRK [28].

### Interaction of SHIP2 with BCR-ABL

SHIP2 is an inositol phosphatase which converts phosphatidyl inositol triphosphates PI(3,4,5)P<sub>3</sub> to PI(3,4)P<sub>2</sub>. SHIP2 associates with BCR-ABL, and is constitutively phosphorylated in primary CML cells or in BCR-ABL-expressing cells [21, 49, 50]. For SHIP2, the microarray data revealed thirteen potential binding sites located in structured domains, with an exception of the site SH1 corresponding to Y177 (Figs. 6d, S8; Table S6). Putative binding sites SH2-SH4 located in DH-PH domains. Binding sites SH5-SH12 in the SH3-SH2-TK region included tyrosines Y89, Y134, Y158, Y276, Y331 and Y488; SH13 was located in FAB domain. Preferential SHIP2 interaction with phosphorylated tyrosine was found for Y134, Y158, Y276, Y331 and Y488 (Fig. 6d).

Next, the selected BCR-ABL constructs were co-expressed with SHIP2 in 293T cells, and subjected to BCR-ABL co-immunoprecipitation. Deletion of SH3-SH2-TK domains essentially abolished interaction



**Fig. 5** Interaction of GRB2, SOS1, cCBL, and SHC1 with BCR-ABL. **a** Secondary structure prediction of p210 BCR-ABL by IUPRED. Values above 0.5 indicate disordered regions IDR1 and IDR3 on the BCR-ABL N- and C-termini, involving Y177 and three NLS, respectively. Smaller disordered region IDR2 is located between domains PH and SH3. **b** Scheme of the microarray analysis. Thirteen amino acid long peptides corresponding to the primary sequence of p210 BCR-ABL were spotted on microarrays, incubated with protein of interest, primary and fluorescently labeled secondary antibodies, and scanned. Fluorescence intensity values for each spot were used to indicate the binding of protein to BCR-ABL peptides. **c** Microarrays indicate direct binding of GRB2 to phosphorylated Y177. Red lines on BCR-ABL scheme indicate potential binding sites. Graph shows averaged relative intensities for phosphorylated (red) and non-phosphorylated peptides involving peptides with Y177. Error bars indicate SD from three technical replicates shown in Fig. S2. **d** Co-immunoprecipitation (Co-IP) of BCR-ABL with GRB2 after expression in 293T cells; Y177F substitution abrogates GRB2 association with BCR-ABL as well as deleting the region (construct BT, bottom arrows). Side arrows indicate electrophoretic mobility shift GRB2 phosphorylated by BCR-ABL. **e, f** Co-immunoprecipitation of endogenous cCBL, SHC1 and SOS1 with transfected BCR-ABL in 293T cells. Please note the compromised SHC1 binding on BCR-ABL-BT, - $\Delta$ ST, - $\Delta$ TK and KD variants (blue arrows). Y177F abrogates binding of SOS1 and largely limits the binding of cCBL (green arrows). Data are representative of three independent experiments ( $n=3$ ). **g** Quantification of SHC1 co-IP with BCR-ABL constructs from (f). SHC1 was normalized to BCR-ABL levels, error bars indicate SD from four independent experiments. Statistically significant differences are indicated (Student's  $t$  test, \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ ; ns non-significant). **h** Scheme of the proposed interaction. GRB2 binds directly to phosphorylated Y177 and recruits SOS1. cCBL also requires GRB2 for recruitment. SHC1 requires TK domain and pleckstrin homology (PH) domain for binding

with SHIP2, similar to KD mutant (Fig. 6e; arrows). The Y177F substitution, as well as the deletion of DH-PH, IDR3 and FABD domains, had no effect on the interaction between BCR-ABL and SHIP2 (Fig. 6e). In contrast to the deletion of TK domain, which abolished the binding almost completely (Fig. 6e; right panel, arrow), deletions of SH3 and SH2 ( $\Delta$ S3,  $\Delta$ S2) had no effect on SHIP2 association with BCR-ABL (Fig. 6e, right panel). To address the importance of tyrosines within the SH3-SH2-TK domains, we created BCR-ABL mutant in which six tyrosines, implicated by the microarray, were mutated to phenylalanines (Y89F, Y134F, Y158F, Y276F, Y331F and Y488F) (BCR-ABL-6YF). SHIP2 and BCR-ABL-6YF co-immunoprecipitated normally (Fig. 6e, right panel) suggesting that phosphorylation at these sites is not critical for SHIP2 binding.

Interestingly, SHC1 interacted with BCR-ABL variants in a pattern similar to SHIP2 (Fig. 6e), suggesting cooperation between SHIP2 and SHC1 in BCR-ABL binding. The fact that BCR-ABL- $\Delta$ TK partially binds SHIP2 but not SHC1, however, demonstrates that SHIP2 binding to BCR-ABL is not dependent on SHC1 (Fig. 6f). Overall, we show that SHIP2 interacts with BCR-ABL directly, and that this interaction depends, to some extent, on catalytic activity of BCR-ABL. In contrast to the previous study indicating

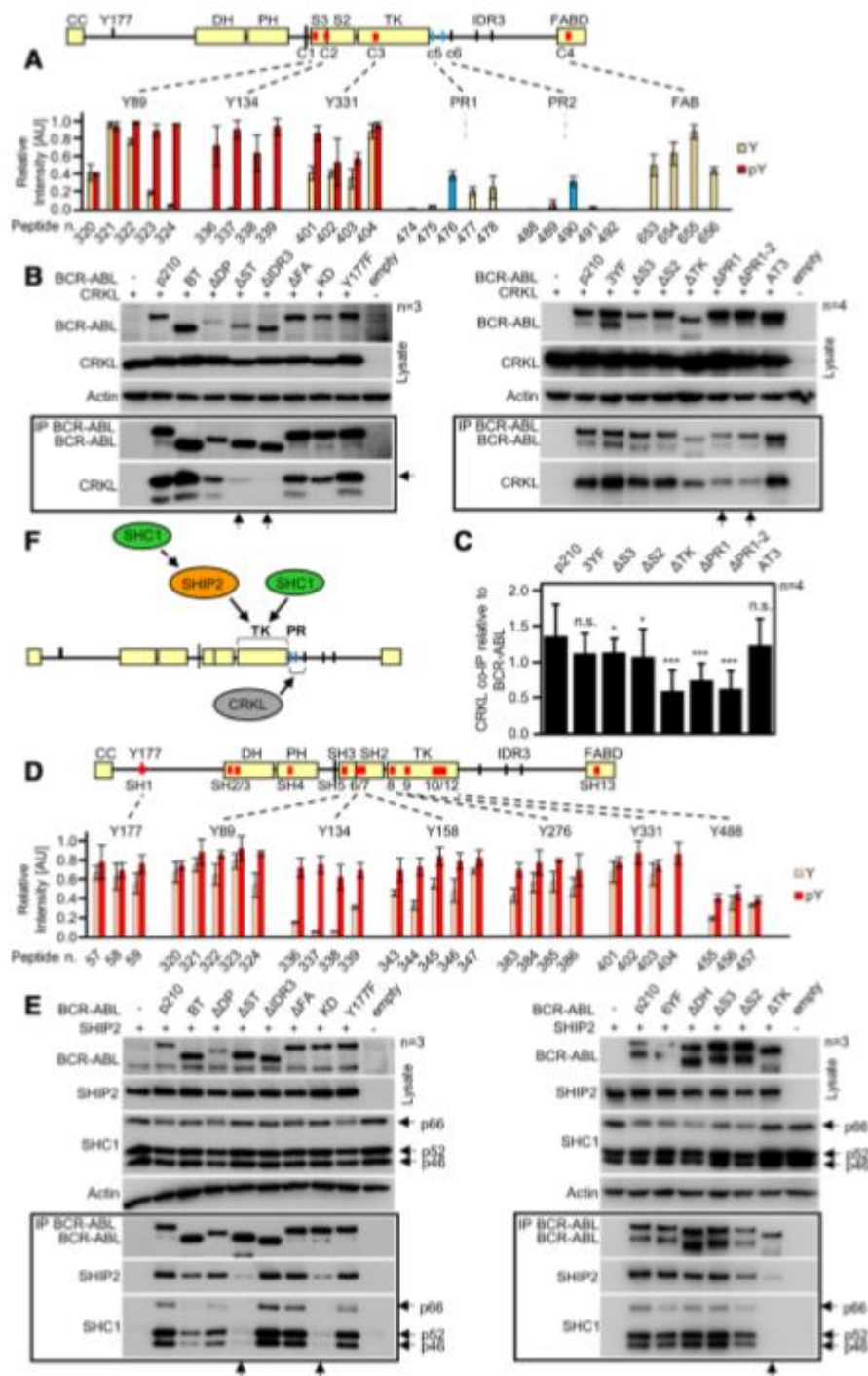
importance of SH3-SH2 for SHIP2 binding [50], our data highlight important role of BCR-ABL TK domain in mediating this interaction.

### Interaction of p85a-PI3K and STS1 with BCR-ABL

p85a is a regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Inhibiting p85a-PI3K expression or PI3K activity leads to inhibition of growth in BCR-ABL positive cells, demonstrating that PI3K contributes to oncogenic signaling of BCR-ABL [5, 51]. The microarray analysis revealed two potential p85a-PI3K binding sites on BCR-ABL, i.e., phosphotyrosines Y134 (p85a-1) and Y158 (p85a-2), located in the SH3 and SH2 domains, respectively (Figs. 7a, S9; Table S7). Double substitution of Y134F and Y158F (BCR-ABL-2YF) had no effect on p85a-PI3K binding, suggesting that phosphorylation at these tyrosines is not critical for p85a-PI3K interaction with BCR-ABL (Fig. 7b).

In contrast to microarray data, co-immunoprecipitation experiments showed decreased p85a-PI3K binding to all tested BCR-ABL variants (Fig. 7c). In particular, deletion of SH3-SH2-TK domain containing Y134 and Y158 ( $\Delta$ ST) and KD BCR-ABL almost completely lost capacity to interact with p85a-PI3K. This complex mode of p85a-PI3K binding to BCR-ABL likely stems from the ability of p85a-PI3K to bind multiple components within the BCR-ABL complex, namely SHC1, cCBL, GAB2 and CRKL [52] (Fig. 7f). The co-immunoprecipitation experiments suggest that p85a-PI3K binding to BCR-ABL is indirect, mediated by other BCR-ABL interactors (Fig. 7f). Interestingly, we found about 50% reduction of p85a-PI3K binding to BCR-ABL with Y177F substitution (Fig. 7c). The Y177 was shown before to recruit p85a-PI3K via GAB2 [53].

STS1 is a tyrosine phosphatase which dephosphorylates BCR-ABL and thus is a negative regulator of BCR-ABL signaling [54]. Microarray data showed no specific association of STS1 with BCR-ABL, despite optimization and use of two different recombinant STS1 proteins (Fig. S10). Co-immunoprecipitation experiments demonstrate preferential STS1 association with p210 BCR-ABL, as p190 BCR-ABL showed ~50% less binding when compared to p210 (Fig. 7d, arrow). Decreased STS1 binding on p210 BCR-ABL with removed DH and PH domains ( $\Delta$ DP) was also found. Deletion of PH domain only did not affect STS1 binding, suggesting that the entire region missing in p190 (aa 425-927) is necessary for STS1 interaction (Fig. 7d). These findings are in agreement with published proteomic data, which report preferential association of STS1 with p210 [55, 56]. However, it was shown that inactivating substitutions in PH domain of p210 lower interaction of STS1 in BaF3 cells [57]. In our hands, deleting PH domain did not significantly change binding to STS1 (Fig. 7d). We further show that kinase activity of BCR-ABL is essential



**Fig. 6** Interaction of CRKL and SHIP2 with BCR-ABL. **a** BCR-ABL scheme with red lines indicating potential CRKL binding sites identified by microarray. Graph shows binding intensities for phosphorylated (red) and non-phosphorylated peptides; strong binding is shown for phosphorylated Y89, Y134 and Y331. Sites c5 (PR1) and c6 (PR2) are not formally considered; however, blue bars indicate positive binding for respective peptides. **b** Co-immunoprecipitation (co-IP) of BCR-ABL with CRKL in 293T cells. Deletion of IDR3 and both PR1 and PR2 sites (constructs  $\Delta$ PR1 and  $\Delta$ PR1-2) limits the interaction of CRKL with BCR-ABL (arrows). Substituting Y89, Y134 and Y331 to phenylalanines (3YF) produced no effect on CRKL binding. **c** Quantification of CRKL co-IP with BCR-ABL constructs from (b, right panel). CRKL was normalized to BCR-ABL levels, error bars indicate SD from four independent experiments ( $n=4$ ). Statistically significant differences are indicated (Student's *t* test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ; n.s., non-significant). **d** Microarray analysis of SHIP2 binding to BCR-ABL shows multiple binding sites in the SH3-SH2-TK domains, association with the tyrosine-phosphorylated motifs is indicated in red. Binding site for Y488 was obtained in independent experiment and, therefore, different threshold applied to this site. **e** Immunoprecipitation of BCR-ABL constructs with SHIP2 in transfected 293T cells. Deletion of SH3-SH2-TK ( $\Delta$ ST), or TK domain ( $\Delta$ TK) limits SHIP2 binding (arrows). Substituting Y89, Y134, Y158, Y276, Y331 and Y488 to phenylalanines (6YF) has no effect on SHIP2 binding. SHC1 associated with BCR-ABL in a manner similar to SHIP2, suggesting mutual interaction. **f** Scheme of proposed interaction. CRKL binds to region containing PR1 and PR2. SHIP2 binds to the TK region of ABL and also recruits SHC1 to BCR-ABL. *n* number of independent experiments

for STS1 binding, as kinase-inactive KD BCR-ABL and BCR-ABL- $\Delta$ ST showed significantly reduced STS1 binding (Fig. 7e). Altogether, our data point to the involvement of DH and PH domains in binding of STS1 to BCR-ABL and suggest that BCR-ABL catalytic activity is required for this interaction (Fig. 7f).

### SHIP2 is required for BCR-ABL-mediated phosphorylation of SHC1

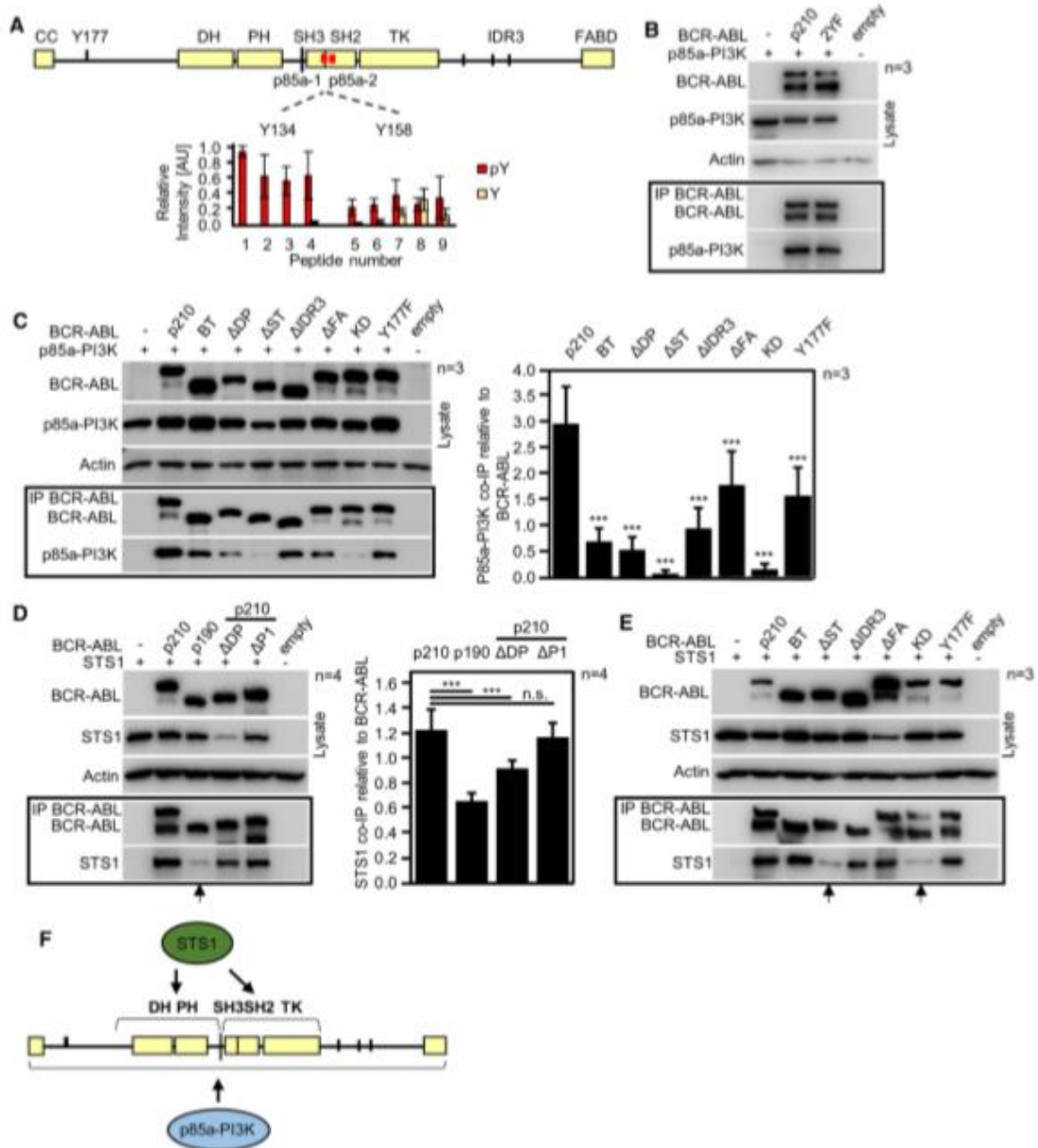
Because the precise role of SHIP2 in BCR-ABL signaling has not been established, we deleted endogenous SHIP2 by CRISPR/Cas9 in 293T cells (SHIP2<sup>Crisepr</sup> cells), transfected these cells with BCR-ABL, and determined the effect of SHIP2 loss on BCR-ABL-mediated signaling. In contrast to wild-type 293T cells, SHIP2<sup>Crisepr</sup> cells could not phosphorylate SHC1 on Y239 and Y240 (Fig. 8a; arrows). Add-back of wild-type SHIP2 into the SHIP2<sup>Crisepr</sup> cells rescued SHC1 phosphorylation. However, co-transfecting catalytically inactive SHIP2 (phosphatase-dead, PD) only partially rescued SHC1 phosphorylation, suggesting that SHIP2 catalytic activity is important for BCR-ABL-mediated SHC1 phosphorylation (Fig. 8b). As SHIP2 and SHC1 are known interactors [50], we tested whether SHC1 interacts with BCR-ABL in SHIP2<sup>Crisepr</sup> cells. SHC1 interacted with BCR-ABL normally in SHIP2<sup>Crisepr</sup> cells (Fig. 8c). Lack of SHC1 phosphorylation in SHIP2<sup>Crisepr</sup> cells is, therefore, not

caused by defective recruitment of SHC1 to BCR-ABL. To validate the importance of SHIP2 catalytic activity in BCR-ABL signaling, we tested the effect of specific SHIP2 chemical inhibitor AS1949490 [58] on proliferation of CML cell lines K562, LAMA-84 and KYO-1. Treatment with AS1949490 inhibited proliferation in all three cell lines (Fig. 8d).

### Conclusions

The BCR-ABL complex initiates signaling, governs the usage of downstream pathways and integrates BCR-ABL signal to processes ongoing in the cell. A precise mapping of the structure of BCR-ABL signaling complex is, therefore, essential for understanding the BCR-ABL function. Yet the in-cell characterization of protein-protein interactions within the complex does not always provide precise information about the hierarchy of these interactions. For instance, the co-immunoprecipitation of BCR-ABL with given interactor is the main approach to prove in-cell association, at the endogenous or forced levels of protein expression and without artifacts generated in cell-free systems (i.e., absence of competing interactors, excess of both partners, spatiotemporal aspects, solvents promoting interaction, and others). Successful co-immunoprecipitation, however, does not prove direct contact, because the whole signaling complex is pulled down, and thus the purified protein may be recruited to BCR-ABL via association with other interactors. This is a common theme in signaling, complicating data interpretation. For instance, recruitment of p85a-PI3K to the BCR-ABL complex may be direct, or maybe mediated by CRKL, GAB2, cCBL and SHC1 instead (Fig. 7f) [53, 59, 60].

Equally important to composition is dynamics of the complex, which allows for response to changing intracellular conditions during cell proliferation and differentiation, integration of BCR-ABL signaling to other signaling pathways, and adaptation and resistance of BCR-ABL signal to inhibitors, such as TKIs. In light of these facts, a detailed characterization of BCR-ABL interaction with GRB2, SHC1, cCBL, CRKL, STS1, p85a-PI3K and SHIP2 carried out here may only serve as basic reference, as it does not appreciate nor address the dynamics of the complex. The modes of interaction of individual signaling mediators with BCR-ABL are likely to be more complex and diverse in terms of the exact mechanism. This opens up a question of dispersity of BCR-ABL complexes, i.e., simultaneous co-existence of complexes of different composition, demonstrated by Figs. 1a, S1A, S2A (BCR-ABL blots). As shown here, several core complex members compete for the same domains when associating with BCR-ABL, suggesting that qualitatively different BCR-ABL complexes exist in a given



cell at the same time. As this aspect of BCR-ABL function is poorly explored, the following research should address the quantitative differences in composition of BCR-ABL complexes.

We demonstrate that the core complex members associate with BCR-ABL in cells treated with TKI or with BCR-ABL inactive due to the KD mutation. This suggests that kinase

activity of BCR-ABL is not necessary for the formation of signaling complex. The exact mechanism of recruitment on inactive BCR-ABL is likely to be different for different members of the core complex. Some proteins do not require phosphorylated motifs on BCR-ABL, and thus may associate regardless of BCR-ABL activity, while other interactors may rely on motifs phosphorylated, on inactive BCR-ABL,

**Fig. 7** Interaction of p85a-PI3K and STS1 with BCR-ABL. **a** BCR-ABL scheme with potential p85a-PI3K binding sites identified by peptide microarray. Graph shows intensities for phosphorylated (red) and non-phosphorylated peptides containing Y134 and Y158. **b** Immunoprecipitation (IP) of BCR-ABL with p85a-PI3K in 293T cells. Substitutions of Y134 and Y158 to phenylalanines (2YF) had no effect on p85a-PI3K interaction with BCR-ABL. Empty, cells transfected with empty plasmid. **c** Deletion of SH3, SH2 and TK domains ( $\Delta$ ST) abolishes p85a-PI3K interaction with BCR-ABL, similar to KD BCR-ABL. Graph, quantification of p85a-PI3K co-immunoprecipitation with BCR-ABL constructs. p85a-PI3K was normalized to BCR-ABL levels, error bars indicate SD from three independent experiments ( $n=3$ ). Statistically significant differences are indicated (Student's *t* test, \*\*\* $p < 0.001$ ; n.s., non-significant). **d**, **e** Immunoprecipitation of BCR-ABL with STS1. p190 BCR-ABL and  $\Delta$ DIP mutant of p210 BCR-ABL show impaired interaction with STS1. Deletion of SH3, SH2, and TK domains ( $\Delta$ ST) also impairs BCR-ABL interaction with STS1. Statistically significant differences are indicated (Student's *t* test, \*\*\* $p < 0.001$ ; n.s., non-significant). **f** Scheme of the proposed interaction. p85a-PI3K interacts with multiple domains of BCR-ABL, whereas STS1 requires for association the SH3-SH3-TK domains and DH-PH domains (absent in p190 BCR-ABL). Data are representative for 3-4 independent experiments ( $n$ )

by other cellular kinases. For instance, although Y177 is autophosphorylated, it can also be phosphorylated by SRC-family kinases [27, 61], creating a GRB2-binding site on kinase-inactive BCR-ABL. The formation of kinase-inactive BCR-ABL complex underlies the residual signaling of inactive BCR-ABL in CML cells treated with TKI. Understanding of these mechanisms is essential for the development of novel therapeutic approaches for CML.

## Materials and methods

### Cell culture, vectors, transfection and CRISPR/Cas9

293T cells were obtained from ATCC, and propagated in DMEM media, supplemented with 10% FBS and antibiotics (ThermoFisher). CML cell lines K562 were obtained from ECACC, LAMA-84 and KYO-1 were obtained from DSMZ. CML cells were propagated in RPMI1640 supplemented with 10% FBS and antibiotics (ThermoFisher). All expression vectors are listed in Table S1. Cells were transiently transfected using FuGENE HD, according to the manufacturer's protocol (Promega). p210 isoform b3a2 and p190 BCR-ABL sequences (isoform b3a2) were cloned into pCR3.1 vector with N-terminal FLAG tag. Polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis was used to generate all BCR-ABL variants. GRB2 (RC200469), p85a-PI3K (RG210544) and SHIP2 (RC214716) vectors were obtained from Origene, CRKL (HG11261-CH) and STS1 (HG13868-NF) vectors were obtained from Sino Biological. Their coding sequences were subcloned into modified pCMV6 entry vector, where C-terminal Myc-DDK tag was replaced by HIS-V5 tag using a NEBuilder HiFi DNA assembly kit (New

England Biolabs). SHIP2 deletion in 293T cells was carried out by CRISPR/Cas9 technology [62]. CHOPCHOP tool was used to design sgRNAs for a pair of SpCas9n (D10A) nickases, which targeted 5'-CGATGGCAGCTTCCTGGTCC-3', 5'-GCGCTCTGCGTCTGTGAGT-3' sites in the first exon of the SHIP2 gene [63]. Successful targeting disrupted the open reading frame of SHIP2, which was detected as loss of SHIP2 in individual clones by western blot. Targeted locus was PCR amplified using 5'-CCGGGCGGC CGCGGAGGAG-3', 5'-TCTGGCGTCCCACCGCCCCAG AAAC-3', inserted into pGEM T-Easy vector (Promega) and sequenced for determination of SHIP2 genotype.

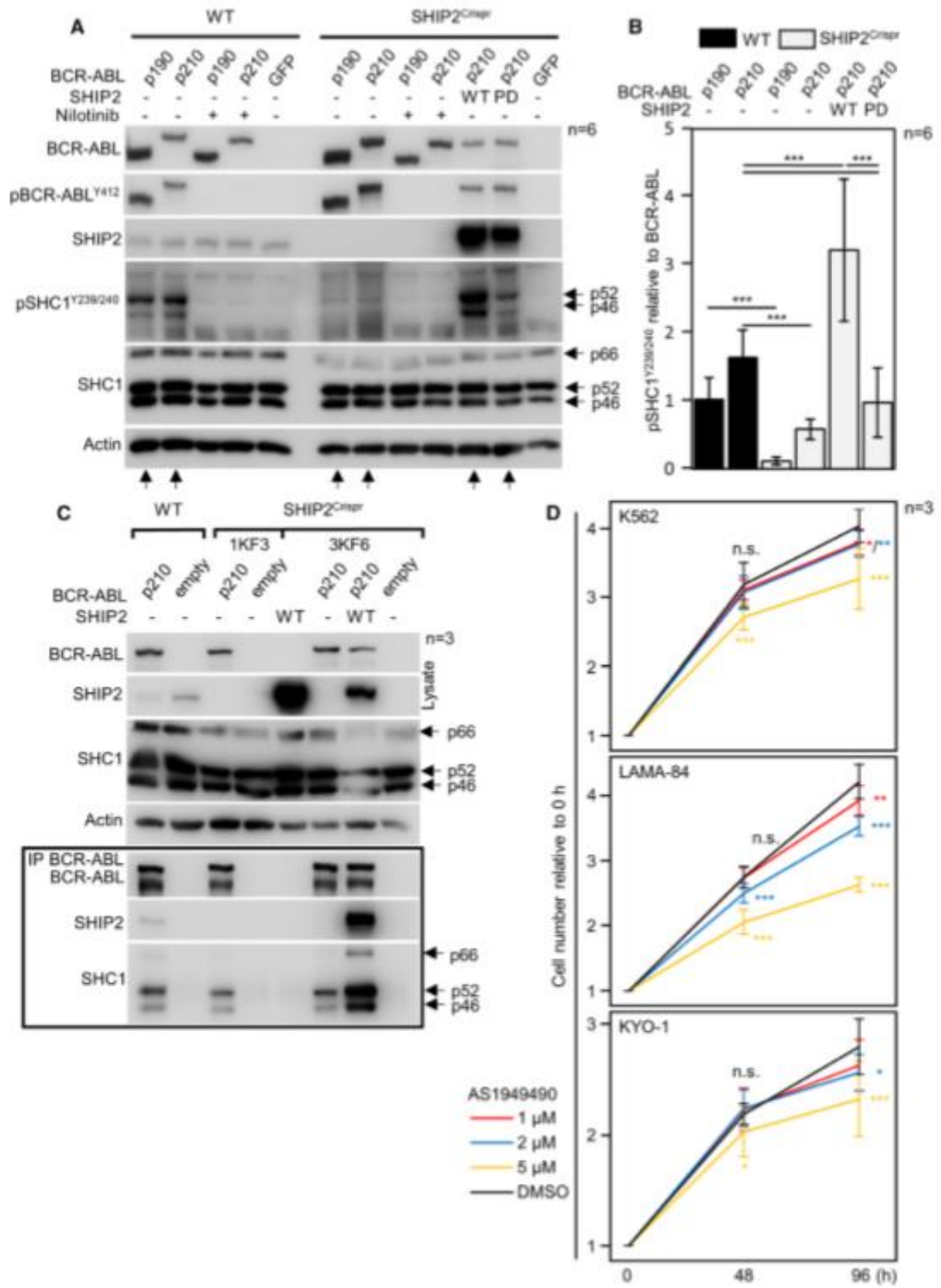
### Western blot and immunoprecipitation (IP)

Cells were lysed for 30 min at 4 °C in lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 2 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and protease inhibitors (Roche). For IP, 25  $\mu$ l of Dynabeads protein G (ThermoFisher) were bound to FLAG antibody (F1804, Sigma-Aldrich) or V5 antibody (R96025, Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Immunocomplexes were collected overnight at 4 °C. Proteins attached to the beads were eluted to 2 $\times$  Laemmli buffer. For western blot, samples were resolved by SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane, and visualized by chemiluminescence using Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific), Immobilon Western (Millipore), Clarity (BioRad) or SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific) substrates. Table S2 lists all antibodies used in the study.

### Gradient ultracentrifugation, BN-PAGE and proximity ligation assay (PLA)

The gradient ultracentrifugation was done as described before [64]. Briefly, the native cell lysates (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Igepal CA-630, 1 mM EDTA, pH 8, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; proteinase inhibitors) were loaded on 15–40% sucrose gradient (1 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>; proteinase inhibitors), and centrifuged at 40,000 rpm/4 °C/16 h using SW 40 Ti rotor (Beckman Coulter). Approximately 18 fractions were collected from each gradient, the proteins were precipitated with 10% TCA, dissolved in 2 $\times$  Laemmli buffer and boiled. The respective fractions, as well as the cell lysates collected before ultracentrifugation were resolved by western blot, and co-sedimentation of the endogenous interaction partners with expressed BCR-ABL was analyzed by densitometry (ImageJ; <http://imagej.nih.gov/ij/>). To quantify western blots shown in Fig. 1a, the relative abundance of each of the proteins in the dominant p190 BCR-ABL fractions (#6 in control and #5 in nilotinib treated cells) was calculated by densitometry of all fractions, and plotted. As





**Fig. 8** SHIP2 is required for BCR-ABL-mediated phosphorylation of SHC1. **a**, **b** Wild-type (wt) 293T cells and cells with SHIP2 deleted by CRISPR/Cas9 (SHIP2<sup>CRISPR</sup>) were transfected by BCR-ABL, and analyzed for presence and phosphorylation (p) of given proteins by western blot. In contrast to wt cells, BCR-ABL could not phosphorylate SHC1 in SHIP2<sup>CRISPR</sup> cells. Addition of wt SHIP2 into the SHIP2<sup>CRISPR</sup> cells fully rescued BCR-ABL-mediated SHC1 phosphorylation, while the addition of catalytically inactive (phosphatase-dead, PD) had only minor effect. Same results were obtained with two independent SHIP2<sup>CRISPR</sup> cell lines (not shown). **b** Quantification of SHC1 phosphorylation in **(a)**, normalized to BCR-ABL levels. Bars represent averages from six experiments (*n*) with indicated SD, statistically significant differences are indicated (Student's *t* test, \*\*\**p* < 0.001). **c** SHC1 interacts with BCR-ABL in SHIP2<sup>CRISPR</sup> 293T cells. BCR-ABL was transfected to wt and two clones of SHIP2<sup>CRISPR</sup> 293T cells (1KF3, 3KF6), and immunoprecipitated (IP). SHC1 co-immunoprecipitates with BCR-ABL in SHIP2<sup>CRISPR</sup>, suggesting that lack of SHC1 phosphorylation in SHIP2<sup>CRISPR</sup> cells is not due to loss of interaction with BCR-ABL. Data are representative for 3 independent experiments (*n*). **d** K562, LAMA-84 and KYO-1 cells were seeded at 500 cells/μl, and treated with AS1949490 or DMSO. Cells were counted 48 and 96 h after treatment. Data represent averages ± SD from three independent experiments (*n*), with two technical replicates for each treatment. Statistically significant differences are indicated (Student's *t* test, \**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001)

only proteins saturated on BCR-ABL were analyzed, any peaks exceeding the relative optical density of 1 (red dashed lines) after treatment with nilotinib would suggest dissociation of the protein from the BCR-ABL complex, as observed with GRB2. Analogically, the peak of p85a-PI3K above 1 in control cells and the absence of the protein in heavier BCR-ABL fractions suggest that not all BCR-ABL complexes involve p85a-PI3K. The BN-PAGE was carried out as described before [64]. The native cell lysates have been loaded on 4–15% native gels, after the native electrophoresis the lane sample strips were excised from the gel, denatured and resolved in 12% SDS-PAGE gels. For Duolink<sup>®</sup> PLA (Sigma), cells were fixed in paraformaldehyde, post-fixed in ice-cold methanol and stained according to the manufacturer's protocol. Mouse FLAG (F1804; Sigma) and Goat V5 (sc-83849; Santa Cruz) antibodies were used for PLA; rabbit anti-c-ABL (2862S; Cell Signaling) was used to counterstain the transfected cells. Secondary antibodies conjugated with AlexaFluor488/594 were from Invitrogen. PLA counting analysis was done in Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>) using maximum projections of Z-stacks.

### Peptide microarrays

Pepstar<sup>™</sup> microarray technology (JPT Peptide Technologies) was used to identify sites in BCR-ABL involved in the binding of individual core complex interactors. Peptide library was generated by dividing the entire p210 BCR-ABL protein sequence into 13-aa-long peptides (674) with ten residues overlapping between neighboring peptides. Peptides were synthesized and immobilized on a glass slide.

To account for phosphorylations at known BCR-ABL sites, namely Y177, Y328, S354, Y360 in BCR and Y89, Y134, Y147, Y158, Y191, Y204, Y234, Y245, Y251, Y272, Y276, Y331, Y412, Y488, S465, S637–638, T754 in cABL1b, phosphorylated versions of the 99 corresponding peptides were also included in the microarrays. For each experiment, experimental and control microarrays were processed in parallel. Arrays were incubated with recombinant interactors. GRB2 (TP300469), SHC1 (TP304362), STS1 (TP303523), CRKL (TP308129) and cCBL (TP314069) were obtained from Origene, SHIP2 (P09-20G-10) and p85a-PI3K (P31–30H) were obtained from SignalChem. Signal was developed by incubation of arrays with primary antibodies against GST (G1160), FLAG (F1804, Sigma-Aldrich) and HIS (sc-8036, Santa Cruz) and secondary, Cy-5-coupled antibody (715-175-151, Jackson ImmunoResearch). Arrays were scanned using InnoScan 1100 AL fluorescence scanner and data were analyzed by Mapix software (Innopsys). Each microarray slide contained three entire peptide libraries, which were analyzed as technical replicates. Fluorescence intensities were plotted as a function of the peptide number (BCR-ABL primary sequence). First, the intensities from all spots in the control microarray were used to calculate the arithmetic average ( $\langle I_c \rangle$ ) and the standard deviation ( $\sigma_c$ ). If a signal intensity for a peptide spot in the control microarray exceeded the value of ( $\langle I_c + 1 \cdot \sigma_c$ ) in all three replicates, the respective peptide (microarray spot) was excluded from further analysis. Subsequently, fluorescence intensities in negative control microarrays were subtracted from values in experimental microarrays and these values were used for all further analyses. To allow direct comparison of fluorescence intensities from the three technical replicates, relative fluorescence intensities for each peptide were calculated by dividing each signal by the biggest value in the respective microarray. Finally, relative fluorescence intensities from the three replicates were averaged, plotted as a function of the peptide number (BCR-ABL primary sequence) and arithmetic average ( $\langle I_{IR} \rangle$ ) and standard deviation ( $\sigma_{IR}$ ) were calculated from the averaged fluorescence intensities. Potential binding site in the microarray was considered when at least three consecutive peptides exceeded ( $\langle I_{IR} + 1 \cdot \sigma_{IR} \rangle$ ) in all replicates.

**Acknowledgements** This study was supported by Agency for Healthcare Research of the Czech Republic, project NV15-34405A. AN was supported by European Regional Development Fund OP RDE Project no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000729.

### References

1. Zhao X, Ghaffari S, Lodish H et al (2002) Structure of the BCR-ABL oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol* 9:117–120. <https://doi.org/10.1038/nsb747>

2. Hantschel O (2012) Structure, regulation, signaling, and targeting of Abl kinases in cancer. *Genes Cancer* 3:436–446. <https://doi.org/10.1177/1947601912458584>
3. Voncken JW, Kaartinen V, Pattengale PK et al (1995) BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice. *Blood* 86:4603–4611
4. Hazlehurst LA, Bewry NN, Nair RR, Pinilla-Ibarz J (2009) Signaling networks associated with BCR–ABL–dependent transformation. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent* 16:100–107. <https://doi.org/10.1177/107327480901600202>
5. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M et al (1997) Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3 k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 16:6151–6161
6. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J et al (1996) Constitutive activation of STAT5 by the BCR–ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 13:247–254
7. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG et al (2004) JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR–ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18:189–218. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403241>
8. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E et al (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of BCR–ABL positive cells. *Nat Med* 2:561–566
9. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K et al (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR–ABL gene mutation or amplification. *Science* 293:876–880. <https://doi.org/10.1126/science.1062538>
10. Modugno M (2014) New resistance mechanisms for small molecule kinase inhibitors of Abl kinase. *Drug Discov Today Technol* 11:5–10. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2013.12.001>
11. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W et al (2005) Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant BCR–ABL. *Cancer Cell* 7:129–141. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.007>
12. Shah NP, Nicoll JM, Branford S et al (2005) Molecular analysis of dasatinib resistance mechanisms in CML patients identifies novel BCR–ABL mutations predicted to retain sensitivity to imatinib: rationale for combination tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood* 106:1093
13. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M et al (2008) Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 22:1200–1206. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.84>
14. Zhou T, Parillon L, Li F et al (2007) Crystal structure of the T3151 mutant of Abl kinase. *Chem Biol Drug Des* 70:171–181. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00556.x>
15. Cortes JE, Kim D-W, Pinilla-Ibarz J et al (2013) A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 369:1783–1796. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306494>
16. Bewry NN, Nair RR, Emmons MF et al (2008) Stat3 contributes to resistance toward BCR–ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Mol Cancer Ther* 7:3169–3175. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0314>
17. Eide CA, Adrian LT, Tyner JW et al (2011) The ABL switch control inhibitor DCC-2036 is active against the chronic myeloid leukemia mutant BCR–ABL T3151 and exhibits a narrow resistance profile. *Cancer Res* 71:3189–3195. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3224>
18. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M et al (2011) Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR–ABL activity. *J Clin Invest* 121:396–409. <https://doi.org/10.1172/JCI35721>
19. Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P et al (2014) Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 32:424–430. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5797>
20. Mitra A, Sasikumar K, Parthasaradhi BVV, Radha V (2013) The tyrosine phosphatase TC48 interacts with and inactivates the oncogenic fusion protein BCR–ABL but not cellular Abl. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis* 1832:275–284. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.014>
21. Brehme M, Hantschel O, Colinge J et al (2009) Charting the molecular network of the drug target BCR–ABL. *Proc Natl Acad Sci* 106:7414–7419
22. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD et al (1993) BCR–ABL–induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75:175–185
23. Goga A, McLaughlin J, Afar DE et al (1995) Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR–ABL oncogene. *Cell* 82:981–988
24. Preyer M, Vigneri P, Wang JYJ (2011) Interplay between kinase domain autophosphorylation and F-actin binding domain in regulating imatinib sensitivity and nuclear import of BCR–ABL. *PLoS One* 6:e17020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017020>
25. Coutinho S, Jahn T, Lewitzky M et al (2000) Characterization of Grb4, an adapter protein interacting with BCR–ABL. *Blood* 96:618–624
26. Preisinger C, Kolch W (2010) The BCR–ABL kinase regulates the actin cytoskeleton via a GADS/Slp-76/Nck1 adaptor protein pathway. *Cell Signal* 22:848–856. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.12.012>
27. Meyn MA, Wilson MB, Abdi FA et al (2006) Src family kinases phosphorylate the BCR–ABL SH3–SH2 region and modulate BCR–ABL transforming activity. *J Biol Chem* 281:30907–30916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605902200>
28. Ren R, Ye Z-S, Baltimore D (1994) Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev* 8:783–795
29. Lewitzky M, Kardinal C, Gehring NH et al (2001) The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-X-X-P core motif. *Oncogene* 20:1052–1062. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204202>
30. Thien CB, Langdon WY (2001) Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:294
31. Dombrosky-Ferlan PM, Corey SJ (1997) Yeast two-hybrid in vivo association of the Src kinase Lyn with the proto-oncogene product Cbl but not with the p85 subunit of PI 3-kinase. *Oncogene* 14:2019
32. Buday L, Khwaja A, Sipeki S et al (1996) Interactions of Cbl with two adaptor proteins, Grb2 and Crk, upon T cell activation. *J Biol Chem* 271:6159–6163
33. Donovan JA, Wange RL, Langdon WY, Samelson LE (1994) The protein product of the c-cbl protooncogene is the 120-kDa tyrosine-phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 269:22921–22924
34. Meisner H, Conway BR, Hartley D, Czech MP (1995) Interactions of Cbl with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in activated Jurkat cells. *Mol Cell Biol* 15:3571–3578
35. Panchamoorthy G, Fukazawa T, Miyake S et al (1996) p120 is a major substrate of tyrosine phosphorylation upon B cell antigen receptor stimulation and interacts in vivo with Fyn and Syk tyrosine kinases, Grb2 and Shc adaptors, and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 271:3187–3194
36. Bhat A, Kolibaba K, Oda T et al (1997) Interactions of CBL with BCR–ABL and CRKL in BCR–ABL-transformed myeloid cells. *J Biol Chem* 272:16170–16175
37. Johnson KJ, Griswold JJ, O'Hare T et al (2009) A BCR–ABL mutant lacking direct binding sites for the GRB2, CBL and CRKL

- adapter proteins fails to induce leukemia in mice. *PLoS One* 4:e7439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007439>
38. Buday L, Downward J (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73:611–620. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90146-h](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90146-h)
  39. Egan SE, Giddings BW, Brooks MW et al (1993) Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363:45. <https://doi.org/10.1038/363045a0>
  40. Li N, Batzer A, Daly R et al (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363:85–88. <https://doi.org/10.1038/363085a0>
  41. Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J et al (1993) The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363:83–85. <https://doi.org/10.1038/363083a0>
  42. Trb T, Choi WE, Wolf G et al (1995) Specificity of the PTB domain of Shc for  $\beta$  turn-forming pentapeptide motifs amino-terminal to phosphotyrosine. *J Biol Chem* 270:18205–18208. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.31.18205>
  43. McWHIRTER JR, Galasso DL, Wang JY (1993) A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of BCR-ABL oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13:7587–7595
  44. Brasher BB, Roumiantsev S, Van Etten RA (2001) Mutational analysis of the regulatory function of the c-Abl Src homology 3 domain. *Oncogene* 20:7744–7752. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204978>
  45. Grebien F, Hantschel O, Wojcik J et al (2011) Targeting the SH2-kinase interface in BCR-ABL inhibits leukemogenesis. *Cell* 147:306–319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.046>
  46. Oda T, Heaney C, Hagopian JR et al (1994) Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* 269:22925–22928
  47. ten Hoeve J, Arlinghaus RB, Guo JQ et al (1994) Tyrosine phosphorylation of CRKL in philadelphia+ leukemia. *Blood* 84:1731–1736
  48. Nichols GL, Raines MA, Vera JC et al (1994) Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* 84:2912–2918
  49. Odai H, Sasaki K, Iwamatsu A et al (1997) Purification and molecular cloning of SH2- and SH3-containing inositol polyphosphate-5-phosphatase, which is involved in the signaling pathway of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, erythropoietin, and BCR-ABL. *Blood* 89:2745–2756
  50. Wisniewski D, Strife A, Swendeman S et al (1999) A novel SH2-containing phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate 5-phosphatase (SHIP2) is constitutively tyrosine phosphorylated and associated with src homologous and collagen gene (SHC) in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood* 93:2707–2720
  51. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M et al (1995) Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86:726–736
  52. Ren S, Xue F, Feng J, Skorski T (2005) Intrinsic regulation of the interactions between the SH3 domain of p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase and the protein network of BCR/ABL oncogenic tyrosine kinase. *Exp Hematol* 33:1222–1228. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.06.030>
  53. Sattler M, Mohi MG, Pride YB et al (2002) Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1:479–492
  54. Mian AA, Baumann I, Liebermann M et al (2019) The phosphatase UBASH3B/Sts-1 is a negative regulator of BCR-ABL kinase activity and leukemogenesis. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0468-y>
  55. Reckel S, Hamelin R, Georgeon S et al (2017) Differential signaling networks of BCR-ABL p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia* 31:1502–1512. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.36>
  56. Cutler JA, Tahir R, Sreenivasamurthy SK et al (2017) Differential signaling through p190 and p210 BCR-ABL fusion proteins revealed by interactome and phosphoproteome analysis. *Leukemia* 31:1513–1524. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.61>
  57. Reckel S, Gehin C, Tardivon D et al (2017) Structural and functional dissection of the DH and PH domains of oncogenic BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02313-6>
  58. Suwa A, Yamamoto T, Sawada A et al (2009) Discovery and functional characterization of a novel small molecule inhibitor of the intracellular phosphatase, SHIP2. *Br J Pharmacol* 158:879–887. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00358.x>
  59. Harrison-Findik D, Susa M, Varticovski L (1995) Association of phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene* 10:1385–1391
  60. Salgia R, Pisick E, Sattler M et al (1996) p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *J Biol Chem* 271:25198–25203
  61. Warmuth M, Bergmann M, Priess A et al (1997) The Src family kinase Hck interacts with BCR-ABL by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *J Biol Chem* 272:33260–33270
  62. Ran FA, Hsu PD, Wright J et al (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8:2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
  63. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA et al (2014) CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res* 42:W401–W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gku410>
  64. Kunova Bosakova M, Nita A, Gregor T et al (2019) Fibroblast growth factor receptor influences primary cilium length through an interaction with intestinal cell kinase. *Proc Natl Acad Sci* 116:4316–4325. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800338116>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### 5.7.7. Příloha 18

Racil Z, Razga F, Drapalova J, Buresova L, Zackova D, Palackova M, Semerad L, Malaskova L, Haluzik M, Mayer J. Mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2013;98(10):e124-6.

IF = 5,868 v roce 2013; HEMATOLOGY Q1; 48 citací ve WOS či Scopus, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Pilotní analýza 10 pacientů s CML, léčených nově nilotinibem, bez anamnézy DM
- Vyšetřované parametry před zahájením terapie nilotinibem a po 3 měsících jejího trvání: fyzikální vyšetření, krevní obraz, biochemická analýza nalačno, včetně glykémie, inzulínu, C-peptidu, glykosylovaného hemoglobinu, sérových lipidů, inkretinů, glukozo-dependentního inzulintropního peptidu, adipokinů a C<sub>trough</sub> imatinibu; provedení oGTT, hodnocení inzulínové senzitivity/rezistence (HOMA2-IR, HOMA-%S a ISI) a funkce  $\beta$ -buněk (HOMA-%B)
- Po 3 měsících léčby nilotinibem došlo k signifikantnímu nárůstu glykémie a inzulinémie na lačno, dále k signifikantnímu nárůstu inzulínové rezistence, celkového a non-HDL-cholesterolu, a naopak k signifikantnímu poklesu hladiny adiponektinu
- Poprvé byl odhalen mechanismus poruchy glukózové tolerance při léčbě nilotinibem v podobě rychle se rozvíjející postreceptorové inzulínové rezistence a kompenzatorní hyperinzulinémie
- Tímto mechanismem lze alespoň částečně vysvětlit i rychlý rozvoj dyslipidémie u sledovaných pacientů a zřejmě i vznik periferních arteriálních okluzí při léčbě nilotinibem

### Mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy in patients with chronic myelogenous leukemia

Nilotinib, a 2<sup>nd</sup> generation tyrosin kinase inhibitor (TKI), is efficacious in the treatment of chronic myelogenous leukemia (CML).<sup>1</sup> Impaired glucose metabolism with hyperglycemia represents one of the most frequently observed adverse events (AEs) during nilotinib therapy.<sup>1</sup> However, the mechanism of glucose metabolism impairment remains unknown.

We, therefore, conducted a study with the aim of identifying the possible mechanism of glucose metabolism impairment under nilotinib therapy: i) impaired insulin secretion (including the possible role of a nilotinib-induced perturbation of incretin secretion); or ii) development of insulin resistance (including the possible role of nilotinib-induced adipokine alterations). Our analysis included 10 patients with CML without a medical history of diabetes mellitus (DM) who had newly initiated nilotinib therapy. Prior to and after three months of nilotinib treatment, all patients received a physical examination, blood count, and fasting biochemical analysis, including glucose, insulin, C-peptide, glycosylated hemoglobin (HbA1C), serum lipids, incretins (glucagon like polypeptide-1, GLP-1), glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), adipokines (adiponectin, serum adipocyte fatty acid-binding protein, FABP), and trough nilotinib plasma concentration ( $C_{trough}$ ). A 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at both time points. Fasting, 1-h and 2-h glucose, insulin, C-peptide, and incretins were assessed during the OGTT. Established models were used to estimate insulin sensitivity/resistance (HOMA2-IR, HOMA2-%S, and ISI<sub>120</sub>) and B-cell function (HOMA2-%B).<sup>2,3</sup>

Ten patients with a median age of 57 years (range 26-74) were included in our study. Four of these 10 patients received nilotinib as first line, and 6 of 10 received the drug as a second or subsequent line CML therapy. Five of 10 patients received 600 mg and 5 of 10 received 800 mg of nilotinib/d. Patients' metabolic characteristics at baseline and after three months of nilotinib therapy are presented

in Table 1. The median nilotinib  $C_{trough}$  was 1510 (range 411-2973) ng/mL.

Fasting, 1-h and 2-h plasma glucose concentrations obtained during the OGTT significantly increased after three months of nilotinib therapy (Table 2, Figure 1). Two patients fulfilled criteria of diabetes mellitus (DM) during nilotinib treatment based on fasting glucose (8.1 and 7.3 mmol/L, respectively), and 2 additional patients displayed impaired glucose tolerance based on the OGTT (2-h plasma glucose concentration of 8.4 and 9.1 mmol/L, respectively).

Nilotinib administration also significantly increased fasting insulinemia (Table 2). Moreover, there was also a trend of higher postprandial insulinemia obtained during OGTT at the 3<sup>rd</sup> month of treatment (Figure 1).

There was no significant change in C-peptide concentrations (fasting and during OGTT) and fasting HbA1C after the initiation of nilotinib therapy (Table 2, Figure 1).

The euglycemic clamp represents the standard method for estimating insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function. However, it is impractical for daily clinical practice, and therefore mathematical models highly correlated with the euglycemic clamp, such as the HOMA2 or ISI<sub>120</sub>, are commonly used.<sup>4</sup> In our study, insulin resistance, as calculated by HOMA2-IR, significantly increased during nilotinib therapy ( $P=0.008$ ). Moreover, there was a significant decrease in the derived insulin sensitivity index HOMA2-%S and additional ISI<sub>120</sub> ( $P=0.006$  and  $P=0.002$ , respectively; *Online Supplementary Figure S1*). While HOMA2-IR and HOMA2-%S are surrogate markers of insulin sensitivity at the basal state and tend to represent hepatic insulin resistance, ISI<sub>120</sub> reflects peripheral (mostly muscle) insulin resistance. Thus, together with marked hyperinsulinemia, we found global insulin resistance develops promptly after the initiation of nilotinib treatment.

B-cell function, as calculated by HOMA2-B%, as well as the secretion of incretins (GLP-1 and GIP), which are postprandial enhancers of insulin production,<sup>5</sup> were not affected by nilotinib administration ( $P=0.922$ ,  $P=0.106$ , and  $P=0.922$ , respectively) (Table 2, *Online Supplementary Figure S1*). However, when we compared B-cell function at the start and after three months of nilotinib therapy (calculated as  $HOMA2-B\%_{3\text{ months}} - HOMA2-B\%_{\text{start}}$ ), we

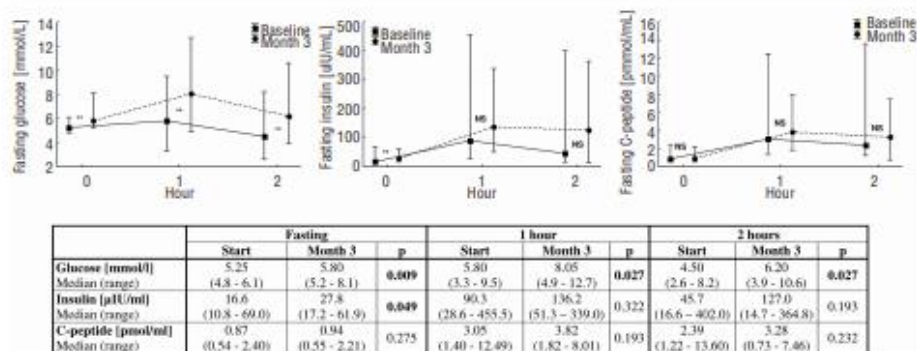


Figure 1. Dynamic parameters obtained during the oral glucose tolerance test (OGTT). Data are presented as median (range). \*\*Statistically significant at a 5% level of significance; NS: not significant.

**Table 1.** Patients' metabolic characteristics at baseline and after three months of nilotinib therapy.

	Median (range)/n
Baseline BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.2 (23.4-32.7)
3 <sup>rd</sup> month BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.4 (23.2-32.7)
Baseline waist circumference (cm)	93.5 (77.0-108.0)
3 <sup>rd</sup> month waist circumference (cm)	91.0 (78.0-104.0)
Diabetes mellitus type 2 in medical history	0
Diabetes mellitus type 2 in family history	3
Impaired glucose metabolism at baseline – impaired fasting glucose/impaired glucose tolerance/diabetes mellitus	3/0/0
Impaired glucose metabolism at the 3 <sup>rd</sup> month – impaired fasting glucose/impaired glucose tolerance/diabetes mellitus	0/2/2
Hypertension in medical history	5
Dyslipidemia in medical history	1
Total serum cholesterol > 5.0 mmol/L at baseline	3
Total serum cholesterol > 5.0 mmol/L at the 3 <sup>rd</sup> month	5

found a significant decrease in B-cell function in the 2 DM patients compared to the 8 other non-DM patients ( $P=0.024$ ) (Online Supplementary Figure S2).

Based on our finding, we assume that nilotinib does not directly affect B cells. However, an organism must compensate for nilotinib-induced tissue insulin resistance through compensatory hyperinsulinemia to maintain euglycemia. In individuals with predisposed impaired B-cell function, a sudden insulin requirement could lead to prompt B-cell exhaustion. This subsequently manifests as glucose metabolism impairment, which is a reported AE of nilotinib therapy.

The mechanism of insulin resistance under nilotinib exposure at the cellular level likely occurs on the postreceptor level.<sup>6</sup> *In vitro* results indicate that c-ABL is involved in the insulin receptor (IR) signaling pathway. Upon insulin stimulation, c-ABL enhances an IR-dependent metabolic effect while attenuating the mitogenic effect by inducing a decrease in FAK phosphorylation, resulting in decreased ERK and increased AKT activity.<sup>7,8</sup> Thus, it is hypothesized that blocking c-ABL during TKI therapy affects the IR metabolic pathway.<sup>9</sup> However, clinically evident differences in the influence of the IR pathway among individual TKIs have not yet been studied.

In addition, results from our adipokine analyses suggest postreceptor insulin resistance. Circulating FABP9 levels did not change during nilotinib treatment. However, the plasma concentration of adiponectin, which exerts a potent insulin-sensitizing effect,<sup>10</sup> decreased (Table 2). This corresponds to published data reporting hyperinsulinemia subsequently causing significant hypoadiponectinemia under euglycemic conditions.<sup>11</sup>

Taken together, our findings also have other important implications. Hyperinsulinemia,<sup>12</sup> postreceptor insulin resistance,<sup>13</sup> and hypoadiponectinemia<sup>14</sup> play critical roles in the development of dyslipidemia and atherosclerosis. Thus, our results not only explain the rapid and significant increase in total and non-HDL cholesterol levels observed in this study (Table 2), but also a possible mechanism of the development of peripheral artery occlusion (PAO), which was recently described as an important AE of nilotinib therapy.<sup>15</sup>

In summary, for the first time we have clarified the mechanism of impaired glucose metabolism in CML patients treated with nilotinib, which occurs via rapidly

**Table 2.** Glucose and lipid metabolism assessed at the start and after three months of nilotinib therapy.

	Start median (range)	Month 3 median (range)	P
Fasting glucose (mmol/L)	5.25 (4.8-6.1)	5.8 (5.2-12.7)	0.009
Fasting insulin (μIU/mL)	16.6 (10.8-69.0)	27.8 (17.2-61.9)	0.049
Fasting C-peptide (pmol/mL)	0.87 (0.54-2.40)	0.94 (0.55-2.21)	0.275
Fasting HbA1c (%)	3.80 (3.4-4.2)	3.9 (3.2-4.7)	0.725
<i>Incretins</i>			
Fasting GLP-1 (pM)	5.4 (4.7-6.5)	5.3 (4.6-6.4)	0.106
2-h stimulated GLP-1 (pM)	6.3 (4.7-10.5)	6.4 (4.5-10.5)	0.160
Fasting GIP (pg/mL)	49.5 (22.9-120.5)	58.5 (14.6-104.2)	0.922
2-h stimulated GIP (pg/mL)	236.3 (47.2-332.2)	150.2 (73.8-270.8)	0.232
<i>Adipokines</i>			
Fasting FABP (ng/mL)	15.7 (5.3-37.5)	17.3 (5.6-55.3)	0.241
Fasting adiponectin (mg/L)	13.8 (0.7-45.1)	7.8 (1.0-22.3)	0.027
<i>Serum lipids</i>			
Total cholesterol (mmol/L)	4.75 (3.5-6.6)	5.35 (4.5-7.0)	0.013
Triglycerides (mmol/L)	1.03 (0.58-2.8)	1.29 (0.6-3.0)	0.432
HDL cholesterol (mmol/L)	1.50 (0.7-2.2)	1.45 (0.8-2.3)	0.152
LDL cholesterol (mmol/L)	2.55 (1.6-4.4)	2.80 (2.3-4.8)	0.020
Non-HDL cholesterol (mmol/L)	2.90 (1.9-5.3)	3.45 (2.6-6.0)	0.011

developed tissue insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia. It also at least partially explains the fast development of dyslipidemia and probably also PAO in these CML patients. However, further studies that include a larger patient cohort, as well as *in vitro* tests to confirm postreceptor insulin resistance, are needed, and these are already ongoing in our study group.

Zdeněk Račil,<sup>1,2</sup> Filip Razga,<sup>1</sup> Jana Drapalová,<sup>1</sup> Lucie Buresová,<sup>4</sup> Daniela Zacková,<sup>1</sup> Martina Palacková,<sup>1</sup> Lukáš Semerád,<sup>1</sup> Ludmila Malásková,<sup>1</sup> Martin Haluzík,<sup>1</sup> and Jiri Mayer<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dept. Internal Medicine, Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno; <sup>2</sup>CEITEC - Central European Institute of Technology, Masaryk University Brno, Brno; <sup>3</sup>3rd Dept. Medicine, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague; <sup>4</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University Brno, Brno; <sup>5</sup>Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

*Funding:* This work was supported by CELL - The Czech Leukemia Study Group for Life, MH CZ - DRO (FNBr, 65269705), by the CEITEC - CZ.1.05/1.1.00/02.0068 and RVO-VFN64165/2012.

*Correspondence:* zncal@fnbrno.cz.  
doi:10.3324/haematol.2013.086355

*Key words:* nilotinib, tyrosin kinase inhibitor, glucose metabolism.

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at [www.haematologica.org](http://www.haematologica.org).

## References

- Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2251-9.
- Levy JC, Matthews DR, Hemmans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care*. 1998;21(12):2191-2.
- Gutt M, Davis CL, Spitzer SB, Llabre MM, Kumar M, Czarnecki EM, et al. Validation of the insulin sensitivity index (ISI(0,120)): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;47(3):177-84.
- Singh B, Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J Diabetes*. 2010;1(2):36-47.
- Phillips IK, Prins JB. Update on incretin hormones. *Ann NY Acad Sci*. 2011;1243:E55-74.
- Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endoc Relat Cancer*. 2009;16(4):1103-23.
- Frasca F, Pandini G, Malaguamera R, Mandarino A, Messina RL, Sciacca L, et al. Role of c-Abl in directing metabolic versus mitogenic effects in insulin receptor signaling. *J Biol Chem*. 2007;282(36):26077-88.
- Genua M, Pandini G, Cassarino ME, Messina RL, Frasca F. c-Abl and insulin receptor signalling. *Vitam Horm*. 2009;80:77-105.
- Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*. 2007;115(12):1537-43.
- Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)*. 2012;11(1):8-20.
- Mohlhlig M, Wegewitz U, Osterhoff M, Isken F, Ristow M, Pfeiffer AF, et al. Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Hum Metab Res*. 2002;34(11-12):655-8.
- DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. 2010;53(7):1270-87.
- Semple RK, Sleight A, Murgatroyd PR, Adams CA, Bluck L, Jackson S, et al. Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J Clin Invest*. 2009;119(2):315-22.
- Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(1):85-9.
- Aichberger KJ, Herndlhofer S, Schernthaner GH, Schillinger M, Mitterbauer-Hohendanner G, Sillaber C, et al. Progressive peripheral arterial occlusive disease and other vascular events during nilotinib therapy in CML. *Am J Hematol*. 2011;86(7):533-9.



### 5.7.8. Příloha 19

Racil Z, Koritakova E, Sacha T, Klamova H, Belohlavkova P, Faber E, Rea D, Malaskova L, Prochazkova J, Zackova D, Voglova J, Wąclaw J, Cetkovsky P, Zak P, Mayer J. Insulin resistance is an underlying mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy. *American Journal of Hematology*. 2018;93(10):E342-E345.

IF = 6,137 v roce 2018; HEMATOLOGY Q1

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Multicentrická studie navazující na pilotní projekt ENIGMA (viz Přílohu 18)
- Zařazeno 94 pacientů léčených nilotinibem (n = 51), imatinibem (n = 28) a dasatinibem (n = 15)
- Signifikantní vzestup glykémie na lačno byl zaznamenán u 45 % pacientů po 3 i 12 měsících (M) léčby nilotinibem. Porucha metabolismu glukózy byla konstatována u 37 % pacientů ve 3. měsíci a u 43 % pacientů ve 12. měsíci podávání nilotinibu. Signifikantně elevovaná inzulinémie v M3 přetrvávala i v M12 a nárůst inzulinové rezistence byl patrný u 71 % pacientů
- Nepotvrdilo se zjištění z pilotní studie, a sice že na rozvoj inzulinové rezistence má vliv rychlý pokles adiponektinu
- Podle předpokladu mělo podání dasatinibu ve vztahu k metabolismu glukózy neutrální efekt, léčba imatinibem však přinesla kontroverzní výsledky
- Prospektivní studie potvrdila rychlý rozvoj inzulinové rezistence a kompenzatorní hyperinzulinémie coby mechanismus poruchy metabolismu glukózy u pacientů s CML léčených nilotinibem, v kontrastu s pacienty léčenými imatinibem či dasatinibem. Spolu s dyslipidemií a centrální obezitou tak nilotinib vede ke vzniku latentního metabolického syndromu, který zvyšuje riziko vzniku cévních NÚ



ektacytometry and molecular biology. KG performed erythrocyte membrane electrophoresis. All authors revised and approved the manuscript.

### CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflicts of interest to disclose.

### ORCID

Thomas Pincez <http://orcid.org/0000-0002-9412-333X>

Thomas Pincez<sup>1</sup>

Corinne Guitton<sup>1</sup>

Judith Landman-Parker<sup>2</sup>

Valentine Brousse<sup>3</sup>

Frédéric Gauthier<sup>4</sup>

Lydie Da Costa<sup>5</sup>

Kaldoun Ghazal<sup>6</sup>

Denis Duffillot<sup>7†</sup>

Gil Tchernia<sup>8</sup>

Véronique Picard<sup>9</sup>

Loïc Garçon<sup>8,9,10</sup>

<sup>1</sup>Service de Pédiatrie Générale, CHU Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>2</sup>Service d'Hématologie-Oncologie Pédiatrique, CHU Trousseau, AP-HP, Paris, France

<sup>3</sup>Service de Pédiatrie Générale, CHU Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France

<sup>4</sup>Service de Chirurgie Pédiatrique, CHU Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>5</sup>Service d'Hématologie Biologique, CHU Robert-Debré, AP-HP, Paris, France

<sup>6</sup>Service de Biochimie, CHU Bicêtre, HUPS, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>7</sup>Service de Pédiatrie, CH de Bigorre, Tarbes, France

<sup>8</sup>Service d'Hématologie Biologique, CHU Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>9</sup>Service d'Hématologie Biologique, CHU Amiens, France

<sup>10</sup>Laboratoire EA HEMATIM, Université Picardie Jules-Verne, Amiens, France

### Correspondence

Loïc Garçon, Service d'Hématologie Biologique CHU Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

Email: [garconloic@gmail.com](mailto:garconloic@gmail.com)

<sup>†</sup>Deceased

### Present address

Thomas Pincez, Service d'Hématologie-Oncologie Pédiatrique, CHU Sainte Justine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

TP and CG contributed equally to this work

### REFERENCES

- Gallagher PG. Abnormalities of the erythrocyte membrane. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(6):1349-1362.

- Pincez T, Guitton C, Gauthier F, et al. Long-term follow-up of subtotal splenectomy for hereditary spherocytosis: a single-center study. *Blood.* 2016;127(12):1616-1618.
- Rosman CWK, Broens PMA, Trzpis M, Tamminga RYJ. A long-term follow-up study of subtotal splenectomy in children with hereditary spherocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(10):e26592.
- Medejel N, Garçon L, Guitton C, Cynober T, Bader-Meunier B. Effect of subtotal splenectomy for management of hereditary pyropoikilocytosis. *Br J Haematol.* 2008;142(2):315-317.
- Cynober T, Mohandas N, Tchernia G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. *J Lab Clin Med.* 1996;128(3):259-269.
- Bader-Meunier B, Gauthier F, Archambaud F, et al. Long-term evaluation of the beneficial effect of subtotal splenectomy for management of hereditary spherocytosis. *Blood.* 2001;97(2):399-403.

### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Received: 17 July 2018

Accepted: 23 July 2018

DOI: 10.1002/ajh.25232

## Insulin resistance is an underlying mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy

To the Editor:

Impaired glucose metabolism (IGM) with hyperglycemia represents one of the most frequently observed adverse events (AE) during nilotinib therapy of chronic myeloid leukemia (CML). The exact mechanism of IGM remains controversial. Although a case report has shown a decrease in insulin secretion<sup>1</sup>, our previous pilot data suggested development of insulin resistance as a possible mechanism.<sup>2</sup> In this prospective study we aimed to confirm results from our pilot study using a larger cohort of CML patients treated with nilotinib and to compare results with data obtained on control groups receiving imatinib and dasatinib.

Patients with CML without known diabetes mellitus (DM) who had newly initiated tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy were included in this multicenter study. Patients received intensive diagnostic workup (including oral glucose tolerance test) after 3 (M3) and 12 months (M12) of TKI treatment and prior to the start of this study. HOMA2-IR/ISL<sub>0,120</sub> models were used to estimate insulin resistance/sensitivity.<sup>3,4</sup> Assessment of DM/pre-DM (impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance) and cardiovascular (CV) risk was performed.<sup>5,6</sup> TKI dose reduction >25%, interruption >2 weeks (start - M3)/>4 weeks (M4 - M12), change/stop of TKI, and start of glucose lowering therapy excluded patients from the analysis at M3 or M12. Patients excluded from analysis at M3 were removed from the study.

**TABLE 1** Analyzed clinical/laboratory parameters and changes during TKI therapy (all tests were two-tailed with  $p < 0.05$  as significant)

	TKI - start median (range)	N	TKI - 3 months median (range)	N	P (compare to start)	TKI - 12 months median (range)	N	P (compare to start)
<b>Nilotinib (all lines)</b>								
Fasting glucose [mmol/L]	5.3 (2.1–7.1)	51	5.7 (4.5–8.3)	51	<.001	5.6 (4.5–7.8)	42	.002
Fasting insulin [mU/L]	8.9 (2.4–27.1)	51	11.9 (2.5–39.1)	51	<.001	9.5 (3.8–38.0)	39	.003
Fasting C - peptide [pmol/L]	794.0 (62.0–4118.0)	51	780.0 (145.0–2933.0)	51	.807	807.5 (410.0–5690.0)	42	.081
HOMA2 - IR	1.12 (0.31–3.42)	51	1.55 (0.32–5.15)	51	<.001	1.29 (0.51–4.98)	39	.001
ISI <sub>0,120</sub>	92.0 (35.5–234.2)	49	73.6 (28.8–198.3)	49	<.001	84.0 (32.3–196.7)	38	.033
Fasting adiponectin [mg/L]	10.1 (2.1–50.0)	51	7.4 (2.2–38.4)	50	.001	8.9 (1.9–21.2)	41	.007
Total cholesterol [mmol/L]	4.9 (2.5–6.7)	50	5.5 (3.4–7.9)	49	<.001	5.8 (3.5–8.7)	36	<.001
LDL cholesterol [mmol/L]	2.7 (1.1–4.9)	49	3.3 (1.6–5.7)	48	<.001	3.6 (1.7–5.4)	34	<.001
HDL cholesterol [mmol/L]	1.1 (0.4–2.1)	50	1.5 (0.8–2.1)	49	<.001	1.7 (0.9–2.5)	35	<.001
Non-HDL cholesterol [mmol/L]	3.3 (1.4–5.8)	41	4.0 (1.9–6.2)	40	<.001	4.1 (2.0–7.4)	29	<.001
Weight [kg]	83.0 (48.0–132.0)	50	83.0 (48.0–136.0)	51	.436	87.0 (48.0–140.0)	41	.006
BMI	27.1 (19.1–37.6)	50	27.5 (18.6–38.8)	51	.417	28.1 (18.6–40.3)	41	.007
Waist circumference [cm]	96.0 (75.0–117.0)	44	96.0 (69.0–128.0)	47	.062	96.0 (72.0–127.0)	37	.002
<b>Imatinib (all lines)</b>								
Fasting glucose [mmol/L]	5.1 (4.1–7.7)	28	5.5 (4.2–7.5)	28	.022	5.6 (4.5–6.4)	24	.041
Fasting insulin [mU/L]	7.2 (2.6–26.0)	27	6.7 (2.4–37.8)	28	.914	7.7 (2.8–49.0)	24	.153
Fasting C - peptide [pmol/L]	761.0 (397.0–2741.0)	27	592.0 (364.0–1784.0)	28	.029	729.0 (407.0–2631.0)	24	.062
HOMA2 - IR	0.95 (0.34–3.48)	28	0.93 (0.30–4.67)	28	.473	1.02 (0.36–6.17)	23	.186
ISI <sub>0,120</sub>	73.5 (39.1–109.2)	25	78.1 (40.6–172.6)	24	.019	67.0 (54.2–175.8)	18	.157
Fasting adiponectin [mg/L]	10.2 (1.1–25.7)	28	23.3 (6.0–50.0)	27	<.001	21.0 (9.5–65.6)	23	<.001
Total cholesterol [mmol/L]	5.3 (3.3–7.1)	28	4.4 (2.6–7.1)	28	.002	4.9 (2.9–6.6)	23	.013
LDL cholesterol [mmol/L]	3.1 (0.8–4.7)	27	2.5 (1.2–4.7)	28	.004	2.7 (1.3–4.3)	21	.011
HDL cholesterol [mmol/L]	1.2 (0.7–2.0)	28	1.4 (0.9–2.2)	28	<.001	1.4 (0.9–2.0)	21	.015
Non-HDL cholesterol [mmol/L]	4.0 (2.4–5.5)	21	2.9 (1.8–5.7)	21	<.001	3.3 (2.4–5.2)	13	.016
Weight [kg]	77.5 (55.0–121.0)	28	81.0 (53.5–125.0)	26	.048	78.5 (51.0–120.0)	22	.009
BMI	25.0 (21.0–43.4)	28	25.8 (20.4–44.8)	26	.059	26.0 (19.4–40.1)	22	.008
Waist circumference [cm]	90.0 (74.0–133.0)	23	96.5 (74.0–129.0)	24	.367	94.0 (73.0–133.0)	19	.098
<b>Dasatinib (all lines)</b>								
Fasting glucose [mmol/L]	5.6 (4.5–6.8)	15	5.2 (3.3–6.7)	15	.073	5.4 (4.3–5.9)	12	.036
Fasting insulin [mU/L]	7.9 (2.5–50.7)	15	8.8 (2.6–27.7)	15	1.000	8.2 (2.4–10.7)	10	.574
Fasting C-peptide [pmol/L]	920.0 (160.0–1820.0)	15	861.0 (240.0–1324.0)	15	.074	686.0 (380.0–1111.0)	10	.284
HOMA2 - IR	1.00 (0.35–6.29)	15	1.21 (0.30–3.60)	15	1.000	1.08 (0.31–1.40)	10	.646
ISI <sub>0,120</sub>	86.5 (41.7–223.3)	15	73.6 (19.2–305.5)	15	.865	83.1 (51.6–201.2)	10	.959
Fasting adiponectin [mg/L]	13.9 (2.7–50.0)	14	11.4 (1.3–50.0)	14	.695	11.8 (6.8–24.5)	11	.859
Total cholesterol [mmol/L]	4.4 (3.0–5.6)	15	4.6 (2.5–7.2)	15	.044	4.1 (1.7–7.2)	9	.314
LDL cholesterol [mmol/L]	2.5 (1.5–3.9)	15	2.4 (1.0–5.0)	15	.173	2.4 (1.5–4.7)	8	.090
HDL cholesterol [mmol/L]	1.2 (0.5–2.1)	15	1.4 (1.0–2.5)	15	.013	1.6 (1.0–1.9)	8	.018
Non-HDL cholesterol [mmol/L]	3.3 (2.2–4.6)	10	3.1 (1.3–6.2)	10	.919	2.3 (1.9–3.1)	3	.285
Weight [kg]	78.0 (60.0–113.0)	15	78.0 (63.0–112.0)	15	.865	75.0 (63.0–106.0)	12	.482
BMI	27.6 (20.7–34.3)	15	27.6 (20.7–34.1)	15	.735	26.8 (20.3–32.0)	12	.401
Waist circumference [cm]	95.0 (74.0–124.0)	12	97.0 (75.0–124.0)	12	.263	91.0 (74.0–115.0)	9	.892

Abbreviations: TKI, tyrosine kinase inhibitor; HOMA2 - IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; ISI, insulin sensitivity index; BMI, body mass index.

Initiation of lipid lowering therapy only excluded patients from the serum lipid analysis.

A total of 51 patients with CML treated with nilotinib were included in the study. Twenty-eight patients receiving imatinib and 15 receiving dasatinib served as control groups. There were no differences in baseline characteristics between groups, with the exception of a significantly higher incidence of peripheral arterial occlusions in

the medical history (Supporting Information Table 1) of patients treated with imatinib.

Compare to baseline, fasting glycaemia increased in 74.5% of patients receiving nilotinib. The elevation of glycaemia was significant at M3 and M12 (Table 1). Using CTCAE4.0 criteria, the maximal detected grade of fasting (but not postprandial) hyperglycemia was grade 1, which was detected in 29.4%, 56.9%, and 45.2% of patients

at baseline, M3, and M12, respectively. Moreover, 11/51 (21.6%) patients fulfilled criteria of newly diagnosed DM/pre-DM (Supporting material Table 1) at baseline, which persisted during treatment in 10/11 (90.9%) patients at M3 and 7/11 (63.6%) at M12. An additional 9/51 (17.6%) patients developed DM/pre-DM at M3 (in three persisting to M12) and 8/42 (19.0%) at M12. Therefore, IGM was detected in 37.3% of patients receiving nilotinib therapy at M3 and 42.9% at M12 ( $P = .021$  and  $.022$  compared to baseline). Only 1/51 (1.9%) patients discontinued nilotinib due to glucose lowering therapy.

Importantly, nilotinib significantly increased fasting insulinemia in 72.5% of patients at M3, which persisted until M12. Insulin resistance (HOMA2-IR) significantly increased in 70.6% of subjects, and insulin sensitivity ( $IS_{0,120}$ ) significantly decreased in 85.1% of patients during this period (Table 1).

Although the role of dasatinib in glucose metabolism appears to be neutral (Table 1), the results obtained from the imatinib control group are subject to controversy. We proved that imatinib does not influence fasting insulinemia or insulin resistance (HOMA2-IR). Furthermore, imatinib significantly increased insulin sensitivity ( $IS_{0,120}$ ) at M3, which could be at least partially explained by the significant increase of adiponectin concentration (Table 1). However, we also detected isolated increase in fasting glucose at M3 and M12, which does not have a clear explanation. The higher frequency of IGM at baseline compared to the nilotinib group does not seem to be the answer. In fact, of the 11/28 (39.3%) patients with IGM at initiation, we observed improvement during imatinib treatment in 5/11 (45.5%). Only 1/28 (3.6%) and 1/24 (4.2%) patients had IGM at M3 and M12, respectively. Together with the increased insulin sensitivity, these data more likely reflect the positive role of imatinib on glucose metabolism.

The exact mechanism of insulin resistance under nilotinib exposure at the cellular level remains unknown. While our pilot study suggested a possible role of a fast decrease of adiponectin (an insulin-sensitizer)<sup>2</sup> after initiation of nilotinib in insulin resistance, this was not confirmed in our larger cohort. Analysis of all nilotinib patients again identified a significant decrease in adiponectin (Table 1). However, the sub-analysis based on line of therapy showed that the adiponectin decrease only in patients receiving nilotinib as second line therapy, and thus only reflects a spontaneous decrease of elevated adiponectin by previous imatinib administration after its withdrawal.

We also analyzed several clinical parameters to identify possible risk factors for development of IGM during nilotinib therapy; however, none of them were significant (Supporting material Table 2).

Since hyperinsulinemia and insulin resistance play critical roles in the development of dyslipidemia, this could at least partially explain the increase in total, LDL, and non-HDL cholesterol in patients receiving nilotinib (Table 1) in this study, confirming our pilot data.<sup>2</sup> Lipid metabolism abnormalities were not observed in the dasatinib group, and imatinib administration was associated with improvement of these parameters (Table 1).

Finally, nilotinib treatment was associated with a significant increase in body weight and BMI at M12. This could be due to decreased catabolism after TKI initiation, though weight gain was also observed in imatinib patients. However, this could also reflect an

increase of abdominal fat tissue enhanced by nilotinib-induced hyperinsulinemia. Indeed, a significant increase in waist circumference was only observed in the nilotinib cohort (Table 1).

In conclusion, this prospective study proved the fast development of insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia as a mechanism of IGM in CML patients treated with nilotinib, which contrasts with patients receiving imatinib and dasatinib. Although hyperglycemia was mild and caused treatment discontinuation in rare exceptions, the percentage of patients with confirmed IGM significantly increased with nilotinib administration duration. Therefore, together with dyslipidemia and central obesity, nilotinib leads to latent metabolic syndrome, which is a cluster of metabolic abnormalities characterized by insulin resistance that substantially increases the risk of CV events. Thus the results from our study strongly support the need for close monitoring of glucose and lipid metabolism during its administration. Whether early intervention will reduce the risk of this potentially life-threatening AE will require additional studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the CELL - the CzeCh Leukemia Study Group - for Life, by BMS Grant CA 180-594 and by Ministry of Health of the Czech Republic, Grant No. 17-30397A (all rights reserved).



#### CONFLICT OF INTEREST

Z.R. received research funding from Novartis, Bristol Mayer Squibb and serve on a speakers bureau for Novartis and Bristol Myers Squibb; E.K. declare no relevant conflict of interest; T.S. received research funding from Novartis, Pfizer and serve on a speakers bureau for Novartis, Bristol Myers Squibb, Pfizer, Angelini; H.K. declare no relevant conflict of interest; PB - no relevant conflict of interest; E.F. received research funding from Novartis and serve on a speakers bureau for Angelini, Novartis and BMS; D.R. received honoraria from Novartis, Pfizer, Incyte and Bristol Myers Squibb; L.M. declare no relevant conflict of interest; J.P. declare no relevant conflict of interest; D.Z. serve as a consultant for Novartis, Bristol Myers Squibb, and Incyte; J.V. declare no relevant conflict of interest; J.W. serve on a speakers bureau for Novartis, Bristol Myers Squibb, Angelini; P.C. declare no relevant conflict of interest; P.Z. declare no relevant conflict of interest; J.M. received research funding from Novartis, Angelini, Bristol Mayer Squibb and serve on a speakers bureau for Novartis and Bristol Myers Squibb.

#### ORCID

Zdenek Racil  <http://orcid.org/0000-0003-3511-4596>

Tomasz Sacha  <http://orcid.org/0000-0002-7207-6595>

Zdenek Racil<sup>1</sup>   
Eva Koritakova<sup>2,3</sup>  
Tomasz Sacha<sup>4</sup>   
Hana Klamova<sup>5</sup>  
Petra Belohlavkova<sup>6</sup>

Edgar Faber<sup>7</sup>  
 Delphine Rea<sup>8</sup>  
 Ludmila Malaskova<sup>9</sup>  
 Jirina Prochazkova<sup>1</sup>  
 Daniela Zackova<sup>1</sup>  
 Jaroslava Voglova<sup>6</sup>  
 Joanna Wąclaw<sup>4</sup>  
 Petr Cetkovsky<sup>5</sup>  
 Pavel Zak<sup>6</sup>  
 Jiri Mayer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Ltd., Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Hematology, Jagiellonian University Hospital, Kraków, Poland

<sup>5</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion and 1st Faculty of Medicine of the Charles University, Prague, Czech Republic

<sup>6</sup>4th Department of Internal Medicine – Hematology, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>7</sup>Department of Hemato-Oncology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

<sup>8</sup>Department of Adult Hematology and INSERM-UMR 1160, Hôpital Saint-Louis, APHP, Paris, France

<sup>9</sup>Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

#### Correspondence

Zdenek Racil, Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 62500 Brno, Czech Republic.

Email: racil.zdenek@fnbrno.cz

#### REFERENCES

1. Ito Y, Miyamoto T, Chong Y, Maki T, Akashi K, Kamimura T. Nilotinib exacerbates diabetes mellitus by decreasing secretion of endogenous insulin. *Int J Hematol*. 2013;97(1):135-138.
2. Racil Z, Razga F, Drapalova J, et al. Mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2013;98(10):e124-e126.
3. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care*. 1998;21(12):2191-2192.
4. Gutt M, Davis CL, Spitzer SB, et al. Validation of the insulin sensitivity index (ISI(0,120)): comparison with other measures. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;47(3):177-184.
5. WHO. *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/IDF Consultation*. Geneva: World Health Organization; 2006.
6. Catapano AL, Graham I, De Backer G, et al. 2016 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J*. 2016;37(39):2999-3058.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Received: 30 May 2018 | Revised: 18 July 2018 | Accepted: 23 July 2018

DOI: 10.1002/ajh.25233

## Opioid utilization patterns in United States individuals with sickle cell disease

To the Editor:

Sickle cell disease (SCD) is the most commonly inherited blood disorder in North America, and impacts approximately 100 000 people in the United States (U.S).<sup>1</sup> Affected individuals generally live on average 30 years less than the general population.<sup>2</sup> These individuals suffer acute, intermittent painful episodes (vaso-occlusive crisis [VOC]), as well as fatigue, chronic organ damage and chronic pain.<sup>2</sup> Currently, the National Heart Lung and Blood Institute and Centers for Disease Control and Prevention recommend aggressive treatment with opioids during acute VOC and as a therapeutic option for chronic pain. Despite these guideline recommendations for aggressive opioid treatment for acute pain in SCD, the high opioid doses often used for SCD-related pain may result in a negative perception of affected persons by some healthcare professionals.<sup>3</sup> Additionally, the current national opioid crisis is impacting overall opioid prescribing including for the SCD population.<sup>3</sup> Despite the critical need for and concerns about opioid-based pain management, there is limited evidence on current opioid treatment patterns among individuals with SCD and any potential link to the U.S. opioid epidemic. This study aims to describe opioid utilization in individuals with SCD within the context of healthcare utilization, and the U.S. opioid epidemic among a published broader U.S. population. Since individuals with SCD are likely to have public health insurance coverage, and literature suggests that utilization (including opioid use) may differ between privately and publicly insured individuals,<sup>4</sup> our study examined utilization in both commercially-insured individuals and those with Medicaid coverage.

This was a retrospective observational study using administrative claims data with detailed methods provided in the Supporting Information Appendix SA1. All reported measures are for the year prior to SCD indication.

For each annual cohort, approximately 2884 Commercial and 5612 Medicaid SCD individuals met the final inclusion criteria (Supporting Information Table S1). Commercial individuals were older but less likely to have prespecified comorbid conditions including chronic pain and acute chest syndrome as described in detail in Supporting Information Table S2. Across payers, the proportion of individuals with SCD with any opioid use was significantly larger in the 18-30-age group (vs <18 years), and remained constant after age 30, with significantly higher use observed among Medicaid individuals (Supporting Information Figure S1 and Supporting Information Table S3).

Average utilization and morphine equivalent dose (MED) per patient exhibited comparable trends across payers (Figure 1). Across payers, MED was significantly higher in the ≥31 age group than in the 18-30 age group, while individuals with opioid use remained constant

### 5.7.9. Příloha 20

Hornák T, Semerád L, Žáčková D, Weinbergerová B, Šustková Z, Procházková J, Bělohávková P, Stejskal L, Rohoň P, Faber E, Žák P, Mayer J, Ráčil Z. Analysis of serum lipids, cardiovascular risk, and indication for statin use during nilotinib and imatinib therapy in de novo CML patients - results from real-life prospective study. *Leukemia & Lymphoma*. 2020;61(2):494-496.

IF = 2,969 v roce 2019/2020; HEMATOLOGY Q2, ONCOLOGY Q3

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Prospektivní studie, hodnoceno 57 pacientů s nově zjištěnou CML, následně léčených nilotinibem (n = 23) a imatinibem (n = 34)
- Pacienti směřující k léčbě nilotinibem byli významně mladší, s méně komorbiditami a s nižším kardiovaskulárním (KV) rizikovým skóre oproti pacientům zahajujícím léčbu imatinibem. Již v době diagnózy užívalo statiny či splňovalo kritéria pro jejich nasazení 53 % pacientů
- Ve skupině léčené nilotinibem jsme pozorovali po 6 měsících od zahájení terapie statisticky významný nárůst celkového a LDL-cholesterolu oproti vstupním hodnotám. Ve skupině léčené imatinibem naopak významně vzrostl HDL-cholesterol a klesla hladina triglyceridů
- Podíl pacientů s nárůstem KV skóre však byl analogický v obou skupinách a žádný z pacientů léčených imatinibem toto riziko nesnížil, protektivní vliv imatinibu na KV riziko tak nebyl prokázán
- I přes rychlé změny v lipidovém metabolismu v obou léčebných skupinách nedocházelo ke změnám KV rizika či novým indikacím k terapii statiny v průběhu prvního roku léčby



## Analysis of serum lipids, cardiovascular risk, and indication for statin use during nilotinib and imatinib therapy in *de novo* CML patients – results from real-life prospective study

Tomáš Hornák<sup>a</sup>, Lukáš Semerád<sup>a</sup>, Daniela Žáčková<sup>a</sup>, Barbora Weinbergerová<sup>a</sup>, Zuzana Šustková<sup>a</sup>, Jiřina Procházková<sup>a</sup>, Petra Bělohávková<sup>b</sup>, Lukáš Stejskal<sup>c</sup>, Peter Rohoň<sup>d</sup>, Edgar Faber<sup>d</sup>, Pavel Žák<sup>b</sup>, Jiří Mayer<sup>a</sup> and Zdeněk Ráčil<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic;

<sup>b</sup>4th Department of Internal Medicine Hematology, Charles University Faculty Hospital and Faculty of Medicine, Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>c</sup>Department of Hemato-Oncology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic; <sup>d</sup>Department of Hemato-Oncology, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

**ARTICLE HISTORY** Received 9 May 2019; Revised 16 September 2019; Accepted 19 September 2019

Tyrosine kinase inhibitors (TKI) have dramatically improved the prognosis of CML patients with life expectancy close to individuals without CML [1], and therefore the long-term safety of TKIs has become especially important due to the potential for lifelong treatment. Nilotinib (NILO) tends to have a negative effect on lipid [2] and glucose [3] metabolism, while imatinib (IMA) seems to improve [4] these abnormalities. Although the data appear convincing, the real impact of these changes on cardiovascular (CV) risk and the development of CV complications during TKI therapy have not yet been confirmed.

The aim of our study was to prospectively monitor and analyze lipid metabolism abnormalities in *de novo* CML patients treated with NILO at the start and during the first year of TKI therapy and to compare the results with patients receiving IMA. We evaluated the association of these laboratory changes with the risk of future CV events, CV risk dynamics, and use of statins during TKI administration based on the European Society of Cardiology (ESC) guidelines [5].

Our study was approved by the EC and patients provided written consent. Ten hematologists from four hematological centers co-operating within the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL) participated in this study. Patients received a diagnostic workup at baseline and every three months during the first year of TKI therapy, including lipid profile [total cholesterol (TC), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triacylglycerols (TG)] and CV risk assessment based on ESC guidelines [5]. In cases when patients fulfilled criteria and initiated hypolipidemic therapy (fluvastatin), their subsequent results were not included in the analysis.

This study included 57 consecutive *de novo* CML patients in chronic phase (CP) treated with NILO ( $n = 23$ ) or

IMA ( $n = 34$ ) in the first line [median follow-up (min–max): NILO-9 (3–24) months, IMA-12 (3–15) months] (Table 1). TKI for each patient was chosen individually, based on patients' comorbidities. NILO patients were significantly younger than IMA patients (median age: 45 vs. 67 years;  $p = .0006$ ) and had significantly less comorbidities at baseline (diabetes mellitus: 0% vs. 32%;  $p = .0018$ ; ischemic heart disease: 0% vs. 24%;  $p = .0163$ ). The baseline CV risk SCORE [5] value of NILO patients was also significantly lower (median of SCORE: 6% vs. 1%;  $p = .009$ ). There were significantly more patients already on or newly indicated for statins at the start of IMA treatment (68% – 7/34 and 16/34 patients, respectively) compared to NILO (30% – 3/23 and 4/23 patients, respectively) ( $p = .0076$ ). More than half of newly diagnosed CML patients (53%, 30/57 patients) were already using statins or were indicated for statin therapy. These findings reflect the general situation in central Europe, with the Czech Republic being among countries with a higher CV risk [5]. Median of Q BCRL-ABL after 6 months of TKI therapy was 0.26% (min–max: 0.05–9.0%).

Baseline levels of TC between groups were not different, which could be affected by the different percentages of patients already on statins at baseline. In the NILO group, we observed a significant increase in TC (month 0 vs. 6: 4.5 vs. 5.5 mmol/l;  $p = .001$ ) and LDL-cholesterol (month 0 vs. 6: 2.7 vs. 3.0 mmol/l;  $p = .001$ ), which confirmed previous findings [2]. There was also a significant increase in HDL-cholesterol (month 0 vs. 6: 1.0 vs. 1.5 mmol/l;  $p = .001$ ) and decrease in TG (month 0 vs. 6: 1.95 vs. 1.32 mmol/l;  $p = .0045$ ) similar to previous studies [2]. We associated changes in the lipid spectrum during TKI administration with the development of CV risk. In the NILO group, only 3/23 (13%) patients had an increased CV risk from low to high/very high and only 2/

**Table 1.** Baseline characteristics and changes of serum lipids during TKI therapy (baseline – M0, month 6 – M6).

Baseline characteristics				
	Imatinib (n = 34)	Nilotinib (n = 23)	p	
Age median (yrs)	67	45	.0006	
Diabetes mellitus (n)	11	0	.0018	
Ischemic heart disease (n)	8	0	.0163	
CV risk SCORE median (%)	6	1	.0009	
Already on statins/newly indicated	23	7	.0076	
Metabolic changes during TKI therapy				
	Imatinib (M0 n = 21, M6 n = 16)	p	Nilotinib (M0 n = 19, M6 n = 18)	p
Total cholesterol M0 median (min–max) [mmol/l] <sup>a</sup>	5.2 (2.2–7.1)	.0966	4.5 (2.8–6.9)	.0001
Total cholesterol M6 median (min–max) [mmol/l] <sup>a</sup>	4.5 (1.9–6.3)		5.5 (3.9–6.8)	
HDL-cholesterol M0 median (min–max) [mmol/l] <sup>a</sup>	1.2 (0.6–1.7)	.0011	1.0 (0.4–1.8)	.0001
HDL-cholesterol M6 median (min–max) [mmol/l] <sup>a</sup>	1.45 (0.6–3.9)		1.5 (1.0–2.8)	
LDL-cholesterol M0 median (min–max) [mmol/l] <sup>a</sup>	2.9 (0.8–4.3)	.1456	2.7 (1.4–5.4)	.0001
LDL-cholesterol M6 median (min–max) [mmol/l] <sup>a</sup>	2.45 (0.6–4.9)		3.0 (2.0–4.4)	
Triacylglycerols M0 median (min–max) [mmol/l] <sup>a</sup>	2.04 (0.5–4.9)	.0004	1.95 (0.8–4.8)	.0045
Triacylglycerols M6 median (min–max) [mmol/l] <sup>a</sup>	1.28 (0.4–3.3)		1.32 (0.6–5.9)	
Weight M0 median (min–max) [kg]	79 (57–139)	.0361	82 (52–133)	.3969
Weight M6 median (min–max) [kg]	80 (56–148)		81 (52–127)	
Syst. BP M0 median (min–max) [mmHg]	141 (92–194)	.9225	141 (108–169)	.0536
Syst. BP M6 median (min–max) [mmHg]	144 (101–180)		150 (97–170)	
Fasting glycemia M0 median (min–max) [mmol/l]	5.7 (4.5–21.0)	.8326	5.2 (4.0–6.7)	.0386
Fasting glycemia M6 median (min–max) [mmol/l]	5.9 (4.6–11.5)		5.5 (4.7–6.8)	

<sup>a</sup>Only data of pts without hypolipidemic therapy at the time of study visit were analyzed.

23 (8.7%) patients were newly indicated and treated with statin during the study period, which effectively lowered TC and HDL-cholesterol levels afterwards. Although TC and LDL-cholesterol elevation were observed in more patients, these patients did not fulfill other criteria for statin therapy according to recent ESC guidelines. No CV event was recorded in patients with nilotinib during the study period. However, the median follow up of patients in NILO group was 9 only months and there are reports of late CVEs occurring 3–4 years after the start of NILO [6]. On the other hand our analysis confirmed previous studies showing that major metabolic laboratory changes occur early in treatment, which was within the first 3–6 months of NILO therapy. No further increase in serum lipid levels seemed to occur thereafter. Therefore, it is very likely that any further increase in CV risk will be not associated with changes in lipid spectrum caused by NILO therapy.

In the IMA group, we observed an insignificant decrease in TC and LDL-cholesterol levels (TC month 0 vs. 6: 5.2 vs. 4.5 mmol/l;  $p = .0966$ , LDL-cholesterol month 0 vs. 6: 2.9 vs. 2.45 mmol/l;  $p = .1456$ ), but a significant increase in HDL-cholesterol levels (month 0 vs. 6: 1.2 vs. 1.45 mmol/l;  $p = .0011$ ) and decrease in TG (month 0 vs. 6: 2.04 vs. 1.28 mmol/l;  $p = .0004$ ), which could reflect a possible protective effect of imatinib as previously described [4]. During the first year of IMA therapy, 2/34 (6%) patients with a previous low CV risk moved to a high/very high-risk category and 2/11 IMA patients not indicated for or using statins from start fulfilled the criteria for statin therapy, which was then initiated. In all cases this increase in CV risk was related to preexisting comorbidities and their

progression over time (hypertension, kidney functions, etc.) and not to further elevation in serum cholesterol (TC, LDL-cholesterol) during IMA treatment. Similarly to NILO group, no CV events occurred during follow-up. While the percentage of IMA patients with increased CV risk and statin indication was similar to the NILO group and no patient moved from high to a low/medium CV risk category during IMA treatment, the real clinical benefit of IMA to CV risk was not proven. However, in our study and in daily routine practice, IMA and NILO are prescribed to different patient groups, and therefore lipid level changes and CV risk dynamics are difficult to compare without a randomized study.

Although NILO and IMA induce fast alterations in lipid metabolism, we found that these abnormalities do not cause changes in CV risk or induce the need for statin therapy during the first year of TKI treatment. However, due to patient preselection between both TKIs in routine practice, a randomized study with a longer follow-up is needed to definitively confirm our results.

#### Disclosure statement

T.H. – no relevant conflict of interest; L.S. – no relevant conflict of interest; D.Z. serves as a consultant for Novartis, Bristol Myers Squibb, Angelini and Incyte; B.W. – no relevant conflict of interest; Z.S. – no relevant conflict of interest; J.P. declares no relevant conflict of interest; P.B. – no relevant conflict of interest; L.S. – no relevant conflict of interest, P.R. – serves/d as a consultant for Novartis; Z.R. received research funding from Novartis, Bristol Mayer Squibb and serves on a speakers bureau for Novartis and Bristol Myers Squibb; J.M. received research funding from Novartis, Angelini, Bristol



Mayer Squibb and serves on a speakers bureau for Novartis and Bristol Myers Squibb.

### Funding

The study was performed on behalf of the CELL – the Czech Leukemia Study Group – for Life and supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant No. [17-30397A] (all rights reserved).

### References

- [1] Bower H, Björkholm M, Dickman PW, et al. Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population. *JCO*. 2016;34(24):2851–2857.
- [2] Rea D, Mirault T, Cluzeau T, et al. Early onset hypercholesterolemia induced by the 2nd-generation tyrosine kinase inhibitor nilotinib in patients with chronic phase-chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014;99(7):1197–1203.
- [3] Racil Z, Koritakova E, Sacha T, et al. Insulin resistance is an underlying mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy. *Am J Hematol*. 2018;93(10):E342–E345.
- [4] Gacic J, Vorkapic E, Olsen RS, et al. Imatinib reduces cholesterol uptake and matrix metalloproteinase activity in human THP-1 macrophages. *Pharmacol Rep*. 2016;68(1):1–6.
- [5] Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: the sixth joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016;37(29):2315–2381.
- [6] Hadzjuszufovic E, Albrecht-Schgoer K, Huber K, et al. Nilotinib-induced vasculopathy: identification of vascular endothelial cells as a primary target site. *Leukemia*. 2017;31(11):2388–2397.

## 6. Edukační činnost a osvěta nad rámec odborné veřejnosti

Ve světle náročnosti a relativně nízké úspěšnosti výzkumných snah cílených na odhalení mechanismů rezistence na TKI překvapil svou jednoduchostí a důvtipem experiment provedený v Hammersmith hospital pod vedením D. Marina, který pomocí monitorování pacienty skutečně užitých tablet TKI jednoznačně prokázal vztah mezi adherencí k léčbě a udržením optimální léčebné odpovědi [34,35]. O důležitosti adekvátní informovanosti pacientů s CML o jednotlivých aspektech léčebného procesu právě ve vztahu k adherenci k léčbě pak byly podány důkazy jak ze strany odborníků hematologů [111], tak i samotnými pacienty a jejich obhájci v rozsáhlém dotazníkovém šetření prokazujícím klíčovou úlohu uspokojivého řešení NÚ a pocitu dobré informovanosti od ošetřujících hematologů v podpoře adherence [37]. Nezbytnost dostatečného přísunu informací, potřeba adekvátní psychologické podpory a kvalita vztahu mezi ošetřujícím specialistou a pacientem hrají neméně důležitou roli i v kontextu nového trendu v managementu pacientů s CML, a sice při vysazování dlouhodobé terapie TKI ve snaze docílit remisi bez nutnosti užívání léčby (treatment-free remission, TFR). Pocity strachu či úzkosti v průběhu vysazení terapie a pocity deprese v období nutnosti jejího navrácení trpělo shodně 56 % z pacientů oslovených v rámci dotazníkového šetření organizovaného opět samotnými pacienty s CML a jejich zástupci, jehož výsledky byly recentně publikovány v prestižním časopise *Leukemia* [38]. Jiné studie ukázaly, že nejistota a obavy z potenciálních nepříznivých důsledků ukončení léčby byly jedněmi z hlavních důvodů, proč nezanedbatelný podíl pacientů, splňujících kritéria pro vysazení TKI, raději volil variantu setrvání na terapii [112,113]. V analýze postojů k vysazení u 329 čínských pacientů s CML polovina respondentů vyžadovala od svých lékařů více evidence-based informací o TFR [114]. V kontextu výše uvedených faktů nabývá logický požadavek na dostatečnou a srozumitelnou informovanost pacientů a důvěryhodnou a empatickou interakci ve vztahu lékař-pacient na zcela zásadním významu. Rozpoznání jeho důležitosti vedlo uchazečku k intenzivní a systematické edukační činnosti a osvětě zaměřené jak na odbornou veřejnost, tak na samotné pacienty a jejich blízké, a to nejen nad rámec ordinací a lůžkových zařízení, ale i za hranicemi ČR na mezinárodní úrovni.

## 6.1. Spolupráce s organizací Diagnóza leukemie

Spolek „Diagnóza leukemie, z.s.“ vznikl v roce 2015 transformací občanského sdružení „Diagnóza CML“, založeného v roce 2006 jednou z pacientek s CML paní Janou Pelouchovou za účelem poskytování pomoci a zlepšování kvality života pacientů s leukemií a jejich rodin. Jako hlavní úkol si organizace vytyčila hájení zájmu pacientů při jednáních se zdravotnickými institucemi a plátcí pojištění a tvorbu vzdělávacích programů ve smyslu zprostředkování odborných informací o diagnostice, léčbě a nových léčebných možnostech v oblasti leukemií. Nástroji k plnění stanovených cílů se staly jednak informační internetový portál (<http://diagnoza-cml.cz/>), kde jsou k dispozici i publikace spolku a bohatá video-knihovna, dále profil na sociálních sítích (<https://www.facebook.com/diagnoza.leukemie/>), a především pak pravidelné edukační semináře pro pacienty a jejich blízké. Spolek také provozuje nepřetržitou telefonní a e-mailovou poradenskou linku.

Organizace je díky své aktivní zakladatelce a předsedkyni významně zapojena do činnosti mezinárodní patientské komunity, a to zejména v rámci „CML Advocates Network“ (<https://www.cmladvocates.net>), globální internetové platformy sdružující 125 patientských podpůrných organizací z 93 zemí ze všech kontinentů, ale také v rámci dalších patientských sítí zaměřených na hematologické malignity: „CLL Advocates Network“, „MPN Advocates Network“ a „Acute Leukemia Advocates Network“. Všechny zmíněné neformální patientské sítě jsou zastřešeny švýcarskou nadací „Leukemia Patient Advocates Foundation“ ([www.lepaf.org](http://www.lepaf.org)), kde Jana Pelouchová zastává prezidentskou funkci. Spolek „Diagnóza leukemie“ je aktivní rovněž v rámci „MDS Alliance“, „Evropské koalice pacientů s rakovinou“ (European Cancer Patient Coalition, ECPC) a také „Evropské hematologické společnosti“ (European Hematology Association, EHA).

Krátce po založení spolku oslovila uchazečku předsedkyně sdružení s nabídkou členství v nově se rekrutující Poradní radě. Od roku 2007 se tak datuje téměř 15letá velmi plodná a intenzivní spolupráce uchazečky se sdružením hned v několika rovinách. Oboustranně velmi oblíbenou edukační aktivitou jsou odborné **přednášky na Regionálních setkáních pacientů a rodinných příslušníků**, konaných každoročně v Brně od roku 2008. V rámci již 12 proběhlých ročníků byla ve výběru témat, která jsou diskutována se samotnými pacienty a předsedkyní spolku a reflektují aktuální dění na poli výzkumu, diagnostiky a léčby CML, uchazečkou pokryta

problematika CML v celé její šíři, počínaje vysvětlením podstaty choroby a jejího vzniku, způsobu, jakým se diagnostikuje, přes nejrůznější aspekty terapie, jakými jsou pravidelně aktualizovaná léčebná doporučení, intolerance a rezistence na léčbu a vývoj nových léčebných možností, až po kontrolované pokusy o vysazování dlouhodobé terapie a snahu o úplné vyléčení z leukemie bez nutnosti celoživotní medikace. Setkání, doplněná přednáškami dalších odborníků nejen z oblasti klinické hematologie, ale i medicínského práva, laboratorní diagnostiky či například mapující historii poznání a léčby leukemií, se stala pro účastníky vyhledávanou a vítanou příležitostí, nejen jak si rozšířit znalosti o svém onemocnění a jeho léčbě, ale též možností sdílet své osudy s ostatními pacienty navzájem a setkat se a diskutovat se svými lékaři i mimo nemocniční prostředí (Obrázek 9).

Občanské sdružení Diagnóza CML  
a Interní hematologicko-onkologická klinika Lékařské  
fakulty MU a Fakultní nemocnice Brno  
si Vás dovoluji pozvat na

### REGIONÁLNÍ SETKÁNÍ ZDRAVOTNÍKŮ, PACIENTŮ A JEJICH RODINNÝCH PŘÍSLUŠNÍKŮ

v sobotu 27. dubna 2013 od 10 do 14  
hodin v hotelu Voroněž I,  
Křížkovského 47, Brno  
(z nádraží tramvaj č. 1 – zastávka  
„Výstaviště hlavní vstup“)

Potvrďte laskavě svoji účast  
na e-mail janape@centrum.cz  
nebo telefonicky na 728 308 360

**CML**  
diagnóza

### ODBOBNÝ PROGRAM

Je možné vyléčit CML?

MUDr. Daniela Žáčková

Historie poznání leukemií a jejich léčby

Prof. MUDr. Michael Doubek, Ph.D.

Komplementární prostředky léčby CML

aneb co pro sebe mohou udělat?

Doc. MUDr. Andrea Janíková, Ph.D.

Zahájení vzdělávací kampaně

„Jaké mám PCR?“

J. Pelouchová

Diskuze v kuloárech

Oběd



*Obrázek 9.* Ukázka z programu jednoho z Regionálních setkání zdravotníků, pacientů a jejich rodinných příslušníků organizovaného spolkem Diagnóza leukemie. Vpravo MUDr. Daniela Žáčková, Ph. D. s předsedkyní a zakladatelkou spolku Janou Pelouchovou během I. Českého hematologického a transfuziologického sjezdu v září 2018 v Praze.

Na úspěch živých setkání s pacienty a jejich blízkými navázal volný **cyklus video-přednášek**, ve kterých zejména členové Poradní rady spolku seznamují diváky a posluchače s nejnovějšími vědeckými poznatky a závěry klinických studií ve srozumitelném jazyce. V rámci tohoto cyklu uchazečka přispěla video-rozhovorem nazvaným „Kde si dnes stojíme v léčbě CML?“, který byl v roce 2013 vydán ve formě DVD a rovněž je k dispozici na webových stránkách spolku

<http://diagnoza-cml.cz/co-je-leukemie-uvod/priznaky-a-priciny-cml/uvod-do-problematiky-lecby-cml/kde-si-dnes-stojime-v-lecbe-cml>). Analogický způsob šíření informací byl využit také v prosinci roku 2019, kdy uchazečka z pozice hlavní investigátorky formou video-rozhovoru informovala patientskou komunitu o principech a pravidlech unikátní multicentrické akademické studie HALF, která si klade za cíl v celonárodním měřítku prověřit úspěšnost a bezpečnost vysazení TKI po předchozí dvoustupňové redukci dávky a je řízena a organizována z domovské kliniky uchazečky ve spolupráci s LF MU. Videorozhovor rozdělený do 11 částí je dostupný z: <https://www.youtube.com/playlist?list=PLZpMSlgWJKrNxbOuMMWypgBWQJMMDFcsX>.

Úspěšná moderní léčba CML byla uchazečkou prezentována a popularizována také v **televizním vysílání**, a sice na programu ČT1 v pořadu „Chronická myeloidní leukemie“, vysílaného v rámci cyklu „Medicína pro 21. století“ v premiéře dne 7. 6. 2012 a dostupného v archivu ČT na stránkách: <https://www.ceskatelevize.cz/ivysilani/10175805663-medicina-pro-21-stoleti/212563231050002-chronicka-myeloidni-leukemie>, a dále na Praha TV a Brno TV v pořadu „Život s diagnózou: Chronická myeloidní leukemie“, který měl premiéru 6. 1. 2019, je opakovaně reprízován a je i nadále přístupný ke zhlédnutí na stránkách: <https://prahatv.eu/porady/zivot-s-diagnozou/zivot-s-diagnozou-06-01-2019-15-33>. V prvním zmíněném pořadu byla úspěšná terapie CML prezentována na životním příběhu pacientky, která je dlouholetou aktivní členkou spolku „Diagnóza leukemie“, a ve druhém, paralelně s neméně poutavým osudem další úspěšně léčené pacientky s CML, byly kromě výkladu uchazečky aktivity a přínos spolku prezentovány přímo jeho předsedkyní.

Spolupráce s patientskou organizací a vnímání potřeb samotných pacientů inspirovaly uchazečku k **autorství komplexního edukačního materiálu**, který pokrývá celou šíři problematiky CML od vysvětlení podstaty vzniku onemocnění, přes detailní popis jeho symptomatologie a diagnostiky, až k vlastní moderní terapii CML, zasazené do širokého kontextu její historie, popisu a vysvětlení mechanismu jejího účinku, popisu a návrhu řešení jejích NÚ, vysvětlení mechanismů rezistence na TKI, definování léčebných cílů a odpovědí na léčbu, zmínky o možných interakcích s jinými léky, doporučení pro životosprávu a plánování rodičovství. Informační brožura nazvaná „Chronická myeloidní leukemie – informace pro pacienty a jejich blízké“, vydaná CELL v roce 2012, se stala vítaným zdrojem informací nejen

pro pacienty a jejich rodinné příslušníky, ale i pro odesílající hematology z oblastních nemocnic, laboratorní pracovníky, zástupce farmaceutických společností a studenty v pre- i postgraduálním studijním programu. Výtisky jsou poskytovány zdarma všem nově diagnostikovaným pacientům, ale i těm, kteří jsou léčeni delší dobu, a to ve všech centrech specializované hematologické péče, která o dodání brožury projevila zájem. Brožura je rovněž zdarma ke stažení na stránkách CELL: <http://www.leukemia-cell.org/res/f/cml.pdf>, a též na stránkách ELN, kde může posloužit česky mluvícím pacientům žijícím v zahraničí: [https://www.leukemia-net.org/content/patients/leukemias/cml/index\\_eng.html](https://www.leukemia-net.org/content/patients/leukemias/cml/index_eng.html). Brožura (Žáčková D. *Chronická myeloidní leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké*. Česká leukemická skupina - pro život (CELL), Brno, 2012, 84 s. ISBN 978-80-260-1828-5) je uvedena jako Příloha 21 v kapitole 6.3. Přílohy ke kapitole 6.

## 6.2. Mezinárodní osvětová činnost

Plodná spolupráce uchazečky s patientskou organizací nezůstala nepovšimnuta ani za hranicemi ČR a našla svůj odraz hned v několika aktivitách. Ve **vyzvané přednášce**, nazvané „The investigator: Why I think patients enroll on a particular study“, doplňující sdělení Jany Pelouchové nazvané „The patient advocate: How to bring patients closer to the researchers“ a přednesené na 12. kongresu Partnerships in Clinical Trials (PCT) konaném ve Vídni ve dnech 20. – 21. 11. 2013, uchazečka prezentovala mimo jiné intenzivní spolupráci lékaře s patientským sdružením coby jeden z předpokladů úspěšného náboru vhodných a motivovaných pacientů do klinických studií. Jedním z vrcholů spolupráce uchazečky s patientskou komunitou na mezinárodní úrovni byly **dvě vyzvané přednášky na světovém summitu** představitelů patientských organizací „CML Horizons 2016“ konaném ve slovinské Ljubljani ve dnech 6. – 8. 5. 2016. Na konferenci, hostící 132 představitelů patientských organizací z 65 zemí Evropy, Severní Ameriky, Asie, Afriky, Středního Východu a Latinské Ameriky, prezentovala uchazečka po boku světově uznávaných expertů na CML, prof. Gianantonia Rostiho z italské Bologni a prof. Stephena O’Briena z anglického Newcastleu, následující sdělení: Zackova D. „Switching the TKI therapy in suboptimal response“ (dostupné zde: <https://vimeo.com/167951367>) a Zackova D. „CML in elderly: The challenge of co-morbidities and cardiovascular predispositions on choice of therapy“ (dostupné zde:

<https://vimeo.com/168552326>). Obě sdělení byla provázena velkým zájmem posluchačů a bohatou diskuzí, a to nejen v čase oficiálně pro ni vymezeném, ale prakticky po celou dobu trvání kongresu (Obrázek 10). Kompletní shrnutí celého summitu je k dispozici na stránkách CML Advocates Network (<https://www.cmladvocates.net/download/cml-horizons-conferences/cml-horizons-2016/639-cml-horizons-2016-report/file>) a výňatek týkající se sdělení uchazečky spolu s programem kongresu je součástí kapitoly 6.3. Přílohy ke kapitole 6 jako Příloha 22.



*Obrázek 10.* Atmosféra světového summitu představitelů pacientských organizací "CML Horizons 2016", konaného ve slovinské Ljubljani ve dnech 6. - 8. 5. 2016.

Kromě vlastních prezentací a formálních i neformálních diskuzí se uchazečka v rámci kongresu účastnila také debatního panelu na téma vysazování terapie TKI, resp. dosažení TFR. Toto velmi aktuální téma napříč odbornou veřejností i pacientskou komunitou se stalo také jedním z nosných bodů **mezinárodní osvětové kampaně nazvané „What If? What Now?“** – projektu

zaštitěného společností Novartis a soustředěného na zlepšení komunikace mezi lékaři a pacienty, na zvýšení informovanosti pacientů a pochopení různých aspektů onemocnění a jeho léčby včetně jejího vysazování, na zlepšení managementu NÚ, které jsou mnohdy ze strany lékařů podceňovány ve světle dobré léčebné odpovědi, na zvýšení dostupnosti adekvátní léčby a nástrojů k monitorování jejího efektu v rozvojových oblastech, a v neposlední řadě na aktuální téma vstupu generických přípravků TKI na trh a vyjasnění pravidel jejich preskripce a užívání. Pozvání uchazečky do **Poradní rady** této mezinárodní osvětové kampaně jako jediné zástupkyně zemí bývalého východního bloku bylo jedním z vrcholů jejího systematického úsilí na poli spolupráce s patientskou komunitou (Tabulka 4).

*Tabulka 4.* Složení Poradní rady mezinárodní osvětové kampaně "What If? What Now?".

<b>Specialisté v oblasti CML</b>	<b>Země</b>
- <b>Gianantonio Rosti</b>	Itálie
- <b>Giuseppe Saglio</b>	Itálie
- <b>Valentín García-Gutiérrez</b>	Španělsko
- <b>Antonio Almedia</b>	Portugalsko
- <b>Andrija Bogdanovic</b>	Srbsko
- <b>Peter Westerweel</b>	Nizozemí
- <b>Daniela Žáčková</b>	Česká republika
<b>Zástupci patientských organizací</b>	
- <b>Giora Sharf</b>	Izrael
- <b>Jelena Čugurovič</b>	Srbsko
- <b>Felice Bombaci</b>	Itálie
- <b>Šarunas Narbutas</b>	Litva
- <b>Mina Daban</b>	Francie
- <b>Nigel Deekes</b>	Velká Británie
- <b>Jan de Jong</b>	Nizozemí

Ze série virtuálních i prezenčních meetingů a jednání, započatých v září roku 2016, vyplynuly jasné kroky k naplnění vytyčených cílů: audit a analýza dostupných edukačních materiálů napříč patientskými podpůrnými organizacemi, vytvoření konkrétních edukačních nástrojů pokrývajících hlavní témata na poli diagnostiky a léčby CML a zaměřených nejen na edukaci pacientů, ale také na lékaře s cílem zlepšení či přímo výuky jejich vzájemné komunikace, a



konečně plán odborné publikace na téma TFR, která by reprezentovala sdílené stanovisko poradců jak z řad zdravotníků, tak samotných pacientů.

V rámci plnění jednotlivých cílů se uchazečka zhostila širokého tématu „Understanding your diagnosis“, jednak ve formě spoluautorství edukačního letáku a zejména pak ve formě natočení **edukačního video-rozhovoru** „A CML patient and specialist discuss: Understanding your diagnosis“ o mechanismu vzniku, epidemiologii, diagnostice a léčbě CML, vedeném s předsedou britské patientské organizace „CML Support“ Nigelem Deekesem (Obrázek 11). Rozhovor natočený v Londýně 20. 9. 2017 je veřejně dostupný pro všechny zájemce o problematiku na stránkách: [https://www.youtube.com/watch?v=qTGB2Wsz\\_qU&t=175s](https://www.youtube.com/watch?v=qTGB2Wsz_qU&t=175s).



*Obrázek 11.* Záběr z video-rozhovoru mezi MUDr. Danielou Žáčkovou, Ph. D. a předsedou britské patientské organizace Nigelem Deekesem na téma "Understanding your diagnosis". Natočeno v Londýně 20. 9. 2017 v rámci mezinárodní osvětové kampaně „What If? What now?“.

Vyvrcholením společného úsilí členů Poradní rady se stala **unikátní publikace prezentující sdílené stanovisko** odborníků z řad lékařů přímo angažovaných v péči o pacienty s CML na straně jedné a reprezentantů podpůrných patientských organizací, mnohdy samotných pacientů se zkušeností s TFR na straně druhé, na téma vysazování dlouhodobé terapie TKI s cílem dosažení TFR. Na práci nazvané „Considerations for Treatment-free Remission in Patients With Chronic Myeloid Leukemia: A Joint Patient Physician Perspective“, publikované v roce 2018 v časopisu *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* (IF = 2,274 v roce 2018; ONCOLOGY Q3) se podílelo 6 pacientů či zástupců patientských podpůrných organizací a 6 specialistů na CML, kteří zaujali společné stanovisko k jednotlivým aspektům vysazování TKI, orientované zejména na potřeby pacientů, ale také směřující k ošetřujícím lékařům, například s pobídkou k implementaci cílených dotazů na psychologické a emocionální faktory spojené s procesem TFR do rutinního klinického vyšetření. V publikaci je kladen důraz mimo jiné na adekvátní terminologii, která sama může ovlivnit pacientovo vnímání situace. Pro návrat onemocnění na molekulární úrovni není použit obligátní termín „relaps“, ale „rekurence“ se zdůrazněním, že se nejedná o selhání léčby. Naopak, pacienti a lékaři by měli být instruováni, že v rámci pokusu o vysazení TKI čekají pacienta něco jako „lékové prázdniny“, které mohou trvat měsíce či dlouhé roky a které mohou být ukončeny opětovným nasazením léčby TKI, aniž by to znamenalo prohru či selhání procesu. V diskuzi s pacienty by měla být zdůrazněna rovněž nutnost vyšší frekvence návštěv po dobu vysazení a také možnost vzniku NÚ známých pod pojmem tzv. syndromu z vysazení TKI. Lze předpokládat, že adekvátně edukovaný pacient, motivovaný mimo jiné i zájmem o jeho pocity, myšlenky a obavy, bude snáze a častěji volit variantu pokusu o vysazení TKI a tím navýší podíl pacientů kladně se rozhodujících pro pokus o TFR.

Zmíněná práce: Saglio G, Sharf G, Almeida A, Bogdanovic A, Bombaci F, Čugurović J, Deekes N, Garcia-Gutiérrez V, de Jong J, Narbutas Š, Westerweel P, Zackova D. Considerations for Treatment-free Remission in Patients With Chronic Myeloid Leukemia: A Joint Patient Physician Perspective. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2018;18(6):375-379 (IF = 2,274 v roce 2018; ONCOLOGY Q3; 5 citací ve WOS či Scopus, bez autocitací) je součástí kapitoly 6.3. Přílohy ke kapitole 6 jako Příloha 23.

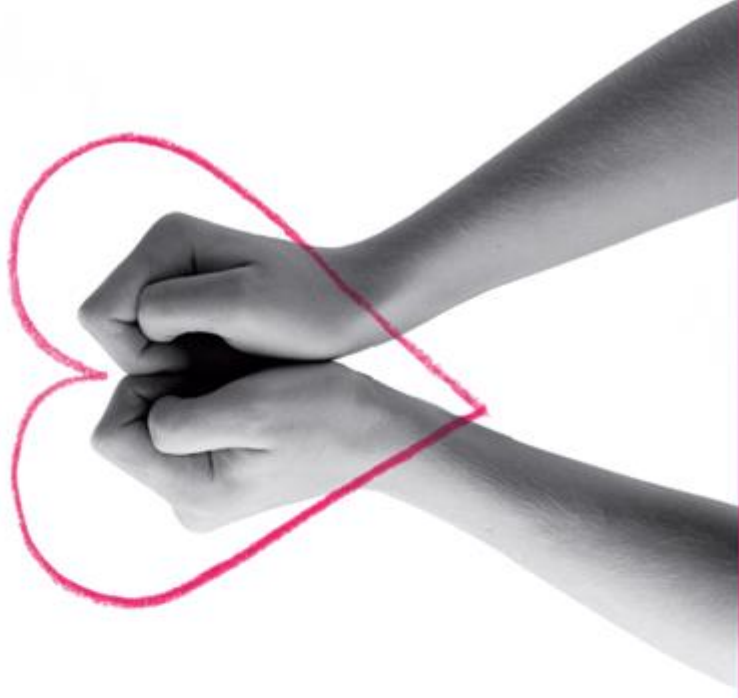
## 6.3. Přílohy ke kapitole 6

### 6.3.1. Příloha 21

Žáčková D. *Chronická myeloidní leukemie – informace pro pacienty a jejich blízké*. Brno: Česká leukemická skupina - pro život (CELL), 2012. ISBN 978-80-260-1828-5.

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Ucelený edukační materiál pokrývající celou šíři problematiky CML od vysvětlení podstaty vzniku onemocnění, přes detailní popis jeho symptomatologie a diagnostiky, až k vlastní moderní terapii CML, zasazené do širokého kontextu její historie, popisu a vysvětlení mechanismu jejího účinku, popisu a návrhu řešení jejích NÚ, vysvětlení mechanismů rezistence na TKI, definování léčebných cílů a odpovědí na léčbu, zmínky o možných interakcích s jinými léky, doporučení pro životosprávu a plánování rodičovství
- Vítaný zdroj informací nejen pro pacienty a jejich rodinné příslušníky, ale i pro odesílající hematology z oblastních nemocnic, laboratorní pracovníky, zástupce farmaceutických společností a studenty v pre- i postgraduálním studijním programu



# CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

informace pro pacienty a jejich blízké

MUDr. Daniela Žáčková

## PODĚKOVÁNÍ

Autoria děkují za podporu České leukemické skupině pro život (The Czech Leukemia Study Group for Life, CELL, [www.leukemia-cell.org](http://www.leukemia-cell.org)), která chápe význam kvalitní informovanosti pacientů s hematologickými chorobami a jejich blízkých jako jeden z pilířů úspěšné diagnostiky a léčby.

Rovněž děkujeme kolegům za podporu a spolupráci, zejména pak prof. MUDr. J. Mayerovi, CSc., bez jehož intelektuálního vedení a motivace by publikace nezvážila, a MUDr. Haně Klamové, CSc. za laskavou a podnětnou recenzi díla.

V poslední řadě patří poděkování pacientům a jejich blízkým, jejichž zkušenosti, potřeby, podněty a dotazy byly autorce nepostradatelnou inspirací.



Česká leukemická skupina – pro život  
2012

## CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

informace pro pacienty a jejich blízké

MUDr. Daniela Žáčková

MUDr. Daniela Žáčková  
**Chronická myeloidní leukemie**  
informace pro pacienty a jejich blízké

**Vyloučení odpovědnosti**

Autorka i vydavatel věnovali maximální možnou pozornost tomu, aby informace uvedené v brožurce odpovídaly aktuálnímu stavu znalosti v době přípravy publikace k vydání. I přes pečlivou kontrolu nelze s naprostou jistotou zaručit úplnou bezchybnost publikovaných údajů. Z těchto důvodů se vylučují jakékoliv nároky na úhradu ať již přímých či nepřímých škod.

Tato publikace ani žádná její část nesmí být kopírována, rozmnožována ani jinak šířena bez písemného souhlasu vydavatele.

**Autor:**

MUDr. Daniela Žáčková  
Interní, hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

**Recenzenti:**

MUDr. Hana Klamová, CSc.  
Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

© Daniela Žáčková, 2012  
ISBN 978-80-260-1828-5

**OBSAH**

10	1. ÚVOD	40
12	2. JAK VZNIKÁ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?	41
12	2.1. Jak vznikají a k čemu slouží krvinky?	41
13	2.2. Co to je leukemie a jaké jsou její druhy?	41
15	2.3. Co je chronická myeloidní leukemie a jaká je její podstata?	46
16	2.4. Kdo může onemocnět chronickou myeloidní leukemií?	47
17	2.5. Co způsobuje vznik chronické myeloidní leukemie?	49
18	3. JAKÁ JSOU STADIA CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?	53
21	4. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE PROJEVUJE?	57
24	5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?	59
24	5.1. Anamnéza a fyzikální vyšetření	63
25	5.2. Krevní obraz a diferenciální rozpočet bílých krvinek	63
26	5.3. Biochemický rozbor krve	64
26	5.4. Vyšetření kostní dřeně – cytologické, případně histologické	64
29	5.5. Cytogenetické vyšetření kostní dřeně a periferní krve	67
30	5.6. Molekulární biologické vyšetření kostní dřeně a periferní krve	67
31	5.7. Další doplňující vyšetření	68
32	6. JAK SE ODHADUJEME PROGNÓZU PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?	71
32	6.1. Vstupní prognostické faktory (v době diagnózy)	73
34	6.2. Prognostické faktory spjaté s léčbou imatinibem	74
34	6.3. Prognostické faktory u alogenní transplantace krevtvoorných buněk	74
35	7. OD JAKÝCH PODOBNÝCH ONEMOCNĚNÍ JE TREBA CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII ODLÍŠIT?	75
36	8. JAK LÉČIME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?	75
36	8.1. Cíle léčby chronické myeloidní leukemie	76
37	8.2. Pohled do historie léčby chronické myeloidní leukemie	77
39	8.3. Cytoredukcí a podpůrná terapie	78
40	8.3.1. Hydroxyurea (Litalir)	79
40	8.3.2. Anagrelid (Thromboreductin)	79

**OBSAH**

8.3.3. Leukaferéza, event. trombocytaferéza	40
8.3.4. Podpůrná léčba	41
8.4. Léčba tyrozinkinázovými inhibitory (TKI)	41
8.4.1. Imatinib (Glivec)	41
8.4.2. Dasatinib (Sprycel)	46
8.4.3. Nilotinib (Tasigna)	47
8.4.4. Rezistencce na tyrozinkinázové inhibitory	49
8.4.5. Nežádoucí účinky tyrozinkinázových inhibitorů a jejich řešení	53
8.4.6. Interakce tyrozinkinázových inhibitorů s dalšími léky	57
8.5. Monitorování efektu léčby pacientů s CML	59
8.6. Léčba alogenní transplantací krevtvoorných buněk (alo-TKB)	63
8.6.1. Co to je alo-TKB a jak se provádí?	63
8.6.2. Kdo může darovat krevtvoorné buňky pro alo-TKB?	64
8.6.3. Komplikace alo-TKB	64
8.6.4. Doporučení pro léčbu alo-TKB v éře TKI	67
8.7. Léčba interferonem- $\alpha$	67
8.8. Doporučení léčby pacientů s CML	68
8.9. Léky ve vývoji a klinickém zkoušení	71
9. JAKÝ JE REŽIM PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?	73
9.1. Zaměstnání	73
9.2. Zálhy a tělesná aktivita	74
9.3. Životospráva	74
9.4. Cestování	75
9.5. Nemoci, operace a úrazy nesouvisející s CML	75
9.6. Alternativní léčebné metody	76
10. JAK PLANOVAT RODIČOVSTVÍ U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?	77
10.1. Plánování rodičovství při onemocnění CML	77
10.2. CML zjištěná v těhotenství	78
11. ZÁVĚR	79

## 1. ÚVOD



Vážení čtenáři,  
dovoluji si Vám předložit publikaci, která je věnována v mnoha ohledech vyjimečné nemoci – chronické myeloidní leukemii.

Chronická myeloidní leukemie (CML) je nádorovým onemocněním krevetvorné tkáně, jehož výjimečné postavení mezi ostatními nejen krevními, ale i nádorovými chorobami jako takovými má hned několik důvodů. V historii výzkumu nádorových onemocnění byla CML první chorobou, u které byla nalezena typická chromozomální porucha, nazvaná dle místa objevu tzv. Filadelfským chromozomem. Odhalení molekulární podstaty této chromozomální odchylky a jejího unikátního významu pro vznik a projevy CML pak vedlo k vývoji specifické cílené molekulární léčby, jejíž prototyp imatinib (Glivec®) byl v roce 2001 uveden do klinické praxe vůbec nejrychleji v historii protinádorových léků. Nová cílená terapie znamenala zcela zásadní průlom do léčebného přístupu k CML a doslova revolučním způsobem zlepšila prognózu tohoto onemocnění. Střední doba přežití pacientů s CML diagnostikovanou v chronické fázi se nyní předpokládá více než 25 let. Jinými slovy, léčbou dobře kontrolované onemocnění nezkracuje přirozenou délku života pacienta.

Spolu s vysokou účinností a též nezanedbatelnou nákladností cílené terapie jsou kladeny velké nároky na pečlivé monitorování jejího efektu a zvládnání případných problémů, jakými jsou vznik rezistence a ztráta účinnosti dosud efektivní léčby nebo její nesnášenlivost. Nezbytnou podmínkou optimálního přístupu k diagnostice a léčbě pacientů s CML je tak nejen vzdělání lékařů, ale i kvalitně informovaný a spolupracující pacient – podpořený obdobně informovanými rodinnými příslušníky. Předkládaná publikace si klade za cíl podat čtenáři vyčerpávající přehled o problematice CML v celé její šířce, počínaje vysvětlením podstaty onemocnění, přes její diagnostiku, až po kompletní informace o její terapii. To vše pak ve srozumitelné formě, aniž by byla učiněna ujma na vědecké podloženosti či aktualnosti jejího obsahu.

Kromě publikovaných vědeckých a klinických dat o CML a vlastních zkušeností s diagnostikou a léčbou tohoto onemocnění mi největší inspiraci byla pravidelná setkávání a diskuze s pacienty a jejich rodinnými příslušníky, a to nejen ve zdech nemocniční ordinace či lužkového oddělení, ale i nezapomenutelná regionální setkání každoročně

## 1. ÚVOD

pořádaná občanským sdružením Diagnóza CML. Publikace by též nevznikla bez spolupráce a podpory mých kolegů, zejména pak bez intelektuálního vedení a motivace k výzkumné a publikační činnosti kontinuálně poskytovaných prof. MUDr. J. Mayerem, CSc. V neposlední řadě pak mě díky patří MUDr. Haně Klamové, CSc. za její cenné připomínky při recenzích textu.

Budu ráda, když Vám brožura bude pomocníkem, rádcem a oporou v boji s onemocněním, a doufám, že Vám současně dodá optimismus a naději, že je možné a vysoce pravděpodobné být v tomto boji úspěšnými.

Daniela Žáčková



## 2. JAK VZNIKÁ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

Chronická myeloidní leukemie je nádorové onemocnění krvetvorných buněk, které se nachází v kostní dřeni. Pro lepší pochopení podstaty této choroby si nejprve vysvětleme, jak funguje krvetvorba normální či lépe fyziologická.

### 2.1. Jak vznikají a k čemu slouží krvinky?

Většina krvinek vzniká v kostní dřeni, která se nachází v dutinách některých kostí (pánve, hrudní kost, obratle, žebra a lebka). Normální kostní dřeň produkuje tři základní typy krvinek, které jsou pak vyplavovány do periferní krve obíhající v cévách:

- Červené krvinky (zvané též erytrocyty, RBC = red blood cells) díky bílkovíně zvané hemoglobin rozvádějí kyslík z plic do všech tkání těla.
- Bílé krvinky (též leukocyty, WBC = white blood cells) hrají důležitou roli v obraně proti infekci. Dělí se dále na 3 podskupiny: granulocyty, monocyty a lymfocyty.
- Krevní destičky (též trombocyty, PLT = platelets) spolupřispívají krevní sráženímu a pomáhají stavět krevci.

Tvorba krevních buněk je přesně řízený proces, jehož výsledkem je produkce takového množství každého z druhů buněk, které je optimální a nezbytné pro udržení zdraví svého nositele. Všechny krvinky vznikají z jediné, tzv. mateřské kmenové krvetvorné buňky. Ta má schopnost sebeobnovy, množení a tzv. diferenciace – procesu, kdy další buňky z ní vznikající již nesou informaci pro vývoj příslušné buněčné linie, na jejímž konci je zralá a funkční krvinka (Obr. 1). Celý proces vývoje krvinek, stejně jako všechny další pochody v lidském organismu, je řízen pomocí genetické informace. Jednotlivé geny se nacházejí na chromozomech, které jsou tvořeny deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) a nacházejí se v buněčném jádru (Obr. 2). Genetická informace je v genech zakódována určitou kombinací tzv. nukleotidů. Aby byla informace v genu obsažená realizována, je nejprve z DNA přepsána do ribonukleotidové kyseliny (RNA)

## 2. JAK VZNIKÁ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

v procesu zvaném transkripcí (přepis) a následně pak vzniká příslušná bílkovina (protein) procesem zvaným translací (překlád). Trojice různé zkombinovaných nukleotidů kódují jednotlivé aminokyseliny, které jsou základními stavebními kameny bílkovin (Obr. 3). Bílkoviny jsou vlastními vykonavateli příslušné genetické informace. Pro proces vyjádření informace obsažené v genu například funkci určité bílkoviny se též používá pojmu tzv. exprese (vyjádření) genu. Výše popsané pochody a pojmy nám pomohou k pochopení řady dalších souvislostí, které se týkají vlastní CML a budou probírány v následujících kapitolách.

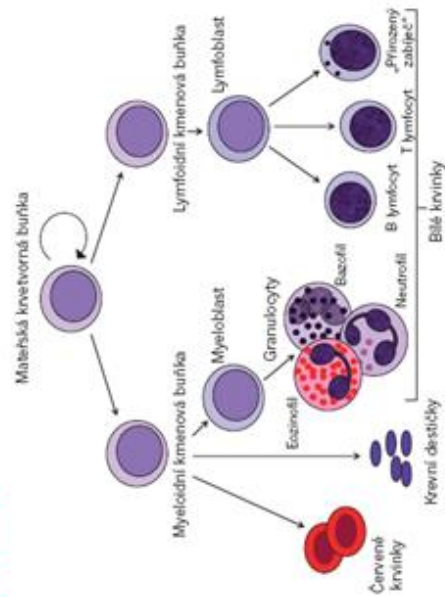
### 2.2. Co to je leukemie a jaké jsou její druhy?

Jak již bylo zmíněno v úvodu této stati, leukemie je nádorovým, tedy zhoubným onemocněním mateřských krvetvorných buněk. Název leukemie pochází z řečtiny (leukos = bílý, haima = či 'aima = krev; leukemie = bělokrevnost). Podstatou leukemie je genetická porucha v mateřské krvetvorné buňce, v jejímž důsledku se naruší regulace krvetvorby a celý proces se vymyká kontrole. Krevní buňky se nekontrolovaně množí a hromadí se nejen v kostní dřeni, ale zvýšeně se vyplavují i do periferní krve a ukládají se v různých orgánech, např. ve slezině, játrech, lymfatických uzlinách, ale i v plicích, centrálním nervovém systému, apod. Tyto patologické nádorové krvinky navíc neplní svoji funkci a případná zdravá zbyvajcí krvetvorba je v důsledku utlaku hromadícími se nemocnými buňkami nedostatečná. Následkem této situace jsou nejružnější projevy, kterými na sebe onemocnění upozorní a pacienta přivede k lékaři.

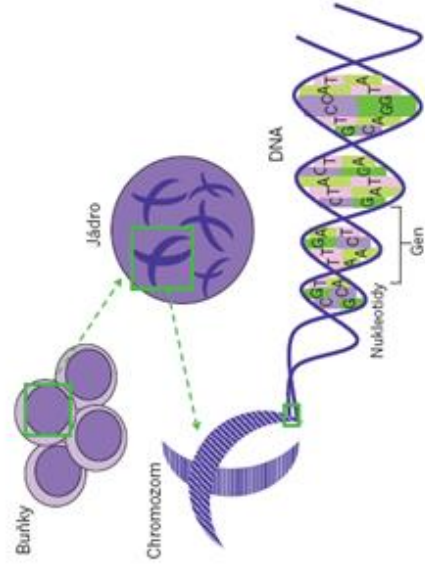
Pod pojmem leukemie si nepředstavujeme jednu nemoc. Existuje několik druhů, které můžeme rozdělit podle některých znaků. Podle rychlosti průběhu rozlišujeme **leukemie akutní a chronické**. Akutní formy mají zpravidla rychlý průběh a některé vedou rychle ke smrti nemocného. Dochází zde k rychlému množení nejmladších krvetvorných buněk, blastů. Na druhou stranu chronické formy mají většinou pomalý a postupný průběh, často jsou diagnostikovány zcela náhodně. V některých případech může nemocný bez léčby žít několik let. Mnozíci se buňky současně vyzrávají a mohou si částečně, alespoň zpočátku, ponechat svoje funkce. Dalším dělicím měřítkem je typ buněk, které jsou postiženy, odtud rozdělení na **myeloidní** (postihující granulocyty a/nebo monocyty) a **lymfatické** (postihující lymfocyty) leukemie.

## 2. JAK VZNIKÁ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

■ Obrázek 1. Schéma krevtvorby.

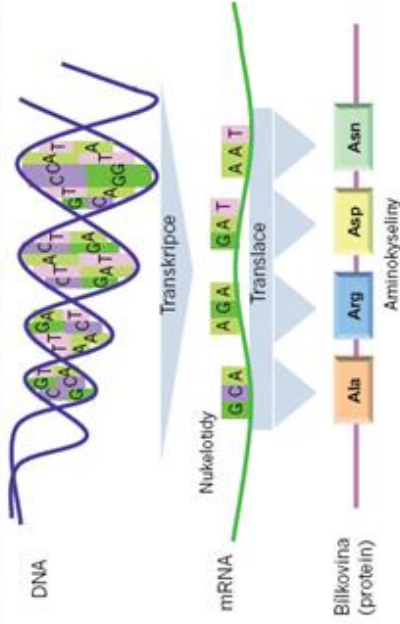


■ Obrázek 2. Schematický pohled na buněčné jádro. Chromozomy nesou genetickou informaci podobě deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Jednotlivá písmena znázorňují tzv. nukleotidy; základní stavební prvky DNA, jejichž řazení kóduje genetickou informaci.



## 2. JAK VZNIKÁ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

■ Obrázek 3. Schéma přepisu a překládky genetické informace z DNA do struktury bílkoviny.



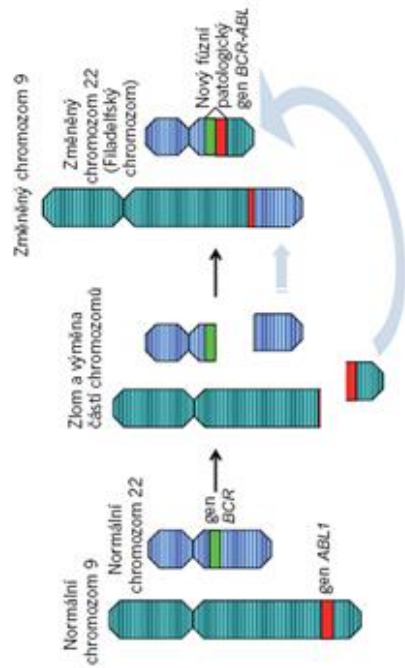
### 2.3. Co je chronická myeloidní leukemie a jaká je její podstata?

Chronická myeloidní leukemie je tedy jedním ze čtyř hlavních druhů leukemií. Jak již z názvu vyplývá, její průběh je zpočátku pozvolný. Mnohdy je nálezy zvýšeného počtu leukocytů v krvi náhodným zjištěním a žádné jiné podezřelé příznaky nejsou zpočátku přítomny. Ve slově „myeloidní“ je obsažena informace, jaké buňky se u CML zmožují. Jsou to především granulocyty, ale mohou být zmoženy i krevní destičky a červené krvinečky, neboť všechny tyto druhy mají prapůvod ve společné myeloidní kmenové buňce (viz obrázek 1).

Unikátní podstata vzniku CML, již byla zmíněna v úvodu k této publikaci. Choroba vzniká v důsledku získané (tedy nevrozené či dědičné) genetické změny, která postihuje kmenovou krevetvornou buňku. Všechny lidské buňky, tedy i krevetvorné, obsahují 46 chromozomů, z nichž 44 je spárováno do 22 párů, číslovaných od 1 do 22, a 2 jsou tzv. pohlavní chromozomy (XX u žen a XY u mužů). U CML dochází k „odlomení“ části chromozomu č. 9 a části chromozomu č. 22, které se vzájemně vymění v procesu zvaném translokace. Významná je změna právě na chromozomu č. 22, kde se po vzájemné výměně vedle sebe dostanou geny – gen *ABL1* (*ABL1* = *Abelson myelin leukémie*) z chromozomu 9 a gen *BCR* (*BCR* = *breakpoint cluster region*) z chromozomu 22, které spolu dohromady splývou v gen nový, tzv. fúzní, *BCR-ABL1* (dříve *BCR-ABL1*) (Obr. 4). Atypicky zkráceného chromozomu 22 u pacientů s CML si všimli v roce 1960

## 2. JAK VZNIKÁ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

■ **Obrázek 4.** Schéma vzniku Filadelfského (Ph) chromozomu a patologického fúzního genu *BCR-ABL1*.



američtí vědci P. Novell a D. Hungerford a svůj nález a předpoklad příčinné souvislosti mezi změnám chromozomem a vlastní chorobou publikovali v prestižním vědeckém časopise Science. Podle místa svého objevu byl patologický chromozom nazýván **Filadelfským (Ph) chromozomem**. V následujících 30 letech se podarilo rozkrýt podstatu tohoto abnormalního chromozomu a odhalit **fúzní gen BCR-ABL1**. Tak jako jiné geny i tento, patologický gen kóduje vznik bílkoviny (proteinu). Vznikající bílkovina se nazývá **Bcr-Abl tyrozinkináza** (též protein p 120) a má funkci enzymu, což je jakýsi katalyzátor (urychlovac) procesů v buňkách. Patologie spočívá v tom, že tyrozinkináza Bcr-Abl trvale aktivovaná a buněčné reakce katalyzuje bez ustání a bez kontroly. Výsledkem je nekontrolované množení buněk, které navíc ve srovnání se zdravými buňkami dle přezívají (Obr. 5). Nositelkami patologického genu *BCR-ABL1* jsou všechny nemocné buňky, kterým dala vznik takto postižená mateřská krevetvorná buňka.

### 2.4. Kdo může onemocnět chronickou myeloidní leukémií?

CML se může vyskytnout v každém věku, nicméně její výskyt u dětí do 16 let velmi řídký. Věkový průměr nemocných se pohybuje kolem 50–55 let věku a frekvence výskytu ležce narůstá směrem k vyšším věkovým skupinám. CML je o něco málo častěji

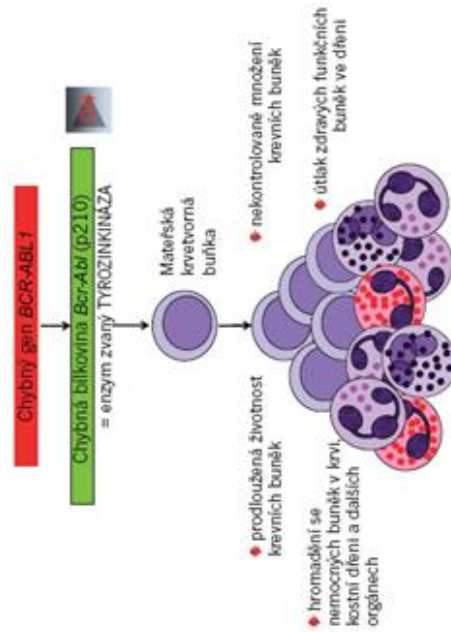
## 2. JAK VZNIKÁ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

u mužů, poměr výskytu mezi muži a ženami se udává 1,3 : 1,0. Každoročně se v ČR zjistí asi 150 až 200 nových případů tohoto onemocnění, ve Velké Británii asi 750 a v USA zhruba 4500 nových případů ročně. V zásadě se jedná o poměrně vzácné onemocnění.

### 2.5. Co způsobuje vznik chronické myeloidní leukémie?

Sice již víme, že CML vzniká jako důsledek genetické abnormality, ale příčinu vzniku této abnormality, a tedy i přesnou příčinu vzniku CML, vlastně neznáme. Je tomu tak podobně i u jiných druhů leukemií. Vyšší pravděpodobnost vzniku CML je u jedinců, kteří byli vystaveni vyšším dávkám radioaktivního záření. Důkazem je vyšší výskyt leukemií u přeživších výbuchu atomové bomby v Hirošimě a Nagasaki. Vliv jiných látek, léků, chemikálií či virů na vznik CML nebyl jednoznačně prokázán. Je důležitě zdůraznit, že CML není chorobou dědičnou, tj. děti po svých rodičích nezískávají náchylnost k jejímu vzniku, ani chorobou nakažlivou.

■ **Obrázek 5.** Podstata vzniku CML.



### 3. JAKÁ JSOU STÁDIA CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

Průběh chronické myeloidní leukemie můžeme rozdělit do tří fází: chronické, akcelerované a blastické. Existují přesná kritéria, která umožňují každému pacienta do té či oné fáze zařadit. V tabulce 1 jsou představena kritéria dle návrhu panelu expertů Evropské leukemické sítě (*The European LeukemiaNet, ELN*), v tabulce 2 pak kritéria dle Světové zdravotnické organizace (*World Health Organization, WHO*).

#### Chronická fáze (anglicky *chronic phase, CP*)

Naprostá většina pacientů (cca 95 %) je diagnostikována v tomto stádiu, které může trvat měsíce až roky. Je to pomalu postupující fáze, kdy mohou být pacienti zcela bez příznaků nemoci nebo jsou příznaky mírné, např. únava, snadná unavitelnost,

Tabulka 1. Definice klinických fází CML (chronické, akcelerované a blastické) dle doporučení Evropské leukemické sítě

<b>Chronická fáze (CP)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blastů &lt; 15% v KD nebo PK</li> <li>• Blastů + promyelocytů ≤ 30% v KD nebo PK</li> <li>• Bazofilů ≤ 20% v PK</li> <li>• Trombocytů ≥ 100 x 10<sup>9/l</sup></li> </ul>
<b>Akcelerovaná fáze (AP)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blastů 15%–29% v KD nebo PK</li> <li>• Blastů + promyelocytů &gt; 30% v KD nebo PK</li> <li>• Bazofilů &gt; 20% v PK</li> <li>• Perzistující trombocytopenie (&lt; 100 x 10<sup>9/l</sup>) nezpůsobená léčbou</li> </ul>
<b>Blastická krize (BC)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blastů ≥ 30% v KD nebo PK</li> <li>• Extramedulární blastická infiltrace</li> </ul>

Vysvětlivky: KD, kostní dřeň; PK, periferní krev

### 3. JAKÁ JSOU STÁDIA CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

Tabulka 2. Definice klinických fází CML (akcelerované a blastické) dle kritérií Světové zdravotnické organizace

<b>Akcelerovaná fáze (AP) – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blastů 10% – 19% v KD nebo PK</li> <li>• Bazofilů ≥ 20% v PK</li> <li>• Perzistující trombocytopenie (&lt; 100 x 10<sup>9/l</sup>) nezpůsobená léčbou nebo perzistující trombocytóza (&gt; 1000 x 10<sup>9/l</sup>) nereagující na terapii</li> <li>• Zvětšující se slezina a narůstající počet leukocytů při léčbě</li> <li>• Klonální evoluce (tj. přítomné cytogenetické změny, jiné než Ph chromozom)</li> </ul>
<b>Blastická krize (BC) – jedno či více z následujících kritérií je přítomno:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blastů &gt; 20% v KD nebo PK</li> <li>• Extramedulární (tj. jinde než v KD) blastická infiltrace</li> <li>• Velká ložiska nebo shluky blastů v biopsii KD</li> </ul>

Vysvětlivky: KD, kostní dřeň; PK, periferní krev

zvýšené pocení, apod. Pacienti jsou v této fázi choroby schopni běžných životních aktivit bez většího omezení. Zvýšení počtu leukocytů je v této fázi choroby snadno ovlivnitelný léčbou, která má ambulantní charakter (nevyžaduje hospitalizaci nemocného). V rámci zmnožených bílých krvinek v této fázi převažují zralejší buňky, alespoň částečně si zachovávající svou funkci; buňky mladé – blasty – představují jen malou část z nich.

#### Akcelerovaná fáze (angl. *accelerated phase, AP*)

U některých pacientů může být choroba diagnostikována v této fázi, jindy v ní může přejít do té doby klidná a snadno zvladatelná chronická fáze choroby. Je to období zvýšené aktivity onemocnění, trávící řádově několik měsíců, charakterizované objevením se příznaků nemoci, např. bolesti kostí, zvýšených teplot, nočního pocení, úbytku na váze, zvětšování se sleziny; únavy, krvácivých projevů, atd. Choroba přestává reagovat na stávající léčbu, je třeba podat intenzivnější terapii. Pacient již není bez zbytku schopen vykonávat běžné aktivity života. Počet bílých krvinek rychle narůstá a zvyšuje se i procento blastů. Stoupají nebo naopak klesají počty krevních destiček, zvětšuje se slezina.

#### Blastická fáze (též blastický zvrát či blastická krize; angl. *blast crisis, BC*)

Blastický zvrát může být předchůzlem fázi akcelerace, ale může vzniknout i náhle z chronické fáze bez předchozího varování v podobě zhoršování průběhu nemoci. V malém procentu případů je CML poprvé diagnostikována v této fázi. Jak co do

### 3. JAKÁ JSOU STÁDIA CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKEMIE?

klinického průběhu, tak co do nálezů v kostní dřeni a periferní krvi, je tato fáze ve podobná akutní myeloidní leukemii. Často jsou přítomny výrazné příznaky, jako například krvácivé projevy, horečky, infekce. Choroba přetváří zcela reagovat na dosavadní léčbu třeba zvolit intenzivní terapii, často akseptní/počátku podanou za hospitalizace. V keř dřeni a/nebo periferní krvi přesahuje procento mladých buněk, blastů, hodnotu 20 ubývá normálně fungujících ostatních buněk, jako jsou zralé leukocyty, červené krví a krevní destičky. Blasty mohou být nejen myeloidní (tzv. myeloblastický zvrst), i lymfoidní (tzv. lymfoblastický zvrst), či se mohou vyskytovat oba typy blastů současně, což je jen další důkaz prapůvodu vzniku CML v mateřské krvetvorné buňce, ze které se obě vývojové řady bílých krvinek rekrutují. U menší části nemocných se blastický zvrst může odehrát mimo kostní dřev, v jakémkoliv orgánu, například v lymfatických uzlinách kostech nebo v mozku či míše, souhrnně označovaných jako centrální nervový systém. Pak hovoříme o tzv. extramedulárním (mimodřevovém) blastickém zvrstu, chlorom myeloblastickému. Léčba blastického zvrstu, ať již dřevového či mimodřevového je svízelná a vždy, pokud jsou pro to podmínky (věk pacienta, jeho ostatní onemocnění, dostupnost vhodného dárce a další), měl by být pacient v blastickém zvrstu směřován k provedení transplantace krvetvorných buněk.

Léčba CML bude v následujícím textu věnována obsáhle kapitola, ale přesto na tomto místě je třeba zdůraznit, že nové, moderní léky významně změnily průběh onemocnění a riziko postupu CML z fáze chronické do fáze pokročilejších, souhrnně akcelerované a blastického fázi nazýváme, je v současné době výrazně sníženo. Postihuje kolem 7 % všech pacientů v chronické fázi léčebných imatinibem od stanovení diagnózy CML.

### 4. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE PROJEVUJE?

**Příznaky** onemocnění jsou z medicinského hlediska rozdělovány na tzv. **subjektivní**, tj. ty, které pociťuje a udává sám pacient, a **objektivní**, tj. ty, které vidí a nalezá lékař během vyšetření pacienta. Nutno podotknout, že žádný z příznaků není pro chronickou myeloidní leukemii příznačný (tzv. specifický), tzn. že podobné projevy může mít celá řada jiných onemocnění.

Jak již bylo zmíněno, naprostá většina pacientů je diagnostikována v chronické fázi onemocnění, přičemž asi polovina pacientů nemá **žádné příznaky**. Onemocnění je tak diagnostikováno zcela náhodně, například při odběru krve z jiného důvodu či při pravidelné preventivní prohlídce. Při vyšetření odebrané krve se pak nachází většinou zvýšený počet bílých krvinek, pokles červených krvinek, zvýšený nebo naopak snížený počet krevních destiček a při fyzikálním vyšetření pacienta může být jediným nálezem zvětšená slezina. Pokud se příznaky vyskytnou, jsou zpočátku mírné, s pokročilejším onemocněním pak nabývají na četnosti a intenzitě.

Nejčastější příznaky, kterými se může CML prezentovat, jsou následující:

- únava
- nechutenství
- nevyssvětlený úbytek hmotnosti
- zvýšené, zejména pak noční pocení
- zvýšené teploty
- snadná tvorba modřin či jiné krvácivé projevy
- dechové obtíže
- závratě
- bolesti břicha
- pocíť plnosti po jídle
- bolesti kostí a kloubů

Co je podkladem těchto potíží? Zvýšená tvorba krvinek představuje pro tělo člověka zvýšené energetické nároky a z toho mohou plynout některé příznaky jako například **únava, zvýšené pocení, zvýšené teploty, snížení chuti k jídlu, úbytek hmotnosti**.

#### 4. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE PROJEVUJE?

Zvýšenou produkci buněk v kostní dřeni se také alespoň částečně vysvětluje **bolest kostí a kloubů**, i když zde je příčin více, například zvýšená tvorba kyseliny močové jako odpadního produktu rozpadu velkého množství buněk (i fyziologicky má buňka omezenou životnost) může způsobovat kloubní poskození. Leukemické buňky se nehromadí jen v kostní dřeni a v periferní krvi, ale cirkulují v těle a osídlují další orgány, v případě CML převážně slezinu a játra. Zvětšení jater, ale zejména **zvětšení sleziny** (tzv. **splenomegalie**) je častým nálezem při vyšetření pacienta s CML. Může být zdrojem **bolesti v levém podžebří**, kde je slezina uložena, a to tlakového charakteru, někdy však i píchavých či vystřelujících do levého ramene, pokud ve zvětšené slezině dojde k nedokrevní části tkáně nebo naopak k zakrvácení v důsledku křehlosti zbytnělého orgánu. Někdy i výrazně zvětšená slezina neboli, ale může způsobovat **dechové obtíže**, jak tlačí zespodu na bránici a omezuje prostor pro dýchající plice. Jindy je příčinou nespecifických brisních potíží, které můžeme označit jako „brisní dyskomfort“ – **pocíty plnosti v žaludku, nemožnost požití větší porce jídla, nevolnost**, atd. Výrazně zvětšená slezina pak může omezovat odtok žilní krve z oblasti břicha a způsobit nahromadění tekutiny v dutině břišní, tzv. ascites. **Zvětšení jater** nebývá tak výrazné, ale i ono může být zdrojem **bolesti v pravém podžebří**, kde jsou játra uložena.

Zvláště v pokročilých fázích CML pak omezuje zvýšená tvorba leukemických buněk v kostní dřeni tvorbu důležitých buněk, jakými jsou červené krvineky a krvní destičky. To má za následek, že vážně okysličování tkání těla, a také se zvyšuje riziko krvácení. Snížené množství červenýchrvinek, tzv. chudokrevnost nebo-li **anémie** se projevuje **bledostí pacienta, jeho pocítem únavy a snadně unavitelností, sníženou tolerancí zátěže, dechovými potížemi, spavostí, bolestmi hlavy či závratěmi**. Tělo si pomáhá zvýšeným průtokem krve a zrychlenou tepovou frekvencí, což může být nemocným pocíťováno nepřijemně jako „**bušení či přeskakování**“ srdce. U pacientů, kteří navíc trpí například ischemickou chorobou srdeční nebo poruchami prokrvení dolních končetin, se může snížená dodávka kyslíku projevit zhoršením příznaků choroby, tj. např. **bolestmi na hrudi či bolestmi v dolních končetinách** při menší zátěži, než bývaly zvykli.

**Krvácení** z nedostatku destiček může mít charakter krvácení do kůže v podobě malých červených teček, zvaných petechie, či větších prokrvacenech skvrn, dále pak v podobě snadné nebo samovolné tvorby modřin (tzv. hematomů). Rovněž se objevuje slizniční krvácení v podobě krvácení z nosu, z dásní či např. přítomnosti krve v moči (bud viditelné okem nebo zjistitelné mikroskopickým vyšetřením).

Mnozíci se leukemické buňky jsou abnormální co do funkce, zvláště pak jejich nezralé formy, blasty. Vážné jejich funkce v obraně proti mikroorganizmům a následkem jsou **infekční komplikace**, typické právě pro pokročilejší fáze onemocnění.

#### 4. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE PROJEVUJE?

Leukemické buňky mohou osídlit kterýkoliv orgán v těle, nejen výše zmíněnou slezinu či játra nebo lymfatické uzliny. Může být postižena i **kůže**, trávicí trakt, ledviny, vzácně také centrální nervový systém (CNS), tj. mozek a mícha. **Projevy z postižení CNS**, jako např. **bolest hlavy, závrať, zmatenost, porucha vědomí, křeče, zvracení**, apod. mohou být způsobeny také poruchou prokrvení mozkové tkáně v důsledku zvýšeného počtu cirkulujících bílýchrvinek a jejich tendence „ucpávat“ malé cévy. Na to konto mohou být nalezeny **změny též na očním pozadí** při vyšetření oftalmologem, především charakteru drobného krvácení. Dalším orgánem, kde se zadržování bílýchrvinek (tzv. leukostáza) může projevit, jsou plice. Pacient může být **dušný**, zrychleně dýchat, trpět **suchým dráždivým kašlem**. V důsledku stagnace krveinek v cévním řečišti může dojít u mužů k bolestivé a trvalé erekci, tzv. **priapismu**.

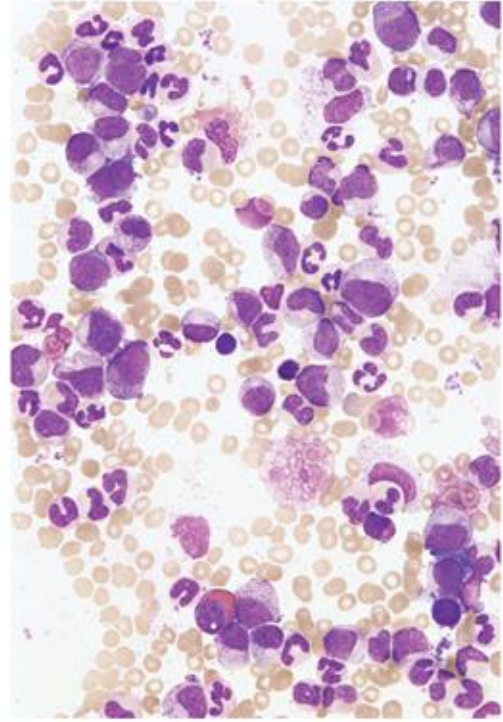
## 5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?

## 5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?

### 5.2. Krevní obraz a diferenciální rozpočet bílých krvinek

Podězení na CML je zpravidla vysloveno na základě patologického krevního obrazu (KO) a diferenciálního rozpočtu leukocytů (dif). Pacientovi je odebrána krev ze žíly do zkumavky a následně vyšetřena jednak v přístroji (krevním analyzátoru) co do počtu a základních charakteristik krevních buněk, jednak se hodnotí krevní nátěr na sklíčku pod světelným mikroskopem. Mikroskopické vyšetření tzv. diferenciálního rozpočtu bílých krvinek přináší informace o vzájemném poměru jednotlivých typů leukocytů. V chronické fázi nacházíme někdy i výrazně zmnožený leukocytů (20–500 x 10na9/l) oproti normě (4–9 x 10na9/l) – hovoříme o tzv. leukocytóze. Rovněž mohou být zmnoženy krevní destičky, a to někdy poměrně významně – tuto situaci nazýváme trombocytémií či trombocytózou. Pokles krevních destiček (trombocytopenie) je méně častý a může se vyskytnout u pokročilých stádií CML. Červené krvinky mohou být v buď v normě, nebo sniženy (tzv. anémie), nebo i mírně zvýšeny. V diferenciálním rozpočtu leukocytů pak nacházíme všechna vývojová stádia granulocytární řady, tj. i buněk, které se za normálních okolností vyskytují pouze v kostní dřeni, jako například promyelocyty, myelocyty, metamyelocyty.

**■** **Obrazek 6.** Mikroskopický pohled na nátěr aspirátu z kostní dřene u pacienta s CML v CP. Zvětšeno 1000x. (Obrazek laskavě poskytl MUDr. A Buldosa, PhD., OKH FN Brno).



Žádný z výše uvedených příznaků není pro diagnózu chronické myeloidní leukémie specifický. Je tedy třeba dále pátrat po příčině uvedených potíží a nálezů. Diagnostická postupy u CML jsou následující:

- anamnéza a fyzikální vyšetření
- vyšetření krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu bílých krvinek
- biochemický rozbor krve
- cytologické, případně i histologické vyšetření kostní dřene
- cytogenetické vyšetření krve a kostní dřene
- molekulárně genetické vyšetření krve a kostní dřene
- další doplňující vyšetření, např. ultrazvuk břicha

### 5.1. Anamnéza a fyzikální vyšetření

Anamnézu se rozumí lékařem vedený rozhovor s pacientem o aktuálních potížích, které má, ale i o dalších důležitých skutečnostech, jakými jsou jeho celkový zdravotní stav, choroby, pro které je sledován a léčen, operace, které prodělal, léky, kterými užívá, případně alergie. Pacient je tázán i na své rodíče a jejich choroby, a rovněž na své sourozence. Informace o sourozencích byly obzvláště důležité v dřívějších letech, kdy byla léčbou volby mladších pacientů transplantace krevtvořných buněk a pacientovi sourozenci se mohli stát vhodnými dárci.

Fyzikální vyšetření pacienta pak může odhalit některé objektivní známky onemocnění, jako je bledost kůže, krvácivé kožní projevy, zvětšená slezina či játra. Velikost jater a sleziny, pokud přesahují přes žeberní oblouk, pak lékař vyjadří v centimetrech přesahu a zdokumentuje v lékařské zprávě.

- Bolestivost: žádná
- Doba trvání: při prvním (vstupním) vyšetření cca 30–45 min (nepočítá se doba čekání na výsledky laboratorních odběrů z téhož dne, což jsou cca 2 hod), při kontrolním vyšetření 15 min.

## 5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?

Blastů bývá v rozpočtu většinou jen do 5% v chronické fázi a jejich množství s pokročilostí onemocnění, kdy ve fázi blastické je jich více než 20%. Typic zmnoženy buňky zvané bazofily a eozinofily, které jsou také reprezentanty granuk line.

- Bolestivost: mírná při odběru krve pomocí jednorázové jehly a odběrové zk
- Doba trvání: odběr krve sekundy, vlastní vyšetření asi 2 hodiny.

### 5.3. Biochemický rozbor krve

Podobně jako vyšetření krevního obrazu, i biochemický rozbor se pro odběr pacientovy žílní krve do zkumavky, a pak následuje přístrojové vyhod U CML mohou být zvýšené parametry jako je kyselina močová a laktátdehydroe což souvisí se zvýšeným obrátem množících se leukocytů. Obecně lze říci, že ČM specifický laboratorní biochemický korelát.

### 5.4. Vyšetření kostní dřeně – cytologické, případně histologické

K přesné diagnóze typu leukémie je většinou nutné vyšetření kostní dřeně získává po místním znečistění z hrudní kosti (tzv. sternální punkce) či pánev (tzv. trepanobiopsie) speciální jehlou. Odběr z pánevní kosti umož nasátí kostní dřeně do stříkačky, tak i odběr části tlusté kostní dřeně v tzv. válečku, odběr z kosti hrudní umožní pouze nasátí kostní dřeně do st (na odběr válečku je kost příliš tenká). Místo odběru zvolí lékař dle typu le na kterou má podezření. Pokud je z vyšetření periferní krve silně pos že půjde o CML, v naprosté většině histologické vyšetření není nutn vlastním výkonem je pacient o proceduře plně informován, což ztvrdí ps tzv. informovaného souhlasu.

Co se s kostní dření dále děje? Nasátá kostní dřeně je jednak rozetřena na a hodnocena pod mikroskopem podobně jako nátěry periferní krve (viz výš vyšetření se nazývá cytologické. Část nasáté kostní dřeně se odešle do spe laboratorí k vyšetření cytogenetickému, molekulárně cytogenetickému a mole genetikckému – viz dále. Váleček kostní dřeně je odeslán na patologii k v histologickému, kdy patolog rovněž pod mikroskopem prohlédne buněky kosti ve vzájemném uspořádání, které zaujmají v našem těle. V případě CML cyt a i případně histologické vyšetření kostní dřeně odhalí její zvýšenou buněč

## 5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?

zvýšením podílu granulocytů na úkor vývojových stadií červených krvinek. Podobně jako tomu je v nátěru periferní krve, i v kostní dření jsou přítomny granulocyty všech stupňů zralosti včetně zmožných eozinofilů a bazofilů (Obr. 6). Podíl blastů se zvyšuje s pokročilostí choroby, jak jsme si popsali už v souvislosti s vyšetřením nátěrů periferní krve.

Nyní si podrobněji popíšeme obě procedury odběru kostní dřeně.

### Sternální punkce:

Pacient leží na zádech. Lékař vyhmátá vhodné místo v horní části hrudní kosti a po opětovném přesvědčení se, že pacient není na zvolený prostředek desinfekce či znečistivní alergický, provede desinfekci kůže. Vyčka na působení desinfekce a provede opich vybraného místa prostředkem ke znečistivění. Opět vyčka, až anestetikum začne působit, aby následně zavedl krouživým pohybem do kosti zvláštní jehlu, složenou ze dvou částí – dutá část jehly se v kosti po dobu odběru ponechá, ostrá vnitřní část, tzv. mandrén, se po dosažení dřeněvoté dutiny vyjme. Následně lékař nasadí na horní konec jehly stříkačku, nasaje část dřeněvoté krve a tu pak rozetře na sklíčka. Po té ještě on či sestra odeberou potřebné vzorky dřeněvoté krve do dalších zkumavek (malá množství) na výše uvedené speciální vyšetření. Jehla je po té vyjmuta a místo vpichu sterilně překryto tampónem a náplastí.

- Bolestivost: místní znečistivění – pocit „štipání“, vlastní vpich – většinou mírná bolest či žádná, nasátí dřeně – zvláštní pocit podtlaku či „tahů“ v hrudní kosti.
- Doba trvání: vlastní odběr: 6 – 10 minut, vyšetření cytologické: 24 hodin, ostatní viz níže.

### Trepanobiopsie:

Pacient leží většinou na břiše, eventuálně na boku. Lékař vyhmátá vhodné místo na lopatě kosti kyčelní, kde je kost nejlépe tělesnému povrchu. Následující kroky (desinfekce, místní znečistivění s dostatečně dlouhým intervalem čekání na začátek působení prostředku – cca 5 min, zavedení jehly – v tomto případě delší a větší, a nasátí dřeněvoté krve na všechna potřebná vyšetření) jsou obdobné, jako jsme popsali výše u sternální punkce. Lékař při nich dodržuje zásady aseptise, neboli sterility. Většinou ze druhého vpichu (otvor v kůži stejný, otvor v kosti cca o 1 cm posunutý) se pomocí duté části jehly krouživými pohyby provede odběr válečku kostní dřeně. Váleček, který cíleně uvízl v jehle, se společně s ní vytáhne z těla pacienta a z jehly vyjme, aby se ve vhodném fixačním roztoku poslal na histologické vyšetření. Místo vpichu se rovněž



## 5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?

sterilně přikryje; a na rozdíl od sternální punkce se rovněž na určitou dobu (1–2 hodiny stlačí, ať již pomocí vlastní valhy těla vleže na zádech nebo např. pomocí vaku s pískem). I tento výkon, stejně jako sternální punkci lze provádět ambulantně, tj. bez nutno hospitalizace.

- **Bolestivost:** mívá až středně intenzivní, někdy výraznější, často je nepřijemný pocit tlaku při promáknání kostí. Možná použít silnější zklidňující a bolest tlumící léky v rámci přípravy k výkonu.
- **Doba trvání vlastní odběru:** 15 minut, cytolog, vyšetření – viz výše, histologické vyšetření 10–14 dní.
- **Riziko:** existuje malé riziko infekce místa vpichu nebo krvácení, pacient je však pečlivě sledován a kontrolován ve snaze eventuelní komplikaci časné zachyt a řešit.

**Obrázek 7.** Průkaz Filadelfského chromozomu cytogenetickým vyšetřením buněk kostní dřeně Sestava 46 lidských chromozomů, kde šipky poukazují na abnormálně prodloužený chromozom 9 a abnormálně zkrácený chromozom 22 (Filadelfský chromozom), vznikající v důsledk vzájemného přemístění jejich odlomených částí. (Obrázek laskavě poskytl MUDr. A. Olto IHOK FN Brno)



## 5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?

### 5.5. Cytogenetické vyšetření kostní dřeně a periferní krve

Zásadním pro potvrzení diagnózy CML je průkaz Filadelfského (Ph) chromozomu, který je přítomen u 95 % pacientů s CML (Obrázek 7). U zbylých 5 % sice nemáme Ph chromozom, ale jeho produkt, fúzní gen *BCR-ABL1* je přítomen vždy, jen je nutné k jeho detekci použít citlivější metodu. **Klasické vyšetření cytogenetické, tzv. karyotypování** je prováděno zkušeným odborníkem ve speciální laboratorii a je časově poměrně náročné (2–3 týdny). Je k němu nutné vzorek kostní dřeně. Dřevové buňky se musí určitou dobu kultivovat ve vhodném médiu a k vyšetření je nezbytné, aby vstaly do cyklu buněčného dělení. K získání informativního výsledku je nutné, aby bylo zhodnoceno nejméně 20 dělicích se buněk (tzv. mitóz nebo metafází). Cytogenetické preparáty se hodnotí po speciálním barvení (nejčastěji tzv. G-pruhování) ve světelném mikroskopu, většinou vybaveném počítačovou analýzou obrazu. Výsledek vyšetření uráží laborator v písemné podobě, průkaz Filadelfského chromozomu je dle cytogenetické nomenklatury zaznamenán následovně: 46, XY, t(9;22)(q34;q11) u mužů a 46, XX, t(9;22)(q34;q11) u žen. Množství Ph-pozitivních buněk se při diagnóze blíží nebo dosahuje 100%, s účinnou terapií pak klesá v ideálním případě úplně vymizí (stav nazýváme kompletní cytogenetickou odpověď). Karyotyp se pak stává fyziologickým u 100% hodnocených buněk, tj. 46, XY u mužů a 46, XX u žen.

Klasické cytogenetické vyšetření má i přes svou náročnost stálejší postavení v diagnostice i dalším sledování pacientů s CML, a to nejen proto, že definice léčebných odpovědí jsou na něm založeny, ale i proto, že jediné tímto vyšetřením je možné posoudit i případné jiné chromozomální abnormality (mimo Ph chromozom), které mohou mít význam pro další prognózu pacientů.

Dalším vyšetřením spadajícím do ranku cytogenetických metod je tzv. **fluorescenční in situ hybridizace (FISH)**. Toto vyšetření má ve srovnání s klasickou cytogenetikou vyšší citlivost, tedy dokáže zachytit i ty buňky nesooucí Ph chromozom, které by klasická cytogenetika nezachytila. Posuzuje se více buněk (200–300), které navíc nemusí být v cyklu buněčného dělení, na kvalitu vzorku tedy nejsou kladeny tak vysoké nároky. Často se totiž stává, že klasické cytogenetické vyšetření je tzv. nehodnotitelné právě z důvodu nutnosti použití dělicích se buněk. FISH je možno provést i z buněk periferní krve. Principem metody je použití speciálních fluorescenčně obarvených sond, které se přímo vážou na určitá místa na chromozomech. V případě podezření na CML jsou použity sondy cílené na geny *BCR* a *ABL1* svítící červeně a zeleně. Pokud je přítomen patologický fúzní gen *BCR-ABL1*, dojde ke splynutí fluorescenčních signálů, což se projeví žlutým zbarvením místa fúze (Obr. 9). Výsledek vyšetření je udán v % *BCR-ABL1* pozitivních jader či buněk.

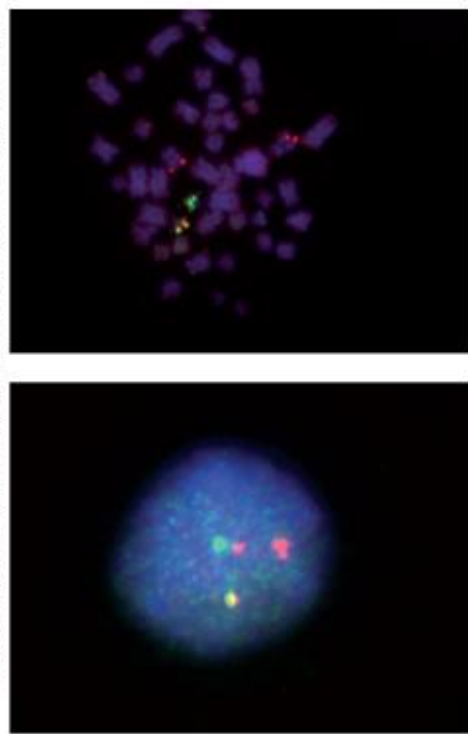
## 5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?

Na tomto místě je třeba zmínit, že i přesto, že Ph chromozóm a potažm *BCR-ABL1* fúzní gen jsou charakteristickým a neodmyslitelným znakem pro CML, mohou se tyto abnormality objevit i u některých jiných hematologických nádorových onemocnění např. akutní lymfoblastické leukemie (ALL), vzácně pak u akutní myeloidní leukemie či některých jiných myeloproliferativních onemocnění, například esenciální trombocytémie. Pro jednoznačné potvrzení diagnózy CML je třeba, aby nález Ph chromozómu a *BCR-ABL1* fúzního genu byl podpořen klinickými projevy a dalšími laboratorními nálezy, zejména pak typickým obrazem v diferenciálním rozpočtu leukocytů.

### 5.6. Molekulárně biologické vyšetření kostní dřeně a periferní krve

Fúzní gen *BCR-ABL1* můžeme dále detekovat ještě citlivější metodou stanovení spadající do tzv. molekulárně biologických metod, a sice metodou **polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR)**. Ide o opět o vysoce specializované vyšetření kdy malé množství nukleové kyseliny nesoucí genetickou informaci se mnohonásobně

**Obrazek 8.** Prokaz fúzního genu *BCR-ABL1* pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) v jádře v interfázi (A) a v mitóze (B). Patologický fúzní gen *BCR-ABL1* svítí žlutě poté, co došlo k hybridizaci (vazbě) sond označených červenou a zelenou fluorescenční barvou s geny *BC1* a *ABL1* a k jejich následné fúzi. (Obrazky laskavě poskytl MUDr. A. Olšov, IHOX FN Brno)



## 5. JAK SE CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE DIAGNOSTIKUJE?

námnožní a snáze se tak detekuje. Touto vysoce citlivou metodou můžeme zachytit i postženou (*BCR-ABL1* pozitivní) buňku mezi řádově stovkami tisíc až miliónem buněk zdravých (můžeme použít přirovnání „najít jehlu v kupce sena“). Pomocí tzv. kvalitativní PCR zjistíme, zda je vůbec gen a jeho „přepsaný“ produkt do RNA (tzv. transkript) přítomen a pomocí tzv. kvantitativní PCR jsme schopni určit i jeho množství. Metoda je kromě použití v diagnostice výborná právě ke sledování účinku léčby (viz dále). Vzhledem k dobré vzájemné korelaci s kostní dřní lze k vyšetření pomocí PCR použít vzorek periferní krve pacienta. Výsledek kvantitativní PCR je vyjádřen v % poměru množství *BCR-ABL1* transkriptu k množství tzv. kontrolního genu, kterým je např. gen *ABL1*, přičemž celý výsledek je vztážen k takzvané mezinárodní škále (stupnice, kde 100% výsledek odpovídá vzorku při diagnóze a hodnota 0,1% tzv. velké molekulární odpovědi). V posledních letech je velké úsilí věnováno standardizaci laboratorních postupů v molekulární diagnostice mezi jednotlivými laboratorními v mezinárodním měřítku. V rámci ČR je situace příznivá, neboť tento typ diagnostiky je prováděn jen několika vysoce specializovanými laboratorními, které se aktivně procesu mezinárodní standardizace účastní.

### 5.7. Další doplňující vyšetření

Uznali lékař za vhodné či potřebné, může naordinovat některá doplňující vyšetření, jako např. ultrazvuk břicha k posouzení velikosti sleziny a jater při špatné fyzikální vyšetřitelnosti pacienta, rentgen hrudníku, jsou-li přítomny dýchací obtíže či jiné symptomy, ekg a eventuelně i echokardiografické vyšetření srdce před zahájením terapie, apod.

## 6. JAK ODHADUJEME PROGNOZU PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ?

Prognóza pacientů s CML diagnostikovanou v chronické fázi doznala v molekulárně cílených léků, tzv. tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) radikální změnou směrem k lepšímu. Zatímco dříve se střední doba přežití pohybovala kolem 3–5 let, nyní je odhad střední doby přežití na více než 25 let. Přežití bez progresivní choroby u pacientů, kteří dosáhli po roce léčby imatinibem (Gleevec®) nejen celkové cytogenetické odpovědi (úplného vymizení buněk s Ph-chromozomem v konvenčním cytogenetickém výsetření ale i velké molekulární (pokles hladiny BCR-ABL1 transkriptů pod 0,1 %) se blíží 100%. Dobrá léčebná odpověď je tedy nejlepší prevencí přechodu CML do pokročilé fáze a s tím spojenou horší prognózou ve smyslu celkové přežití.

Z hlediska odhadu prognózy pacientů s CML můžeme vycházet jednak z parametrů a informací, které máme k dispozici při stanovení diagnózy onemocnění, jednám z dosahovaných léčebných odpovědí v průběhu terapie samotné. Speciální kategorií pak odhad prognózy pro pacienty, kteří podstupují transplantaci krevetvorných buněk

### 6.1. Vstupní prognostické faktory (v době diagnózy)

Prognóza pacientů v době stanovení diagnózy CML zcela zásadně ovlivňuje i onemocnění. Pacienti diagnostikovaní v blastické krizi měli dříve střední dobu přežití několik málo měsíců a imatinib, tak úspěšný v chronické fázi, tento parametr přežít prodloužil pouze na necelých 8 měsíců.

V chronické fázi jsou informace důležité pro odhad prognózy odvozeny z klinicky a laboratorních parametrů (věk, velikost sleziny, počet bazofilů, eosinofilů a blastů v periferní krvi), které tvoří tzv. **Sokalovo a Hasfordovo rizikové skóre**, pojmenovaní podle jejich autorů (Tab. 3). Na základě vypočtené hodnoty jsou pacienti rozděleni do skupiny nízkého, středního a vysokého rizika. I přesto, že oba dva skórovací systémy byly vytvořeny v dobách, kdy se CML léčila staršími typy léčby a sloužily tedy k odhadu vývoje onemocnění u pacientů, ukázalo se, že i v éře nových moderních léků dobře koreluje s pravděpodobností dosažení dobré léčebné odpovědi, a tudíž i prognózou pacientů léčených imatinibem. Způsob výpočtu je poměrně komplikovaný a je uveden v tabulce

## 6. JAK ODHADUJEME PROGNOZU PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ?

Tabulka 3. Výpočet rizikových skóre dle Sokala a Hasforda

	Sokalovo skóre	Hasfordovo skóre
Výpočet	$\text{Exp}(0,0116 \cdot (\text{věk} - 43,4) + 0,0345 \cdot (\text{velikost sleziny} - 7,51) + 0,1888 \cdot (\text{trombocyty} \cdot 700)^{-0,563} + 0,0887 \cdot (\text{blasty} - 2,1))$	$(0,666 \cdot \text{věk} / 10 \text{ pokud je věk} < 50 \text{ let, jinak } 1) + 0,042 \cdot \text{velikost sleziny (cm pod žeberní oblouk)} + 0,0584 \cdot \text{blasty [\%]} + 0,0413 \cdot \text{eosinofily [\%]} + 0,2039 \cdot \text{bazofily} / 10 \text{ pokud jsou bazofily} < 3\%, \text{ jinak } 1) + 1,0956 \cdot \text{x trombocyty} / 10 \text{ pokud jsou trombocyty} < 1500 \cdot 10^9 / \text{l, jinak } 1) \cdot 1000$
Nízké riziko	< 0,8	< 780
Střední riziko	0,8 – 1,2	780 – 1480
Vysoké riziko	> 1,2	> 1480

Tabulka 4. Výpočet Grabrowskova (EBMT) skóre pro odhad rizika alogenní transplantace krevetvorných buněk a pravděpodobnost 5-ti letého přežití pacientů dle jeho hodnoty

Parametr	Specifikace	Body
Věk pacienta	Pod 20 let	0 bodů
	20–40 let	1 bod
	Nad 40 let	2 body
Doba od diagnózy k alo-TKB	Do 1 roku	0 bodů
	Nad 1 rok	1 bod
Fáze choroby	CP	0 bodů
	AP	1 bod
	BC nebo 2. CP	2 body
Darce	HLA identický sourozenec	0 bodů
	HLA kompatibilní příbuzný dárc	1 bod
Kombinace pohlavi dárců/příjemce	Žena/muž	1 bod
	Jiná kombinace	0 bodů
Skóre	0 1 2 3 4 5	6–7
Pravděpodobnost 5-ti letého přežití	76% 73% 59% 49% 38% 39%	39% 19%

Vysvětlivky: alo-TKB, alogenní transplantace krevetvorných buněk

## 6. JAK ODHADUJEME PROGNÓZU PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ?

K dispozici je řada automatických kalkulátorů, které výpočet usnadní, <http://www.pharmacoepi.de/cgi-bin/cmlscore.cgi> nebo [http://www.leukemia-net.content.leukemias/cml/cml\\_score/](http://www.leukemia-net.content.leukemias/cml/cml_score/). Nedávně bylo publikováno nové prognostické s tzv. **EUTOS skóre** (*The European Treatment and Outcome Study for CML, EUTOS*), bylo vyvinuto a testováno na početné populaci pacientů léčených imatinibem v I linii a které až zjednodušeno na hodnocení počtu bazofilů a velikosti sleziny velmi odhaduje pravděpodobnost dosažení kompletní cytogenetické odpovědi a přežití progresse. Automatický výpočet je k dispozici na adrese: [http://www.leukemia-net.content.leukemias/cml/eutos\\_score/](http://www.leukemia-net.content.leukemias/cml/eutos_score/).

Kromě výše uvedeného je s horší prognózou ve smyslu kratšího přežití progresse a celkového přežití spojován výskyt **přidatých cytogenetických abnorm v Ph-pozitivních buňkách**, tedy ještě jiných dalších změn kromě vlastní Ph chromozomu.

### 6.2. Prognostické faktory spjaté s léčbou imatinibem

Od vstupu imatinibu do léčby CML jsou jim dosažené výsledky net analyzovány a dávány do souvislosti s dlouhodobou prognózou takto léčených paci. Ukázalo se, že nejen hloubka dosažené léčebné odpovědi, ale i čas jejího dosažení svůj dlouhodobý prognostický význam. Dobrá léčebná odpověď tak může smazat původního rozdělení do rizikových skupin dle Sokala a Hasforda. Vzhledem k návaz na kapitulu o léčbě imatinibem a dalšími moderními léky bude prognostický vý jednotlivých typů léčebných odpovědi probrán tam.

### 6.3. Prognostické faktory u alogenní transplantace krvetvorných buněk

K odhadu transplantacního rizika slouží tzv. **Gratwohlho (The European C for Blood and Marrow Transplantation, EBMT) skóre** (Tab. 4). Blíže se mu bude vět kapitola o transplantacích níže.

## 7. OD JAKÝCH PODOBNÝCH ONEMOCNĚNÍ JE TŘEBA CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ ODLIŠIT?

Proces vylučování jiných podobných onemocnění, se kterými by CML mohla být zaměněna, se nazývá diferenciální diagnostikou. V případě CML je poměrně jednoduchá, protože se opírá o jednoznačný prokaz Ph chromozomu a *BCR-ABL1* fuzního genu. Ostatní případy *BCR-ABL1* –negativní leukocytózy mohou zahrnovat

- atypickou CML (odlišení: *BCR-ABL1* negativita, chybění bazofilie, dysplastické /dysplazie = odchylka od normálního vývoje buněk/změny ve vývojových řadách buněk KD) mutace *BCR-ABL1* kinázové domény
- myeloproliferativní onemocnění typu polycytémia vera, esenciální trombocytémie nebo chronická idiopatická myelofibróza (odlišení: *BCR-ABL1* negativita, typický obraz v histologickém vyšetření KD, pozitivita mutace JAK-2)
- akutní leukemii (odlišení:  $\geq 20\%$  blastů v KD a/nebo PK, krom zralých elementů chybění jednotlivých vývojových buněčných stadií, *BCR-ABL1* negativita, výjma případů Ph-pozitivní akutní lymfoblastické leukemie)
- chronickou myelomonocytární leukemii (CMML) (odlišení: *BCR-ABL1* negativita, monocytóza  $> 1 \times 10^9/lv$  PK, dysplastické změny, chybění bazofilie)
- jiné příčiny leukocytózy (infekce, záněty, ...)

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

Léčba CML patří do rukou specialisty – hematologa, který je dostatečně zkuš a vzdělaný a též kontinuálně informovaný o všech novinkách v oblasti, která se neustavivě vyvíjí a zlepšuje. To vše je velmi důležité, aby byl pacient správně a optimálně léčen. V ČR je péče o pacienty s CML soustředěna do několika málo vysoce specializovaných hematologických center, která se nacházejí ve velkých městech (Praha, Brno, Olomouc, Hradec Králové, Plzeň) a která zaručují vysokou úroveň erudice svých odborníků a též disponují všemi potřebnými diagnostickými metodami a přístroji. Pacienti jsou tedy záhy po zjištění či vyslovení podezření na CML odesláni právě do jednoho z těchto center, kde se jednak diagnostika dokončí a následně je naplánována zahájení vlastní terapie.

### 8.1. Cíle léčby chronické myeloidní leukemie

Cílem léčby chronické myeloidní leukemie je zpochybnění úleva od obtěžujících příznaků rozvinutého onemocnění a normalizace krevního obrazu a velikosti sleziny. Tento stav nazýváme **kompletní hematologickou odpovědí (complete hematologic response, CHR)**. Kromě úpravy hematologických parametrů je léčebně usilováno i o vymizení buněk, které nesou Ph chromozom, respektive gen *BCR-ABL1*. Stav, kdy kmenové cytogenetickou analýzou neprokážeme v KD žádnou Ph-positivní buňku, nazýváme **kompletní cytogenetickou odpovědí (complete cytogenetic response, CCR)**. Je to nepodkrácitelný léčebný cíl v éře tyrozinkinázových inhibitorů. Ve snaze co nejlépeš prognózu pacientů se zajištěním dlouhodobého přežití a vyšší mírou přežitím v dlouhodobou stran případného vysazení léků je cílem dosažení minimální až nulové zbytkové choroby na molekulární úrovni – tzv. **velké molekulární odpovědi (major molecular response, MMR)** či dokonce **kompletní molekulární odpovědi (complete molecular response, CMR)**. S tím je spojena optimální cílová varianta úplného vyčlenění z chronické myeloidní leukemie. V neposlední řadě je terapeutickým cílem normalní plnohodnotná a kvalitní život pacienta.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

Kromě určité hloubky léčebné odpovědi na úrovni hematologické, cytogenetické a molekulární je podle současných mezinárodních doporučení požadováno její dosažení v jistém časovém horizontu, např. CCR by mělo optimálně být dosaženo do 1 roku od startu terapie imatinibem, nepozději však do roku a půl. Případně nedosažení požadované léčebné odpovědi či její ztráta představují selhání terapie a léčebné úsilí by mělo být začleneno na nápravu tohoto stavu (zintenzivnění léčby či její změna). Léčebným doporučením bude věnována pozornost v kapitole 8.8. Nejprve však krátce nahledneme do historie léčby CML.

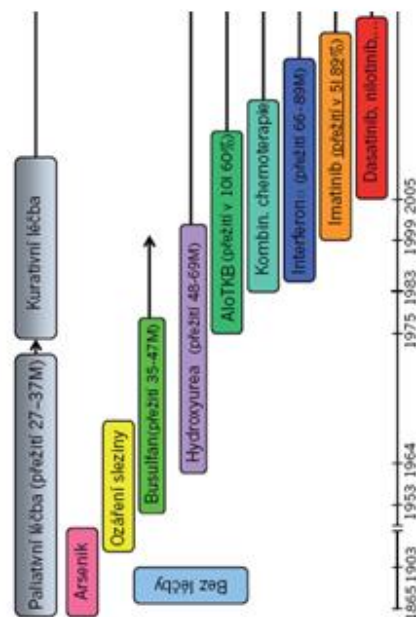
### 8.2. Pohled do historie léčby chronické myeloidní leukemie

První popis chronické myeloidní leukemie je datován do roku 1845, kdy bylo toto onemocnění nezávisle na sobě popsáno dvěma patology, Johnem Hughsem Bennettem z Edinburghu jako případ pacienta se zvětšenými játry a slezinou a s patologickou krví, a jen o několik týdnů později pak zachytil a popsal podobný případ Rudolf Virchow v Berlíně. Třebáže jisté prevenství z hlediska chronologie náleží J. Bennetovi, slovo „leukemie“ bylo poprvé užito právě Virchowem, který též na rozdíl od Bennetta popsany případ považoval za příklad nádorového onemocnění.

Zprvu nebyla leukemie léčena vůbec a pacienti přežívali v průměru 32 měsíců od prvních příznaků choroby (Obr. 9). V roce 1865 se podařilo poprvé u nemocného snížit počet leukocytů přípravkem obsahujícím **arsen**. Tento po staletí známý a užívaný jed se v medicinském užítí začal objevovat od 15. století. V r. 1786 vyvinul dr. Thomas Fowler přípravek obsahující arsenik zvaný Fowlerův roztok. Zajímavostí je, že v roce 1882 publikoval v prestižním medicinském časopise *Lancet* svůj úspěch s léčbou arsenikem u pacientů s pravděpodobnou CML. Sir A.C. Doyle, autor detektivních příběhů o Sherlocku Holmesovi. Arzenik se používá i v současnosti, a to v léčbě některých jiných typů leukemií. Počátkem 20. století byla zavadena do léčby CML **radioterapie** nebolí léčba ionizujícím zářením. Ozáření sleziny přineslo částečnou úlevu od potíží, které její zvětšení provázelo, prodloužení života však dosaženo nebylo. V roce 1953 bylo ozáření sleziny nahrazeno tabletovým cytostatikem, **busulfanem** (firemni název Myleran, Mylectan), který přinesl úlevu od obtíží i prodloužení života na 35–47 měsíců. Popularitu busulfanu narušovalo podezření, že sám může svým působením přispívat k progresi do pokročilé fáze choroby, a též závažné nežádoucí účinky, jakými byly útlum kostní dřeně, poruchy funkce trávicího ústrojí a plícní toxicita. O několik let později byl busulfan nahrazen lépe snášenou **hydroxyureou**, která se v některých indikacích používá dodnes (viz dále). Hydroxyurea (Litalir) prodloužila přežití pacientů na 48–69 měsíců.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

Obrazek 9. Historie léčby CML.



První zpráva o úspěšné **transplantaci kostní dřeně** u pacientů s CML od 1. –jedenadvacátých dvojčat znamenala začátek nové éry v léčbě CML. Dosa-paliativní způsob terapie (tj. pouze úleva od příznaků a potíží) nabyl zcela odli-charakteru, a sice kurativního (tj. se záměrem pacienta vyléčit). Vůbec první pou- o prvních 100 alogenně transplantovaných pacientech spatřila světlo světa v 1977 a její první autor, dr. Donnal Thomas, za ni obdržel v roce 1990 Nobelovu V 90. letech minulého století transplantaci krevtvoorných buněk u CML rychle přil a CML se tak stala v letech 1980–2000 nejčastější indikací pro tuto léčebnou proc- vubec. I přes nezanedbatelné riziko komplikací včetně úmrtí se transplantaci standardním postupem v léčbě mladších pacientů s CML. V 70. a 80. letech mir století se zkoušela **léčba CML vysokými dávkami protinádorových léků, tzv. cyto** Protože měla podstatně více nežádoucích účinků a neprodloužila přežití ve sr- s hydroxyureou, nedoznala většího rozšíření. Stejně tak **antoloni transpl- krevtvoorných buněk**, které se prováděly v 90. letech, kdy byly buněhy odebrány paci samotnému a navraceny mu též po přípravě vyššími dávkami cytostatik, se v léčbě neujaly.

V ranných 80. letech byl do léčby CML zaveden **interferon alfa**, kte- objeven již v roce 1957. Jde o bílkovinu, kterou produkují některé typy lí- bílých krvinek a je zaměřená proti virovým nakažam. Pro léčebné účely se

tzv. rekombinantní technologii, pomocí bakterií. Podstata účinku u CML není zcela objasněna, pravděpodobně jde o imunitní působení. Ve srovnání s ostatními léky do té doby užívány v léčbě CML, dokázal interferon významně snížit počet Ph pozitivních buněk až k nulovým hodnotám a tak dosáhnout významného prodloužení života, i když jen u části pacientů. Interferon v kombinaci s cytostatikem zvaným **cytosar** se stal tzv. zlatým léčebným standardem pro ty pacienty, kteří nemohli být transplantováni ať již z důvodu věku, nedostupnosti dárce nebo jiných chorob, které by činily transplantaci léčbu příliš riskantní procedurou.

V roce 1999 byly zveřejněny první povzbudivé výsledky klinických zkoušek nového léku, který byl syntetizován v r. 1992 jako specifický inhibitor právě oné patologické tyrozinkinázy Bcr-Abl, která je hybným motorem CML. Lék byl nazván **imatinib mesylát**. Imatinib (**Glivec**) se stal prvním molekulárně cíleným lékem užitým v léčbě nádorového onemocnění, úspěšně prošel všemi fázemi klinického zkoušení, kde prokázal výbornou účinnost a dobrou snášenlivost, a v roce 2001 se stal vůbec nejrychleji schváleným protinádorovým lékem pro užití v klinické praxi. Výzkum v oblasti CML stále kráčí kupředu a v současnosti máme k dispozici ještě účinnější tyrozinkinázové inhibitory 2. generace – **dasatinib (Sprycel)** a **nilotinib (Tasigna)**, kterými lze imatinib nahradit v případě jeho léčebného selhání či intolerance. Od roku 2010 jsou oba tyto preparáty schvaleny coby prvoliniové léky pro nově diagnostikované pacienty v chronické fázi CML. Rada dalších slibných léků jev různých fázích vývoje a klinického zkoušení.

V následujícím textu budou charakterizovány jednotlivé typy léčby CML a zařazeny do kontextu současných léčebných doporučení.

### 8.3. Cytoredukční a podpůrná terapie

Po záchytu zvýšeného počtu leukocytů a/nebo trombocytů v KO a provedení nezbytných vstupních vyšetření (viz výše) je zpravidla nutné ještě před definitivním potvrzením diagnózy CML zahájit tzv. cytoredukční terapii, jejímž cílem je snížit často velmi zvýšené hodnoty krvinek na hodnotu bezpečnou pro pozdější zahájení specifické terapie tyrozinkinázovými inhibitory. V některých případech vstupní hodnoty krvinek nejsou dramaticky zvýšeny a dovolí vyčkat potvrzení diagnózy CML bez nutnosti jiné terapie.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

### 8.3.1. Hydroxyurea (Litalir)

Hydroxyurea je tabletové cytostatikum, které se užívá ke snížení počtu leukocytů a/nebo trombocytů zejména v úvodu terapie CML, a dále pak v situacích, kdy z nějakého důvodu nelze užívat TKI (rezistence vůči účinku všech dostupných TKI, nesnášenlivost všech TKI). Úvodní dávka se pohybuje mezi 30–40 mg/kg/den p.o. (možno rozdělen ve více denních dávkách) a dále se upravuje dle hodnot KO. Hydroxyurea je poměrně dobře snášena a její účinek nastupuje rychle. Z nežádoucích účinků (NU) se mohou vyskytnout nevolnost, ospalost, nervové a psychické obtíže, bolesti hlavy, kožní vyrážky, trávicí obtíže, záněty v dutině ústní.

### 8.3.2. Anagrelid (Thromboreductin)

Anagrelid je rovněž perorální přípravek, který dokáže účinně a selektivně snížit zvýšený počet trombocytů. Úvodní dávka se pohybuje mezi 0,5 – 1 mg/den, následně úpravy se řídí dynamikou poklesu počtu trombocytů a tolerancí přípravku. Nejčastější NU anagrelidu jsou bolesti hlavy, bušení srdce, průjem, nevolnost, bolesti břicha.

### 8.3.3. Leukaferéza, event. trombocytaferéza

Přístrojová cytoredukční metoda slouží k rychlému a relativně bezpečnému snížení významné a symptomatické leukocytózy a/nebo trombocytémie. Užívá se zejména v úvodu terapie CML, před zahájením specifické terapie TKI. Pacientovi žilní krev je odváděna do speciálního přístroje (separatoru krevních elementů), kde je centrifugací zbavena nežádoucích krvinek (ty se liší svou hmotností a různým nastavením centrifugy pak dochází k úbytku pouze požadovaných krvinek). Následně se krev vrací do oběhu pacienta. Rozhodnutí, zda cytoredukce proběhne přístrojově nebo farmakologicky (tablety), je vždy na lékaři a je ovlivňováno výší leukocytózy a/nebo trombocytózy a případnými příznaky, které se v jejich důsledku objevují. Čím vyšší počet krvinek a čím vyjadřenější příznaky (krváčení na očím pozadí, poruch zraku, neurologické poruchy, dechové obtíže,...), tím více stojí rozhodnutí na straně přístrojové cytoredukce.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

### 8.3.4. Podpůrná léčba

Od zahájení léčby CML až do normalizace počtu leukocytů je doporučeno podání alopurinolu (Milturit, Purinol) jako prevence vysoké hladiny kyseliny močové (hyperurikémie). Hromadění se kyseliny močové v organismu souvisí s vysokým obrátem množících se leukocytů a mohlo by mít nežádoucí dopad na funkci ledvin. Alopurinol je k dispozici v tabletové formě a užívá se zpravidla v jedné denní dávce (100–300 mg). Ve výjimečných případech velmi vysoké hladiny kyseliny močové v krvi je možno jejího rychlého snížení dosáhnout intržilním přípravkem rasbunkázou (Fasturtec). Zvláště v úvodu léčby CML je dále velmi důležitý dostatečný příjem tekutin, monitorování změn vnitřního prostředí pomocí biochemických rozborů krve a případná korekce zjištěných patologií (například hrazení chybějících iontů, apod.).

Jak bude dále rozvedeno, současná léčba CML je soustředěna do ambulantní sféry a pacientův naprostě většině žijí plnohodnotným životem jako před stanovením diagnózy. V úvodu léčby však může být doporučena nebo i nutná hospitalizace ať už za účelem přístrojové cytoredukce (viz výše) nebo z důvodu nutnosti častých kontrol vnitřního prostředí při farmakologickém snižování bílých krvinek. I v průběhu léčby ambulantní pak mohou spíše výjimečně nastat situace, kdy je nutná hospitalizace pacienta, například z důvodu nežádoucích účinků léčby tyrozinkinázovými inhibitory nebo při poměrně vzácné progresi onemocnění do pokročilé fáze, kdy se léčba mění a zintenzivňuje.

## 8.4. Léčba tyrozinkinázovými inhibitory (TKI)

V době psaní této brožury jsou v klinické praxi v našich podmínkách pro léčbu CML dostupné tři TKI: imatinib (Glivec) pro nově diagnostikované pacienty a TKI 2. generace – dasatinib (Sprycel) a nilotinib (Tasigna) – pro případy, kdy je CML na léčbu imatinibem rezistentní či není imatinib pacientem snášen. V následujícím textu si jednotlivé přípravky přiblížíme.

### 8.4.1. Imatinib (Glivec)

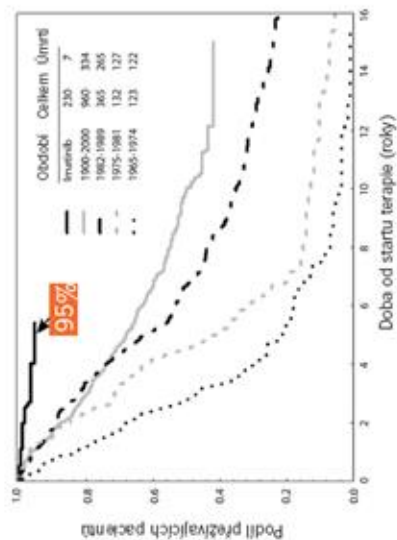
Zavedení prvního tyrozinkinázového inhibitoru – imatinibu (Glivec) – do léčby pacientů s CML v roce 2001 znamenalo skutečnou revoluci v dosavadním léčebném přístupu k této nemoci. Ukázalo se, že funguje ve všech fázích CML, ale nejlepší účinnost prokazuje u pacientů s nově diagnostikovaným onemocněním

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

v chronické fázi. Nejdelší sledování mají pacienti, kteří byli v roce 2000 zařazeni d studie IRIS, která původně porovnávala imatinib s předchozím zlatým léčebným standardem – interferonem alfa v kombinaci s cytosarem, ale záhy pro velký odliv pacient z této léčebné větve se stala vlastně pilířem pro hodnocení dlouhodobého účinku imatinibu v léčbě nově diagnostikovaných pacientů v CP. Po 7 letech sledování se ukázalo, že 82% pacientů dosáhlo kompletní cytogenetické odpovědi a odhad podílu přežívajících pacient je 86%. Pokud jsou však započítávána jen úmrtí související s CML, 7-letý odhad celkové přežití je 94%. Takových výsledků nebylo dosaženo žádnými předchozími typy léčby (Obr. 10). Rovněž v podmínkách každodenní klinické praxe imatinib potvrdil svo účinnost a dobrou snášenlivost. Imatinib se stal novým zlatým standardem léčby pacient s nově diagnostikovanou CML.

Mechanismus účinku imatinibu jako prototypu ostatních TKI je znázorněn n obrázku 11. Imatinib utlumí patologický aktivovaný enzym Bcr-Abl tyrozinkinázu v své činnosti tím, že obsadí místo, kam se váže kyselina adenosintrifosforečná (ATP). Tato kyselina je dodavatelem fosfátu, který Bcr-Abl tyrozinkináza váže na další výkonní bílkoviny oblasti tzv. tyrozinových zbytků. Bílkoviny obohacené fosfátem přenášej celou řadu informací a dále aktivují další bílkoviny v procesu, jehož výsledkem j

■ **Obrázek 10.** Srovnání celkového přežití pacientů v CP/CML léčených imatinibem a jinými typy konzervativní terapie v éře před zavedením TKI. Upraveno dle Quintás-Cardama A. a kol., *May Clin Proc* 2006; 81:973-988.

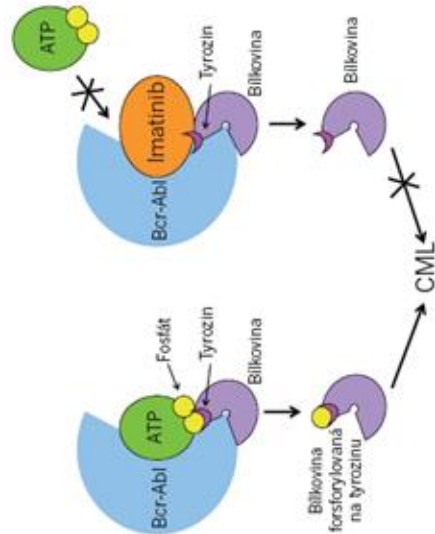


## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

nekontrolované množení krevních buněk, jejich prodloužené přežívání a vyniknutí se kontrole, kterou zajišťuje mikroprostředí v kostní dřeni. Pokud imatinib zabránil vazbě ATP na Bcr-Abl tyrozinkinázu, k fosforylaci výkonných bílkovin nemůže dojít a celý patologický proces projevů CML je zablokován.

Léčba imatinibem se zahajuje buď ihned po potvrzení diagnózy CML nebo po snížení leukocytů a/nebo trombocytů pomocí hydroxyurey či dalších cytoredukčních prostředků na hodnoty kolem 20 tisíc leukocytů. Lék je k dispozici v tabletách a dávka pro pacienty v CP je 400 mg v jedné denní dávce, pro pokročilé fáze je pak doporučována dávka vyšší – 600 až 800 mg rozdělených do dvou denních dávek. Je důležité dodržovat doporučení v příbalové informaci, například užívat imatinib s jídlem a zapít ho velkou sklenicí vody a vyvarovat se některých potravin (grapefruitu a grapefruitové šťávy, sevilských pomerančů, karamboly, čaje z třezalky tečkované). Rovněž některé léky, které pacient užívá z důvodu jiných onemocnění, mohou s imatinibem v organismu vstupovat do nepříznivé interakce a jeho účinnost buď snižovat či zvyšovat. Jedná se zejména o léky, které jsou v organismu zpracovávány v játrech pomocí enzymatického systému cytochromu P-450 (viz též kapitola 8.4.6.). Je ukolem hematologa, aby případně interakce posoudil a doporučil případnou změnu z jiné lékové skupiny. Je tedy důležité

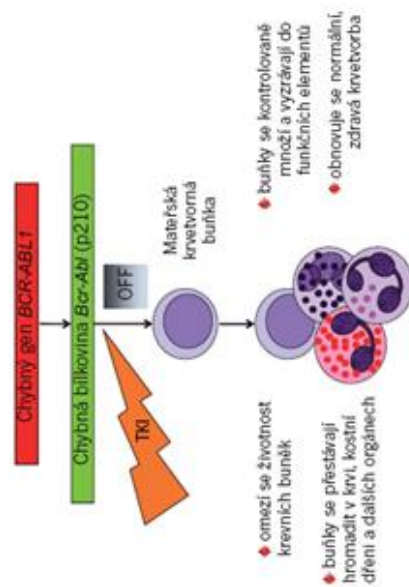
■ **Obrázek 11.** Schéma mechanismu účinku tyrozinkinázního inhibitoru imatinibu. Imatinib na Bcr-Abl tyrozinkináze obsadí vazebné místo pro kyselinu adenosintrifosforečnou (ATP) a znemožní tak fosforylaci bílkovin, které jsou zodpovědné za progresi CML.





## 8. JAK LÉČIME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

Obrazek 12. Důsledky blokad proteínu Bcr-Abl tyrozinkinázojními inhibitory (TKI)



svého ošetřujícího hematologa o užíváních medikamentech informovat včetně zn prováděných v mezidobí mezi hematologickými kontrolami. Z běžných léků n doporučováno kombinovat imatinib s paracetamolem (přípravky Paralen, Paral Panadol, Ataralgin, Efferalgan, Doreta, Daleron, Korylan, Medipyrin, Zaldiar...) horečky či bolesti je doporučován spíše lék typu ibuprofenu či acylpyrimu.

Léčba imatinibem se ukázala být dobře snášenou, zvláště porovnáme-li ji s léčb interferonem alfa, který může vyvolat celou řadu NU (viz podkapitola 8.7.), n s možnými komplikacemi alogenní transplantace krvetvorných buněk, kt mohou být až život ohrožující (viz podkapitola 8.6.). Přesto však ani imatinib není pr nežádoucích účinků a vzhledem k jeho dlouhodobému podávání je třeba se serió zabývat i potížemi, které jsou hodnoceny co do intenzity jako mírné či střední.

Vůbec nejčastějším nežádoucím účinkem nejen imatinibu, ale i ostatn dostupných TKI je tzv. hematologická toxicita nebo-li útlum kostní dřeně. Proj se poklesem v jedné nebo více řadách krvinek (červené krvinky, krevní destič leukocyty). Vyskytuje se zejména v úvodu léčby a částečně je to dané za rychlý efekt T na nemocnou, Ph-pozitivní krvetvorbu, která po účinném utlumení není dostatek rychle nahrazena krvetvorbou zdravou. Útlum kostní dřeně po TKI se prohlub s pokročilostí fáze onemocnění, nejčastěji bývá u nemocných v blastickém zvr

## 8. JAK LÉČIME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

Nejčastějšími nehematologickými NU imatinibu jsou:

- Trvající obtíže (průjem, nevolnost)
- Otoky (nejčastěji otoky v oblasti, kolem víček, dale otoky dolních končetin, nárůst hmotnosti ze zadržování tekutin)
- Kožní vyrážka (různého stupně, od drobné nesvědivé krupičky v oblasti obličejé až po rozsáhlou svědivou vyrážku na kůži celého těla)
- Svalově-kloubní obtíže (svalové křeče, bolesti svalů a kloubů)
- Únava
- Bolesti hlavy
- Zvýšení jaterních testů (enzymů ALT, AST, bilirubinu)
- Změny pigmentace (zbarvení) kůže, poruchy kožních adnex (vypadávání vlasů, obocí,...)
- Oční změny (krvácení do oční spojivky, záneť spojivek, rozmazané vidění)
- Poruchy iontů a minerálů (snížení krevní hladiny fosforu)

Opatření k mírnění a zvládnutí NU imatinibu i ostatních TKI budou probírána v kapitole 8.4.5. Účinnost léčby imatinibem se hodnotí pomocí vyšetření krve a kostní dřeně v pravidelných intervalech. Monitorování léčebného efektu TKI u pacientů s CML bude věnována kapitola 8.5. Již na tomto místě je však třeba zmínit, že léčba imatinibem je dlouhodobá a prakticky trvá i u pacientů, kde se podaří dosáhnout výborného léčebného účinku, např. kdy ani velmi citlivou vyšetřovací metodou nemůžeme zjistit přítomnost buněk nesoucí BCR-ABL1 gen. V současné době nelze říci, že by imatinib dokázal nemoc úplně zlikvidovat a že by mohl být po čase bezpečně vysazen bez rizika návratu onemocnění. Předpokládá se totiž, že mateřské kmenové buňky, které jsou ve dření v klidovém stadiu, tzv. spící, nejsou na imatinib vnímavé, a tudíž zůstávají v organismu jako potenciální zdroj možného návratu nemoci. Věda a výzkum jdou však rychle kupředu a je možné, že se v horizontu několika málo let dockáme změny ve stávajícím postupu a že budeme moci třeba léčbu i vysadit bez rizika návratu onemocnění. Zatím se vysazení léku za přísné kontrolovaných podmínek připouští jen v rámci klinických studií.

Dlouhodobé užívání jakékoli medikace sebou nese riziko a je to i ověřená zkušenost, že pacienti mohou časem polevit v pravidelnosti užívání léku. Taková možnost se i nabízí, protože pacienti s CML, léčení TKI žijí v naprostě většině velmi kvalitní a plnohodnotný život, kdy nemají potíže a mohou tedy mít pocit, že lék nepotřebují nebo že senic nestane, pokud si ho párkrát zapomenou vzít. Poslední výzkumy provedené např. ve Velké Británii ale ukázaly, že i nečetné zapomenutí léku ovlivní křečnou odpověď

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

a další vývoj pacienta. Pravidelné užívání léku je tedy velmi důležitým faktorem léčebného úspěchu. V neposlední řadě je nutné brát v potaz též fakt, že imatinib se jako oba dostupné TKI 2. generace jsou velmi drahé léky (cena roční léčby je polí kolem 1 milionu korun), a třebaže jsou plně hrazeny zdravotní poisťovnou, je nutno léčbu vážít a vědomě si vysvětlit své léčby neohrožovat nepravdělným užíváním.

### 8.4.2. Dasatinib (Sprycel)

Dasatinib je představitelem 2. generace TKI, který byl původně vyvinut jako inhibitor tzv. Src kináz, tyrozinkinázy účastnících se přenosu signálu v buňce. Ukazuje se, že mimo jiné kinázy velmi účinně tlumí i Bcr-Abl tyrozinkinázu. Jeho účinnost udává až 325x větší v pokusech *in vitro* (mimo živý organismus, „ve zkumavce“) je účinnost imatinibu a kromě toho dasatinib působí na většinu mutací BCR/ABL kinázové domény (KD), které jsou na imatinib rezistentní (mutacím bude věnoáno kapitola 8.4.4, zde tedy jen krátce – jedná se o varianty BCR/ABL KD, které se mohou vymýkat kontrole TKI a léčba se pak stává neúčinnou). Svou účinnost v léčbě pacientů s CML všech fází na imatinib rezistentních či imatinib netolerujících dasatinib potvrdily výsledcích klinických studií a na jejich základě byl v roce 2006 schválen pro klinické užívání v této indikaci. Ze studií rovněž vyplynula doporučená dávka dasatinibu pacienty v chronické fázi – 100 mg jednou denně a v pokročilých fázích (40 mg v denní dávce). Ukázalo se, že ve všech dávkovacích schématech mají tato dávkování nejvyšší účinnost za zachování přijatelné toxicity. V chronické fázi je ve studiích dosahováno druhé linie léčby dasatinibem (po selhání nebo intoleranci imatinibu) po 2 letech začátku terapie kompletních cytogenetických odpovědí asi u 50% pacientů a celková přežití je 94%. Vynikající účinnost dasatinibu vedla k jeho porovnání s imatinibem též u nově diagnostikovaných pacientů a ukázalo se, že ve všech sledovaných parametrech – procento a rychlost dosažení kompletní cytogenetické a velké molekule odpovědi – byl dasatinib účinnější než imatinib. V říjnu 2010 byl dasatinib schválen příslušnými institucemi pro klinické užívání v této indikaci. V době psaní této publikace však ještě nebyly v ČR splněny všechny podmínky, aby ho bylo možno napsat na reálné nově diagnostikovanému pacientovi.

Dasatinib je rovněž k dispozici v tabletech, a to v síle 20, 50 a 70 mg. Užívá se v denní dávce (viz výše) a je možné ho užívat s jídlem jako imatinib nebo i nalačno. Roční dasatinib může vstupovat s ostatními pacientovými léky do nežádoucích interakcí, je třeba jejich užívání s ošetřujícím hematologem zkontrolovat (viz též kapitola 8.4.6.)

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

Dasatinib je dobře snášen a často je právě chybění nežádoucích účinků, které nemocnému způsoboval imatinib, pro pacienta příjemným překvapením. Nicméně i dasatinib může způsobovat řadu obtíží, na které je třeba myslet a účinně je řešit. Nejčastějším a ze všech dostupných TKI nejvíce vyjádřeným NU je opět útlum krvetvorby, pro který platí analogické zakonitosti, jak již je uvedeno výše u imatinibu.

Z nehematologických NU jsou nejčastějšími tyto:

- Periferní otoky (zadržování tekutin)
- Pohrudniční výpotky, výpotky v perikardu
- Trávící obtíže (nevolnost, průjem)
- Dušnost
- Infekce
- Únava
- Bolesti hlavy
- Bolesti v polyhybovém aparátu

Opatrnosti k mírnění a zvládnutí NU dasatinibu budou probírána v kapitole 8.4.5. Účinnost léčby dasatinibem je posuzována podle stejných měřítek jako u imatinibu, hodnotí se tedy léčebná odpověď na úrovni hematologické, cytogenetické a molekulární ve stanovených intervalech (viz kapitola 8.5.). Ani tento lék nedokáže vymýtit spící kmenové buňky, proto by léčba dasatinibem měla být při dobré účinnosti trvalá.

### 8.4.3. Nilotinib (Tasigna)

Nilotinib je syntetickým derivátem imatinibu, který byl vyvinut s cílem ovlivnit Bcr-Abl tyrozinkinázu i v případech, že je díky mutaci nepřístupná pro imatinib, který na ni pak nemůže působit. Vazba nilotinibu na Bcr-Abl tyrozinkinázu nevyžaduje tak těsné přilnutí a číni ho tedy vůči mutacím odolnějším. *In vitro* prokázal nilotinib asi 30x vyšší účinnost než imatinib v inhibici Bcr-Abl tyrozinkinázy a působil i na většinu testovaných mutací, na které byl imatinib neúčinný. Po úspěších v klinickém zkoušení byl v roce 2007 nilotinib v dávce 2 x 400 mg denně schválen pro podání u pacientů s CML v CP a AP na imatinib rezistentních nebo ho netolerujících. Dvouleté sledování pacientů v CPCML zarázených do studie s nilotinibem ukázalo 44% dosažení kompletních cytogenetických remisí a odhad podílu přežívajících ve 2 letech od startu terapie byl 87%. Rovněž nilotinib byl porovnán s imatinibem v mezinárodní klinické studii v první linii léčby u nově diagnostikovaných pacientů s CPCML, a sice ve dvou

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

dávkovacích schématech – 300 mg a 400 mg 2 x denně. Nilotinib v obou dávkovacích režimech statisticky významně předčil imatinib v procentu dosažených MMR a CCR v 12. měsíci terapie a stejně tak ve snížení rizika progresse do pokročilé fáze. Výsledky této studie vedly v roce 2010 ke schválení nilotinibu v dávce 300 mg 2 x denně pro léčbu pacientů s nově diagnostikovanou CPCML. V době psaní této publikace však ještě nebyly ČR splněny všechny podmínky, aby ho bylo možno napsat na recept nově diagnostikovanému pacientovi.

Nilotinib má na rozdíl od imatinibu a dasatinibu striktní doporučení ve smyslu nutnosti užít lék nalačno. Je nezbytné být lačný 1 hodinu před a 2 hodiny po užít nilotinibu. Vzhledem k tomu, že nilotinib se užívá ve dvou denních dávkách – ve druhé linii je to 400 mg ráno a večer, jsou na pacienta kladeny určité nároky na dodržení správných intervalů lácení. V případě nedodržení těchto doporučení se může zvýšit účinnost nilotinibu v organismu nežádoucím způsobem ve smyslu nárůstu toxicity léku. I pro nilotinib platí, že se může ovlivňovat s jinými užívanými léky a je tedy třeba jejich vhodnost či nepřipustnost s hematologem zkontrolovat (viz též kapitola 8.4.6.).

Z hlediska nežádoucích účinků nilotinib způsobuje útlum kostní dřeně, i když ne v takové míře jako dasatinib. Nejčastějšími projevy nehematologické nesnášenlivosti nilotinibu jsou:

- Kožní vyrážka a svědění kůže
- Nevolnost
- Únava
- Periferní otoky
- Bolesti hlavy
- Průjem
- Biochemické abnormality (zvýšení glykemie – hladiny krevního cukru, zvýšen bilirubinu, jaterních testů, zvýšení enzymů slinivky břišní – amylázy a lipázy
- snížení hladiny fosforu v krvi)
- Proloužení QT intervalu na EKG záznamu – může být spojeno se vznikem závažných poruch srdečního rytmu

Zajímavé a povzbudivé je, že i přes strukturální podobnost nilotinibu s imatinibem existuje jen minimální zkrížená intolerance mezi těmito dvěma léky. V praxi to znamená, že závažné nežádoucí účinky, které vedly k vysazení imatinibu se nemusejí opakovat při léčbě nilotinibem. Pravidla pro řešení NU nilotinibu budou dále probírána v kapitole 8.4.5.

Pro sledování účinnosti nilotinibu a délku podávání platí podobné principy, které již byly zmíněny pro imatinib či dasatinib.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

### 8.4.4. Rezistence na tyrozinkinázové inhibitory

I přes vynikající účinnost imatinibu v léčbě pacientů s CML jsme asi u 30 % takto léčených pacientů svědky situace, kdy není v požadovaný čas dosaženo křížené léčebné odpovědi (tzv. **primární rezistence**) nebo je léčebná odpověď po jejím nabytí ztracena (tzv. **sekundární** nebo **získaná rezistence**). Podle toho, na jaké úrovni rezistence vzniká, ji můžeme dále dělit na **hematologickou, cytogenetickou a molekulární**. Rezistence hematologická a cytogenetická jsou významným problémem zejména v pokročilých fázích CML. U pacientů s CML v CP i přes dosažení kompletní cytogenetické odpovědi u více než 80 % pacientů a optimální velké molekulární odpovědi u významného podílu pacientů v CCgR přesto zůstává u naprostě většiny pacientů přítomná zbytková populace **BCR-ABL1** pozitivních buněk a dá se říci, že tento typ molekulární rezistence, či spíše perzistence (přetrvávání) CML je aktuální pro naprostou většinu pacientů léčených TKI.

Z hlediska mechanismů rezistence je možno ji dále dělit na rezistenci na **BCR-ABL1** závislou (asi 50–60 % případů) a na rezistenci nezávislou na aktivitě **BCR-ABL1** (40–50 % případů). Nejčastějšími příčinami na **BCR-ABL1 závislé rezistence** jsou:

- mutace **BCR-ABL1** kinázové domény
- amplifikace (zmožnění) genu **BCR-ABL1**
- zvýšená exprese RNA transkriptu **BCR-ABL1**

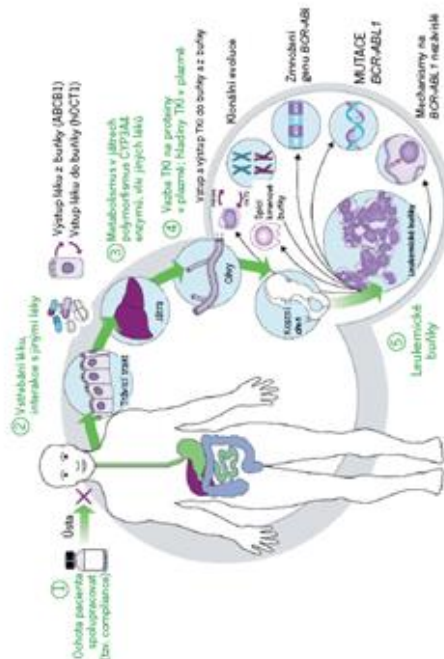
Mechanismy **rezistence na BCR-ABL1 nezávislé** zahrnují

- neochotu pacienta spolupracovat (tzv. non-compliance)
- poruchu na úrovni vstřebávání léku z trávicího traktu
- sníženou dostupnost léku v plazmě (vazba na plazmatické bílkoviny, interakce s jinými léky při jejich píeměně v játrech, variabilita enzymatického systému CYP3A4 v játrech)
- změny na úrovni transportu léku do buněk a z buněk
- aktivaci alternativních drah přenosu signálu v buňce, nezávislých na **BCR-ABL1**
- klonální evoluci (= vznik přidatných cytogenetických abnormalit v Ph- pozitivních buňkách)

Přehledné jsou mechanismy rezistence znázorněny na obrázku 13. Stručně si nyní jednotlivé mechanismy rezistence problemem v posoupnosti znázorníme na obrázku 13 s vyjádřením k jejich klinickému významu, tj. jejich konkrétnímu dopadu na pacienta.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

**Obrazek 13.** Mechanizmy rezistence k imatinibu. Upraveno dle Apperley J, Lancet Oncol 2007; 8(11): 1018-29.



**Ochota pacienta spolupracovat (compliance, též adherence k léčebnému režimu** je velmi významným faktorem léčebného úspěchu. Jak již bylo uvedeno výše v kapitole 8.4.1., nedávno zveřejněné výsledky výzkumu poukázaly na zcela zásadní význam pravidelného užívání imatinibu pro udržení léčebné odpovědi a snížení rizika selhání léčby. I nečetná zapomenutí či vědomá neuzítí medikace se již na léčebném efektu mohou projevit. Je proto velmi důležité si každodenní užití léku zařizovat, případně napojit nějaký jiný pravidelný rituál – nejlépe jídlo, s nímž je imatinib přímo doporučován. též možno pomoci si například dávkovačem léků, který lze zakoupit v lékárně. Další důležité nezapomenout si léky s sebou zabalit na cestě. Nejen nevědomá zapomnění ale i vědomé neuzítí léku z důvodu např. nežádoucích účinků, které jsou pro pacienta obtěžující (křeče ve svalu, otoky víček, průjem) a kterým se tak pacient snaží vyhnout je velmi rizikovým jevem. Je tedy důležité otevřeně se svým lékařem všechny své potřeby, zdůraznit jejich závažnost a dopad na pacientovo prožívání a kvalitu života a snažit se společně najít vhodná řešení k jejich zvládnutí a zlepšení pacientovy přilnavosti (adherence) k léčbě. Přestože podobné důkazy o zásadním významu pravidelného užívání TKI 2. generace, tj. dasatinibu a nilotinibu pro udržení léčebné odpovědi a ochranu před selháním terapie chybějí, je jen otázkou času, kdy bu

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

analogická analýza provedena i u pacientů jimi léčených. Nicméně podobnost v zásadním významu pravidelného užívání těchto preparátů pro výsledky léčby se dá již nyní předpokládat a výše uvedená pravidla pro prevenci nevědomých i vědomých výpadků v užívání léku je třeba důsledně dodržovat.

**Porucha vstřebávání léku z trávicího traktu** může být vzácnější příčinou nedostupnosti léku v plazmě při některých onemocněních, např. stavu po operaci žaludku, střevních zánětech.

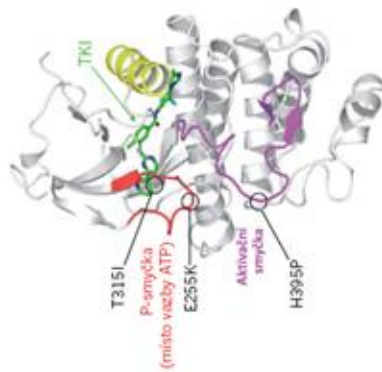
**Snížená dostupnost imatinibu v plazmě** může vzniknout jednak důsledkem sníženého vstřebávání z trávicího traktu, jednak na úrovni změn jeho metabolismu v játrech, či jeho zvýšenou vazbou na bílkoviny v plazmě. V některých studiích byly vyšší plazmatické hladiny imatinibu asociovány s lepší léčebnou odpovědí, v jiných ne. Vzhledem k tomu, že se imatinib v plazmě váže na bílkoviny – albumin a kyselé -1-glykoprotein, je diskutován vliv zvýšené vazby imatinibu na příslušnou rezistenci. Otázka klinického významu tohoto faktoru je však sporná. Na úrovni metabolismu v játrech může nastat nežádoucí ovlivnění dostupnosti imatinibu v důsledku soustře o enzymatický systém cytochromu P450, zejména pak jeho část CYP3A4 s jinými léky, jak již bylo uvedeno v kapitole 8.4.1. a bude dále podrobně rozebráno v kapitole 8.4.6.

**Změny v dostupnosti imatinibu uvnitř buněk** mohou být způsobeny změnami v aktivitě či expresi bílkovin, které jsou součástí buněčné membrány a zajišťují transport imatinibu do buněk (bílkovina zvaná *human organic cation transporter-1*, hOCT-1) nebo ho z buněk odčerpávají (bílkovina ABCB1 nebo též P-glykoprotein, produkt genu pro mnohobuněčnou rezistenci, a ABCG2). Významu změn v těchto transportních mechanismech pro možný vliv na rezistenci na imatinib je v současné době věnována značná pozornost, nicméně dosavadní výsledky spíše nepodporují jednoznačný silný vliv těchto parametrů na ovlivnění léčebné odpovědi.

**Klonální evoluce** je definována jako objevení se přidatých cytogenetických změn v Ph- pozitivních buňkách. Vyskyt těchto změn je vysoký zejména u imatinib rezistentních pacientů v pokročilých fázích CML (až 80%). Příkladem takové změny je trizomie chromozomu 8 (místo dvojce je chromozom přítomen ve trojici) nebo delece chromozomu Y (chromozom Y zcela chybí). Bylo prokázáno, že klonální evoluce je spojena s horší léčebnou odpovědí a horším přežitím u pacientů léčených imatinibem. Pokud se objeví průběhu terapie imatinibem, jedná se o tzv. selhání léčby a mělo by dojít k výměně za TKI 2. generace. Naproti tomu objevení se chromozomálních abnormalit v Ph-negativních buňkách u pacientů, kteří dosáhli kompletní cytogenetické odpovědi, by nemělo znamenat většího nebezpečí pro svého nositele. Nicméně klinický význam tohoto jevu není stále zcela zřejmý a předpokládá se, že až delší sledování případných vlivů na prognózu pacientů vyjasní.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

**Obrázek 14.** Mechanismus působení mutací Bcr-Abl tyrozinkinázy na účinnou tyrozinkinázní inhibitor (TKI). Šedá spirála znázorňuje Bcr-Abl tyrozinkinázu zaujímající prostorovou konformaci umožňující navázání TKI (zelenomodře). Mutace H395P je příkladem změny v tzv. aktivační smyčce, která právě kontroluje prostorovou konformaci tyrozinkinázy. Mutace E255K je lokalizována v P-smyčce, v místě vazby fosfátu, kde mutace snižuje flexibilitu této oblasti. Mutace T315I je lokalizována přímo v oblasti, kam se váže TKI, přímo tedy zabírá jeho vazbu. Upraveno dle Vajpota N. a kol., J Biol Chem 2008; 283:18292-18302.



**Amplifikace (= zmožnění) genu *BCR-ABL1*, případně overexprese (= zvýšení přepisu a překladu) genu *BCR-ABL1*** jsou dalšími mechanismy, které se mohou podílet na vzniku rezistence na imatinib, například v primitivních kmenových CML buňkách. V klinické praxi je však jejich výskyt řídký.

**Mutace *BCR-ABL1* kinázové domény** představují nejčastější a též nejlépe prostudovaný mechanismus rezistence na TKI. V současné době je popsáno téměř 10 typů mutací a vyskytují se u 40–90% pacientů rezistentních na imatinib. Výskyt mutací narůstá s pokročilostí CML, zatímco v CP se pohybuje kolem 30%, v lymfoblastické zvrátě se vyskytují mutace až u 85% imatinib-rezistentních pacientů. Jak jsme již naznačili výše, mutace představují jinou variantu Bcr-Abl tyrozinkinázy, která může být odolná jednomu nebo i více TKI. Mutace vzniká chybou v genetické informaci, nejčastě charakteru záměny jednoho nukleotidu v DNA za jiný, což pak vede ke kódování zcela jiné aminokyseliny než za normálních okolností (obr. 3). I taková, relativně malá změna ve struktuře bílkoviny, v tomto případě Bcr-Abl tyrozinkinázy, může ovlivnit její vlastnosti natolik, že se TKI nemůže navázat a tedy ani na ni léčebně působit. Mutace

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

mohou být přítomny na různých místech *BCR-ABL1* genu – některé jsou sice vzdáleně od místa vazby TKI, ale ovlivní prostorovou strukturu, a tak vazbu TKI zneemožní, jiné jsou přímo v místě vazby TKI, kde mohou zneemožnit účinek všech TKI, jako například mutace T315I, na kterou jsou rezistentní imatinib, nilotinib i dasatinib (Obrázek 14). Výskyt mutace nemusi vždy znamenat zhoršení vývoje choroby, závisí to na typu mutace a dalších okolnostech, například na fizi onemocnění. Klinický význam mutací spočívá v tom, že je možné zjistit vyšetřením založeným na principech PCR a že v případě jejího potvrzení můžeme učinně změnit dosavadní léčbu zvláště tehdy, kdy je výskyt mutace spojen s dalšími rysy progresse choroby (ztráta léčebné odpovědi, apod.).

**Aktivace alternativních drah přenosu buněčného signálu** se může podílet na vzniku na *BCR-ABL1* nezávislé rezistence. Existuje řada bílkovin, které se účastní přenosu signálu v buňce. Jsou to například Src kinázy, jejichž zvýšená aktivita byla prokázána u imatinib-rezistentních pacientů. Klinický význam tohoto faktu má svůj odraz v inhibičním vlivu, který má na Src kinázy dasatinib. Ve vývoji a zkoušení jsou molekuly, které mohou ovlivnit další potenciální cesty přenosu signálu, zatím však bez klinické využitelnosti.

**Převážání CML kmenových krevetvorných buněk** coby mechanismus perzistence CML v organismu je další výzovou pro vývoj a výzkum molekul, které by dokázaly spící kldové buňky uvést do buněčného cyklu a tak je učinit citlivějšími pro TKI. Rovněž v tomto případě si budeme muset na klinické dopady tohoto snažení ještě počkat.

### 8.4.5. Nežádoucí účinky tyrozinkinázních inhibitorů a jejich řešení

Interakce a závažnost nežádoucích účinků TKI je hodnocena pomocí stupnice zvané *National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE v.4.0) (<http://ctep.cancer.gov/>). Stupeň 1 značí mírnou intenzitu obtíží, stupeň 2 střední, stupeň 3 závažnou a stupeň 4 život ohrožující situaci. Tato škála byla navržena pro hodnocení akutní toxicity po interenzii a krátkodobě působící chemoterapii a zdá se, že v souvislosti s dlouhodobou až de facto doživotní léčbou TKI u CML je její použitelnost sporná. Za dobu používání TKI v klinické praxi již máme zkušenost, že dlouhotrvající obtíže stupně 2 či dokonce stupně 1 mohou velmi ztěžovat pacientovi jeho avizovaný kvalitní a plnohodnotný život. Vnímání intolerance TKI vedoucí ke změně léčebného preparátu se tedy postupně posouvá od strukturních kritérií užívávaných v klinických studiích ke změně definice intolerance ve smyslu každého výraznějšího negativního ovlivnění kvality pacientova života. Ve snaze případně nežádoucí účinky mírnit až eliminovat jsou volány tyto základní postupy:

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

- symptomatická (úlevná) terapie a/nebo snížení dávky či přerušeni léčby
- výměna za jiný TKI
- zvažení alogenní transplantace krevtvořných buněk či léčby dostupné v rámci klinických studií

V následujícím textu zmíníme opatření vhodná nebo doporučovaná ke zvládnutí jednotlivých nežádoucích účinků tak, jak jsou publikována v odborných textech na toto téma.

**Hematologická toxicita** je vubec nejčastějším a nejpravděpodobnějším NÚ vs 3 dostupných TKI. Její pravděpodobná příčina byla zmíněna v kapitole 8.4.1. V jejím řetězu by měly být dodrženy tyto základní principy:

- intenzita léčby CML by měla korespondovat se závažností onemocnění a přeruš léčby a/nebo snížení dávky TKI by mělo být omezeno na minimum s pomí napříkladem transfuzní léčby a dalších podpůrných opatření
- po startu léčby časté kontroly KO (a 2 týdny) -> přerušeni terapie v případě závažné poklesu -> návrat léku ve stejné dávce či redukováné s cílem opětovného nastavení původní dávky
- v případě hematologické toxicity stupně 1-2 (dle CTC/AE v.4.0) není indikov; redukce dávky
- v případě anémie jakéhokoliv stupně závažnosti není indikováno přerušeni léčby, sr jen v případě chronické anémie může pomoci redukce dávky

Ošetřující hematolog na základě publikovaných doporučení pro ten který T a na základě znalosti hloubky poklesu neutrofilů a/nebo destiček rozhodne o konkrétn postupu u daného pacienta.

**Trávící obtíže** jsou poměrně častým NÚ všech 3 TKI, přičemž nevolnost se vyskyt u 40-65% pacientů léčených imatinibem a 20-30% pacientů léčených dasatinib nebo nilotinibem a projev je též nejčastější u imatinibu (45% pacientů), méně častý i u dasatinibu (30%) a nilotinibu (22%). Toxicita stupně 3-4 je však vzácná. K ovlivn nevolnosti je v případě imatinibu či dasatinibu doporučováno užít si jablem a zapít velk; množstvím tekutin, dále možno podat léky proti zvracení. Projev je možno zmírnit podán loperamid (Imodium), dietními opatřeními, a též se osvědčilo užítí léku večer, kdy paci nejen tráví, ale i jiné obtíže v podstatě „zaspí“. Nilotinib je třeba užít na lačný žaludek, jak bylo uvedeno v kapitole 8.4.3.

**Retence tekutin (otoky)** jsou častým nežádoucím účínem imatinibu (54-61% pacientů). Často jsou lokalizovány do oblasti obličej, zejména víček, a dále dolních končet

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

Někdy je proslávnuti tkáni poséchné a projeví se nárůstem tělesné hmotnosti. Při léčbě nilotinibem a dasatinibem jsou periferní otoky méně časté - 11% a 17%, respektive. Ovlivnění otoků je problematické, v doporučeních se objevují typy jako např. dieta s nízkým obsahem soli, omezení příjmu tekutin, léky na odvodnění (diuretika), lokální steroidy na otoky víček, případně vysazení TKI, jsou-li otoky závažné.

**Pleurální (pohrudníční) a perikardální (v osrděčníku) výpotky** jsou nežádoucím účínem vyjádřeným zdaleka nejvíce při léčbě dasatinibem. Vyskytují se u 11-35% pacientů léčených dasatinibem a jejich výskyt narůstá s pokročilostí fáze onemocnění a s dávkou dasatinibu. Příčina jejich vzniku není zcela jasná, předpokládá se specifický vliv dasatinibu na některé typy kináz v buněčích pohrudnicích či ovlivnění imunitního systému. Rizikovými faktory pro jejich vznik jsou vysoký krevní tlak, srdeční onemocnění, autoimunitní choroby, pokročilá fáze CML a vyšší věk. Výpotky mohou vzniknout kdykoliv během terapie, i po delší době (např. po 2 letech úspěšné léčby). Projevit se mohou ztíženým dechem či drážděním ke kašli. Důležitá je jejich včasná diagnostika - fyzikálním vyšetřením a RTG hrudniku či ultrazvukem pohrudnicních dutin. Nejúčinnějším opatřením je přerušeni terapie dasatinibem. Z dalších kroků je možno přidat léky na odvodnění (diuretika), a pokud nefungují, je možná nárazová terapie kortikosteroidy (Prednison, Dexamethazon). V případě významného výpotku, který činí větší obtíže, lze provést punkci pohrudnicní dutiny, tzv. thorakocentézu, kdy kromě odlehčení a úlevy od potíží můžeme vzorek punktuátu poslat na laboratorní analýzu. V případě opakujícího se nebo přetrvávajícího výpotku je nutná dlouhodobá redukce dávky nebo výměna za jiný TKI.

**Kožní reakce** charakteru svědivého zarudnutí či vyrážky jsou častým NÚ, vyskytující se častně pozahájení terapie a většinou mírným až středním co do intenzity. Často se vyskytují v obličej, na trupu, na zádech, na horních i dolních končetnách. Setkáváme se s nimi u 40% pacientů léčených imatinibem, 30% pacientů na nilotinibu a 20% na dasatinibu. V léčbě podáváme antihistaminika (Zyrtec), lokální steroidní masti (Locoid, Beloderm), při těžší reakci mohou pomoci systémové podané kortikosteroidy (tablety, infuze) a přerušeni podávání léku. Pokud se těžší reakce vrací po obnovení léčby TKI, je nutno tento vyměnit za jiný dostupný přípravek. S imatinibem jsou spojeny změny pigmentace kůže, jak ve smyslu zvýšení tak snížení. Objevují se po delším podávání terapie. V rámci možného postižení kožních adnex (nehtů, vlasů, ochlupení) se můžeme setkat s vypadáváním vlasů nebo obočí.

**Oční změny** charakteru zejména zvýšeného slzení, zánětu spojivek a krvácení do spojivkoveho vaku se mohou vyskytnout jako NÚ imatinibu kromě již zmíněných otoků očních víček. Mohou pomoci oční kapky při zánětu, ascortin při krvácení.

**Svalové-kloubní obtíže** zahrnují svalové křeče, bolesti svalů a kloubů. U pacientů léčených imatinibem se křeče vyskytují až u 50%, po nilotinibu a dasatinibu jsou

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

vzácnější a nepřežívají 15 % vyskytu. Také bolesti ve svalově-klobovinném aparátu jsou nejčastější při léčbě imatinibem (30%). Ke zvládnutí krčící se doporučuje zvýšený příjem tekutin, přípravky kalcia a magnézia, chinin nebo tonik. Na bolesti je možná zkusit analgetika či protizánětlivé léky typu ibuprofenu. V případě závažných projevů je nutno TKI vysadit a případně vyměnit za jiný preparát. Na tomto místě je možná zmínit i ovlivnění kostního metabolismu imatinibem a s tím související snížení hladiny fosfátu. Kromě doplňování chybějících iontů nejsou stran této záležitosti žádná speciální doporučení.

**Bolesti hlavy** se mohou vyskytnout během terapie všemi TKI a je možno je tlumit běžnými analgetiky, nejlépe typu ibuprofenu.

**Krvácení** se může vyskytnout jako nežádoucí průvodní jev terapie dasatinibem a souvisí s jeho tlumivým vlivem na shlukování destiček. Nejčastějším typem krvácení je krvácení do trávicího traktu, vzácně se však může vyskytnout i krvácení do mozku. V takovém případě je nutno dasatinib okamžitě vysadit a poskytnout podpůrnou terapii dle charakteru krvácení. U pacientů užívajících dasatinib, zejména pak anamnézou krvácení do trávicího traktu, by neměly být podávány léky zabírající srážení krve (Warfarin) nebo shlukování destiček (Anopyrin, Godesal).

**Jaterní toxicita** projevující se zvýšením laboratorních jaterních testů nejčastějším závažným nehematologickým NÚ imatinibu (2–5 % pacientů se stupněm 3–4 závažnosti). Stejně závažná může být i u pacientů léčených nilotinibem či dasatinibem. Během léčby nilotinibem je časté zejména zvýšení bilirubinu. Nejčastějším opatřením je přerušování terapie TKI, případně přidání léků – hepatoprotektiv. Po zlepšení laboratorního nálezů se TKI vrátí do medikace v snížené dávce ve snaze znovu obnovit dávku původní. Pokud se testy opět zhorší, nutně opětovně vysazení a po úpravě nálezů výměna za jiný TKI.

**Postižení slinivky břišní** projevující se nejčastěji zvýšením enzymů amylázy a lipázy v krvi je typickým NÚ terapie nilotinibem. Naštěstí se většinou oběje b příznaků rozvinuté akutní pankreatitidy. Řešení spočívá ve vysazení nilotinib a eventuelní následné redukci dávky. Obecně není léčba nilotinibem doporučována pacientům, kteří v minulosti akutní pankreatitidu prodělali.

**Biochemické laboratorní abnormality** kromě zvýšení amylázy a lipázy zahrnují snížení hladiny fosfátu a kalcia a zvýšení hladiny glukózy v krvi v plazmě. Nedostatek iontů je možno řešit jejich perorální nebo parenterální dodávkou. Zvýšení hladiny glukózy zvláště u pacientů s cukrovkou vyžaduje úpravu léčebného režimu či změny léčby. Pacientům s těžkou formou diabetu nebo s dekompenzovaným onemocněním není nilotinib doporučován, i když zvláštních zkušeností máme, že i dobře monitorovaný a léčený pacient s cukrovkou může být nilotinibem úspěšně léčen.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

**Srdcevní toxicita** je vzácnou, ale potenciálně závažnou komplikací terapie TKI. Předpokládání srdcevní toxicity imatinibu vyplývající z laboratorních výzkumů se však naštěstí v klinické praxi nepotvrdila a výskyt srdcevních komplikací při léčbě imatinibem nepřesahuje běžné riziko v celkové populaci. Všechny 3 dostupné TKI, zejména pak nilotinib, mohou vést k prodloužení tzv. QT intervalu na EKG zřizovanu srdcevní činnosti. Tim se zvyšuje potenciální riziko život ohrožujících poruch srdcevního rytmu. V klinických studiích s nilotinibem a dasatinibem se však prodloužení QT intervalu nad 500 ms týkalo pouze < 1 % případů. Je důležité vyvarovat se souběžného podání jiných léků, které QT interval též prodlužují, a při léčbě nilotinibem je vyžadováno pravidelné sledování EKG křivky (viz též kapitola 8.4.6.).

### 8.4.6. Interakce tyrozinkinázových inhibitorů s dalšími léky

Tyrozinkinázové inhibitory jsou v lidském organizmu metabolizovány v játrech pomocí enzymatického systému cytochromu P450, a to konkrétně pomocí jeho izoenzymu CYP3A4. Systém izoenzymu CYP3A4 slouží k přeměně a zpracování celé řady dalších léků, což může při souběžném užívání vést k nežádoucím interakcím, kdy další léky mohou buď zvyšovat nebo snižovat hladinu TKI v krevní plazmě, a tak nejen ovlivňovat jejich vlastní terapeutický účinek, ale i například zvyšovat nežádoucím způsobem jejich toxicitu.

- Souběžné užívání léků, které **systém CYP3A4 inhibují (tlumí)**, mohou plazmatickou **hladinu TKI zvyšovat**. Jedná se např. o antibiotika claritromycin a erytromycin, antimykotika ketokonazol, itraconazol a vorikonazol, lék tlumící imunitu cyklosporin, analgetikum fentanyl a další. Do kategorie inhibitorů CYP3A4 systému je možno započítat i šťávu z grapefruitu.
- Souběžné užívání léků, které **systém CYP3A4 indukují (aktivují)**, mohou **hladinu TKI snižovat**. Mezi takové léky patří například dexmethazon, antituberkulikum rifampicin, antiepileptika fenytoin a karbamazepin, fenobarbital a další. Rovněž čaje a přípravky z trezalky tečkované mohou vést ke snížení hladiny TKI.
- Souběžné užívání léků, které jsou stejné jako **TKI substrátem systému CYP3A4**, mohou být úspěšnější v „soutěži“ o obsazení enzymatického systému a tímto mechanismem **zvýší hladinu TKI** v plazmě. Mezi substráty CYP3A4 řadíme např. diazepam, midazolam, cyklosporin, tacrolimus, amlodipin, verapamil, diazepam, atorvastatin, lovastatin, zolpidem, astemizol, pimozid, chinin a řadu dalších přípravků.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

Podrobný seznam všech léků, ovlivňujících se v rámci cytochromu P450, je možná získat na adrese: <http://www.medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>.

Při užívání zejména dasatinibu a nilotinibu by dále neměly být současně podávány léky často předepisované na pálení žáhy a jiné žaludeční obtíže, tzv. H2 blokátory (famotidin, ranitidin) a inhibitory protonové pumpy (lansoprazol, omeprazol, pantoprazol), pacientům známé pod názvy Helicid, Omeprazol, Controloc. V případě pálení žáhy, které může užívání TKI znepříjemňovat, je možno u pacientů na dasatinibu použít tzv. antacida (jedlá soda, Maalox, Rennie, apod.). Pacienti užívající nilotinib se měli vyhnout i užívání antacid. Naopak u pacientů léčených imatinibem je možná při pálení žáhy užít i některý z výše vyjmenovaných H2 blokátory nebo inhibitor protonové pumpy.

O nevhodnosti paracetamolu u pacientů užívajících imatinib již byla zmínka v kapitole 8.4.1. Při bolestech nebo horečce je v tomto případě vhodnější preparát typ ibuprofenu nebo acylpyrinu. U pacientů léčených dasatinibem je naopak při užívání léků typu acylpyrinu a léků z řady tzv. nesteroidních antiflogistik, např. indometacinu nebo diklofenacu třeba opatrnosti, protože dasatinib může zvyšovat tendenci ke krvácení která je pak těmito léky ještě potencionována. Rovněž užívání protisrážlivých léků, jak např. warfarinu, je zapotřebí u dasatinibem léčených pacientů zvážit a v případě jejich nevyhnutelnosti pacienta o zvýšeném riziku krvácení důkladně poučit a intenzivně sledovat.

Další pozornosti hodnou skupinou léků jsou medikamenty, které mohou prodlužovat tzv. QT interval na EKG křivce pacienta a tím zvyšovat riziko vznik závažných arytmií (viz též kapitola 8.4.5.). Dle dostupných informací QT interval prodlužují též všechny tři klinicky dostupné TKI, největší ostražitost je však vyžadován u nilotinibu. Léky, jejichž současně užívání může být z tohoto pohledu rizikové a jim by se měl ošetřující specialista po dohodě s hematologem vyhnout, jsou např. léky koviřinidrcedního rytmu (amiodaron, sotalol, procainamid), antibiotika (erytromycin claritromycin), antihistaminikum astemizol, antiopsychotikum chlorpromazin nebo antidepresivum amitriptylin. Kompletní seznam léků prodlužujících QT interval, k nalezení na adrese: <http://www.qtdrugs.org/>.

Vzhledem k tomu, že problematika lékových interakcí u pacientů užívajících TKI je poměrně široká a ani velmi vzdělaní lékaři v nerůznějších oborech nemohou v hlavách nosit kompletní seznamy všech léků a jejich kontraindikací, je nutná vzájemná komunikace všech specialistů pečujících o pacienty s CML léčených TKI a konzultace všech nově nasazovaných léků nejprve s ošetřujícím hematologem, který posoudí jejich vhodnost či naopak doporučí alternativní preparát.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

**Tabulka 5.** Definice léčebných odpovědí a doporučení pro jejich monitorování během léčby pacientů s CP-CML imatinibem v první linii (dle Baccarani M. a kol., J Clin Oncol, 2009; 27:6041-6051)

Léčebná odpověď	Definice	Monitorování
Kompletní hematologická odpověď (CHR)	Leucocyty < 10 x 10 <sup>9</sup> /l Trombocyty < 450 x 10 <sup>9</sup> /l Dítě z PK: Žádné myelocyty, promyelocyty či myeloblasty Basofily < 5% v PK Nehmatná slezina	Při dg., a pak a 2 týdny či častěji do dosažení CHR, dále alespoň a 3 M neměli jinak specififikováno (PK)
Cyto genetická odpověď (CgR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kompletní (CCgR): 0 Ph+ buněk</li> <li>• Parciální (PCgR): 1–35% Ph+ bb.</li> <li>• Malá: 36-65% Ph+ bb.</li> <li>• Minimální: 66-95% Ph+ bb.</li> <li>• Žádná: &gt; 95% Ph+ bb.</li> </ul>	Při dg., ve 3 a 6 M; dále a 6 M do dosažení CCgR, dále alespoň a 12 M, pokud nemůže být zajištěno pravidelné molekulární sledování; vždy při selhání léčby nebo nejisté cytopenii (KD)
Molekulární odpověď (MolR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kompletní (CMolR): nedetekovatelné transkripty BCR-ABL1 pomocí RQ-RT-PCR a/nebo nested PCR</li> <li>• Velká (MMolR) poměr BCR-ABL1/ABL1 (či jiný kontrolní gen) ≤ 0,1 % IS</li> </ul>	A 3 M do potvrzení MMolR, pak alespoň a 6 M (PK); mutační analýza v případě selhání či suboptimální odp.; vždy před změnou terapie na jiný TKI či další typy léčby

Vysvětlivky: CHR, kompletní hematologická odpověď; CCgR, kompletní cytogenetická odpověď; PCgR, částečná cytogenetická odpověď; CMolR, kompletní molekulární odpověď; MMolR, velká molekulární IS, mezinárodní škála, PK, periferní krev; KD, kostní dřeň

### 8.5. Monitorování efektu léčby pacientů s CML

Jednou ze zásad optimální léčby pacienta s cílem dosažení co nejlepší léčebných výsledků je správné monitorování efektu léčby. V případě léčby TKI je zasláno na hodnocení úrovně hematologické, cytogenetické a molekulární odpovědi. Definice léčebných odpovědí a doporučení pro jejich monitorování v CP-CML při léčbě imatinibem jsou uvedeny v tabulce 5. Co se týká sledování léčebného efektu TKI u pacientů v pokročilé fázi CML, doporučení pro hodnocení hematologické odpovědi není jednoznačně stanoveno, jednou z možností tedy je vycházet z doporučení použitých v klinických studiích.



## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

**Tabulka 6.** Definice optimální, suboptimální léčebné odpovědi, selhání a varovných signálů u pacientů s CML v časně CP léčivých imatinibem 400 mg/den (dle Baccarani M. a kol., J Clin Oncol, 2009; 27:6041-6051)

Doba hodnocení	Optimální odpověď	Suboptimální odpověď	Selhání	Varování
V době diagnózy	NA	NA	NA	Vysoké riziko (Sokal, Hensford), CCA/Ph <sup>+</sup>
3 měsíce	CHR a alespoň malá CgR	Žádná CgR	< CHR	NA
6 měsíců	Alespoň PCgR	< PCgR	Žádná CgR	NA
12 měsíců	CCgR	< CCgR	< PCgR	< MMolR
18 měsíců	MMolR	< MMolR	< CCgR	NA
Kdykoliv	Stabilitní či zlepšující se MMolR	Ztráta MMolR, mutace citlivá na IMF	Ztráta CHR, ztráta CCgR, mutace necitlivá na IMF, CCA/Ph <sup>+</sup>	CCA/Ph <sup>+</sup> , vzestup hladiny transkriptů

Vysvětlivky: NA, nelze aplikovat; CHR, kompletní hematologická odpověď; CCgR, kompletní cytogenetická odpověď; PCgR, částečná cytogenetická odpověď; MMolR, velká molekulární odpověď CCA/Ph<sup>+</sup>, klonální chromozomální abnormality v Ph-pozitivních buňkách; CCA/Ph<sup>+</sup>, klonální chromozomální abnormality v Ph-negativních buňkách; IM, imatinib.  
 \*CCA/Ph<sup>+</sup> jsou varovným signálem při diagnóze, ale jejich objevení se během léčby znamená selhání. Nutný je průkaz ve 2 cytogenetických vyšetřeních po sobě, stejná abnormalita nejméně ve 2 Ph+ buňkách.

\*Citlivost mutací vůči IM a dalším TKI se odhaduje pomocí tabulek referujících o vlivu jednotlivých TKI na mutovanou Bcr-Abl tyrozinkinázu v laboratorních pokusech

V praxi monitorování pacientů v CPCML probíhá tak, že po zahájení léčby TI do ustálení nemoci a dosažení hematologické odpovědi jsou kontroly častější (1x za 1-3 týdny), později se intervaly prodlouží a ustálí se nejtýpější na kontroláchy tříměsíční odstupu. Kromě krve jsou samozřejmě odebrány anamnestické informace o pacienta, informace o případných nežádoucích účincích terapie, provádí se fyzikální vyšetření a při určitých kontrolách se vyšetřuje kostní dřeň (viz kapitola 5.4.). Vyšetření kostní dřeně s ternální punkcí nebo zřídka kdy trepanobiopsií se standardně na naše pracovišti provádí ve 3., 6., 12. a 18. měsíci od startu terapie TKI. Obecně platí, že i dosažení CCgR je možno intervaly mezi vyšetřeními kostní dřeně prodloužit na 1 ro Z odebrané kostní dřeně se pak vzorky rezešlou na vyšetření cytologické, cytogenetické

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

**Tabulka 7.** Provozní definice léčebných odpovědí na TKI 2. generace ve 2. linii léčby po selhání imatinibu u CPCML (dle Baccarani M. a kol., J Clin Oncol, 2009; 27:6041-6051)

Doba hodnocení	Odpověď		Varování
	Suboptimální	Selhání	
V úvodu léčby	NA	NA	Hematologická rezistence na IM; CCA/Ph <sup>+</sup> ; mutace <sup>1</sup>
3 měsíce	Malá CgR	Žádná CgR; nově mutace <sup>1</sup>	Minimální CgR
6 měsíců	PCgR	Minimální CgR; nově mutace <sup>1</sup>	Malá CgR
12 měsíců	Méně než MMolR	< PCgR; nově mutace <sup>1</sup>	NA

Zkratky: TKI, tyrozinkinázní inhibitory; NA, nelze aplikovat; CCgR, kompletní cytogenetická odpověď; PCgR, částečná cytogenetická odpověď; MMolR, velká molekulární odpověď; CCA/Ph<sup>+</sup>, klonální chromozomální abnormality v Ph-pozitivních buňkách  
<sup>1</sup>Citlivost mutací vůči IM a dalším TKI se odhaduje pomocí tabulek referujících o vlivu jednotlivých TKI na mutovanou Bcr-Abl tyrozinkinázu v laboratorních pokusech

včetně FISH a molekulárně biologické, kde se sleduje hladina BCR-ABL1 transkriptu. Výsledky těchto vyšetření sdělujeme pacientovi při další kontrole za 3 měsíce, pokud si okolnosti nevyžadují častější kontrolu a třeba i změnu terapie pro neúčinnost. Krev je naopak vyšetřována při každé návštěvě pacienta u specialisty-hematologa. Provádí se vyšetření KO+ dif., biochemický rozbor krve, odběr na kvantitativní molekulárně-biologické vyšetření a je možné, že část odebrané krve, a potažmo kostní dřeně je použita k výzkumným účelům – to však až po informovaném souhlasu pacienta stvrzeném vlastnoručním podpisem. Výsledky KO+ dif. a biochemického rozboru krve jsou pacientovi sděleny zpravidla při téže kontrole (cca za 2 hod po odběru obdrží lékař výsledky z laboratoré). Výsledky molekulárního vyšetření jsou k dispozici asi za 2-3 týdny, ale pokud není situace nestabilní, jsou též sděleny pacientovi až při příští kontrole. Zvláště ve výsledcích molekulární analýzy můžeme být svědky kolísání léčebné odpovědi, kdy se může přechodně ztratit CMolR nebo MMolR, při dalším odběru je pak zase obnovena. Toto zakolísání souvisí s více faktory a neznamená pro pacienta zásadní ohrožení jeho dlouhodobé prognózy. Právě pečlivým monitorováním je zaručeno, že případný významný trend ve ztrátě léčebné odpovědi je zachycen a vyplýnou z něj opatření v smyslu došetření příčiny a změny léčby. Pokud je přítomno podezření či už je potvrzené selhání léčby, obnáší to zpravidla kontrolu časnéji, spojenou s vyšetřením kostní dřeně se všemi náležitostmi, například též s mutační analýzou. Je-li zapotřebí zkontrolovat některé parametry např. KO nebo biochemie v mezidobí mezi dvěma

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

kontrolami u specialisty-hematologa, je možné takovou kontrolu zrealizovat v místě bydliště u praktického lékaře nebo okresního hematologa s tím, že jsou výsledky se specialistou v centru zkontrolovány telefonicky.

Ukázalo se, že nejen hloubka dosažené odpovědi na úrovni hematologické, cytogenetické a posléze molekulární, ale i časový horizont, v jakém je jí dosaženo, hraje svou významnou roli pro další osud pacienta. Na základě kombinace těchto faktorů, tedy stupně dosažené léčebné odpovědi na úrovni hematologické, cytogenetické a molekulární a na základě časového intervalu od zahájení léčby imatinibem k jejímu dosažení byly panelem expertů Evropské leukemické sítě (*The European LeukemiaNet*, ELN) definovány 3 varianty léčebných odpovědí: **optimální**, **suboptimální** a **selhání**, a jako prvek modifikující byla navíc definována kategorie zvaná **varování** – viz tabulku 6. Zařazení pacienta do příslušné kategorie má své důsledky v přístupu k jeho léčbě a monitorování jejího efektu:

- **Optimální odpověď** – ideální situace, kdy není indikována změna terapie, naopak pokračování v zavedené léčbě je příslibem dosažení dlouhodobých výborných výsledků
- **Suboptimální odpověď** – pacienti stále mohou dlouhodobě profitovat z pokračování v zavedené terapii, nicméně jejich pravděpodobnost dosažení optimální odpovědi je nižší a mohou tedy být kandidáty na změnu léčby
- **Selhání** – dlouhodobý profit ze stávající terapie je nepravděpodobný a je indikována změna terapie
- **Varování** – varovné známky jsou takové charakteristiky nemoci či varianty léčebné odpovědi, které mohou nepříznivě ovlivnit další osud pacientů a mohou vyžadovat častější a bodlivější monitorování.

Provizorní definice léčebných odpovědí na TKI 2. generace ve 2. linii léčby u imatinib rezistentních pacientů v CPCML jsou uvedeny v tabulce 7. Zde je však třeba zdůraznit, že výsledky dosažené TKI ve 2. či 3. linii je třeba hodnotit s ohledem na dostupnou alternativní léčbu, která je v této fázi mnohdy již vyčerpána. Někdy byly publikovány výsledky pacientů, kteří keřbou TKI ve 2. a další linii dosáhli „pouze“ PCgR, malé CgR nebo jen CHR. V této posoupnosti bylo po 3 letech terapie celkové přežití a přežití bez progresse do pokročilé fáze 83% a 73%, 83% a 84%, a 76% a 88%. Rovněž tito pacienti tedy mohou z terapie TKI v další linii profitovat, třebaže se jim nepodařilo dosáhnout CCgR.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

### 8.6. Léčba alogenní transplantací krevtvoorných buněk (alo-TKB)

Alogenní transplantace krevtvoorných buněk (alo-TKB) představuje i v éře TKI jedinou ovrěnou metodu, pomocí níž lze CML zcela vyléčit. Od nástupu nové cílené léčby v podobě TKI se však především v léčbě CP-CML přesunula prakticky až do 3. linie léčby. V následujícím textu si přiblížíme principy alo-TKB, její nejčastější komplikace a současná doporučení pro její indikaci.

#### 8.6.1. Co to je alo-TKB a jak se provádí?

Alo-TKB je náhrada nemocné krevtvoorny za jinou od zdravého dárcce. Nejde o operaci v pravém slova smyslu, krevtvoorné buňky jsou tekuté a od dárcce se dají získat odsátím z vnitřku kosti pomocí speciální jehly přes kůži – jde vlastně o jakousi analogii trepanobiopsie, jen vpichů musí být více, a proto se pro komfort dárcce provádí v celkové anestézii. K transplantaci je navíc potřeba relativně malého množství buněk, které dárci v žádném případě nebude chybět. Kromě získu buněk kostní dřeně výše popsaným způsobem je možné v indikovaných případech použít tzv. periferní kmenové buňky krevtvoorny, které se pomocí podkožně aplikovaných růstových faktorů vyplaví z kostní dřeně do periferního krevního řečiště dárcce a odtud se získají odvodem jeho žilní krve přes separator krevních elementů principem podobným, jako jsme si popsalí u leukaferézy (viz kapitola 8.3.3.). Vlastní převod odebrané kostní dřeně/periferálních kmenových buněk, které navenek vypadají jako krev, má charakter krevní transfúze, kdy se transplantát pustí do žil pacienta cestou žilní kanály. Technicky se tedy nejedná o složitou záležitost. Komplikovanost celé procedury spočívá v nutnosti náročné přípravy příjemce transplantátu, tedy pacienta, a v nárocích na vhodného dárcce.

Příprava pacienta na příjem transplantátu začíná již několik týdnů před vlastní transplantací, kdy se musí vyšetřeními zjistit, že pacient splňuje podmínky pro podstoupení náročné léčby, že je jinak „zdrav“ a v kondici, tedy že netrpí jinými chorobami, které by snižovaly naději na úspěch procedury nebo by ji znemožňovaly. Rádové dny před vlastní transplantací je pacientovi podán tzv. přípravný režim, který je složen z chemoterapie nebo kombinace chemoterapie a celotělového ozáření a jehož cílem je zničit nemocnou krevtvoornou tkáň. Přípravný režim již vyžaduje hospitalizaci pacienta, která pokračuje i po vlastní transplantaci do doby, než se převedené krevtvoorné buňky uchytí v kostní dřeni pacienta a dostatečně namnoží a zajistí vyplavování zdravých funkčních krevních elementů do periferní krve. I po propuštění z nemocnice následuje ještě řada měsíců rekonvalescence, kdy si musí tělo zvyknout na novou tkáň a naopak. Kromě náhrady zničené nemocné krevtvoorny za zdravou tkáň od dárcce se uplatňuje

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

u alo-TKB ještě jeden důležitý princip. Je to imunitní působení, jakási kontrola, kterou uplatňují transplantované buňky proti nemocné krevtvoře. Hovoříme o tzv. reakci štepů proti leukemii (*graft versus leukemia effect*, GvL).

### 8.6.2. Kdo může darovat krevtvořné buňky pro alo-TKB?

Pro úspěšnost transplantace je zásadní shoda mezi dárcem a příjemcem v jistých znacích na povrchu buněk, zvaných HLA systém (*Human Leucocyte Antigens*). Je třeba, aby dárcem byl jakýsi „tkaňový dvojnák“, který se v zásadních znacích HLA systému shoduje s pacientem. Zásadních znaků je 5, každý ve dvou verzích, tedy ideální shoda ve všech 10 znacích označujeme jako 10/10 („deset z deseti“). Vhodného dárce je nejnázuší najít ve vlastní rodině mezi sourozenci, protože HLA znaky se dědí. Bohužel sance, že pacient a jeho sourozenec zdědí přesně stejné znaky od otce i od matky, je jen 25%. V širší rodině je pak pravděpodobnost shody jeden ze sta. Pokud není dárce nalezen v rodině, přistupuje se k vyhledávání shodného nepríbuzného dárce z řad dobrovolníků sdružených v registrech dárců krevtvořných buněk. Vyhledání vhodného dárce je značně nákladná a často zdoluhavou procedurou v řádech týdnů až měsíců a i přes veskeré úsilí se nemusí podarit shodného dárce najít. V ČR fungují 2 registry, Český registr dárců krevtvořných buněk v Praze při IKEM a Český národní registr dárců dětne v Plzni, které jsou napojeny na mezinárodní registry – v případě, že není nalezen dárce na území ČR, zahajují se vyhledávání v celosvětovém měřítku. Vlastní transplantace včetně celého procesu přípravy na ni a následného dlouhodobého sledování pacientů se provádějí ve vysoko specializovaných hemato-onkologických centrech, která jsou v ČR tožná s centry péči o pacienty s CML kčene TKI.

### 8.6.3. Komplikace alo-TKB

Alo-TKB je zatížena nezanedbatelným rizikem komplikací, které mohou být velmi závažné až život ohrožující. Komplikace alo-TKB můžeme rozdělit na časně a pozdní. Časně komplikace jsou důsledkem toxicity přípravného režimu, výrazně oslaben obranných schopností proti infekcím v době, než se transplantát přibojí, a důsledkem imunitního působení štepů nejen proti leukemickým buňkám, ale i proti dalším tkáním a orgánům hostitele. Nejčastějšími časnými komplikacemi alo-TKB jsou:

- Infekce (bakteriální, virové, plisňové, parazitární)
- Krvácení (z nedostatku krevních destiček)

64

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

- Postžení sliznic trávicího traktu (mukozitida), postžení plic, kůže (v důsledku toxicity přípravného režimu)
- Akutní reakce štepů proti hostiteli (*acute graft versus host disease*, aGvHD) (v důsledku imunitního působení buněk transplantátu; postžení kůže, jater, sliznice trávicího traktu, nejčastěji střev)
- Venookluzivní nemoc jater (v důsledku toxicity přípravného režimu; poskození výstelky malých cév v játrech)

Je snahou vzniku těchto závažných komplikací předejít preventivními opatřeními, např. izolací nemocného ve sterilním prostředí v době největšího dřevného útlumu, podáváním léků, které tlumí imunitu pacienta a tím i projevy možné GvHD, apod. V případě, že přece jen ke komplikaci dojde, je nasazen celý arzenál medikamentů a opatření k jejímu zvládnutí.

**Pozdní komplikace** alo -TKB mohou souviset s imunitním působením štepů proti hostiteli, vyplývat z dlouhodobě snížené obranných schopností organismu, nebo být důsledkem postžení některých tkání a orgánů, které se projeví až s odstupem času. Patří mezi ně:

- Chronická reakce štepů proti hostiteli (*chronic graft versus host disease*, chGvHD) (v důsledku imunitního působení buněk transplantátu; postžení kůže, jater, sliznic)
- Oportunní infekce (virové, plisňové, parazitární; infekce původci běžně se vyskytujícími, ale napadajícími oslabený organismus)
- Poruchy reprodukce
- Sekundární nádory
- Poruchy žláz z vnitřní sekreci
- Sedý zákal oční čočky
- Porucha tvorby slin a slz
- Poruchy růstu u dětí

Jednou z nejobavanejších komplikací transplantace je **relaps (návrat) onemocnění**, který může být časný i pozdní (jsou popisovány relapsy i 20 let po transplantaci). Vzhledem k tomu, že pacienti jsou po transplantaci pečlivě monitorováni, dá se hrozba návratu nemoci zachytit již na úrovni vzestupu hladiny transkriptů BCR-ABL1, kdy mlavíme o relapsu molekulárním. Jako účinná zbraň ke zvládnutí návratu nemoci již v jeho počátcích slouží **inhibice dárceových lymfocytů (*donor lymphocyte infusion*, DLI)**. Je založena na jednom z principů vlastní transplantace, tedy imunitním

65

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

■ Tabulka 8. Doporučení pro alogenní transplantaci krevetvorných buněk (alo-TKB) (dle Baccarini M. a kol., J Clin Oncol, 2009; 27:6041-6051)

Úkoly a jejich časová posloupnost	Cílová populace pacientů
Hledání příbuzného dárce:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>v době stanovení diagnózy</li> <li>v době selhání IM</li> </ul>	<p>U pacientů dg. v AP/BC; u dětí a adolescentů mladších 20-ti let; u pacientů s varovnými příznaky</p> <p>U všech pacientů</p>
Hledání nepřibuzného dárce; není-li příbuzný dárce k dispozici:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>v době stanovení diagnózy</li> <li>v době selhání IM</li> </ul>	<p>U pacientů dg. v AP/BC</p> <p>U pacientů v progresi do AP/BC; nositelů mutace T3151 nebo pacientů s hematologickou rezistencí</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>v průběhu nebo po terapii TKI 2.generace</li> </ul>	<p>U všech pacientů se selháním TKI</p> <p>U pacientů se suboptimální odpovědí na TKI a s EBMt skóre 0–2</p>
Provedení alo-TKB	
<ul style="list-style-type: none"> <li>v době stanovení diagnózy</li> <li>v době selhání IM (tedy ve 2.linii)</li> <li>v době selhání TKI 2.generace</li> </ul>	<p>U pacientů dg. v AP/BC (předložení pomoci TKI je doporučeno)</p> <p>U pacientů s progresí do AP/BC (předložba pomoci TKI 2.generace je vhodná)</p> <p>U pacientů s mutací T3151</p> <p>U všech pacientů</p>

Tato doporučení platí pro pacienty, kteří jsou s ohledem na věk, zdraví a kondici vhodnými kandidáty alo-TKB, jsou schopni podstoupit myeloablativní (dříve likvidující přípravky režim) a mají k dispozici HLA-identického příbuzného dárce nebo nepřibuzného shodného dárce či částečně shodného (tj. 8/8 nebo 7/8 A, B, C, DR, vysoké rozlišení) dárce.

Zkratky: alo-TKB, alogenní transplantace krevetvorných buněk; AP, akcelerovaná fáze; BC, blastická krize; TKI, tyrosin kinázové inhibitory; IM, imatinib; EBMt, The European Group for Blood and Marrow Transplantation

působení buněk transplantátu proti leukemii. Buněk se odeberou původnímu dárci na separátoru krevních elementů a v podobě infuze se jejich imunitně účinná frakce vpraví do žíly pacienta. Procedura se dá opakovat a obnovení remise onemocnění je dosažováno touto metodou v 60–90%. V současné době je možno k léčbě molekulárního relapsu po transplantaci použít i TKI.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

### 8.6.4. Doporučení pro léčbu alo-TKB v éře TKI

Současná doporučení pro indikaci léčby alo-TKB v éře TKI shrnuje tabulka 8. Odhad transplantačního rizika a výsledků transplantační léčby u CML dle Gratwohlůva (EBMT) skóre byl zmíněn v kapitole 6.3. a je uveden v tabulce 4. Cím je skóre nižší, tím je vyšší naděje na dlouhodobé přežití pacientů po transplantaci. Dle dostupných statistických údajů může být pravděpodobnost 20-ti letého přežití pacientů s nízkou hodnotou Gratwohlůva skóre a s dostupným HLA-identickým sourozencem vyšší než 80%. V posledních letech doslo nejen kvýznatnému pokroku v netransplantační terapii CML, ale zlepšily se i výsledky transplantací obecně. Je to dáno zavedením přípravných režimů s redukcí intenzitou (důraz na imunitní působení za nižší toxicity pro organismus), zlepšením podpůrné péče a ochrany proti závažným potransplantačním komplikacím, apod. Důležitým zjištěním je též fakt, že předchozí podání imatinibu nezhoršil výsledky později provedené transplantace.

### 8.7. Léčba interferonem- $\alpha$

Základní charakteristika interferonu- $\alpha$  byla podána v kapitole 8.2. Tento imunitu modulující lék v kombinaci s cytostatikem cytosarem (ARA-C) představoval do nástupu imatinibu zlatý léčebný standard pro pacienty, kteří nemohli či nechtěli být transplantováni. Též interferonem- $\alpha$  bylo možno docílit CCgR, bohužel však jen asi u 10% všech léčených pacientů. Přežití po 10 letech léčby interferonem- $\alpha$  se pohybovalo mezi 20–35%, pokud však bylo dosaženo CCgR, byl podíl významně vyšší – 70%. Pokud bylo dosaženo CCgR u pacientů s nízkým rizikovým skóre dle Sokala, přežití činilo až 80%.

Léčba interferonem- $\alpha$  má svá úskalí. Jednak je to forma podání – lék je k dispozici pouze v podobě podkožních injekcí, což může být pro pacienty zatěžující. Je třeba jej uchovávat v lednici. Jeho podávání je zatíženo poměrně četnými a někdy velmi obtěžujícími nežádoucími účinky:

- Útlum krevetvorby
- Příznaky připomínající chřipku (horečky, únava, bolesti svalů a kloubů)
- Jaterní toxicita
- Nechutenství, hubnutí
- Únava
- Vyrážky

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

- Padání vlasů
- Snižená funkce štítné žlázy
- Změny nálady, nespavost, deprese, zmatenost, psychózy
- Poškození jater a plic

I přes revoluční úspěch TKI v léčbě pacientů s CML, nebyl interferonem- $\alpha$  v té indikaci zcela vymýcen. Je lékem volby v graviditě, dále ho lze doporučit u pacient kde by v důsledku jiných onemocnění či užívání léků byla terapie TKI nevhodná nebo všechny dostupné TKI selhaly či nebyly pacientem tolerovány a nelze provést alo-TKB. Interferon- $\alpha$  je též testován v některých indikacích v rámci klinických studií ve snaze ještě zlepšit výsledky dosahované pomocí TKI (v první linii léčby v kombinaci s imatinibem nebo v udržovací léčbě samotný nebo v kombinaci s TKI za účelem udržení či zlepšení molekulární odpovědi či ve snaze vysadit TKI).

### 8.8. Doporučení léčby pacientů s CML

Na základě výše uvedeného lze nyní stručně shrnout základní pravidla pro doporučení léčby CML v roce 2012. Po stanovení diagnózy CML je v úvodu léčby možno docílit redukce symptomatiké či výrazné leukocytózy a/nebo trombocytémie pomocí časově omezeného podání hydroxyurey a/nebo anagrelidu. Dlouhodobě podává hydroxyurey je vyčleněno pro ojedinělé případy, kdy podání TKI není možné či vhodné například v indikaci paliativní (úlevné) léčby. Interferon- $\alpha$  je léčbou volby u těhotných žen a v některých specifických situacích, jak bylo popsáno výše v kapitole 8.7. Vyjít těchto případů je standardní léčbou pacientů v CPCML imatinibem dávkou 400 mg denně (dle poslední verze „National Comprehensive Cancer Network“ (NCCN) doporučení již pamatováno i na dasatinib a nilotinib v první linii léčby – viz tabulku 9). Léčba podávána dlouhodobě, po dobu trvání optimální odpovědi. Kontrolované vysazování léku je nyní předmětem klinických studií, v klinické praxi jej nelze doporučit. V případě jiné než optimální léčebné odpovědi či intolerance imatinibu je doporučena změna léčebného přístupu, jak je uvedeno v tabulce 9.

Volbu mezi oběma dostupnými TKI 2. generace ve 2. linii – dasatinibem a nilotinibem – nám usnadní znalost výsledků mutační analýzy a ostatních choro pacienta; co do účinnosti dosahované v klinických studiích jsou totiž oba přípravky analogické. Bylo zjištěno, že některé mutace vykazují nižší citlivost na dasatinib (T315I/A, F317I/L/V/C a V299L), jiné zase na nilotinib (T315I, Y253H, E255K a F359V/C), což se projeví horší léčebnou odpovědí na příslušné TKI. Při nálezu jedi

Tabulka 9. Doporučení pro léčbu pacientů s CPCML (dle Baccarani M. a kol., J Clin Oncol, 2009; 27:6041-6051)

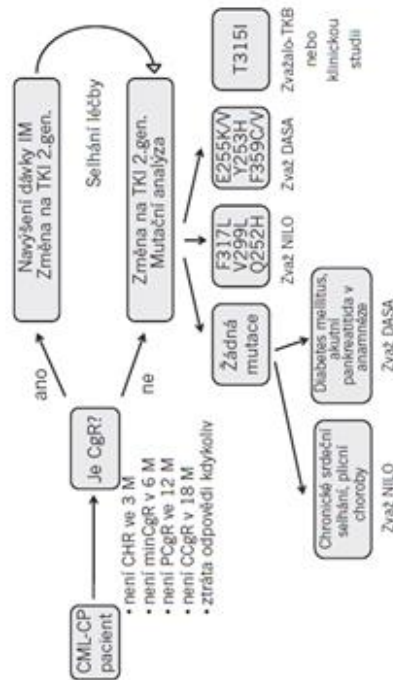
Specifické linie léčby/výchozí stav	Doporučení léčby
<b>První linie</b>	
• Všichni nově diagnostikovaní pacienti	Imatinib 400 mg 1x denně nebo Nilotinib 300 mg 2x denně nebo Dasatinib 100 mg 1x denně*
<b>Druhá linie</b>	
• Intolerance imatinibu	Dasatinib 100 mg 1x denně nebo nilotinib 2x 400 mg denně
• Suboptimální odpověď na imatinib	Pokrácování v imatinibu 400 mg/den, ke zvládnutí vyšší dávka imatinibu 600–800 mg/den, dasatinib nebo nilotinib
• Selhání imatinibu	Dasatinib 100 mg 1x denně nebo nilotinib 2x 400 mg denně; alo-TKB v případě progresse do AP/BC a v případě přítomnosti mutace T315I
<b>Třetí linie</b>	
• Suboptimální odpověď na dasatinib nebo nilotinib	Pokrácování v dasatinibu nebo nilotinibu se zvládnutím alo-TKB u pacientů s varovnými známkami (tj. předchozí hematologická rezistence na imatinib, mutace) a u pacientů s hodnotou EBMt skóre $\leq 2$
• Selhání dasatinibu nebo nilotinibu	Alo-TKB

Zkratky: alo-TKB, alogenní transplantace krevetvorných buněk; AP, akcelerovaná fáze; BC, blastická krize; EBMt, The European Group for Blood and Marrow Transplantation  
\*Doporučení pro TKI 2. generace v 1. linii léčby u nově diagnostikovaných pacientů dle „National Comprehensive Cancer Network“ (NCCN) version 2.2011

ze zmínovaných mutací bychom se měli vyhnout nasazení TKI se sníženou citlivostí. Problemem je mutace T315I, která je necitlivá na všechny dostupné TKI. Prvním krokem při jejím zachytu by mělo být vysazení TKI, protože někdy dojde k vymizení mutace již jen po tomto opatření. Pacient by měl být směřován k alo-TKB. Ve světě běží několik klinických studií s novými slibnými léky, které vykazují účinnost i vůči této mutaci (např. ponatinib), u nás však v době psaní této publikace, bohužel, není žádná z těchto studií aktivní. Důležitým rozhodovacím kritériem jsou i přidružené onemocnění pacienta a zohlednění profilu NU toho kterého TKI. V případě prodělané ataky akutní pankreatitidy, špatné kompenzované cukrovky nebo prodlouženého QT intervalu na

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

■ **Obrázek 15.** Rozhodovací algoritmus u pacienta v CP-CML. Upraveno dle Ibbour E. a kol., *J Clin Leukemia* 2010; 24(1):6-12.



EKG křivce bychom se měli vyhnout nasazení nilotinibu, v případě těžkých srdečních či plicních onemocnění či špatně kompenzovaného vysokého tlaku by neměl být nasazován dasatinib (Obrázek 15). Obecně ale platí, že volba přípravku je individuální, zohledňuje řadu faktorů a při dobré kontrole ostatních onemocnění a pečlivém sledování pacienta by žádný z TKI 2. generace neměl být z léčebné volby kategoriicky vyloučen.

Léčba pokročilých fází CML, jak v době diagnózy onemocnění tak v rámci progresse z CP je shrnuta v tabulce 10. Doporučení pro léčbu pokročilých fází CML dle ELN a NCCN nejsou jednoznačná a kromě v tabulce 10 uvedeného postupu je ve verzi 2.2011 NCCN doporučení v léčbě BC navržena indukční kombinovaná chemoterapie volená dle typu blastů – jako pro akutní myeloidní leukemii (AML) v případě myeloblastického zvratu nebo akutní lymfoblastickou leukemii (ALL) v případě lymfoblastického zvratu, kombinovaná s TKI – v první linii imatinibem v dávce 600–800 mg/den nebo ve druhé linii dasatinibem v dávce 140 mg/den. Je-li proveditelná, měla by následovat alo-TKB. Doporučení pro indikaci a provedení alo-TKB byla probírána v podkapitole 8.6.4. a tabulce 8.

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

■ **Tabulka 10.** Doporučení pro léčbu pacientů s AP-CML a BC-CML (dle Baccarani M. a kol., *J Clin Oncol*, 2009; 27:6041-6051)

Specifikace (linie léčby/výchovní stav)	Doporučení léčby
První linie	Alo-TKB předcházená imatinibem 600-800 mg/den, v případě mutací rezistentních na imatinib dasatinibem 140 mg 1x denně či nilotinibem 2x 400 mg/den <sup>1</sup>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Pacienti, kteří dosud neužívali TKI</li> </ul>	
Druhá linie	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pacienti předléčení imatinibem</li> </ul>
	Alo-TKB, předcházená dasatinibem 140 mg 1x denně či nilotinibem 2x 400 mg/den <sup>1</sup>

Zkratky: alo-TKB, alogenní transplantace krevetvorných buněk; TKI, tyrozinkinázové inhibitory; <sup>1</sup> pro léčbu BC ve druhé linii je schválen pouze dasatinib

## 8.9. Léky ve vývoji a klinickém zkoušení

Rezistence vůči v praxi dostupným TKI, omezená léčebná účinnost TKI v pokročilých fázích CML a perzistence CML na úrovni spících kmenových buněk – to všechno jsou silné motivy pro výzkum a vývoj nových, ještě účinnějších léků v boji s CML. Kromě účinnější inhibice Bcr-Abl tyrozinkinázy včetně jejích mutovaných variant jsou nové léky cíleny i na další klíčové bilkoviny činné v cestě přenosu buněčné informace, na mikroprostředí v kostní dřeni, které umožňuje spícím kmenovým buňkám unikat účinku TKI, na ovlivnění imunitních mechanismů např. vakcínami proti Bcr-ABL1, apod. Od objevu nové účinné látky však vede dlouhá, roky trvající cesta k jeho uvedení do klinické praxe, přičemž z ročně více než 150 000 nových objevných látek projde cestou preklinického výzkumu (testy na tkaňových kulturách v laboratořích, testy na zvířatech) až do klinického výzkumu (testování nových látek podáním člověku) jen 8-10. Klinické studie jsou přísně kontrolovaným a precizně vedeným procesem, který zjišťuje a zajišťuje, že nový lék přináší opravdu něco nového ve srovnání se zavedenými fázích: fáze I – hledá se účinná bezpečná dávka léku, hodnotí se i účinnost, ale není hlavním sledovaným parametrem, omezuje se na desítky pacientů s velmi pokročilým onemocněním, kde jiné postupy selhaly; fáze II – upřesňuje se způsob podání nové látky a hodnotí se účinnost léčby, provádí se na desítkách až stovkách pacientů s pokročilým onemocněním; fáze III – srovnává se účinnost nové látky se standardními zavedenými léčebnými postupy, provádí se na stovkách nemocných, může se týkat i pacientů s nové

## 8. JAK LÉČÍME CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

diagnostikovaným onemocněním, fáze IV – týká se léků již uvolněných do klinické praxe a běžně dostupných, cílem je získat co nejvíce informací o léku v souvislosti s jeho dlouhodobým užíváním.

Jedním z nadějných nových léků, který vstoupil do fáze II klinického zkoušení je **ponatinib** (též **AP24534**). Ve fázi I klinických zkoušek prokázal tento Bcr-Abl inhibitor účinnost i u velmi předléčených pacientů, rezistentních na několik podaných TKI. U pacientů v CP bylo ponatinibem dosaženo 53% CCgR a 42% MMolR, přičemž z 9 pacientů s pozitivní mutací T3151 jich 8 (89%) dosáhlo CCgR a 7 (78%) MMolR. Další potenciální zbrani proti mutaci T3151 u pacientů rezistentních na předchozí léčbu TKI je **omacetaxin (homoharringtonin)**, z rostliny odvozený alkaloid, který v podobě podkožních injekcí prokázal účinnost u pacientů s CML rezistentních na předchozí terapii, včetně nositelů mutace T3151. Další slibnou látkou je **danusertib (PHA-739358)**, inhibitor tzv. Aurora kináz, který byl v klinických testech též účinný v boji s mutací T3151.

I přesto, že klinické studie s novými nadějnými léky nejsou tč. v ČR aktivní, vzhledem k progresu, který na poli CML panuje, je možné, že budete i Vy vyzváni k účasti v některé z klinických studií. Jedná se z Vaší strany o ryze dobrovolný akt, a pokud odmítnete, nikdo z ošetřujícího personálu se na Vás nebude zlobit či Vám v dalším sledování jakkoliv upírat nároky na tu nejlepší dostupnou léčbu. Rozhodnete-li se kladně, vězte, že klinické studie jsou přísně kontrolovány a nastaveny tak, aby léčba nemocného nepoškodila. Naopak, testovaný léčebný postup by měl být lepší než běžně dostupný, nebo alespoň se zavedenými postupy srovnatelný. Klinické studie jsou nezbytným nástrojem medicínského pokroku, jehož jedním z důsledků je právě i úspěch TKI v terapii CML.

## 9. JAKÝ JE REŽIM PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

O leukemii a nádorových onemocněních vůbec panuje stále mezi lidmi mnoho předsudků. Jedním z nich je ten, že tato diagnóza znamená dřívější či pozdější konec, že tedy nezbyva než čekat na to nejhorší. A i tehdy, kdy pacient po uklidňující informaci od svého lékaře připustí, že jde o chronickou nemoc s dokonce velmi dobrou prognózou bez zkrácení přirozené délky života, má přesto pocit, že ho nemoc vyřadí z práce a aktivního života. Opač je pravdou. CML je sice chronickým onemocněním, které přináší určité starosti a nároky, např. na pravidelnost v užívání léků či návštěvy u lékaře, v některých obdobích též jistá zdravotní omezení, ale při současné léčbě TKI většinou umožňuje normální plnohodnotný život bez větších limitací.

### 9.1. Zaměstnání

Pokud je CML zjištěna v rozvinutější fázi, kdy pacient již na sobě cítí nějaké potíže nebo musí být vstupně hospitalizován, bývá v úvodu léčby vhodná nebo i nutná pracovní neschopnost. Velmi často je však CML zjištěna náhodně a nepřináší svému nositeli žádné potíže. V takovém případě je pak dovyšetření a zahájení terapie ambulantní záležitostí a je možno ji vyřešit jen několika propustkami z práce. Tato záležitost je však individuální, záleží na charakteru zaměstnání, na vstřícnosti zaměstnavatele, na samotném postoji pacienta, zda si zaměstnání chce udržet, apod. Zpočátku je třeba počítat s častějšími ambulantními kontrolami a tedy i s častějšími pracovními absencemi. S postupem času by se situace měla ustálit a s nabytím kompletní hematologické odpovědi i pominout případné příznaky onemocnění. Většina pacientů se tak může vrátit do původního zaměstnání, snad jen s výjimkou nejtěžších provozů. V případě, že přece jen návrat do zaměstnání není možný ať už z důvodu přetrvávající potíže nebo i nežádoucích účinků léčby, je možné setrvat v pracovní neschopnosti a případně zvážit možnost invalidního důchodu. Tato situace je však spíše výjimečná.

## 9. JAKÝ JE REŽIM PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ?

### 9.2. Zálby a tělesná aktivita

V souladu s výše uvedenými informacemi o setrvání či návratu pacientů s CML do původního zaměstnání je i fakt, že zpravidla není nutné žádné omezení v dosavadních zálibách a volno-časových aktivitách včetně sportu. Pokud je stav pacienta dobrý, sport a tělesná aktivita jsou vítány a doporučovány, protože péstování fyzické kondice zvyší celkovou odolnost organismu a pomáhá i odraťovat se od všedních starostí, ale třeba i od obav a starostí spojených s vyrovnáváním se s nově stanovenou diagnózou. Pokud nastane situace, kdy třeba v důsledku nežádoucího účinku léchy, např. snížení množství krve, bude některá aktivita riziková, lékař na opatrnost upozorní a situaci osvětlí. Je zcela namístě se na ambulantních kontrolách svého lékaře ptát, i třeba na zdánlivě malichernosti, a nechat si nejasnosti podrobně vysvětlit.

### 9.3. Životostřava

Často se pacienti ptají, zda mohou svým krvinkám „pomoc“ nějakou potravinou (např. červenou řepou) nebo potravinovým doplňkem. Nic takového není nutné. Stravovací návyky není třeba měnit, snad jen zlepšit, pokud byla pacientova strava nepravidelná, nevyvážená, příliš kalorická, apod. Důležité je zajistit dostatečný přísun vitamínů, stopových prvků a minerálních látek, požívat kvalitní bílkoviny, tedy stravovat se racionálně. Diety, ať už dramatické redukční či jiné speciální, nejsou vhodné, mohly by organismu uškodit. Jediná omezení plynou z nežádoucích interakcí s užívanými léky, tj. je třeba se vyvarovat grapefruitů a grapefruitové šťávy, sevilských pomerančů, karamboly a čaju či přípravků z třezalky tečkované.

Je vhodné mít dostatečný přísun tekutin, denně 2–3 litry. U přednostňovanými nápoji je voda, minerálky, čaj, mléko, ředěné džusy. Malé množství alkoholických nápojů, např. 2 dcl vína k jídlu nebo 3 dcl piva by nemělo zásadně zhoršit výsledek léchy, není tedy potřeba je striktně zakazovat. Naopak důrazně doporučeno je přestat kouřit, protože vliv kouření je jednoznačně škodlivý, a to nejen stran vzniku jiných nádorových onemocnění, např. plic, ale předpokládá se, že kouření může zhoršovat výsledky protinádorové léchy jako takové.

Samozřejmostí je dostatek klidného spánku a pravidelný odpočinek, které organismus posilují. Dostatečný by měl být i pobyt na čerstvém vzduchu s doštráváním zásad správného slunění v letních dnech.

## 9. JAKÝ JE REŽIM PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ?

### 9.4. Cestování

Ani v cestování včetně pobytů v zahraničí nemusejí u pacientů s CML nastat žádné limitace. Je však důležité dodržet několik zásad, zejména uzavřít potřebné zdravotní pojištění, dále je vhodné si s sebou vzít orientační záznam o svém onemocnění a užívání léchy, ideálně přeložený do angličtiny, a naprosto nezbytné je si s sebou vzít dostatečné množství užívaného léku, aby nebyla lécha nežádoucím způsobem přerušena. Je nutné dodržovat zásady správného slunění, což znamená zejména vyhnout se přímému slunci v době mezi 11. až 15. hodinou, mimo tento interval se chránit vhodným oblečením a křemí, a vůbec omezit pobyt na přímém slunci na minimum. Je třeba též nezapomenout na dostatečný přísun tekutin.

### 9.5. Nemoci, operace a úrazy nesouvisející s CML

Po dobu let, kdy je pacient léčen a sledován pro CML, a kdy na konto této choroby má komplikace či potíže zřídka, se mohou objevit nejrůznější méně či více závažné zdravotní problémy jiného rázu, s CML nesouvisející. V těchto případech je možno se obracet na praktického lékaře či příslušné specialisty v daných oborech, kterých se problémy týkají. Případná nejasnost či nejistota jiného specialisty stran diagnózy CML může být vyřešena buď písemnou nebo telefonickou konzultací s ošetřujícím hematologem, který specialistu v jiném oboru zpravidla ujistí o faktu, že CML nepřináší žádné limitace v řešení jiných zdravotních problémů (chirurgický zákrok, návštěva stomatology, lécha běžné infekce, očkování proti chřipce). Někdy je požadováno ujištění, že jsou v pořádku parametry KO a případně i krevní srážlivosti, které je možno zkontrolovat během ambulantní kontroly, která bude předcházet plánovanému výkonu. Obecně je vhodné s sebou k jiným lékařům nosit zprávu z poslední ambulantní kontroly, kde by mělo jasně být uvedeno, v jakém stadiu se onemocnění nachází (nejčastěji stabilní remise) a měly by tam být k nahlédnutí i výsledky laboratorního vyšetření. Na základě těchto informací může specialista jiného oboru jednat i bez telefonické konzultace s hematologem. Konzultace je naopak nutná v případě plánovaného nasazení nových léků, protože ty se mohou nežádoucím způsobem ovlivňovat s TKI (kapitola 8.4.). Dalším důležitým prvkem léchy TKI je fakt, že tyto drahé léky jsou nejen vázány na předpis specialisty-hematologa v příslušném centru, kde je pacient sledován, ale i jejich vyvednutí je doporučeno v tamní nemocnici lékárně, která je na odběr a výdej těchto léků připravena a zavědena. V případě hospitalizace pacienta v jiné nemocnici není tedy možno po propuštění zajistit mu chybějící lék předpisem od jiného lékaře. Toto je vázáno výhradně na hematologické centrum, kde je pacient sledován.



## 9. JAKÝ JE REŽIM PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

### 9.6. Alternativní léčebné metody

Ve snaze udělat pro zvládnutí nemoci opravdu maximum někteří pacienti nebo jejich příbuzní a blízcí hledají pomoc v metodách alternativní medicíny a obrací se na léčitele. Zde je třeba zdůraznit, že postupy alternativní medicíny ani v nejmenším nesplňují hlavní požadavek medicíny klasické, že totiž každý léčebný postup a medikament musí projít dlouhou cestou preklinických a klinických zkoušek a musí na dostatečně početném vzorku pacientů jednoznačně prokázat svou účinnost a bezpečnost. Léčitelovo ubezpečení, že alternativním postupem již pomohl několika lidem a to ještě s různorodými, a tudíž neporovnatelnými chorobami, je velmi laciným argumentem, který nemůže ve srovnání s vědeckými důkazy podloženými postupy klasické medicíny obstát. Léčitelovy odhady zdravotního stavu pacienta si nemohou v ničem zadat s precizní diagnostikou a sledováním efektu klasické léčby pomocí vysoce citlivých a sofistikovaných metod molekulární biologie, které dokáží přesně vyhodnotit a kvantifikovat množství nemocných buněk v organismu. Ve světle případů, kdy navíc ještě pacienti pod vlivem léčitelů zcela odmítají navrhovanou klasickou léčbu a vystavují se tím riziku progresse onemocnění do pokročilých a velmi špatně léčebně ovlivnitelných stadií, je nutno alternativní léčebné postupy označit za hazard z vlastním zdravím a životem. V konečném důsledku se pak zvládnutí často již neřešitelné situace, kdy šance na úspěch je mizivá, očekává opět od lékaře.

Často se též pacienti a jejich příbuzní ptají na vhodnost či účinnost nejrůznějších potravinových doplňků a produktů alternativní medicíny. Tyto produkty nesplňují kritéria ověřených léků a to, že pomohly několika jedincům, ještě neznamená, že budou užitečné a bezpečné pro jedince ostatní. Lékař je tak nemůže doporučit, ale samozřejmě ani zakázat. Ve svém rozhodování by pacient a jeho blízcí měli zohlednit i často vysokou cenu těchto produktů, která prozrazuje, že v některých případech jde především o výhodný obchod s důvěrou pacientů a jejich touhou uzdravit se.

## 10. JAK PLÁNOVAT RODIČOVSTVÍ U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMII?

CML může vzniknout v každém věku a právě typický bývá její začátek v mládí dospělosti, kdy lidé zakládají rodiny a plánují rodičovství. Samozřejmě, že nemoc může přijít i v období, kdy těhotenství již probíhá. Obě dvě tyto maximální pozornosti hodné situace si v následujícím textu rozvedeme.

### 10.1. Plánování rodičovství při onemocnění CML

Preklinické studie se všemi dostupnými TKI, tedy imatinibem, nilotinibem i dasatinibem ukázaly, že všechny tyto léky mohou být škodlivé pro pohlavní buňky, embrya či vyvíjející se plod, a i když už jsou z klinické praxe známy případy zdravě narozených dětí matek, které užívaly v těhotenství imatinib, nelze riziko pro plod vyloučit. Všechny ženy ve fertilním věku by měly být před zahájením terapie TKI o tomto riziku informovány a mělo by jim být doporučeno užívání spolehlivé antikoncepce.

Pokud žena s CML plánuje materství, je žádoucí vytvořené těhotenství odložit na dobu, kdy se nemoc stabilizuje nejlépe ve velké molekulární remisi. Pak je možno léčbu TKI vysadit a pokusit se otěhotnět. Pokusy o otěhotnění mohou být spontánního charakteru nebo je možno využít metody asistované reprodukce poté, co je ještě před zahájením léčby TKI mužům s CML odebráno a zamrazeno sperma a ženám s CML laparoskopicky po hormonální stimulaci odebrána a zamrazena vajíčka. Na tuto možnost je třeba myslet a její vhodnost zvážit záhy po stanovení diagnózy CML.

V případě úspěšného otěhotnění po vysazení TKI musí být žena bedlivě monitorována svým ošetřujícím hematologem, samozřejmě v úzké spolupráci s gynekologem. Dochází-li k horší léčebné odpovědi a nemoc si vyžádá léčebný zásah, je lékem volby interferon- $\alpha$ . Po porodu pak je možno obnovit podávání TKI, jen je třeba zříci se kojení, protože jak imatinib, tak i dasatinib se vylučují do mateřského mléka.

Může se stát, že i přes doporučení stran antikoncepce dojde k otěhotnění během terapie TKI. V takovém případě je nutno ihned TKI vysadit a zvážit přerušení těhotenství. Jde o individuální rozhodnutí–nelze vyloučit narození poškozeného

## 10. JAK PLÁNOVAT RODIČOVSTVÍ U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ?

plodu, ale dítě se může narodit i zdravé. Rozhodnout se je v tomto případě těžké. Pokud bude těhotenství pokračovat, postup je analogický, jako je uvedeno výše.

### 10.2. CML zjištěná v těhotenství

Diagnóza CML může být stanovena i u právě gravidní ženy. Nebylo prokázáno, že by těhotenství muselo průběh nemoci zhoršovat, ale vyloučit se to samozřejmě nedá. Opět tedy žena, či spíše mladý pár stojí před rozhodnutím, zda těhotenství ukončit ze zdravotních důvodů nebo se pokusit zvládnout obojí – graviditu i CML. V takovém případě hodně závisí na pokročilosti onemocnění a na celkovém stavu ženy. Pokud rozhodnutí padne ve smyslu zachování gravidity, je potřeba bedlivého sledování jak z pohledu hematologického, tak gynekologického po celou dobu těhotenství. Z léčebných možností lze použít interferon- $\alpha$ , v případě výrazné leukocytózy je možno provést u těhotné ženy leukaférezu. Na řadě případů bylo prokázáno, že plod není leukemii matky ohrožen. Nicméně znovu je třeba připomenout, že rozhodování o zachování gravidity v době diagnózy CML je těžké a přísně individuální, po zvážení všech pro a proti, zejména pak s ohledem na zachování zdraví a života matky. Naději na šťastný konec přináší konkrétní případy zdravě narozených dětí maminkám s CML.

## 11. ZÁVĚR

Chronická myeloidní leukemie je sice nádorovým onemocněním krevtvorby, ale zavedení léků cílených přímo na její molekulární podstatu změnilo přirozený průběh této choroby a zejména její prognózu naprosto unikátním způsobem. Při optimální léčebné odpovědi na tyrozinkinázové inhibitory je velký předpoklad, že CML nezkrátí přirozenou délku života svého nositele. Nemoc se stala chronickou v pravém slova smyslu, jako je třeba onemocnění cukrovkou, se kterou pacient při dobré léčbě může dlouhodobě přezít. Navíc je léčba CML komfortní – ambulantní a tabletová, umožňující pacientům žít svůj život plnohodnotně a prakticky bez omezení. Problémem zůstává léčba pokročilých fází onemocnění, dále vznik rezistence na TKI u pacientů v chronické fázi a konečně dosavadní nemožnost úplně likvidace choroby postupem jiným než riziky zatíženou transplantací krevtvoorných buněk. Nebylo by pokroku bez výzev, a proto jsme svědky intenzivního výzkumu, vývoje a prvních úspěchů dalších slibných preparátů ve snaze nedorůšená úskalí léčby CML eliminovat.

MUDr. Daniela Záčková  
Interní, hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno  
Jihlavská 20  
625 00 Brno  
dzackova@fnbrno.cz

**POZNÁMKY**

**FYZIOLOGICKÉ HODNOTY LABORATORNÍCH TESTŮ (FN BRNO)**

Parametr [jednotky]	Fyziologické rozmezí
Krevní obraz a diferenciální rozpočet leukocytů:	
Leukocyty (WBC) [x 10 <sup>9</sup> /l]	4–10
Erytrocyty (RBC) [x 10 <sup>9</sup> /l]	Muži: 4–5,9; ženy: 3,8–5,4
Hemoglobin [g/l]	Muži: 130–176; ženy: 120–160
Hematokrit [l/l]	Muži: 0,39–0,51; ženy: 0,35–0,46
Trombocyty (PLT) [x 10 <sup>9</sup> /l]	150–350
Neutrofilů absolutně [x 10 <sup>9</sup> /l]	2–7
Neutrofilů v %	50–70
Lymfocytů v %	20–40
Monocytů v %	2–12
Eozinofilů v %	0–5
Bazofilů v %	0–1
Biochemický rozbor krve:	
Urea [mmol/l]	1,7–8,3
Kreatinin [μmol/l]	Muži: 62–115; ženy: 53–97
Kyselina močová (KM) [μmol/l]	Muži: 202–417; Ženy: 143–339
Nátrium (Na) [mmol/l]	136–145
Kalium (K) [mmol/l]	3,5–5,1
Chloridy (Cl) [mmol/l]	98–107
Kalcium (Ca) [mmol/l]	2,15–2,55
Magnezium (Mg) [mmol/l]	0,65–1,05
Fosfát (P) [mmol/l]	0,87–1,45
Bilirubin [μmol/l]	2–21
Alaninaminotransferáza (ALT) [ukat/l]	Muži: 0,17–0,85; ženy: 0,17–0,6
Aspartátaminotransferáza (AST) [ukat/l]	Muži: 0,17–0,85; ženy: 0,17–0,6
Gamma-glutamyltransferáza (GGT) [ukat/l]	Muži: 0,13–1,02; ženy: 0,08–0,6
Alkalická fosfatáza (ALP) [ukat/l]	Muži: 0,67–2,15; ženy: 0,58–1,74
Laktátdehydrogenáza (LD) [ukat/l]	Muži: 2,25–3,75; ženy: 2,25–3,55
Albumin [g/l]	34–48
Celková bílkovina (CB) [g/l]	64–83
Glukóza [mmol/l]	3,9–5,6
C-reaktivní protein (CRP) [mg/l]	0–5

**Kontakt na ošetrujícího hematologa:**

Jméno

Telefon (ordinace):

Telefon (mobil):

E-mailová adresa:

Ordinační hodiny:

## UŽITEČNÉ ODKAZY

- <http://www.fnbrno.cz/interni-hematoonkologicka-klinika/k1449>
- <http://www.leukemia-cell.org/>
- <http://www.uhkt.cz>
- [www.diagnoza-cml.cz](http://www.diagnoza-cml.cz)
- <http://www.cmladvocates.net/>
- <http://www.cancer.gov/w>
- <http://leukaemialymphomaresearch.org.uk/>
- <http://www.uptodate.com/contents/patient-information-chronic-myeloid-leukemia-cml-in-adults>
- <http://www.patient.co.uk/health/Leukaemia-Chronic-Myeloid.htm>
- <http://www.lls.org/disease-information/leukemia/chronicmyeloidleukemia/>
- <http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertypes/Leukaemiachronicmyeloid/CML.aspx>
- <http://www.cmlsupport.org.uk/>

MUDr. Daniela Žáčková

**Chronická myeloidní leukemie**  
informace pro pacienty a jejich blízké

Vydala Česká leukemická skupina – pro život (CELL)  
Ilustrace a obrazová dokumentace: Daniela Žáčková a archiv autorky  
Foto na obalce: Tereza Trautmannová  
Grafická příprava: Jerevan s.r.o. – [www.jerevan.cz](http://www.jerevan.cz)  
Layout: Andrea Hrušková  
Tisk: Bekros, Příční 11, Brno  
První vydání, 2012  
Počet výtisků: 1500 ks  
84 stran

ISBN 978-80-260-1828-5

### 6.3.2. Příloha 22

Program světového summitu zástupců podpůrných organizací pro pacienty s CML „CML Horizons 2016“, konaného ve slovinské Ljubljani ve dnech 6. – 8. 5. 2016, doplněný o výňatek z reportu, týkajícího se sdělení uchazečky: Zackova D. „Switching the TKI therapy in suboptimal response and intolerance: What to take when? “ a Zackova D. „CML in elderly: The challenge of co-morbidities and cardiovascular predispositions on choice of therapy“. Kompletní report dostupný na stránkách: <https://www.cmladvocates.net/download/cml-horizons-conferences/cml-horizons-2016/639-cml-horizons-2016-report/file>



**UPDATED**

## CML HORIZONS 2016: LEARN. SHARE. GROW. 6-8 MAY 2016, LJUBLJANA, SLOVENIA

### DAY 1: Friday 6 May

- 09:00-10:30** CML 201 - Overview of CML Horizons 2016 and preparation for the medical sessions  
(Pat Garcia-Gonzalez)
- 10:45-11:00** Opening:
1. Welcome from Milena Remic (Slovenian Lymphoma and Leukemia Patient Association) and Tanja Fajon (via video)
  2. Update on the CML Advocates Network (Jan Geissler)
- 11:00-12:30** **Advocacy Session #1: Patient Advocacy in Research**
1. Patient involvement in medicine R&D and PRO (Bettina Ryll)
  2. Patient-generated data: how can advocacy groups generate and publish results - a practical example: the CML Adherence Survey (Giora Sharf)
  3. How to partner with medical writers (Marion Alzer)
- 12:30-13:45** Lunch
- 13:45-15:30** **Medical Session #1: CML State of Play and Future**
1. ELN Recommendations on treatment choice and response (Gianantonio Rosti)
  2. Imatinib and Ponatinib - two ends of the spectrum in 2016's reality? (Steve O'Brien)
  3. Switching treatments in suboptimal response and intolerance: What to take when? (Daniela Zackova)
  4. Debate on state of play 2016 in CML therapy (Gianantonio Rosti, Daniela Zackova, Steve O'Brien)
  5. Future of CML: ABL001 and others treatments in the pipeline (Gianantonio Rosti)
- 15:30-16:00** Coffee break
- 16:00-17:30** **Advocacy Session #2: Best Practice in Advocacy**
- Presentation of key initiatives of CML patient organisations in the areas of "CML generics" and "advocating for access to CML therapy"
1. Access Issues as Generic Imatinib Arrives in USA (Jerry Clemens, Greg Stephens, USA)
  2. Advocating for access in CML/GIST therapy (Puthen Parameswaran, India)
  3. Fight for continuity of care - is it feasible? (Tamie Kimmelman, Israel)
  4. Little by little the bird makes its nest: Access to CML diagnostics (Abdoul Nasser, Niger)
  5. Exempting Goods and Services Tax (GST) on CML drugs (Abu Hurairah Bahari, Malaysia)
  6. TKIs access: A Road Less Travelled (Ken Choy, Hong Kong)
- 19:00** Dinner (at the Hotel)



## DAY 2: Saturday 7 May

- 9:00-10:30** *Medical Session #2: Stopping Treatment*
1. Oxford Style debate on stopping CML treatment (*Gianantonio Rosti, Steve O'Brien*)
  2. Discussion with the audience (*Daniela Zackova, Gianantonio Rosti, Steve O'Brien*)
- 10:30-11:00** *Coffee break*
- 11:00-12:30** *Advocacy Session #3: Financial Management*
1. Fundraising in non-pharma (*Kris Rogers*)
  2. Writing grant requests (*Kris Rogers*)
  3. Show your muscles: Reporting in-kind contributions in financial reports of patient organizations (*Patrice Regnier*)
- 12:30-13:30** *Lunch*
- 13:30-15:00** *Medical Session #3: CML at Both Ends of Life*
1. CML in elderly: The challenge of co-morbidities and cardiovascular predispositions on choice of therapy (*Daniela Zackova*)
  2. CML in young adults: Special challenges, adherence, fertility (*Gianantonio Rosti*)
- 15:00-15:30** *Coffee break*
- 15:30-17:30** *Advocacy Session #4: "World CML Day" - Training and Best Practices*
- Rotating sessions:
1. Training Session: Social Media use for World CML Day (*Sojia Sa Cardoso*)
  2. Training Session: Posters and event planning (*Jelena Cugurović*)
  3. Best practice examples on the use of the World CML Day Kit in 2015 (*Erin Lindsay Schneider*)
- 18:30** *Departure for off-site dinner*
- 19:00-23:00** *Off-site dinner*

## DAY 3: Sunday 8 May

- 8:45-10:15** *Medical Session #4: Diagnostics and Monitoring*
1. Importance of monitoring response (*Steve O'Brien*)
  2. State of the art testing in high-resource countries (*Gianantonio Rosti*)
  3. Testing and monitoring in low-resource countries (*Pat Garcia-Gonzalez*)
- 10:15-11:00** *Coffee break*
- 11:00-12:30** *Advocacy Session #5: Psychosocial Issues*
1. How to train advocates to handle newly diagnosed patients and complex situations (*Guy Tavori, Cristian Neves*)
  2. Caring for the caregivers (*Cristian Neves*)
  3. Cancer at the workplace (*Ward Rommel*)
- 12:30-13:00** *Best poster, closing session and farewell*
- 13:00-14:00** *Farewell lunch*
- 15:00-18:30** *Tour to Lake Bled  
(for those who pre-registered)*



### **Medical Session #1: CML State of Play and Future**

*Chairs: Sarunas Narbutas, Lisa Machado*

- **ELN Recommendations on treatment choice and response** (Gianantonio Rosti)
- **Imatinib and Ponatinib - two ends of the spectrum in 2016's reality?** (Steve O'Brien)
- **Switching treatments in suboptimal response and intolerance: What to take when?** (Daniela Žáčková)
- **Debate on state of play 2016 in CML therapy** (Gianantonio Rosti, Daniela Žáčková, Steve O'Brien)
- **Future of CML: ABL001 and others treatments in the pipeline** (Gianantonio Rosti)

**Daniela Žáčková** (Czech Republic) shared the latest updates on switching treatments in suboptimal response and intolerance, and explained what to take when. Dr. Žáčková initially mentioned that the category suboptimal response as defined in the ELN treatment recommendations from 2009 no longer exists. The criteria of the category were incorporated into the category failure in the ELN recommendations from 2013. Now, the only intermediate category between optimal response and failure is warning. An important objective of response definitions is to guide treatment decisions. Optimal response means that there is no indication for switch whereas failure requires a switch to a more potent drug to prevent risk of progression or death. Warning implies that a patient should continue their therapy but needs to be monitored closely.

Dr. Žáčková reflected whether warning response had any prognostic value. Studies showed that the absence of an early molecular warning response at 3 months was associated with significantly worse outcome. Nevertheless, the ELN treatment guidelines do not recommend a switch with warning response as a single measurement because it is not deemed sufficient to justify such a huge step. Outcome can still be favorable at 6 months. Furthermore, controlled trials did not show any benefit of early versus late switch. Therefore, monitoring is crucial to the decision whether to change treatment.

Switch to other treatments is only recommended in case of treatment failure or in the event of non manageable or serious toxicity.

Factors to be considered when choosing TKI for a subsequent line include: availability of drugs, treatment line, cost, efficacy, mutational status, comorbidities, and toxicity profiles of TKIs. Allogeneic stem cell transplantation is still an option as third line treatment. Limited data revealed that outcome in third line therapy was excellent.

During the following debate many questions focused on the issue of risk. The physicians stated that their appreciation and acceptance of risk might be very different to that of the patient. Therefore, risk should always be discussed with the patient and the patient should be actively involved in the decision making process. Some clinics have their own internal recommendations of which score to adopt to assess risk. Treatment decisions may also be influenced by the reimbursement status in the respective country. Advocates criticized that there are no straightforward criteria how to define or categorize risk in CML. This scenario is difficult to handle for many physicians, especially those who have limited experience with treating CML patients.

With regard to patient input in clinical research, regulators and funders in the UK require that patients are engaged in trial design. This cooperative thinking is regarded as very useful and adds valuable aspects to trials which would otherwise be missed. Nevertheless, there is still room for improvement.

Further questions and discussion touched on switching and discontinuing treatment, achieving and losing deep molecular response, overall survival as well as limited access to treatment, and diagnostic tests. Voices from the audience expressed concern that treatment decisions in certain countries are guided by cost considerations rather than clinical treatment guidelines, and patients are even expected to have stem cell transplantation as second line treatment although this procedure may not be medically justified.





### **Medical Session #3: CML at both ends of life**

*Chairs: Mei Ching Ong, Cornelia Borowczak*

- **CML in elderly: The challenge of co-morbidities and cardiovascular predispositions on choice of therapy** (Daniela Žáčková)
- **CML in young adults: Special challenges, adherence, fertility** (Gianantonio Rosti)

**Dr. Daniela Žáčková** discussed the challenges of CML in elderly. Old age is commonly defined as an age of 65 years and above. Although the incidence of CML increases with age, older patients are often excluded from clinical trials. Consequently, they are underrepresented in most published studies which form the basis for treatment recommendations. According to current recommendations, TKIs should be given for life. Thanks to the efficacy of TKIs, the prevalence of older people living with CML is growing. All these are good reasons to be concerned about CML in elderly.

Prior to the arrival of TKIs, age was considered a factor for poor prognosis. TKIs have eliminated the negative effect of age on the outcome. The management of CML in elderly should not be limited due to age. However, older patients have more comorbidities and take more concomitant drugs. Therefore, treatment decisions should take into account drug interactions, risk of adverse events, treatment interruptions or dose reductions which will have an impact on efficacy. It is important to assess elderly patients for their functional, cognitive and psychological status and social support before starting TKI therapy. This will help predict patient compliance and chances of therapeutic success. The management of CML in the elderly follows the same rules as in younger patients. It should not be based on age but on indicators of frailty. The choice of the TKI should consider many factors, above all safety profiles and comorbidities.

**Prof. Gianantonio Rosti** turned to the opposite end of the patient spectrum and looked at special challenges, adherence and fertility issues in young adults.

Patients below the age of 29 years are a strict minority in Europe. This is different in other parts of the world where the median age is a lot younger. Clinical studies in Italy and the USA demonstrated that patients between 18 and 29 years had lower response rates and a higher probability of progression. The ENEST1st trial with nilotinib as first line therapy showed that young patients achieve similar response rates at 18 months as very elderly patients. To Prof. Rosti's knowledge this is the only situation in oncology or hematology where younger patients do not reach a better response than the very elderly.

Interestingly, younger patients tend to be less adherent than older patients. This applies to taking medication as directed as well as to continuing treatment until directed otherwise. A young patient may be more motivated to continue treatment if they understand that they may have a chance to stop therapy after a specific milestone has been reached after a few years. Adherence is strongly influenced by the relationship between patient and physician. Patients are more adherent if their doctor is approachable. Tools to increase adherence include reminders from family members and pill dispensers.

Changing over to the topic of pregnancy, Prof. Rosti pointed out that CML is not a mutational agent. There are no problems associated with fathering children. The story is completely different for female CML patients. TKIs cause damage to the fetus in about 5 to 10% of pregnancies or increase the rates of post-implantation loss. Treatment of patients in deep molecular response can be stopped before a planned pregnancy or during an unplanned pregnancy. Low-dose interferon can be given if the patient relapses. The disease should be monitored with monthly PCR testing. For patients with a good response but still detectable levels of BCR-ABL, alternative experimental treatments are possible. The next update of the ELN treatment recommendations will address the issue of treatment free remission and pregnancy.

Prof. Rosti added some brief thoughts on allogeneic stem cell transplantation. According to the ELN recommendations, it is reserved for patients in whom three lines of TKI failed.

### 6.3.3. Příloha 23

Saglio G, Sharf G, Almeida A, Bogdanovic A, Bombaci F, Čugurović J, Deekes N, Garcia-Gutiérrez V, de Jong J, Narbutas Š, Westerweel P, Zackova D. Considerations for Treatment-free Remission in Patients With Chronic Myeloid Leukemia: A Joint Patient Physician Perspective. *Clinical Lymphoma Myeloma & Leukemia*. 2018;18(6):375-379.

IF = 2,274 v roce 2018; ONCOLOGY Q3; 5 citací dle WOS či Scopus, bez autocitací

Komentář shrnující hlavní výstupy a přínos publikace:

- Unikátní sdílené stanovisko 6 zástupců patientských podpůrných organizací, v některých případech přímo pacientů s CML se zkušeností s TFR, a 6 zdravotníků – specialistů na CML
- Diskutovány jednotlivé aspekty vysazování TKI s důrazem zejména na potřeby pacientů. Apel na implementaci cílených dotazů na psychologické a emocionální faktory spojené s procesem TFR do rutinního klinického vyšetření
- Užití adekvátní terminologie, jako např. „molekulární rekurence“ místo „relaps“ či „selhání“, a dále např. „lékové prázdniny“, připouštějící variantu nutnosti navrácení terapie, aniž by to znamenalo prohru či selhání procesu
- Vysloven předpoklad, že adekvátně edukovaný pacient, motivovaný mimo jiné i zájmem o jeho pocity, myšlenky a obavy, bude snáze a častěji volit variantu pokusu o vysazení TKI a tím navýší podíl pacientů kladně se rozhodujících pro pokus o TFR.



# SOHO State of the Art Updates and Next Questions

## Considerations for Treatment-free Remission in Patients With Chronic Myeloid Leukemia: A Joint Patient–Physician Perspective

Giuseppe Saglio,<sup>1</sup> Giora Sharf,<sup>2</sup> Antonio Almeida,<sup>3</sup> Andrija Bogdanovic,<sup>4</sup>  
Felice Bombaci,<sup>5</sup> Jelena Čugurović,<sup>6</sup> Nigel Deekes,<sup>7</sup> Valentín García-Gutiérrez,<sup>8</sup>  
Jan de Jong,<sup>9</sup> Šarūnas Narbutas,<sup>10</sup> Peter Westerweel,<sup>11</sup> Daniela Zackova<sup>12</sup>

### Abstract

Treatment-free remission (TFR) after discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy is now an emerging treatment goal for patients with chronic myeloid leukemia, who have achieved a deep and stable response to treatment. Although guidance is now available, patients' questions regarding this progressive concept have yet to be addressed. The overall aim of this European Steering Group is a patient-centered approach that educates patients on their treatment options, including TFR, facilitates better patient–physician relationships, and meets patients' emotional and psychological needs. The present report outlines 5 key topic areas on discontinuing tyrosine kinase therapy and the implications of TFR for patient–physician consideration: what TFR is; when TFR is appropriate; which patients might and might not be eligible for TFR; and patients' considerations for discontinuing therapy, such as tyrosine kinase withdrawal syndrome, potential psychological implications, molecular recurrence, and repeat treatment. This Steering Group advocates that patients with chronic myeloid leukemia should have access to high-quality, frequent molecular monitoring and be treated in a specialist center with appropriate medical and psychological support. As patient concerns with attempting TFR become forefront in patient–physician discussions, a greater number of eligible patients might be willing to discontinue therapy.

*Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, Vol. 18, No. 6, 375–9 © 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc.  
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Keywords:** CML, CML advocates, TFR, TKIs (Tyrosine Kinase Inhibitors), Therapy discontinuation

<sup>1</sup>Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Turin, Italy  
<sup>2</sup>CML Advocates Network, Netanya, Israel  
<sup>3</sup>Hospital da Luz, Lisbon, Portugal  
<sup>4</sup>Clinical Centre of Serbia, University of Belgrade, School of Medicine, Belgrade, Serbia  
<sup>5</sup>Gruppo AIL Pazienti Leucemia Mieloide Cronica, Rome, Italy  
<sup>6</sup>CML Association of Serbia, Belgrade, Serbia  
<sup>7</sup>CML UK, Birmingham, United Kingdom  
<sup>8</sup>Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ramón y Cajal Health Research Institute, Madrid, Spain  
<sup>9</sup>Hematon Foundation, Utrecht, The Netherlands  
<sup>10</sup>PCOLA, Lithuanian Cancer Patient Coalition, Kaunas, Lithuania  
<sup>11</sup>Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht, The Netherlands  
<sup>12</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

Submitted: Apr 18, 2018; Accepted: Apr 19, 2018; Epub: Apr 25, 2018

Address for correspondence: Giuseppe Saglio, MD, Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, 10043 Orbassano-Torino, Italy  
E-mail contact: [gsaglio@unito.it](mailto:gsaglio@unito.it)

### Introduction

The introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has considerably improved the outcomes for patients with chronic myeloid leukemia (CML), with survival rates now almost equal to that of the healthy, general population. Although the incidence of this rare disease remains at ~1 case per 100,000 population,<sup>1</sup> improved survival has resulted in an increased prevalence, and 400,000 patients with CML are expected in Europe by 2050.<sup>2</sup> With the better survival and increasing prevalence of CML comes a different set of challenges for patients and physicians, including the side effects of continuous treatment on a patient's health, well-being, and quality of life (QoL) and the increasing health care burden and costs associated with managing a lifelong disease.<sup>2</sup>

The concept of discontinuing TKI therapy for certain patients, an approach first put forward in 2006,<sup>3</sup> has the potential to reduce side effects associated with lifelong TKI therapy and to be a

## Joint Patient–Physician Perspectives on TFR in CML

**Table 1** Summary of Steering Group Discussion Recommendations for Physicians and Patients With CML Considering Discontinuation of TKI Therapy and Attempting TFR

Key Area	Summary of Steering Group Recommendations for Patient–Physician Discussion
Treatment goals in CML	The initial treatment goal is the rapid reduction of tumor burden/number of leukemic cells, with best OS in the long term, and for patients to achieve the same QoL as before the CML diagnosis.
What is TFR and when is it appropriate?	TFR is achieved when a patient who has discontinued TKI therapy maintains MMR and does not need to restart therapy; patients in the chronic phase of CML with a stable, prolonged, and DMR for $\geq 2$ years might be ready to discontinue TKI therapy and attempt TFR.
Which patients might be eligible to attempt TFR?	The following factors should be considered before attempting TFR: patients in the chronic phase of CML at diagnosis, who have not experienced resistance to any TKI therapy at any time, and who have been in DMR for $\geq 2$ years; patients should be well-informed about TFR and well-motivated to discontinue treatment but not experiencing pressure to stop therapy <sup>4,7</sup> ; patients should fully understand that molecular recurrence is not “failure” and that treatment will be restarted; molecular monitoring test results should be available within 2–4 weeks. <sup>4,7</sup>
Which patients might not be eligible to attempt TFR?	Patients who have achieved MMR/MR3.0 but have not reached a DMR and are, therefore, not eligible to attempt TFR should be reassured by their physicians that they have still reached a treatment goal/safe haven and can continue TKI treatment and have a life expectancy similar to that of the general population. If these patients continue to adhere to treatment, they can continue with the same therapy and wait to reach a deeper molecular response, at which time, once sustained, TFR might be an option. If a patient wishes to stop treatment and has a specific desire or need to change therapy, the physician should discuss with the patient the possibility of switching to a second-generation TKI that might enable achievement of a deeper molecular response; these patients should also be advised about the different side effect profiles of TKI treatments.
Patient considerations for discontinuing TKI therapy	The following factors should be considered before a patient discontinues TKI therapy: physicians should emphasize the importance and frequency of follow-up visits and, therefore, the commitment necessary from patients to attend clinic visits more frequently; TFR does not mean a cure, and molecular recurrence can develop at any time, requiring TKI treatment to be restarted; even if TFR is achieved, physicians should remind patients that they will still need to attend routine clinic visits and undergo regular, lifelong monitoring.
TKI withdrawal syndrome	Physicians should discuss TKI withdrawal syndrome with patients considering discontinuing TKI therapy and how the syndrome can be managed; on withdrawal of TKI treatment, some patients might experience musculoskeletal pain, which, generally, can be managed with over-the-counter pain medications. In addition to ongoing disease surveillance, regular clinical monitoring will enable the identification of long-term toxicity of previous TKI therapy or, even, of its discontinuation; withdrawal symptoms should be monitored and treated.
Psychological implications of discontinuing TKI therapy and attempting TFR	Current guidelines do not address the psychological issues related to discontinuing TKI therapy and attempting TFR. However, Steering Group members advocate that screening for potential psychological issues associated with TFR should form a part of routine monitoring for patients, because professional psychological help might be necessary for certain patients. Physicians should also be aware that patients could experience anxiety as a result of fluctuating blood levels of <i>BCR-ABL1</i> during TFR monitoring.
Molecular recurrence and retreatment	Patients should be prepared for drug-free periods that could last from only a few months to many years, and physicians should explain and advise patients about the possibility of reinstitution of therapy owing to molecular recurrence.

Abbreviations: CML = chronic myeloid leukemia; DMR = deep molecular response; MMR = major molecular response; OS = overall survival; QoL = quality of life; TFR = treatment-free remission; TKI = tyrosine kinase inhibitor.

cost-effective measure for health care providers.<sup>2</sup> Although discontinuation of TKI therapy is still largely conducted in controlled clinical trials, and standard protocols for TKI discontinuation in clinical practice have not yet been developed, guidelines and recommendations are available for eligible patients considering TKI withdrawal and attempting treatment-free remission (TFR).<sup>2,4-7</sup> This guidance considers both patient selection criteria and the eligibility of centers to adequately monitor patients with standardized and timely molecular testing of *BCR-ABL1* transcripts.<sup>4,6,8</sup>

TFR after discontinuation of TKI therapy is an emerging treatment goal for patients who have had a deep and stable response to treatment. For the purposes of the present report, TFR can be described as a state in which a patient with CML has discontinued TKI therapy and remained in major molecular response (MMR; also known as MR3.0, or a level of 0.1% on the international scale), thereby remaining free of the need for TKI therapy. Although

recent 2017 guidelines on patient eligibility for discontinuing TKIs and attempting TFR are available from the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) and the European Society for Medical Oncology (ESMO),<sup>4,5</sup> with the European LeukemiaNet guidelines available in early 2018,<sup>6</sup> patients' concerns and questions regarding this progressive concept have yet to be addressed in reported studies.

With the patients' perspective in mind, a European Steering Group of 6 health care professionals (specialist hematologists) and 6 experienced CML patient advocates (some with a personal experience of TFR) convened in July 2017 in Vienna to discuss key areas and patient concerns relating to discontinuing TKI therapy for patients with CML. The overall aim of this Steering Group, founded in July 2016 from members of the CML Advocates Network (an international network connecting 116 patient organizations from 86 countries advocating the sharing of best

**Table 2** Glossary of Terms

Term	Definition
<i>BCR-ABL1</i>	Fusion gene responsible for CML
Deep molecular response	<i>BCR-ABL1</i> transcripts present at $\leq 0.01\%$ (MR4.0, MR4.5, MR5.0) according to the International Scale
International Scale	Standardization of level of <i>BCR-ABL1</i> transcripts in patients with CML to allow common evaluation of treatment response
Major molecular response (MR3.0)	<i>BCR-ABL1</i> transcripts at $\leq 0.1\%$ using the International Scale
Molecular monitoring	Analysis of percentage of <i>BCR-ABL1</i> transcript in peripheral blood to determine response to TKI therapy
Molecular recurrence	Loss of MMR/MR3.0 and indication to restart TKI therapy
Transcript	RNA molecule derived from transcription of a specific gene
Treatment-free remission	A state in which a patient with chronic CML who has discontinued TKI therapy maintains the MMR and does not need to restart therapy
Tyrosine kinase	An enzyme able to phosphorylate proteins and produced by cells to control and regulate growth and differentiation processes
Tyrosine kinase inhibitor	Targeted drugs able to inhibit tyrosine kinase activity of <i>BCR-ABL</i> proteins used to treat patients with CML

Abbreviations: CML = chronic myeloid leukemia; MMR = major molecular response; TFR = treatment-free remission; TKI = tyrosine kinase inhibitor.

practice in CML), is for a patient-centered approach that addresses the unmet needs of patients with CML. The group's main objectives include educating patients on their treatment options, including with respect to TFR; facilitating better patient–physician relationships using patient empowerment as a method to improve CML care; and meeting patient needs (including emotional and psychological needs) within the CML community.

The present report outlines 5 key topic areas or questions about discontinuing TKI therapy and the implications of TFR for patient–physician consideration (Table 1). In view of recent guidelines, this collective narrative also provides timely discussion points from an experienced Steering Group of specialist hematologists and CML patient advocates, offering a unique, joint patient–physician perspective that compliments current guidance and reported data. For accessibility of the information provided in the present report, a glossary of terms has been provided (Table 2).

### What Is TFR and When Is TFR Appropriate?

TFR is achieved when a patient who has discontinued TKI therapy maintains a MMR and does not need to restart therapy. The Steering Group members agreed that, in general, patients in the chronic phase of CML with a stable, prolonged, and deep molecular response (DMR) for  $\geq 2$  years might be ready to discontinue TKI therapy and attempt TFR.

For patients participating in controlled clinical trials, the achievement of DMR can be defined as *BCR-ABL1* transcripts present at  $\leq 0.01\%$  (ie, an MR4.0-, MR4.5-, or MR5.0-log reduction from the standardized baseline [MR4.0 or deeper]).<sup>8</sup> In the largest TFR trial to date (European Stop TKI [EURO-SKI] study), achievement of MR4.0 was sufficient for TFR eligibility for many patients.<sup>9</sup> However, the eligibility for the recent ENEST freedom study was based on the more stringent criterion of MR4.5 (*BCR-ABL1* transcript levels of  $\leq 0.0032\%$ ).<sup>5</sup>

Analysis of the EURO-SKI data suggested that responses deeper than MR4 provide no advantage in terms of long-term TFR<sup>9</sup>; however, this finding has yet to be confirmed by ongoing trials, such as the ENESTPath trial (ClinicalTrials.gov identifier, NCT01743989).

Currently, the ESMO and NCCN guidelines recommend attempting TFR outside of clinical trials, as long as proper, high-quality, well-regulated, and certified monitoring can be ensured.<sup>4,8</sup> The 2017 ESMO guidelines recommend that before discontinuing therapy, patients should have achieved MR4.5 and stability of the DMR (at least MR4.0) for  $\geq 2$  years after  $\geq 5$  years of TKI therapy.<sup>8</sup> The NCCN guidelines state that TFR can be attempted for carefully selected patients who have achieved and maintained a DMR (MR4.0 or deeper) for  $\geq 2$  years.<sup>4</sup>

After achievement of a stable DMR, TFR should be seen by the CML community as an option in CML treatment. It should not be thought of as a cure for CML, because molecular recurrence, both early and occasionally late, does develop in some patients.

### Which Patients Might Be Eligible to Attempt TFR?

Members of the Steering Group agreed that the following factors should be considered when a patient is considering a TFR attempt. Patients should have been in the chronic phase of CML at diagnosis, should not have experienced resistance to any TKI therapy at any time, should have had a DMR for  $\geq 2$  years. Patients also need to be well-informed about TFR and well-motivated to discontinue treatment but should not experience pressure to stop therapy.<sup>4,7</sup> Patients should also fully understand that molecular recurrence is not a “failure,” and that treatment will be restarted if it develops. Molecular monitoring test results should also be available within 2 to 4 weeks.<sup>4,7</sup>

A longer duration of TKI therapy before attempting TFR has been associated with a greater chance of sustaining a MMR.<sup>9-11</sup> Overall, for first-line TKIs, 31% of patients will be eligible for TFR at 6 years.<sup>12</sup>

### Which Patients Might Not Be Eligible to Attempt TFR?

The Steering Group acknowledged that patients who have achieved a MMR/MR3.0 but have not reached a DMR and are therefore not eligible to attempt TFR should be reassured by their physicians that they have still reached a treatment goal or safe haven and can continue receiving TKI treatment and have a similar life

## Joint Patient—Physician Perspectives on TFR in CML

expectancy to that of the general population. If these patients continue to adhere to treatment they can continue with the same therapy and wait to reach a deeper molecular response, at which point, once sustained, TFR might be an option. If a patient wishes to stop treatment and has a specific desire or need to change therapy, the physician should discuss with the patient the possibility of switching to a second-generation TKI that might enable achievement of a deeper molecular response. At this time, patients should be advised about the side effect profiles of TKI treatments.

The recommendations provided by the Steering Group are supported by the reported data. Patients who have achieved a MMR/MR3.0 have a minimal risk of disease progression and have a life expectancy similar to that of the general population as long as they continue to adhere to their TKI therapy.<sup>13,14</sup> Patients who have not achieved a MR3.0 with their current therapy can be switched to a different TKI if necessary. This could increase their chances of attaining a DMR. Patients are more likely to achieve both a DMR with second-generation TKIs and achieve this more quickly than with first-generation TKIs. However, adherence to therapy is a critical factor in achieving a DMR.<sup>8</sup>

### Patient Considerations for Discontinuing TKI Therapy

The Steering Group recommends that physicians discuss the following points with patients considering discontinuing TKI therapy. Before discontinuing TKI therapy, the importance and frequency of the follow-up visits and, therefore, the commitment by patients to attend clinic appointments more frequently should be emphasized. TFR does not mean a cure, and molecular recurrence can develop at any time, requiring TKI treatment to be restarted. Even if TFR has been achieved, physicians should remind patients that they will still need to attend routine clinic visits and undergo regular and lifelong monitoring.

### TKI Withdrawal Syndrome

The Steering Group strongly recommends that physicians discuss TKI withdrawal syndrome with patients thinking about discontinuing TKI therapy and how the syndrome can be managed. On withdrawal of TKI treatment, some patients might experience musculoskeletal pain. Generally, the pain can be managed with over-the-counter pain medications. In addition to ongoing disease surveillance, clinical monitoring will enable the identification of long-term toxicity of previous TKI therapy or, even, of its discontinuation. All withdrawal symptoms should be monitored and treated.

Study data have suggested that  $\leq 30\%$  of patients who stop TKI therapy will experience the withdrawal syndrome, usually in the form of musculoskeletal pain.<sup>15-17</sup> Although TKI withdrawal syndrome can last for months, it can often be managed with nonprescription drugs such as paracetamol or nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and, in more severe cases, corticosteroids.<sup>16,17</sup> The TKI withdrawal syndrome does not appear to be dependent on the particular TKI the patient was taking before stopping therapy,<sup>17</sup> and the occurrence of the TKI withdrawal syndrome has been associated with a greater chance of achieving successful TFR.<sup>10</sup>

### Psychological Implications of Discontinuing TKI Therapy and Attempting TFR

The current guidelines have not addressed the psychological issues related to discontinuing TKI therapy and attempting TFR. However, the Steering Group members advocate that screening for potential psychological issues associated with TFR should form a part of routine monitoring for patients, because professional psychological help might be necessary for certain patients. Physicians should also be aware that patients could experience anxiety as a result of fluctuating *BCR-ABL1* blood levels during TFR.

It is well-recognized that psychological and emotional factors, in addition to clinical variables, play a vital part of a patient's decision to discontinue TKI therapy. Thus, these factors should be considered when discussing TFR with patients.<sup>18</sup> The main reasons for patients wanting to discontinue TKIs are to reduce the potential side effects of long-term TKI therapy, decrease medication costs, and ease the inconvenience of taking daily medication.<sup>19,20</sup> The main anxiety that patients have experienced regarding stopping TKI therapy is a fear of disease recurrence or progression<sup>18,19</sup>; however, to date, this has not been documented.<sup>2,7</sup>

A recent Italian observational study found that about 82% of patients would be willing to stop TKI therapy if their disease were likely to remain stable and the probability of a response to TKI therapy if treatment needed to be restarted were high. Patients were also more likely to attempt TFR if their risk of recurrence was  $< 30\%$ .<sup>18</sup> In addition, not all patients who are eligible for TFR will be willing to discontinue treatment. In a recent survey, 49% of Italian patients with CML (total,  $n = 1133$ ) and 34% of US patients with CML (total,  $n = 84$ ) would not choose to discontinue treatment owing to concerns of disease recurrence.<sup>19,20</sup> Although patients and their physicians should discuss all concerns, including psychological and emotional concerns, of attempting TFR, it is recognized that, currently, these do not form a part of a routine clinic visit.<sup>20</sup>

### Molecular Recurrence and Retreatment

The Steering Group highlighted that patients should be prepared for drug-free periods that could last from only a few months to many years and recommended that physicians advise patients about the possibility of reinitiation of therapy because of molecular recurrence.

Data have shown that not all patients eligible for TFR will sustain a response once TKI therapy has been discontinued: 40% to 60% of eligible patients will have a sustained TFR  $> 1$  to 2 years.<sup>4,5,7,10,11,21</sup> Most cases of molecular recurrence will develop within the first 6 months of stopping TKI therapy,<sup>11</sup> and the confirmed loss of MR3.0 should be seen as an indication to restart therapy.<sup>22</sup> Late molecular recurrences do develop; thus, patient adherence to monitoring during TFR is vital to detect recurrence and ensure protection from disease progression.<sup>8,11</sup> Factors that are potentially predictive of molecular recurrence include previous TKI treatment duration and previous duration of DMR.<sup>2</sup> Studies have shown that resuming TKI therapy immediately after the loss of MMR results in regaining MMR in almost all patients. No risk, to

date, has been found of developing resistance to TKIs,<sup>5,10,11,21</sup> and attempting a second TKI discontinuation after molecular recurrence is possible, once a prolonged DMR has again been achieved. Some data have shown this might be effective in ~30% of cases after an adequate duration of the re-achieved DMR. The speed of molecular recurrence after the first attempt at TFR was the only factor associated with a poorer outcome with the second attempt.<sup>23</sup>

## Conclusion

This Steering Group considered the patients' perspective, a potentially overlooked area of CML management.<sup>2</sup> This innovative approach, facilitating collaboration between specialist hematologists and CML patient advocates, highlights the practical considerations for eligible patients attempting TFR and advocates that patients with CML should have access to high-quality and frequent molecular monitoring and be treated in a specialist center with appropriate medical and psychological support. Despite the current uncertainties regarding which patients are the best candidates to attempt TFR and which factors will predict for the loss of MMR/MR3.0 after discontinuing TKI therapy, treatment interruption is a safe option, providing adequate high-quality and timely monitoring is available, with prompt reintroduction of TKI therapy once MMR/MR3.0 has been lost. Worldwide, > 2000 patients with CML have attempted TFR, and no instances of disease progression have been reported. It is possible that as attempting TFR becomes a standard part of CML care, and patients' concerns are forefront to patient-physician discussions, a greater number of eligible patients will be willing to discontinue TKI therapy and attempt TFR.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Cello Health iScience for editorial assistance.

## References

- Hoffman V, Baccarani M, Hasford J, et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European countries. *Leukemia* 2015; 29:1136-43.
- Saufele S, Richter J, Hochhaus A, Mahon F-X. The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2016; 30:1638-47.
- Goldman J, Gordon M. Why do chronic myelogenous leukemia stem cells survive allogeneic stem cell transplantation or imatinib: does it really matter? *Leuk Lymphoma* 2006; 47:1-7.
- Radich JP. NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017; 17:1159-73.
- Hochhaus A, Masszi T, Giles FJ, et al. Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the ENESTfreedom study. *Leukemia* 2017; 31:1525-31.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122:872-84.
- Hughes TP, Ross DM. Moving treatment-free remission into mainstream clinical practice in CML. *Blood* 2016; 128:17-23.
- Hochhaus A, Sauffele S, Rosti G, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; 28(suppl 4):iv41-51.
- Mahon F-X, Richter J, Guilhot J, et al. Cessation of tyrosine kinase inhibitors treatment in chronic myeloid leukemia patients with deep molecular response: results of the Euro-Ski trial. *Blood* 2016; 128:787.
- Lee S-E, Choi SY, Song H-Y, et al. Imatinib withdrawal syndrome and longer duration of imatinib have a close association with a lower molecular relapse after treatment discontinuation: the KID study. *Haematologica* 2016; 101:717-23.
- Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010; 11:1029-35.
- Geelen I, Thielen N, Janssen J, et al. Treatment outcome in a population-based 'real-world' cohort of chronic myeloid leukemia patients. *Haematologica* 2017; 102:1842-9.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355:2408-17.
- Bower H, Björkholm M, Dickman PW, Höglund M, Lambert PC, Andersson TM-L. Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population. *J Clin Oncol* 2016; 34:2851-7.
- Richter J, Soderlund S, Lubking A. Musculoskeletal pain in patients with chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib: a tyrosine kinase inhibitor withdrawal syndrome? *J Clin Oncol* 2014; 32:2821-3.
- Park JS, Lee S-E, Jeong SH, et al. Change of health-related profiles after imatinib cessation in chronic phase chronic myeloid leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2015; 57:341-7.
- Berger MG, Pereira B, Oris C, et al. Osteoarticular pain after discontinuation of tyrosine kinase inhibitors (TKI): a French cohort. *Blood* 2015; 126:137.
- Riva S, Mazzocco K, Pravettoni G. Cognitive and emotional impact of discontinuation therapy in patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Tumori* 2016; 102:217-21.
- Goldberg S, Hamarman S. Patients with chronic myelogenous leukaemia may not want to discontinue tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood* 2015; 126:1584.
- Breccia M, Efficace F, Sica S, et al. Adherence and future discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic phase chronic myeloid leukemia: a patient-based survey on 1133 patients. *Leuk Res* 2015; 39:1055-9.
- Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 2013; 122:515-22.
- Rouselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, et al. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol* 2014; 32:424-30.
- Legros L, Nicolini FE, Erienne G, et al. Second tyrosine kinase inhibitor discontinuation attempt in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2017; 123:4403-10.

## 7. Závěr a perspektivy do budoucna

Předložená habilitační práce dokumentuje formou komentovaného souboru publikací více než 15letou systematickou vědeckou, klinickou, edukační a osvětovou činnost uchazečky na poli výzkumu, diagnostiky a léčby pacientů s CML. Vlastními výsledky se podařilo naplnit všechny vytyčené cíle, a tím zásadně přispět k optimalizaci péče o pacienty s CML nejen v národním, ale jednoznačně i mezinárodním měřítku. Z podmínek centralizované specializované hematologické péče vycházející databáze INFINITY, vytvořená uchazečkou v rámci doktorského studia za supervize prof. Mayera a dále modernizovaná ve spolupráci s IBA MU, slouží coby jedna z celosvětově největších nekomerčních a parametricky nejbohatších databází jako zdroj kvalitních dat jednak pro sdílení v rámci mezinárodního registru a z něj rezultujících projektů, jednak pro vlastní analýzy. Prakticky pouze v zahraničních impaktovaných časopisech bylo na základě těchto analýz opublikováno několik zcela prioritních poznatků. Ve snaze poskytnout co nejpřiléhavější obraz o účinnosti a snášenlivosti moderní léčby pacientů s CML v podmínkách běžné klinické praxe jsme poukázali na fakt, že zavedené parametry hodnocení zejména účinnosti tyto nároky nespĺňují a navíc v jejich definicích napříč studii panuje velká variabilita. Výzvu jsme proměnili v návrh nového způsobu statistického hodnocení reflektujícího skutečnou pozici daného léku v klinické praxi, který byl akceptován v mezinárodních doporučeních pro hodnocení výsledků studií na poli CML, publikovaných v prestižním časopisu *Blood*. Systematickou analýzou dat o účinnosti a snášenlivosti terapie TKI v podmínkách centralizované péče jsme přispěli do mozaiky poznatků z klinické praxe, které vyvažují převládající přísun dat z klinických studií, zatížených selekčním bias, a tudíž ne vždy odrážejících realitu adekvátně. V oblasti studia mechanismů rezistence na TKI jsme dokázali, že některé do té doby uznávané parametry pro odhad dalšího osudu pacientů léčených TKI nelze z řady důvodů spolehlivě použít. Našimi příspěvky k tématu identifikace leukemických kmenových buněk a objasnění struktury a dynamiky Bcr-Abl interaktomu jsme posunuli snahy o zvládnutí rezistence a perzistence nezávislých na *BCR-ABL1* signalizaci blíže k ambicióznímu cíli úplného vyléčení z leukemie. Náš tým jako první odhalil mechanismus poruchy glukózové tolerance při léčbě nilotinibem, což má ve světle jeho podílu na vzniku latentního metabolického syndromu a zvýšení rizika vzniku cévních NÚ velký význam s implikacemi jak pro volbu příslušného TKI, tak pro sledování a management těchto NÚ



v průběhu samotné terapie. Obsáhlou a mnohvrstevnou edukační a osvětovou činností, cílenou na komunitu pacientů, ale i širokou zdravotnickou veřejnost, a realizovanou nejen na národní, ale i na mezinárodní úrovni uchazečka přispěla k posílení informovanosti, motivace a adherence pacientů, coby jedněch ze základních předpokladů úspěchu jak samotné terapie, tak i procesu jejího kontrolovaného vysazování. A právě téma vysazení TKI po předchozí dvoustupňové redukci jejich dávky ve snaze dosáhnout setrvalé TFR, prověřované v nedávno otevřené unikátní akademické celonárodní studii HALF (NCT04147533), je hlavní současnou a budoucí vědecko-výzkumnou i organizační aktivitou uchazečky, která je spoluautorkou konceptu studie, její hlavní investigátorkou a národní koordinátorkou.

## 8. Seznam použité literatury

1. Novell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1479.
2. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243(5405):290-293.
3. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985;315(6020):550-554.
4. O'Dwyer ME, Druker BJ. The role of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in the treatment of cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2001;1(1):49-57.
5. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
6. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2017;376(10):917-927.
7. Bower H, Björkholm M, Dickman PW, et al. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J Clin Oncol* 2016;34(24):2851-2857.
8. Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, et al. Impact of treatment end point definitions on perceived differences in long-term outcome with tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29(23):3173-3178.

9. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355(23):2408-2417.
10. Rohrbacher M, Berger U, Hochhaus A, et al. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia* 2009;23(3):602-604.
11. Latagliata R, Carosino I, Vozella F, et al. Impact of exclusion criteria for the DASISION and ENESTnd trials in the front-line treatment of a 'real-life' patient population with chronic myeloid leukaemia. *Hematol Oncol* 2017;35(2):232-236.
12. Hamaker ME, Stauder R, van Munster BC. Exclusion of older patients from ongoing clinical trials for hematological malignancies: an evaluation of the National Institutes of Health Clinical Trial Registry. *Oncologist* 2014;19(10):1069-1075.
13. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 2007;110(10):3540-3546.
14. Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M, et al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood* 2007;109(6):2303-2309.
15. Kantarjian H, Pasquini R, Levy V, et al. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer* 2009;115(18):4136-4147.
16. Cortes JE, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 2011;118(17):4567-4576.
17. Lipton JH, Bryden P, Sidhu MK, et al. Comparative efficacy of tyrosine kinase inhibitor treatments in the third-line setting, for chronic-phase chronic myelogenous leukemia after failure of second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Res* 2015;39(1):58-64.
18. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest* 2011;121(1):396-409. Erratum in: *J Clin Invest* 2011;121(3):1222.
19. Efficace F, Baccarani M, Breccia M, et al. Health-related quality of life in chronic myeloid leukemia patients receiving long-term therapy with imatinib compared with the general population. *Blood* 2011;118(17):4554-4560.

20. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol* 2016; 34(20):2333-2340.
21. Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia* 2016;30(5):1044-1054.
22. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, et al. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood* 2018; 132(4):393-404.
23. Experts in Chronic Myeloid Leukemia. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. *Blood* 2013;121(22):4439-4442.
24. Pye SM, Cortes J, Ault P, et al. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood* 2008; 111(12):5505-5508.
25. Lou J, Huang J, Wang Z, et al. Chronic myeloid leukemia patients and treatment-free remission attitudes: a multicenter survey. *Patient Prefer Adherence*. 2018;12:1025-1032.
26. Mahon FX, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(11): 1029-1035.
27. Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood*. 2013;122(4):515–522.
28. Rouselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, et al. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol* 2014;32(5):424–430.
29. Saussele S, Richter J, Guilhot J, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol* 2018;19(6):747–757.
30. Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, et al. Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood* 2017;129(7):846–854.
31. Hochhaus A, Masszi T, Giles FJ, et al. Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the ENESTfreedom study. *Leukemia* 2017;31:1525–1531.

32. Fava C, Rege-Cambrin G, Dogliotti I, et al. Observational study of chronic myeloid leukemia Italian patients who discontinued tyrosine kinase inhibitors in clinical practice. *Haematologica* 2019;104(8):1589–1596.
33. Richter J, Söderlund S, Lübking A, et al. Musculoskeletal pain in patients with chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib: atyrosine kinase inhibitor withdrawal syndrome? *J Clin Oncol* 2014;32(25):2821–2823.
34. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol* 2010;28(14):2381-2388.
35. Ibrahim AR, Eliasson L, Apperley JF, et al. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. *Blood* 2011;117(14):3733-3736.
36. Guilhot J, Baccarani M, Clark RE, et al. Definitions, methodological and statistical issues for phase 3 clinical trials in chronic myeloid leukemia: a proposal by the European LeukemiaNet. *Blood* 2012;119(25):5963-5971.
37. Geissler J, Sharf G, Bombaci F, et al. Factors influencing adherence in CML and ways to improvement: Results of a patient-driven survey of 2546 patients in 63 countries. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143(7):1167-1176.
38. Sharf G, Marin C, Bradley JA, et al. Treatment-free remission in chronic myeloid leukemia: the patient perspective and areas of unmet needs. *Leukemia* 2020;34(8):2102-2112.
39. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006;108(6):1809-1820.
40. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008;26:3358-3363.
41. Yilmaz M, Kantarjian H, Jabbour E, et al. Similar outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib in or out of clinical trials. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13(6):693–699.
42. Castagnetti F, Di Raimondo F, De Vivo A, et al. A population-based study of chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib in first line. *Am J Hematol* 2017;92(1):82-87.
43. Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, et al. Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry. *Leukemia*. 2017;31(3):593-601.

44. Geelen IGP, Thielen N, Janssen JJWM, et al. Treatment outcome in a population-based, 'real-world' cohort of patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2017;102(11):1842–1849.
45. Faber E, Mužík J, Koza V, et al. Treatment of consecutive patients with chronic myeloid leukaemia in the cooperating centres from the Czech Republic and the whole of Slovakia after 2000--a report from the population-based CAMELIA Registry. *Eur J Haematol* 2011;87(2):157-168.
46. Lucas CM, Wang L, Austin GM, et al. A population study of imatinib in chronic myeloid leukaemia demonstrates lower efficacy than in clinical trials. *Leukemia* 2008;22:1963-1966.
47. Kizaki M, Okamoto S, Tauchi T, et al. Current and future perspectives on the TARGET system: the registration system for Glivec established by the JSH. *Int J Hematol* 2008;88(4):409-417.
48. Shepherd P, Dhanapala C, Maguire C, et al. Successful use of National Cancer Registry data to monitor the effective use of imatinib for treating chronic myeloid leukaemia. *Scott Med J* 2008;53(3):8-12.
49. Henk HJ, Woloj M, Shapiro M, Whiteley J. Real-world analysis of tyrosine kinase inhibitor treatment patterns among patients with chronic myeloid leukemia in the United States. *Clin Ther* 2015;37(1):124-133.
50. Craddock C, Szydlo RM, Klein JP, et al. Estimating leukemia-free survival after allografting for chronic myeloid leukemia: a new method that takes into account patients who relapse and are restored to complete remission. *Blood* 2000;96(1):86-90.
51. Cony-Makhoul P, Gardembas M, Coiteux V, et al. Nilotinib after imatinib first-line: a real-life longitudinal cohort of patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase. *Br J Haematol* 2018;180(3):356-364.
52. Tiribelli M, Bonifacio M, Binotto G, et al. Excellent outcomes of 2G-TKI therapy after imatinib failure in chronic phase CML patients. *Oncotarget* 2018;9(18):14219-14227.
53. Shah NP, Kim DW, Kantarjian H, et al. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica* 2010; 95(2):232-240.
54. Shah NP, Rousselot P, Schiffer C, et al. Dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant chronic-phase, chronic myeloid leukemia patients: 7-year follow-up of study CA180-034. *Am J Hematol* 2016;91(9):869-874.
55. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;27: 6041-6051.

56. Cortes J, Kantarjian H. How I treat newly diagnosed chronic phase CML. *Blood* 2012;120(7):1390–1397.
57. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013;122(6):872-884.
58. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007;8(11):1018-1029.
59. Apperley JF. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007;8(12):1116-1128.
60. Noens L, Hensen M, Kucmin-Bemelmans I, Lofgren C, Gilloteau I, Vrijens B. Measurement of adherence to BCR-ABL inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia: current situation and future challenges. *Haematologica* 2014;99(3):437-447.
61. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008;111(8):4022-4028.
62. Guilhot F, Hughes TP, Cortes J, et al. Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity Trial. *Haematologica* 2012;97(5):731-738.
63. Picard S, Titier K, Etienne G, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;109(8):3496-3499.
64. Forrest DL, Trainor S, Brinkman RR., et al. Cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia are correlated with Sokal risk scores and duration of therapy but not trough imatinib plasma levels. *Leuk Res* 2009;33(2):271-275.
65. Faber E, Friedecký D, Mičová K, et al. Imatinib trough plasma levels do not correlate with the response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia in routine clinical setting. *Ann Hematol* 2012;91(6):923-929.
66. Giles FJ, Yin OQ, Sallas WM, et al. Nilotinib population pharmacokinetics and exposure-response analysis in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia. *Eur J Clin Pharmacol* 2013;69(4):813-823.
67. Larson RA, Yin OQ, Hochhaus A, et al. Population pharmacokinetic and exposure-response analysis of nilotinib in patients with newly diagnosed Ph+ chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Eur J Clin Pharmacol* 2012;68(5):723-733.

68. Wang X, Roy A, Hochhaus A, Kantarjian HM, Chen TT, Shah NP. Differential effects of dosing regimen on the safety and efficacy of dasatinib: retrospective exposure-response analysis of a Phase III study. *Clin Pharmacol* 2013;5:85-97.
69. Nicaise C, Wang X, Roy A, et al. Dasatinib pharmacokinetics and exposure-response relationships to efficacy and safety in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase (CML-CP). *Haematologica* 2008; 93(S1), Abs. 0559.
70. Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Zucchetti M, D'Incalci M. Binding of imatinib by alpha(1)-acid glycoprotein. *Blood* 2002;100(1):367-368; author reply 368-369.
71. Jørgensen HG, Elliott MA, Allan EK, Carr CE, Holyoake TL, Smith KD. Alpha1-acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571. *Blood* 2002;99(2):713-715.
72. White DL, Saunders VA, Dang P, et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 2006;108(2):697-704.
73. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 2004;104(12):3739-3745.
74. Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, et al. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003;101(6):2368-2373.
75. Galimberti S, Cervetti G, Guerrini F, et al. Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;162(1):57-62.
76. Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 2004;104:2940-2942.
77. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(2):258-264.
78. Hirayama C, Watanabe H, Nakashima R, et al. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. *Pharm Res* 2008;25(4):827-835.
79. White DL, Dang P, Engler J, et al. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol* 2010;28(16):2761-2767.

80. Nardinelli L, Sanabani SS, Didone A, et al. Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2012;127(4):228-234.
81. Bazeos A, Marin D, Reid AG, et al. hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2010 24(6):1243-1245.
82. Jaruskova M, Curik N, Hercog R, et al. Genotypes of SLC22A4 and SLC22A5 regulatory loci are predictive of the response of chronic myeloid leukemia patients to imatinib treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36(1):55.
83. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Hughes TP. OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1. *Leukemia* 2010;24(11):1962-1965.
84. Zheng Q, Wu H, Yu Q, et al. ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2015;15(2):127-134.
85. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, et al. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood* 2002;100(5):1628-1633.
86. Cortes JE, Talpaz M, Giles F, et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003;101(10):3794-3800.
87. Wang W, Cortes JE, Tang G, et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood* 2016;127(22):2742-2750.
88. Hehlmann R, Voskanyan A, Lauseker M et al. High-risk additional chromosomal abnormalities at low blast counts herald death by CML. *Leukemia* 2020;34(8):2074-2086.
89. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12(24):7374-7379.
90. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Iacobucci I, Baccarani M. Advances in treatment of chronic myeloid leukemia with tyrosine kinase inhibitors: the evolving role of Bcr-Abl mutations and mutational analysis. *Pharmacogenomics* 2012;13(11):1271-1284.
91. Vajpai N, Strauss A, Fendrich G, et al. Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J Biol Chem* 2008;283(26):18292-18302.



92. Branford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood* 2009;114(27):5426-5435.
93. Soverini S, Branford S, Nicolini FE, et al. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2014;38(1):10-20.
94. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020;34(4):966-984.
95. Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood* 2017;129(1):38-47.
96. Kim T, Tyndel MS, Zhang Z, et al. Exome sequencing reveals DNMT3A and ASXL1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leuk Res* 2017;59:142-148.
97. Roche-Lestienne C, Marceau A, Labis E, et al. Mutation analysis of TET2, IDH1, IDH2 and ASXL1 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2011;25(10):1661-1664.
98. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, et al. Imatinib mesylate resistance through BCR-ABL independence in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004;64(2):672-677.
99. Ma L, Shan Y, Bai R, et al. A therapeutically targetable mechanism of BCR-ABL-independent imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 2014;6(252):252ra121.
100. Burchert A, Wang Y, Cai D, von Bubnoff N, et al. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* 2005;19(10):1774-1782.
101. Shah M, Bhatia R. Preservation of Quiescent Chronic Myelogenous Leukemia Stem Cells by the Bone Marrow Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2018;1100:97-110.
102. Giustacchini A, Thongjuea S, Barkas N, et al. Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia. *Nat Med* 2017;23(6):692-702.
103. Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, Pirmohamed M, Wang L, Clark RE. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* 2005;106(3):1133-1134; author reply 1134.
104. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011;118(5):1208-1215.
105. Kizilers A, Crisà E, Lea N, et al. Effect of low-level BCR-ABL1 kinase domain mutations identified by next-generation sequencing in patients with chronic myeloid leukaemia: a population-based study. *Lancet Haematol* 2019;6(5):e276-e284.

106. Aichberger KJ, Herndlhofer S, Scherthaner GH, et al. Progressive peripheral arterial occlusive disease and other vascular events during nilotinib therapy in CML. *Am J Hematol* 2011;86(7):533-539.
107. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA asks manufacturer of the leukemia drug ICLUSIG (ponatinib) to suspend marketing and sales. 2013. Available at: <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/drugsafetypodcasts/ucm373040.htm>.
108. Rea D, Mirault T, Cluzeau T, et al. Early onset hypercholesterolemia induced by the 2nd-generation tyrosine kinase inhibitor nilotinib in patients with chronic phase-chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2014;99(7):1197-1203.
109. Li W, Croce K, Steensma DP, McDermott DF, Ben-Yehuda O, Moslehi J. Vascular and Metabolic Implications of Novel Targeted Cancer Therapies: Focus on Kinase Inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 2015;66(10):1160-1178.
110. Campia U, Moslehi JJ, Amiri-Kordestani L, et al. Cardio-Oncology: Vascular and Metabolic Perspectives: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2019;139(13):e579-e602. Erratum in: *Circulation* 2019 Apr 9;139(15):e838-e839.
111. Efficace F, Baccarani M, Rosti G, et al. Investigating factors associated with adherence behaviour in patients with chronic myeloid leukemia: an observational patient-centered outcome study. *Br J Cancer* 2012;107(6):904-909.
112. Goldberg S, Hamarman S. Patient with chronic myelogenous leukemia may not want to discontinue tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood* 2015;126: Abs.1584.
113. Breccia M, Efficace F, Sica S, et al. Adherence and future discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic phase chronic myeloid leukemia. A patient-based survey on 1133 patients. *Leuk Res* 2015;39(10):1055-1059.
114. Lou J, Huang J, Wang Z, et al. Chronic myeloid leukemia patients and treatment-free remission attitudes: a multicenter survey. *Patient Prefer Adherence* 2018;12:1025-1032.

## 9. Seznam zkratek

ABCB1: ATP-binding competitor B1 - známý též jako P-glykoprotein 1 .....	134
ABCG2: ATP-binding cassette, sub-family G - známý též jako breast cancer resistance protein .....	134
AFTER-SKI: Akademický projekt sledující další osudy účastníků studie EURO-SKI.....	54
AGP: Kyselý $\alpha$ -1-glykoprotein.....	134
aloTKB: Alogenní transplantace krvetvorných buněk .....	61
AP: Akcelerovaná fáze (Accelerated phase) .....	88
ATFS: Přežití bez alternativní terapie (Alternative treatment-free survival) .....	56
AZV: Agentura pro zdravotnický výzkum .....	144
Bcr-Abl1: Tyrozinkináza - patologický protein.....	9
<i>BCR-ABL1</i> : Breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase gene 1 – patologický fúzní gen.....	9
BLAST CRISIS: Multicentrický registr dat pacientů s CML v blastické krizi.....	54
BP: Blastická fáze (Blast phase) .....	88
CAMELIA: Databáze pacientů s CML .....	55
CCI: Current cumulative incidence .....	56
CCyR: Kompletní cytogenetická odpověď (Complete cytogenetic response) .....	13
CI: Konfidenční interval (Confidence Interval) .....	98
CLADE-IS: Clinical Data Warehousing Information System .....	55
CLFS: Current leukemia-free survival .....	56
CLL: Chronická lymfatická leukemie.....	219
CML: Chronická myeloidní leukemie.....	9
CP: Chronická fáze (Chronic phase).....	14
CRF: Formulář pro zadávání dat (Case report form) .....	60
CTCAEv4.0: Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 .....	62
CYP3A4: Cytochrom P450 3A4 – enzymetabolizující více než 50 % léků.....	132
ČLS JEP: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně .....	10
DASA: Dasatinib .....	96
DLI: Infúze dárcovských lymfocytů (Donor lymphocyte infusion) .....	93
DM: Diabetes mellitus.....	146
ECPC: European Cancer Patient Coalition .....	219
EFS: Přežití bez události (Event-free survival) .....	88
EHA: European Hematology Association.....	219
ELN: Evropská leukemická síť (The European LeukemiaNet) .....	60
ELTS: EUTOS long-term survival .....	66
ENESTnd: Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed patients - studie s nilotinibem versus imatinibem v 1. linii.....	146
ENIGMA: Projekt výzkumu nilotinibem indukované poruchy metabolismu glukózy .....	57
EURO-SKI: Multicentrická akademická studie vysazující TKI pacientům s CML (EUROpe Stop TKI) .....	54
EUTOS: The EUROpean Treatment and Outcome Study .....	65
FFS: Přežití bez selhání terapie (Failure-free survival).....	96
FN: Fakultní nemocnice.....	54
GDPR: General Data Protection Regulation - nařízení o ochraně osobních údajů .....	61
HALF: Multicentrická akademická studie vysazující TKI po předchozí dvoustupňové redukci dávky.....	54
hOCT-1: "Lidský transportér organických kationtů (Human organic cationic transporter .....	134
HOMA-%B: Homeostasis Model Assessment of $\beta$ -cell Function .....	205
HOMA-%S: Homeostatic Model Assessment for Insulin Sensitivity .....	205
HOMA2-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance.....	205
HSCs: Fyziologické krvetvorné kmenové buňky (Hematopoietic stem cells) .....	143
CHR: Kompletní hematologická odpověď (Complete hematologic response) .....	88
IBA: Institut biostatistiky a analýz .....	55

IBE: Institut für Medizinische Informationsverarbeitung Biometrie und Epidemiologie .....	66
IF: Impakt faktor.....	54
IHOK: Interní hematologická a onkologická klinika .....	54
IMA: Imatinib .....	90
INFINITY: Databáze pacientů s CML (Tyrosine Kinase Inhibitors in First and following CML Treatment) .....	55
IRIS: International Randomized Study of Interferon and STI571.....	10
IS: Mezinárodní škála (International Scale) .....	98
ISI: Insulin Sensitivity Indices.....	205
JCR: Journal Citation Reports - nástroj pro zhodnocení prestiže a vzájemné porovnání časopisů.....	66
KD: Kostní dřeň .....	61
KV: Kardiovaskulární .....	148
LSCs: Leukemické kmenové buňky (Leukemia stem cells) .....	132
MCyR: Velká cytogenetická odpověď (Major cytogenetic response).....	88
MDR-1: Multi drug resistance-1 .....	134
MMR: Velká molekulární odpověď (Major molecular response) .....	78
MPN: Myeloproliferativní neoplazie .....	219
MR4.0: Hladina <i>BCR-ABL1</i> transkriptů ≤ 0,01 % na Mezinárodní škále .....	97
MU: Masarykova univerzita .....	55
NGS: Sekvenování nové generace (Next generation sequencing).....	141
NÚ: Nežádoucí účinek .....	13
oGTT: Orální glukózový toleranční test .....	205
OS: Celkové přežití (Overall survival) .....	12
PAH: Plicní arteriální hypertenze .....	98
PCT: Partnerships in Clinical Trials .....	222
PFS: Přežití bez progresu (Progression-free survival).....	78
Ph1: Philadelphia 1 – označení filadelfského chromozomu .....	9
PK: Periferní krev.....	61
PONDEROSA: Observační akademická studie zaměřená na léčbu ponatinibem v každodenní praxi .....	54
Scopus: Citační databáze.....	66
START-C: SRC/ABL Tyrosine Kinase Inhibition Activity; Research Trials of Dasatinib - studie s dasatinibem ve 2. linii u pacientů v CP CML.....	95
START-R: SRC/ABL Tyrosine Kinase Inhibition Activity; Research Trials of Dasatinib - studie s dasatinibem u pacientů rezistentních na imatinib.....	95
SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv .....	61
TFFS: Přežití bez úplného selhání terapie (Total failure-free survival) .....	96
TFR: Remise bez nutnosti užívání terapie (Treatment-free remission) .....	14
TFS: Přežití bez transformace (Transformation-free survival).....	90
TIGER: Akademická multicentrická studie - Tasigna and Interferon-alfa evaluation by the GERman CML Study Group.....	54
TKI: Inhibitor tyrozinkinázy (Tyrosine kinase inhibitor) .....	9
ÚHKT: Ústav hematologie a krevní transfúze.....	59
VAF: Variant allele frequency.....	141
VFN: Všeobecná fakultní nemocnice.....	59
WOS: Web of Science - citační databáze.....	54

## 10. Seznam obrázků, tabulek a příloh

### 10.1. Seznam obrázků

<i>Obrázek 1.</i> Schéma reciproké translokace t(9;22)(q34;q11), dávající vznik filadelfskému chromozomu a fúznímu genu <i>BCR-ABL1</i> . .....	9
<i>Obrázek 2.</i> Centra zúčastněná v databázi INFINITY k 1. 11. 2020. ....	60
<i>Obrázek 3.</i> Schéma elektronického systému CLADE-IS pro sběr dat v databázi INFINITY.....	63
<i>Obrázek 4.</i> Náhled webového formuláře systému CLADE-IS ke sběru dat v databázi INFINITY.....	63
<i>Obrázek 5.</i> Výňatek z mezinárodních doporučení pro statistické hodnocení výsledků léčby v klinických studiích u CML s uznáním parametru alternative treatment-free survival (ATFS) [36]. .....	92
<i>Obrázek 6.</i> Srovnání přežití bez události (event-free survival, EFS) na imatinibu a "current leukemia-free survival" (CLFS) u 152 pacientů v CP CML léčených vstupně imatinibem. ....	94
<i>Obrázek 7.</i> Mechanismy rezistence k imatinibu.....	133
<i>Obrázek 8.</i> Mechanismus působení mutací <i>BCR-ABL1</i> kinázové domény na účinek inhibitorů tyrozinkináz (TKI). .....	136
<i>Obrázek 9.</i> Ukázka z programu jednoho z Regionálních setkání zdravotníků, pacientů a jejich rodinných příslušníků organizovaného spolkem Diagóza leukemie. ....	220
<i>Obrázek 10.</i> Atmosféra světového summitu představitelů patientských organizací "CML Horizons 2016", konaného ve slovinské Ljubljani ve dnech 6. - 8. 5. 2016.....	223
<i>Obrázek 11.</i> Záběr z video-rozhovoru mezi MUDr. Danielou Žáčkovou, Ph. D. a předsedou britské patientské organizace Nigelem Deekesem na téma "Understanding your diagnosis". ....	225

### 10.2. Seznam tabulek

<i>Tabulka 1.</i> Definice událostí v analýzách přežití.....	90
<i>Tabulka 2.</i> Definice událostí v analýzách přežití při léčbě dasatinibem ve 2. linii. ....	96
<i>Tabulka 3.</i> Doporučení pro možnosti léčby v případě identifikace vybraných mutací Bcr-Abl1.....	136
<i>Tabulka 4.</i> Složení Poradní rady mezinárodní osvětové kampaně "What If? What Now?".....	224

### 10.3. Seznam příloh

1.1.1. Příloha 1.....	15
(Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie v roce 2015. <i>Onkologie</i> . 2015;9(3):119-122.)	
1.1.2. Příloha 2.....	20
(Žáčková D. Problematika chronické myeloidní leukemie u seniorů. In Matějovská Kubešová H. a Kiss I. <i>Geriatrická onkologie</i> . 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2015, s. 257–265. ISBN 978-80-204-3738-9.)	
1.1.3. Příloha 3.....	26

(Žáčková D., Faber E., Indrák K., Rohoň P., Klamová H., Machová Poláková K., Karas M., Černá O., Skoumalová I., Bělohávková P., Žák P., Ráčil Z., Mayer J. Chronická myeloidní leukemie. In: Mayer J. ed. *Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 1. vyd. Praha: Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně, 2016, s. 79–99. ISBN 978-80-260-9718-1.)

1.1.4. Příloha 4..... 38

(Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie. In: Büchler T. *Speciální onkologie*. Vydal Maxdorf s. r. o. v Praze, 2020. 2. aktual. a dopl. vyd. Praha: Maxdorf, 2020, s. 185–191. ISBN 978-80-7345-651-1.)

1.1.5. Příloha 5..... 43

(Žáčková D. Chronická myeloidní leukemie – je možné léčbu ukončit? *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2020;22(1):36-45. ISSN 1212-4184.)

3.6.1. Příloha 6..... 68

(Pravidelný roční analytický výstup z databáze INFINITY pro všechna zúčastněná centra vytvořený k 5. 8. 2020.)

3.6.2. Příloha 7..... 78

(Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, Castagnetti F, Di Raimondo F, Casado LF, Turkina A, Zackova D, Ossenkoppelle G, Zaritskey A, Höglund M, Simonsson B, Indrak K, Sninska Z, Sacha T, Clark R, Bogdanovic A, Hellmann A, Griskevicius L, Schubert-Fritschle G, Sertic D, Guilhot J, Lejniece S, Zupan I, Burgstaller S, Koskenvesa P, Everaus H, Costeas P, Lindoerfer D, Rosti G, Saussele S, Hochhaus A, Hehlmann R. Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry. *Leukemia*. 2017; 31(3):593-601.)

4.4.1. Příloha 8..... 102

(Zackova D, Klamova H, Dusek L, Muzik J, Polakova KM, Moravcova J, Jurcek T, Dvorakova D, Racil Z, Pospisil Z, Oltova A, Michalova K, Brezinova J, Razga F, Doubek M, Cetkovsky P, Trneny M, Mayer J. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials? *Am J Hematol*. 2011;86(3):318-321.)

4.4.2. Příloha 9..... 108

(Pavlik T, Janousova E, Mayer J, Indrak K, Jarosova M, Klamova H, Zackova D, Voglova J, Faber E, Karas M, Machova Polakova K, Racil Z, Demeckova E, Demitrovicova L, Tothova E, Chudej J, Markuljak I, Cmunt E, Kozak T, Muzik J, Dusek L. Current survival measures reliably reflect modern sequential treatment in CML: correlation with prognostic stratifications. *Am J Hematol*. 2013; 88(9):790-797.)

4.4.3. Příloha 10..... 117

(Zackova D, Klamova H, Muzik J, Cmunt E, Racil Z, Machova Polakova K, Dvořáková D, Jurcek T, Razga F, Cetkovsky P, Dusek L, Mayer J. Efficacy and tolerance of dasatinib after imatinib failure or intolerance for patients with chronic myeloid leukemia treated in three different hospitals compare well with results achievable in formal clinical trials. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(10):2310-2313.)

4.4.4. Příloha 11..... 122

(Zackova D., Klamova H., Belohlavkova P., Stejskal L., Necasova T., Semerad L., Weinbergerova B., Srbova D., Voglova J., Cicatkova P., Sustkova Z., Hornak T., Baranova J., Prochazkova J., Mayer J. Dasatinib Treatment Long-Term Results among Imatinib-Resistant/Intolerant Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia are Favourable in Daily Clinical Practice. *Leuk Lymphoma*. 2020; 6:1-9. doi: 10.1080/10428194.2020.1827242. Epub ahead of print. PMID: 33021423.)

5.7.1. Příloha 12..... 150

(Racil Z, Razga F, Buresova L, Jurcek T, Dvorakova D, Zackova D, Timilsina S, Cetkovsky P, Mayer J. The assessment of human organic cation transporter 1 (hOCT1) mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia is affected by the proportion of different cells types in the analyzed cell population. *Am J Hematol*. 2010; 85(7):525-528.)

5.7.2. Příloha 13..... 155

(Racil Z, Razga F, Polakova KM, Buresova L, Polivkova V, Dvorakova D, Zackova D, Klamova H, Cetkovsky P, Mayer J. Assessment of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) mRNA expression in patients with de novo chronic myelogenous leukemia: the role of different cell types. *Leuk Lymphoma*. 2011; 52(2):331-334.)

5.7.3. Příloha 14..... 160

(Racil Z, Razga F, Klamova H, Voglova J, Belohlavkova P, Malaskova L, Potesil D, Muzik J, Zackova D, Polakova KM, Zdrahal Z, Malakova J, Suttnar J, Dyr J, Mayer J. No clinical evidence for performing trough plasma and intracellular imatinib concentrations monitoring in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Hematol Oncol*. 2014;32(2):87-93.)

5.7.4. Příloha 15..... 168

(Romzova M., Smitalova D, Tom N., Jurcek T., Culen M., Zackova D., Mayer J., Racil Z. Novel Illumina-based next generation sequencing approach with one-round amplification provides early and reliable detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol*. 2020;189(3):469-474.)

5.7.5. Příloha 16..... 175

(Culen M, Borsky M, Nemethova V, Razga F, Smejkal J, Jurcek T, Dvorakova D, Zackova D, Weinbergerova B, Semerad L, Sadovnik I, Eisenwort G, Herrmann H, Valent P, Mayer J, Racil Z. Quantitative assessment of the CD26+ leukemic stem cell compartment in chronic myeloid leukemia: patient-subgroups, prognostic impact, and technical aspects. *Oncotarget*. 2016;7(22):33016-33024.)

5.7.6. Příloha 17..... 185

(Gregor T, Bosakova MK, Nita A, Abraham SP, Fafilek B, Cernohorsky NH, Rynes J, Foldynova-Trantirkova S, Zackova D, Mayer J, Trantirek L, Krejci P. Elucidation of protein interactions necessary for the maintenance of the BCR-ABL signaling complex. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(19):3885-3903.)

5.7.7. Příloha 18..... 205

(Racil Z, Razga F, Drapalova J, Buresova L, Zackova D, Palackova M, Semerad L, Malaskova L, Haluzik M, Mayer J. Mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2013;98(10):e124-6.)

5.7.8. Příloha 19..... 209

(Racil Z, Koritakova E, Sacha T, Klamova H, Belohlavkova P, Faber E, Rea D, Malaskova L, Prochazkova J, Zackova D, Voglova J, Wąclaw J, Cetkovsky P, Zak P, Mayer J. Insulin resistance is an underlying mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy. *Am J Hematol*. 2018;93(10):E342-E345.)

5.7.9. Příloha 20..... 214

(Horňák T, Semerád L, Žáčková D, Weinbergerová B, Šustková Z, Procházková J, Bělohlávková P, Stejskal L, Rohoň P, Faber E, Žák P, Mayer J, Ráčil Z. Analysis of serum lipids, cardiovascular risk, and indication for statin use during nilotinib and imatinib therapy in de novo CML patients - results from real-life prospective study. *Leuk Lymphoma*. 2020;61(2):494-496.)

6.3.1. Příloha 21..... 227

(Žáčková D. *Chronická myeloidní leukemie – informace pro pacienty a jejich blízké*. Brno: Česká leukemická skupina – pro život (CELL), 1. vyd., 2012. ISBN 978-80-260-1828-5.)

6.3.2. Příloha 22..... 269

(Program světového summitu zástupců podpůrných organizací pro pacienty s CML „CML Horizons 2016“, konaného ve slovinské Ljubljani ve dnech 6. – 8. 5. 2016, doplněný o výňatek z reportu, týkajícího se sdělení uchazečky: Zackova D. „Switching the TKI therapy in suboptimal response and intolerance: What to take when?“ a Zackova D. „CML in elderly: The challenge of co-morbidities and cardiovascular predispositions on choice of therapy“.)

6.3.3. Příloha 23..... 274

(Saglio G, Sharf G, Almeida A, Bogdanovic A, Bombaci F, Čugurović J, Deekes N, Garcia-Gutiérrez V, de Jong J, Narbutas Š, Westerweel P, Zackova D. Considerations for Treatment-free Remission in Patients With Chronic Myeloid Leukemia: A Joint Patient Physician Perspective. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(6):375-379.)