

ONLINE



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2021

POST-ASH

*KAM NÁS POSOUVÁ TO NEJLEPŠÍ Z LOŇSKÉ
SVĚTOVÉ HEMATOLOGIE*

28.–29. 1. 2021

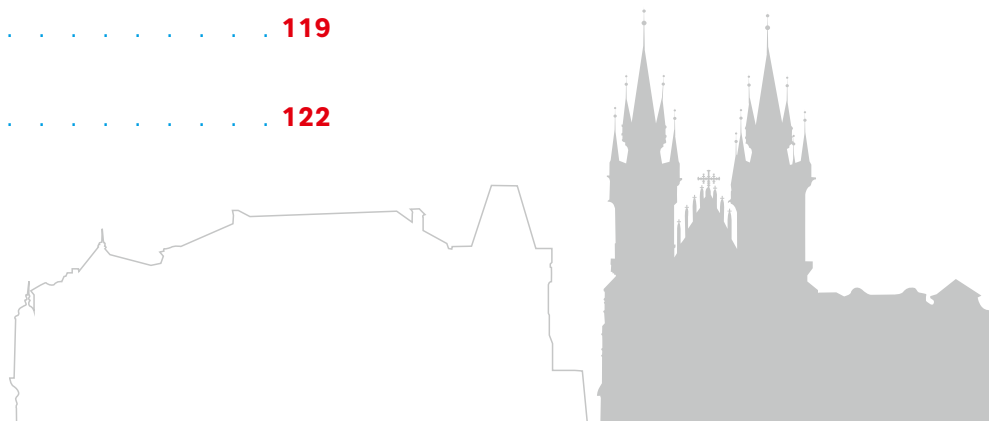
Clarion Congress Hotel Prague
(Freyova 33, Praha 9 – Vysočany)

**PROGRAM KONFERENCE
A SBORNÍK ABSTRAKTŮ**





OBSAH	2
ÚVODNÍ SLOVO	3
DŮLEŽITÉ INFORMACE	4
SCHÉMA ODBORNÉHO PROGRAMU	6
PODROBNÝ PROGRAM KONFERENCE	7
POSTEROVÁ SEKCE	11
OŠETŘOVATELSKÝ PROGRAM	16
SATELITNÍ SYMPOZIA	18
SBORNÍK ABSTRAKTŮ	25
ABECEDNÍ REJSTŘÍK AUTORŮ	119
PŘEHLED PARTNERŮ A VYSTAVOVATELŮ	122





Vážené kolegyně, vážení kolegové, milí hosté 21. pražských hematologických dnů-HEMATOLOGIE 2021,

Ioni jsme na 20. pražských hematologických dnech zahájili novou tradici, kterou účastníci velmi přivítali: uspořádat konferenci na začátku roku a reflektovat při nich to nejlepší, co se v našem oboru odehrálo na loňských světových kongresech. Jsou to především ASH a EHA, ale i více specializované konference. I když celý loňský rok poznamenala pandemie, bylo nám celou dobu jasné, že úspěšnou tradici nesmíme přerušit. Optimisté v našich řadách doufali, že se podaří uspořádat konferenci v klasickém formátu, nicméně připravovali jsme paralelně všechny varianty. Nakonec zvítězila varianta výhradně online. Podobně jako našim dětem chybí interakce se spolužáky, i my budeme postrádat milá setkání s kolegy, hovory ve frontě na kávu, diskusi v přednáškových sálech i chutný štrůdl v hotelu Clarion.

Na co se ale těšit můžete: z pohodlí domova, kanceláře či lékařského pokoje se můžete připojit, nemusíte platit registrační poplatky a uslyšíte kvalitní edukační i původní přednášky. Postery si můžete prohlédnout, kdy se Vám to bude hodit a navíc můžete využít posterovou sekci. Při ní uvidíte kratičké prezentace autorů, my coby moderátoři se budeme snažit rozproudit diskusi a upozornit všechny na výsledky, které nás zaujaly. Pro všechny přednášky a sdělení platí, že je budeme vysílat buď ze studia z Clarionu nebo z prostředí, které si zvolí přednášející.

Rozhodli jsme se část odborného programu věnovat tomu, co nás od roku 2020 obklopuje. Sdělení na covidová témata nemají za cíl opakovat zpravodajství hlavních serverů a způsobit mezi účastníky vegetativní reakci, ale prezentovat ověřené poznatky z oblasti imunologie infekce a v ošetrovatelském bloku předat praktické informace, které Vám pomohou při každodenní práci nejen s pacienty s COVIDem.

Očekáváme vysoký počet účastníků, takže autoři přednášek se mohou těšit na široké obecenstvo a odpovídající diskusi. Děkujeme firmám za účast a podporu a těšíme se, že připraví kvalitní sympozia.

Milí kolegové, těšíme se na setkání s Vámi, byť virtuální a doufáme, že Vás 21. pražské hematologické dny - HEMATOLOGIE 2021 zaujmou.

Ondřej Hrušák
předseda organizačního a vědeckého výboru

Marek Trněný
prezident



TERMÍN KONÁNÍ ONLINE KONFERENCE

28. – 29. 1. 2021

Online verzi, prosíme, sledujte ve dnech 28. – 29. 1. 2021 na: www.phd.cz

ve dnech a časech:

čtvrtek	28. 1. 2021	11.00 – 19.00 hodin
pátek	29. 1. 2021	11.15 – 15.45 hodin



Záznam všech přednášek z konference bude dostupný pro všechny registrované účastníky na webu akce od 10. 2. 2021 až po dobu 3 měsíců.

REGISTRACE

Online sledování je pro všechny účastníky ZDARMA, po provedené registraci.

Registrační formulář je k dispozici online na webových stránkách konference.

Po odeslání registračního formuláře se objeví potvrzení, že registrace byla v pořádku odeslána a po několika minutách obdržíte potvrzení o Vaší registraci.

Jako vstupní přihlašovací kód do online vysílání, prosíme, zadejte e-mailovou adresu zadanou při registraci.

V případě problémů s přihlášením nás neváhejte kontaktovat na bilkova@meritis.cz nebo tel. číslo: +420 739 571 536.

CERTIFIKÁTY

Akreditovaná akce systému celoživotního vzdělávání je garantována ČLK a ohodnocena kreditními body.

Vzdělávací akce je pořádána dle Stavovského předpisu ČLK č. 16.

Konference je určena pro odbornou veřejnost.

Certifikáty budou zaslány elektronicky 14 dní po skončení konference všem registrovaným účastníkům, kteří sledovali ONLINE přenos.



**SPOLEK ČESKÝCH LÉKAŘŮ
V PRAZE ČLS JEP**

pod záštitou:

České hematologické společnosti ČLS JEP

České společnosti pro trombózu
a hemostázu ČLS JEP

ve spolupráci s:

I. interní klinikou - klinikou hematologie
VFN a 1. lékařské fakulty UK v Praze

Ústavem hematologie a krevní transfuze

Klinikou dětské hematologie a onkologie
FN Motol a 2. lékařské fakulty UK v Praze

Hematologickou klinikou FN Královské
Vinohrady a 3. lékařské fakulty UK v Praze

Prezident konference:

Marek Trněný

Emeritní prezident:

Pavel Klener

**Předseda organizačního
a vědeckého výboru:**

Ondřej Hrušák

**Organizační a vědecký výbor,
členové:**

Petr Cetkovský
Jaroslav Čermák
Jan Evangelista Dyr †
Anna Jonášová
Pavel Klener jr.
Tomáš Kozák
Peter Salaj
Jan Starý
Tomáš Stopka
Jan Trka

Garanti ošetrovatelského programu:

Darja Hrabánková
Lucie Vylitová
Lenka Turková
Jitka Wintnerová

Garanti paliativního bloku:

Klinika paliativní medicíny VFN a 1.LF UK
Tým dětské podpůrné a paliativní péče FN Motol
Tým podpůrné a paliativní péče ÚHK
Kateřina Rusinová
Lucie Hrdličková
Michal Kouba





SCHÉMA ODBORNÉHO PROGRAMU

čtvrtek 28. 1. 2021

11:00

12:00

13:00

14:00

15:00

16:00

17:00

18:00

19:00

SEKCE 1

11:00

Zahájení
konference

SEKCE 2

pátek 29. 1. 2021

SEKCE 1

SEKCE 2

15:45

Zakončení
konference

Legenda:

EDUKAČNÍ PROGRAM

PŘEDNÁŠKOVÁ SDĚLENÍ

SATELITNÍ SYMPOZIA

OŠETŘOVATELSKÝ PROGRAM

POSTEROVÁ SEKCE

**čtvrtek 28. 1. 2021**

čas	SEKCE 1
11:15 - 12:00	Satelitní sympozia (více na straně 19)
12:00 - 13:00	Satelitní sympozia (více na straně 20)
13:00 - 14:30	Odborný program - Blok I <i>Předsedající: Zuna J. (Praha)</i>
13:00 - 13:20	E01 Ph-negativní chronická myeloproliferativní onemocnění a chronická myeloidní leukemie na ASH 2020 <i>Faber E. (Olomouc)</i>
13:20 - 13:35	O01 Major molecular response is the threshold for NGS analysis and resistant BCR-ABL1 mutation detection in CML <i>Machová Poláková K. (Praha) a spol.</i>
13:35 - 13:55	E02 Anémie ve stáří a klonální hematopoéza <i>Čermák J. (Praha)</i>
13:55 - 14:10	O02 Diagnostic yield of bronchoalveolar lavage (BAL) in haematological patients - single centre 14 years experience <i>Palacková M. (Brno) a spol.</i>
14:10 - 14:30	E03 Trombóza a hemostáza ve světle aktuálních poznatků <i>Penka M. (Brno)</i>

čas	SEKCE 2
11:15 - 12:00	Satelitní sympozia (více na straně 19)
12:00 - 13:00	Satelitní sympozia (více na straně 20)
13:00 - 14:30	Odborný program - Blok IV <i>Předsedající: Cetkovský P. (Praha)</i>
13:00 - 13:20	E07 Myelom - přehled z ASH 2020 <i>Špička I. (Praha)</i>
13:20 - 13:35	O03 Identification of novel regulatory pathway for immunoglobulin production provides rational treatment for bortezomib-resistant multiple myeloma patients - OCENĚNÁ SDĚLENÍ MLADÝCH HEMATOLOGŮ <i>Šimíček M. (Ostrava) a spol.</i>
13:35 - 13:50	O04 miR-29 Influences CD40 Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): An Axis Affected by BCR Inhibitors <i>Mráz M. (Brno) a spol.</i>
13:50 - 14:05	O05 Single-Cell Profiling of Signal Transduction Pathways in pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia by Mass Cytometry: Dissecting JAK/STAT and PI3K/Akt/mTOR Active Signalling - OCENĚNÁ SDĚLENÍ MLADÝCH HEMATOLOGŮ <i>Kužlíková D. (Praha) a spol.</i>
14:05 - 14:25	E08 CAR buněčná terapie v léčbě lymfoidních malignit <i>Pytlík R. (Praha)</i>



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

ONLINE

PODROBNÝ PROGRAM KONFERENCE

8

čtvrtek 28. 1. 2021

čas	SEKCE 1	SEKCE 2
14:30–15:55	SLAVNOSTNÍ ZAHÁJENÍ KONFERENCE	
14:30 - 14:45	Zahájení konference	
14:45 - 15:15	<u>Neuwirtova přednáška:</u> Problematika poruch hemokoagulace v České republice Dyr J. E. (Praha) Kotlín R., Štikarová J. (Praha)	
15:15 - 15:45	<u>Heřmanského přednáška:</u> Pokrok v léčbě leukémie u dětí v novém tisíciletí Starý J. (Praha)	

**čtvrtek 28. 1. 2021**

čas

SEKCE 1

16:00 – 17:30

Odborný program - Blok II*Předsedající: Trka J. (Praha)*

16:00 - 16:15

Integration of COO into the clinical CNS International Prognostic Index improves CNS relapse prediction in DLBCL

- oceněná práce ČHS

Klánová Zikmundová M. (Praha)

16:15 - 16:30

Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia

- oceněná práce ČHS

Žaliová M. (Praha)

16:30 - 16:50

E04 Imunologie COVID-19 a péče o hematologické pacienty*Hrušák O. (Praha)*

16:50 - 17:10

E05 Paliativní medicína na ASH: 62th Annual Meeting*Rusinová K. (Praha)*

17:10 - 17:30

E06 Pediatrie na ASH 2020*Pospíšilová D. (Olomouc)*

17:35 – 19:00

Posterová sekce*Moderují: Hrušák O. (Praha), Trka J. (Praha)***SAVE THE DATE!**

SRDEČNĚ VÁS ZVEME NA

**22. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY
HEMATOLOGIE 2022 - POST-ASH****20. - 21. 1. 2022**

**pátek 29. 1. 2021**

čas	SEKCE 1
11:15 - 12:00	Satelitní symposia (více na straně 21)
12:00 - 12:45	Satelitní symposia (více na straně 22)
12:45 - 13:30	Satelitní symposia (více na straně 23)
13:30 - 15:00	Odborný program - Blok III <i>Předsedající: Trněný M. (Praha)</i>
13:30 - 13:50	E09 Non-Hodgkinovy lymfomy <i>Janíková A. (Brno)</i>
13:50 - 14:05	O06 Targeting anti-apoptotic MCL1 protein with S63845 is highly effective in aggressive B-cell Non-Hodgkin lymphomas with non-expression of BCL2 <i>Klánová M. (Praha) a spol.</i>
14:05 - 14:20	O07 Bayesian Network Modelling As a New Tool in Predicting of the Early Progression of Disease in Follicular Lymphoma Patients <i>Procházka V. (Olomouc) a spol.</i>
14:20 - 14:40	E10 Aktuální trendy v diagnostice a léčbě Hodgkinova lymfomu <i>Móciková H. (Praha)</i>
14:40 - 15:00	E11 Novinky v biologii CLL a mechanismech cílené léčby <i>Mráz M. (Brno)</i>
15:00 - 15:45	Satelitní symposium (více na straně 24)
15:45	Zakončení konference

čas	SEKCE 2
11:15 - 12:00	Satelitní symposia (více na straně 21)
12:00 - 12:45	Satelitní symposia (více na straně 22)
12:45 - 13:30	Satelitní symposia (více na straně 23)
13:30 - 15:00	Odborný program - Blok V <i>Předsedající: Kozák T. (Praha)</i>
13:30 - 13:50	E12 Transplantace kmenových buněk krvetvorby u dětí s akutní lymfatickou leukémií, po 50 letech už víme kdy a jak? <i>Sedláček P. (Praha)</i>
13:50 - 14:05	O08 In vitro and in vivo preclinical models for testing new therapies for AZACITIDINE-RESISTANT MDS/AML <i>Stopka T. (Praha) a spol.</i>
14:05 - 14:25	E13 Akutní myeloidní leukémie na 62. ASH Annual Meeting and Exposition <i>Ráčil Z. (Praha)</i>
14:25 - 14:40	O09 Randomized open-labeled academic trial comparing 'G-CSF PRIOR AZA' with standard AZA THERAPY in high risk MDS patients <i>Stopka T. (Praha) a spol.</i>
14:40 - 14:55	O10 MethScore as a New Prognostic Tool for Complex DNA Methylation Changes Assessment in Patients with Acute Myeloid Leukemia <i>Šestáková Š. (Praha) a spol.</i>



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

ONLINE

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

11

POSTEROVÁ SEKCE



P01

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MECHANISMS RESPONSIBLE FOR THE DEVELOPMENT OF EXTRAMEDULLARY DISEASE IN MYELOMA AND POTENTIAL NOVEL THERAPEUTIC TARGETS USING TRANSCRIPTOMIC AND EXOME PROFILING

Žihala D. (Ostrava) a spol.

P02

A PHASE Ib, OPEN-LABEL, RANDOMIZED STUDY TO ASSESS SAFETY AND PRELIMINARY EFFICACY OF TAFASITAMAB (MOR208) OR TAFASITAMAB + LENALIDOMIDE IN ADDITION TO R-CHOP IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA: ANALYSIS OF THE SAFETY RUN-IN PHASE

Belada D. (Hradec Králové) a spol.

P03

CLONAL HEMATOPOIESIS WITH SOMATIC MUTATIONS IN „AYA“ GENERATION OF PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Koblihová J. (Praha) a spol.

P04

ANTI-ANGIOGENIC THERAPY WITH BEVACIZUMAB IS EFFECTIVE IN VIVO IN IBRUTINIB-RESISTANT MANTLE CELL LYMPHOMA

Vočková P. (Praha) a spol.

P05

LIMITED EFFICACY OF DARATUMUMAB IN MULTIPLE MYELOMA WITH EXTRAMEDULLARY DISEASE

Jelínek T. (Ostrava) a spol.

P06

HOW TO TREAT ELDERLY PATIENTS OVER 80 YEARS WITH DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA: ALL BENEFIT FROM RITUXIMAB AND SELECTED ONES FROM R-CHOP

Vodička P. (Praha) a spol.

P07

DO NOT WASTE THE DATA: A PIPELINE FOR EVALUATION OF BCR-ABL1 KINASE DOMAIN MUTATION USING INDIVIDUAL THRESHOLDS

Benešová A. (Praha) a spol.

P08

PROTON RADIOTHERAPY FOR MEDIASTINAL HODGKIN LYMPHOMA: THEORETICAL BACKGROUND AND CLINICAL EXPERIENCE

Dědečková K. (Praha) a spol.

P09

IDENTIFICATION OF PML-RARA, CBFB-MYH11 AND RUNX1-RUNX1T1 GENOMIC FUSION SEQUENCES IS FEASIBLE AND ENABLES NAMBIGUOUSLY INTERPRETABLE AND SENSITIVE MONITORING OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE

Lukeš J. (Praha) a spol.

P10

DYNAMIC CHANGES OF INHIBITORY KILLER-IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS ON NK CELLS AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION: AN INITIAL STUDY

Jindra P. (Plzeň) a spol.



P11

**ACTIVE THROMBIN BOUND TO D-DIMERS AND ITS VALUE:
NEW APPROACH TO DIAGNOSIS OF THROMBOSIS?**

Štikarová J. (Praha) a spol.

P12

**SURVEY OF TRANSPLANT ASSOCIATED MACROPHAGE
ACTIVATION SYNDROME (TAMAS) FOLLOWING ALLOGENEIC
HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN
CHILDREN AND YOUNG ADULTS**

Sedláček P. (Praha) a spol.

P13

**STORAGE OF UV LIGHT AND RIBOFLAVIN TREATED RBC
AFTER CRYOPRESERVATION AND RECONSTITUTION IN AS-3
ADDITIVE SOLUTION**

Kutac D. (Praha) a spol.

P14

**MUTUAL COMPETITION BETWEEN IMATINIB AND CARNITINE
INTAKE THROUGH THE OCTN2 TRANSPORTER IN CML
AND MUSCULAR CELLS**

Burda P. (Praha)

P15

**ATYPICAL DELETIONS OF THE LONG ARM OF CHROMOSOME
5 WITH RETAINED COMMONLY DELETED REGIONS (CDR) IN
MDS**

Zemanova Z. (Praha) a spol.

P16

**INDIVIDUAL MOLECULAR RESPONSE EVALUATION ON
BOTH DNA AND mRNA BCR-ABL1 LEVEL DIMINISHED
DIFFERENCES IN TIME TO MOLECULAR RESPONSE
ACHIEVEMENT BETWEEN CML PATIENTS WITH e13a2 vs
e14a2 TRANSCRIPT TYPE**

Machová Poláková K. (Praha) a spol.

P17

**THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF MINIMAL RESIDUAL
DISEASE MONITORING BY WT1 GENE EXPRESSION IN
PERIPHERAL BLOOD BEFORE AND AFTER ALLOGENEIC STEM
CELL TRANSPLANTATION IN AML PATIENTS**

Válková V., Vydra J. (Praha) a spol.

P18

**ANALYSIS OF CMV REACTIVATION RISK AFTER T CELL
REPLETE HAPLOIDENTICAL AND MATCHED DONOR
ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION**

Čemusová B., Vydra J. (Praha) a spol.

P19

**RARE TRANSLOCATIONS IN BONE MARROW CELLS OF
PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML)**

Ransdorfová Š. (Praha) a spol.

P20

**LncRNA PROFILING REVEALS THAT THE DEREGULATION OF
H19, WT1-AS, TCL6, AND LEF1-AS1 IS ASSOCIATED WITH
HIGHER-RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROME**

Dostálová Merkerová M. (Praha) a spol.



P21

LABORATORY DIAGNOSTICS OF 21 UNRELATED FAMILIES FROM CZECH REPUBLIC WITH DYSFIBRINOGENEMIA AND HYPOFIBRINOGENEMIA

Ceznerová E. (Praha) a spol.

P22

KINETICS OF BONE MARROW BLASTS AND USEFULNESS OF DAY 14 AND DAY 21 ASSESSMENT DURING INDUCTION OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Ráčil Z. (Praha) a spol.

P23

REZISTENCE NA IMATINIB U CML LINIE K562: EXOSOMY Z REZISTENTNÍCH BUNĚK NESOU SPECIFICKÉ MEMBRÁNOVÉ MARKERY A POMÁHAJÍ PŘEŽÍT SENZITIVNÍM BUŇKÁM

Toman O. (Praha) s spol.

P24

NELFINAVIR INHIBITS THE TCF11/Nrf1-MEDIATED PROTEASOME RECOVERY PATHWAY IN MULTIPLE MYELOMA

Fassmannová D. (Praha) a spol.

P25

CAPTURE-BASED NGS PANEL FOR DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN AND T-CELL RECEPTOR GENE REARRANGEMENTS IN DNA SAMPLES FROM PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Jelínková H. (Brno) a spol.

P26

FUNCTIONAL ANALYSIS OF NEW VARIANT GP1BA GENE IN INHERITED MACROTROMBOCYTOPENIA

Skalníková M. (Brno) s spol.

P27

HBV AND HCV EPIDEMIOLOGY AMONG NEWLY DIAGNOSED NHL PATIENTS IN REAL WORLD ANALYSIS (NIHIL)

Dlouhá L. (Praha) a spol.

P28

SOMATIC MUTATIONS IN HLA-loci IN PATIENTS WITH MYELOID LEUKEMIA

Půbalová Š. (Praha) a spol.

P29

SÉROVÉ HLADINY VYBRANÝCH CYTOKINŮ U AKUTNÍ LYMFOLASTICKÉ LEUKEMIE DOSPĚLÝCH A JEJICH SOUVISLOST S PROGNOSTICKÝMI FAKTORY A PŘEŽITÍM

Horáček J.M. (Hradec Králové) a spol.

P30

SEARCHING FOR OTHER TOPICS OF QUALIFICATION PLANS IN THE TRANSPLANT PROGRAM CLINICAL PART - THE ONE CENTER EXPERIENCE

Dobrovolná M. (Praha) a spol.

P31

IMPACT OF FIBRINOGEN POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS ON ITS STRUCTURE AND FUNCTION

Sovová Ž. (Praha) a spol.



P32

**SÉROVÉ HLADINY VYBRANÝCH CYTOKINŮ A SOLUBILNÍCH
ADHEZNÍCH MOLEKUL U NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÉ
AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE: SOLUBILNÍ RECEPTOR PRO
INTERLEUKIN-2 JE PREDIKTOREM CELKOVÉHO PŘEŽITÍ**

Kupsa T. (Hradec Králové) a spol.

P33

**VLIV POUŽITÉ METODY IZOLACE DNA NA VÝSLEDNOU
KVANTIFIKACI PRO MONITOROVÁNÍ BUNĚČNÉHO
CHIMERISMU**

Josefusová K. (Praha) a spol.



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

ONLINE

16

OŠETŘOVATELSKÝ PROGRAM

**Čtvrtek 28.1.2021****SEKCE 2**

17:30 - 19:00

Ošetřovatelský program – Ošetřovatelství v COVID-19 éře*Předsedající: Hrabánková D. (Praha)*

17:30 - 17:45

Trojánek M. (Praha):

Nový koronavirus SARS-COV-2 a onemocnění COVID-19

17:45 - 18:00

Jonášová A. (Praha):

COVID-19 a myeloidní nádory

18:00 - 18:15

Kořen J. (Praha):

COVID-19 a lymfomy

18:15 - 18:30

Sedlák F. (Praha):

COVID-19 a mnohočetný myelom

18:30 - 18:45

Klatovská M. (Praha):

"Sestra v akci" covidového centra intenzivní péče

18:45 - 19:00

Feberová P. (Praha)

"Sestra v akci" covidového centra lůžkové péče



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

ONLINE

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

18

SATELITNÍ SYMPOZIA



ČTVRTEK 28. 1. 2021 – SEKCE 1



11:15-12:00 SEKCE 1

HEMLIBRA® DATA VS KLINICKÁ PRAXE V ČESKÉ REPUBLICCE

**KORESPONDUJÍ DATA Z LITERATURY
S NAŠÍ KLINICKOU PRAXÍ U DOSPĚLÝCH
PACIENTŮ S PROFYLAXÍ HEMLIBRA®?**

MUDr. Petr Smejkal, Ph.D.

CO ZAZNĚLO NA ASH 2020 K EMICIZUMABU A KAZUISTIKY PACIENTŮ Z ÚHKT PRAHA

MUDr. Věra Geierová

HEMLIBRA® - STARŠÍ A NOVÁ DATA VE VZTAHU K NAŠIM ZKUŠENOSTEM S LÉČBOU U DĚTSKÝCH PACIENTŮ

MUDr. Ester Zápotocká

ČTVRTEK 28. 1. 2021 – SEKCE 2



11:15-12:00 SEKCE 2

ZKUŠENOSTI S PŘÍPRAVKEM YESCARTA V ČESKÉ REPUBLICCE LÉČEBNÉ MOŽNOSTI U PACIENTŮ S LYMFOMEM Z PLÁŠŤOVÝCH BUNĚK (MCL)

**PŘEHLED PACIENTŮ LÉČENÝCH CAR-T
A KAZUISTIKY VYBRANÝCH PACIENTŮ
LÉČENÝCH PŘÍPRAVKEM YESCARTA**

MUDr. František Folber, Ph.D.

MCL - EPIDEMIOLOGIE, SOUČASNÉ A BUDOUCÍ LÉČEBNÉ MOŽNOSTI

Doc. MUDr. Andrea Janíková, Ph.D.



ČTVRTEK 28. 1. 2021 – SEKCE 1



12:00-13:00 SEKCE 1

ÚVODNÍ SLOVO PŘEDSEDAJÍCÍHO SYMPOZIA

Prof. MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D.

KDY ZAHÁJIT LÉČBU 2. LINIE IMUNITNÍ TROMBOCYTOPENIE?

MUDr. Eva Konířová

*(1. interní klinika — klinika hematologie 1. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze)*

CAR-T V LÉČBĚ LYMFOMŮ: KONFRONTACE KLINICKÝCH STUDIÍ S REALITOU

MUDr. Robert Pytlík, Ph.D.

(Ústav hematologie a krevní transfuze Praha)

LÉČBA AML V ROCE 2021

Prof. MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D.

(Ústav hematologie a krevní transfuze Praha)

ČTVRTEK 28. 1. 2021 – SEKCE 2



12:00-13:00 SEKCE 2

VENCLYXTO™: NOVÉ OTÁZKY A ODPOVĚDI

Uvádí prof. MUDr. Michael Doubek, Ph.D.

BCL-2: ATRAKTIVNÍ LÉČEBNÝ CÍL

Doc. MUDr. Pavel Klener, Ph.D.

PŘEDNOSTI ČASOVĚ OMEZENÉ TERAPIE A HLUBOKÝCH LÉČEBNÝCH ODPOVĚDÍ

Prof. MUDr. Michael Doubek, Ph.D.

KTERÉ FAKTORY VSTUPUJÍ DO ROZHODOVÁNÍ PŘI VÝBĚRU CÍLENÉ TERAPIE?

Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.



PÁTEK 29. 1. 2021 – SEKCE 1



11:15-12:00 SEKCE 1

VIRTUÁLNÍ SYMPOZIUM SPOLEČNOSTI TAKEDA: NOVINKY V HEMATOLOGICKÉ A HEMATOONKOLOGICKÉ LÉČBĚ

KDY A JAK LÉČIT SEKUNDÁRNÍ IMUNODEFICIENCE (SID) V HEMATOONKOLOGII

MUDr. Alexandra Jungová, Ph.D.

(Hematologicko - onkologické oddělení, FN Plzeň)

STAV A DIAGNOSTIKA KLOUBŮ U PACIENTŮ S HEMOFILIÍ - NA KAŽDÉM KRVÁCENÍ ZÁLEŽÍ

Doc. MUDr. Petr Dulíček, Ph.D.

(Vedoucí centra pro trombózu a hemostázu, IV. interní
hematologická klinika, FN a LF Hradec Králové)

BRENTUXIMAB VEDOTIN - 5LETÁ DATA ZE STUDIÍ ECHELON-1 A ECHELON-2

MUDr. Heidi Móciková, Ph.D.

(Oddělení klinické hematologie, FNKV Praha)

PÁTEK 29. 1. 2021 – SEKCE 2



11:15-12:00 SEKCE 2

LÉČBA AKUTNÍCH LEUKÉMIÍ V ÉŘE ADC – CO PŘINÁŠEJÍ DO KLINICKÉ PRAXE

JAK ZMĚNIL GEMTUZUMAB OZOGAMICIN NÁŠ PŘÍSTUP K LÉČBĚ PACIENTŮ S AML

Prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc.

(Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno)

PRAKTICKÉ ASPEKTY LÉČBY R/R ALL INOTUZUMABEM OZOGAMICINEM

MUDr. Mgr. Cyril Šálek, Ph.D.

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha 2)



PÁTEK 29. 1. 2021 – SEKCE 1



12:00-12:45 SEKCE 1

IMBRUVICA® – DŮKAZY MÍSTO SLIBŮ LÉČBA PACIENTŮ S CLL

IMBRUVICA® V DOBĚ COVID-19

Prof. MUDr. Michael Doubek, Ph.D.

VOLBA CÍLENÉ TERAPIE PODLOŽENÁ DLOUHODOBÝMI DATY

Prim. MUDr. Martin Špaček, Ph.D.

A CO NA TO KLINICKÁ PRAXE?

MUDr. Martin Šimkovič, Ph.D.

PÁTEK 29. 1. 2021 – SEKCE 2



12:00-12:45 SEKCE 2

JISTOTY I NOVINKY V LÉČBĚ HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

Předsedající: Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc. (VFN Praha)

NOVINKY V MANAGEMENTU MDS

*Doc. MUDr. Anna Jonášová, Ph.D.
(VFN Praha)*

IMiDy V LÉČBĚ MM V ROCE 2021

*MUDr. Petr Pavlíček
(FNKV Praha)*



PÁTEK 29. 1. 2021 – SEKCE 1



12:45-13:30 SEKCE 1

POLIVY – MOŽNOST ÚČINNÉ TERAPIE PACIENTŮ S RELAPSEM DLBCL

Moderátor: Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

CO MŮŽEME NABÍDNOUT PACIENTOVI S RELAPS/REFRAKTERNÍM DLBCL?

Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

JAK PŘISTUPOVAT K VÝBĚRU NEMOCNÝCH S RELAPSEM DIFUZNÍHO B-VELKOBUNĚČNÉHO LYMFOMU NEVHODNÝCH K TRANSPLANTACI PRO KOMBINAČNÍ LÉČBU POLA+BR

Prof. MUDr. Vít Procházka, Ph.D.

SEKVENCE LÉČEBNÝCH MOŽNOSTÍ V TERAPII NEMOCNÝCH S R/R DLBCL

MUDr. David Belada, Ph.D.

PÁTEK 29. 1. 2021 – SEKCE 2



12:45-13:30 SEKCE 2

XOSPATA™ – NOVÁ CÍLENÁ LÉČBA R/R FLT3 + AML

DETEKCE A PROGNOSTICKÝ VÝZNAM FLT3 ITD A TKD MUTACÍ U AML?

*Prof. MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D.
(ÚHKT Praha)*

NOVÁ MOŽNOST V LÉČBĚ RELAPS/REFRAKTERNÍ AML S POZITIVITOU FLT3 MUTACE

*Doc. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.
(IV. Hematologická klinika, FN Hradec Králové)*

PRVNÍ ZKUŠENOSTI S LÉČBOU PŘÍPRAVKEM XOSPATA™ V ČESKÉ REPUBLICE

*MUDr. Barbora Weinbergerová
(Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno)*



PÁTEK 29. 1. 2021 – SEKCE 1



15:00-15:45 SEKCE 1

**AKTUÁLNÍ TÉMATA NAPŘÍČ
HEMATOLOGICKÝMI DIAGNÓZAMI**

Předsedající: Prof. MUDr. Tomáš Kozák Ph.D., MBA

15:00 – 15:15

**STUDIE VS. PRAXE – JAK SI BLINATUMOMAB
STOJÍ V TOMTO SROVNÁNÍ?**

MUDr. Mgr. Cyril Šálek, Ph.D.

15:15 – 15:30

**ROZŠÍŘENÉ MOŽNOSTI LÉČBY PŘÍPRAVKEM
KYPROLIS® (KARFILZOMIB)**

MUDr. Petr Pavlíček

15:30 – 15:45

**ITP A NPLATE® (ROMIPLOSTIM) V
DOBĚ PANDEMIE COVID-19**

MUDr. Eva Konířová



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

ONLINE

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

25

SBORNÍK ABSTRAKTŮ



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

ONLINE

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

26

EDUKAČNÍ PROGRAM (ABSTRAKTY E01 – E13)

**E01****PH-NEGATIVNÍ CHRONICKÁ MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ A CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE NA ASH 2020**

Faber E.

Hemato-onkologická klinika FN Olomouc a LF UP v Olomouci

Na 62. výroční konferenci Americké hematologické společnosti (ASH) bylo přijato do obou zmíněných sekcí celkem 142 sdělení (39 přednášek a 103 posterů) věnovaných chronickým myeloproliferativním onemocněním. Příspěvků věnovaných chronické myeloidní leukemii (CML) bylo o poznání méně než těch, které byly zaměřeny na Ph-negativní chronická myeloproliferativní onemocnění (Ph-CMO). CML byla tématem 4 orálních a 5 posterových sdělení zaměřených experimentálně plus 13 přednášek a 38 posterů věnovaných klinické problematice, zatímco o Ph-CMO pojednávalo 27 experimentálních (9 přednášek a 18 posterů) a 55 klinických (13 přednášek a 42 posterů) příspěvků. Dominovaly zejména zprávy o klinických studiích různé fáze, které přinášely úplně nové nebo nejnovější výsledky zkoumání účinnosti nebo bezpečnosti nových přípravků (idasanutlin, tamoxifen, imetelstat, navitoclax, melotininib a další) a derivátů interferonu u Ph-CMO v různých klinických situacích (po stanovení diagnózy, s rezistencí na standardní léčbu v první nebo dalších liniích a s různým vstupním rizikem nemoci). Mohlo by se zdát, že toto množství abstrakt reflektovalo pouze zvýšenou snahu firem prosadit se v této oblasti s inovativními preparáty, ale opak je pravdou. Odezněly také velmi zajímavé příspěvky s výsledky akademického výzkumu, který na chronická myeloproliferativní onemocnění rozhodně nezapomíná.

Je zajímavé, že tři ze šesti „late-breaking“ souhrnů byly věnovány právě Ph-CMO a CML. Patřil k nim především pravděpodobně nejlepší příspěvek konference vůbec, který přednesla Jyoti Nagalia z Cambridge (1). Jak sama uvedla jejich výzkum se snažil zjistit odpověď na dvě poměrně běžné otázky pacientů: „Jak dlouho trpím tímto onemocněním?“ a „Jak rychle se nemoc vyvíjí?“ Tým z Cambridge si jako model díky klinickým charakteristikám a genetickému profilu vybral právě Ph-CMO s mutací V617F v genu JAK2 nebo

s mutacemi v dalších genech, aby se pokusil odhadnout čas, kdy během života pacienta k „driver“ mutaci došlo a jaká byla následná dynamika klonální expanze. Za tímto účelem prováděl celogenomové sekvenování kolonií odvozených z jednotlivých kmenových buněk ze vzorků, které byly odebrány 10 pacientům ve věku od 20 do 76 let s různými Ph-CMO. Vzorky byly odebrány opakovaně během průběhu sledování a léčby nemocných. Vědci získali 952 vzorků, které následně cíleně resekvenovali. Zachytili přitom 448 553 somatických mutací, které jim umožnili rekonstruovat fylogenetická schémata vývoje hemopoézy a vystopovat jednotlivé linie až do období embryogenézy. Tyto experimenty jim umožnily určit čas, kdy k příslušné mutaci došlo, charakterizovat dynamiku vývoje nádoru a změřit rychlost klonální expanze u individuálních pacientů. V případě mutace JAK2 V617F pozitivních Ph-CMO došlo ke vzniku mutace buď jako k první změně vůbec nebo byla jednou z „řídících“ mutací nemoci. Mutace se podle odhadů experimentátorů objevila od několika týdnů po koncepci (!) až do 11. roku života. K manifestaci nemoci došlo poté s různou latencí – od 20 do 54 (!) let. Další mutace následovaly po první v intervalu dekád. Podobným průběhem se vyznačovala také mutace DNMT3A ať už jako první „driver“ mutace nebo jako druhá událost následující po mutaci JAK2 genu – první až osmý týden gestace až 8. rok života. Vědci dále pozorovali 1,5 až 5,5krát vyšší náklonnost k výskytu podobných genetických změn v různých klonech jednoho pacienta, což ukazovalo na to, že pravděpodobně ke vzniku mutací existují individuální dispozice. Také rychlost klonální expanze byla u jednotlivých pacientů výrazně rozdílná a pohybovala se od méně než 10 % za rok (což v daném případě znamenalo, že klon dosáhl 1% podílu po 30 letech) až po více než 200 % za rok (což představovalo zdvojení hmoty nádoru za 7 měsíců). Rozdíly byly pozorovány i v případě, kdy jedinou „řídící“ mutací byla mutace JAK2 V617F. Rychlost klonální expanze následně determinovala dobu, po níž došlo ke klinické manifestaci onemocnění. Jyoti Nagalia svou fascinující prezentaci ukončila konstatováním, že jejich zjištění vyvolávají potřebu mnohem časnější identifikace a intervence u klonálních poruch hemopoézy. Současně zůstává výzva pro další výzkum identifikovat faktory, které se skrývají za náchylností k mutacím u individuálních pacientů (1).



Identické problematice byl věnován rovněž poster skupiny autorů v čele s Debra Van Egeren, která použila obdobné metodiky ke stejným cílům u 3 pacientů s JAK2 V617F pozitivní esenciální trombocytémií (ET) a 3 dalších pacientů s polycytemia vera (PV) (2). Vědci potvrdili, že mutace JAK2 V617F samotná dokáže iniciovat vznik myeloproliferace. Postižený klon měl před stanovením diagnózy a akvizicí mutace JAK2 delší dobu vlastnosti klonální hemopoiezy nejasného významu (CHIP). Odhadovaný interval mezi vznikem mutace a manifestací onemocnění byl u dvou případů ET 25 a 44 let. Autoři uvažovali o možnostech včasné prevence rozvoje myeloproliferace (2). Provedení studie a také prezentace její výsledků však nebyla zdaleka tak elegantní a přesvědčivá jako v případě projektu skupiny z Cambridge.

Dvě orálně prezentovaná sdělení byla věnovaná patogenezi leukemické transformace Ph-CMO (3,4). V první práci šlo o sérii experimentů využívajících genové editace pomocí systému CRISP/Cas9 na myším modelu. Autoři prokázali v procesu leukemizace účast ztráty genu STK11, který kóduje LKB1 regulující řadu klíčových signálních drah (3). V druhé studii francouzští autoři zjistili asociaci leukemické transformace s mutacemi genu NFE2, u něhož byla před nedávnem na myším modelu prokázána schopnost predisponovat k získání dalších genetických abnormalit (resp. genetické nestabilitě) a k leukemické transformaci (4). Výskyt mutací NFE2 byl hodnocen v retrospektivní studii s 1243 pacienty s Ph-CMO a bylo prokázáno, že mutace NFE2 byly nezávisle asociovány s kratším přežitím bez transformace a kratším celkovým přežitím, zatímco nehrály žádnou roli při rozvoji trombohemoragických komplikací ani při vzniku sekundární fibrózy (4). Pokud budou tyto výsledky potvrzeny, nabízí se možnost zařadit vyšetření mutací NFE2 do iniciačního vyšetření pacientů a přidat tuto mutaci také do schémat pro výpočet molekulárních prognostických indexů.

Z klinického výzkumu byly prezentovány výsledky řady studií fáze II s inovativními molekulami, které mají ambici být registrovány v léčbě Ph-CMO. Obecnou charakteristikou prezentací byly samozřejmě relativně malé skupiny poměrně krátce sledovaných pacientů. U PV byly referovány výsledky studie s idasanutlinem (antagonistou MDM2 vedoucím ke zvýšené aktivitě p53) (5). Zařazeno bylo 27 pacientů, u nichž se procento nemocných s odpovědí

hodnocené po 32 týdnech léčby pohybovalo mezi 60 až 70 %. Přes 40 % pacientů popsalo vyšší než 50% redukci symptomů, hodnocených podle škály po myeloproliferace MPN TSS. K odpovědi docházelo dokonce u pacientů, kteří byli předléčeni ruxolitinibem. Zásadním problémem léku byly nežádoucí účinky, z nichž některé budou asi problémem při potřebě dlouhodobé terapie: došlo ke dvěma závažným epizodám atriálního flutteru a fibrilace, nicméně nejčastěji se vyskytovaly nevolnost a zvracení, které si u nadpoloviční části vynutily pacientů redukci dávky (5). U PV s nezbytností terapeutických venepunkcí a případně i cytoredukce byly dosaženy velmi zajímavé výsledky s mimetikem hepcidinu PTG-300 (6). Úvahu o možné účinnosti této molekuly spočívaly na přítomnosti chronické sideropenie, expanze erytropoézy a supresi hepcidinu u PV, ale také potvrzení efektu PTG-300 na hladiny sérového železa u talasemie, u níž byla ve fázi II studie prokázána také velmi dobrá snášenlivost a bezpečnost této molekuly. Doposud bylo zařazeno 18 pacientů vyžadujících alespoň 3 venepunkce k udržení hematokritu $\leq 0,45$ během posledního půlroku. Lék (aktuálně aplikován po dobu 5 až 54 týdnů) byl velmi dobře tolerován a nevedl k žádným nežádoucím účinkům stupně 3 a více, 90 % nežádoucích reakcí bylo stupně 1. Léčba vedla k poklesu hematokritu a počtu erytrocytů, vzestupu ferritinu a překvapivě i eliminaci potřeby venepunkcí v průběhu půl roku po zahájení terapie. Pacienti popsali významné zlepšení kvality života hodnocené škálou MPN-TSS. Klinická studie s tímto zajímavým lékem nadále pokračuje (6). U myelofibrózy (MF) byly popsány zajímavé výsledky při použití inhibitoru telomerázy imetelstatu u vysoce rizikových pacientů doposud neléčených ruxolitinibem. Výsledky studie fáze II IMbark se dvěma schématy dávkování imetelstatu referoval John Mascarenhas (7). U části nemocných bylo zjištěno zmírnění symptomů a zmenšení splenomegalie, nicméně důležitější bylo zjištění zmírnění dřevňové fibrózy, dosažení cytogenetických odpovědí a poklesu mutační nálože. Příznivě reagující pacienti dosáhli delšího přežití. Molekula by se měla aktuálně dostat do fáze III klinického zkoušení (7). Srdan Verstovsek referoval o dlouhodobých výsledcích studií SIMPLIFY 1 a 2 zkoumajících účinek nového inhibitoru JAK1 a JAK2 momelotinibu u vysoce rizikových pacientů s MF předléčených i nepředléčených ruxolitinibem (8). Maximální doba sledování a léčby 105 ze 137 pacientů, kteří měli



možnost pokračovat v prodloužených protokolech studie dosahovala až 10 let. Mometinib vykázal dlouhodobé účinky se zlepšením přežití, redukcí objemu sleziny a udržení transfuzní nezávislosti (8).

Několik příspěvků bylo věnováno studiím s deriváty interferonu u Ph-CMO, z nichž nelze neuvést projekt PROUD-PV s extenzí CONTINUATION-PV, jehož se účastnila také česká pracoviště (9). Heinz Gisslinger přednášel o pětiletých výsledcích této randomizované studie srovnávající ropeginterferon alfa-2b (RP-INF) s hydroxyureou. Z iniciálně zařazených 257 pacientů randomizovaných v poměru 1:1 pokračovalo v protokolu 95 nemocných léčených RP-INF a 76 hydroxyureou. Tři čtvrtiny pacientů v obou ramenech pokračovali v léčbě i v době této průběžné analýzy. Statisticky významně více zařazených (téměř 82 %) s RP-INF ve srovnání s ramenem s hydroxyureou (63 %) udrželo hematokrit pod 0,45 bez potřeby venesecké při 4,2 a 6,6% riziku závažné tromboembolické příhody. Schopnost RP-INF významně ovlivnit přirozený průběh onemocnění vyplývala ze signifikantně významnější redukce mutační nálože (během 5 let z původních 37,3 % na 7,3 %, zatímco v rameni s hydroxyureou došlo k jejímu zvýšení) a podílu dosažení molekulární odpovědi (69,1 versus 21,6 %). Z pacientů léčených RP-INF pouze u jednoho došlo k progresi do MF, zatímco v rameni s hydroxyureou to byli 2 nemocní a další 2 prodělali leukemickou transformaci. Důležitým faktem bylo také to, že od poslední analýzy nedošlo k novým problémům z hlediska bezpečnosti a snášenlivosti léčby RP-INF (9).

Z prezentovaných experimentálních prací věnovaných CML mě zaujala studie mezinárodního konsorcia vedeného finskými autory v čele se Satu Mustjoki, která se zabývala identifikací imunologických markerů korespondujících nejen s následným úspěšným přerušením léčby inhibitory tyrosinové kinázy (TKI), resp. dosažením remise bez potřeby další terapie (*treatment-free remission*, TFR), ale imunitní odpovědí na CML obecně a cílené reakci na leukemické kmenové buňky (10). Použili k tomu sekvenování RNA a T buněčného receptoru prováděného v jednotlivých buňkách (celkem bylo osekvenováno přes 170 000 buněk!) ve 25 vzorcích od pacientů s CML v různých fázích léčby a po jejím ukončení. Dále se zaměřili na vyšetření specifické odpovědi na nádorový antigen PR1 a následně odpověď na tento antigen srovnali nejen

u CML pacientů a zdravých kontrol, ale i u dalších hematologických a solidních malignit, na neseptovaných populacích buněk. Výsledky experimentů svědčily pro výraznější účast NK buněk v reakci na CML a pro rozdíly v celkové intenzitě imunitní odpovědi u nemocných s úspěšným dosažením TFR ve srovnání s pacienty, u nichž došlo k časným nebo pozdním relapsům. Na leukemických CD34+ kmenových buňkách s nízkou expresí BCR-ABL se jim podařilo z potenciálních kandidátů vytipovat antigen LGALS9, jako ten s nejvyšším potenciálem identifikace imunitním systémem, a to zejména NK buňkami. Naopak na CD34+ buňkách s vysokou aktivitou BCR-ABL autoři zjistili preferenční expresi antigenu PR1, na něj reagovali T lymfocyty se specifickým anti-PR1 receptorem častěji u pacientů s CML než u zdravých kontrol. Pro pacienty s následným úspěšným dosažením TFR byla charakteristická cytotoxická anti-PR1 odpověď při přerušení léčby TKI, zatímco u pacientů s časným relapsem byly anti-PR1 buňky vyčerpány a reagovali méně cytotoxicky. Studie přinesla další významné poznatky v oblasti imunitní reakce proti CML, které budou pravděpodobně použitelné při identifikaci pacientů vhodných k úspěšnému ukončení léčby TKI (10).

Z klinicky zaměřených sdělení byla mezi pozdní přelomové souhrny zařazena prezentace výsledků studie ASCEMBL, studie fáze III srovnávající asciminib (první inhibitor selektivně interagující s myristoylovou kapsou ABL kinázy) a bosutinib u pacientů, u kterých předtím selhala léčba dvěma TKI (11). 233 pacientů bylo randomizováno v poměru 2:1 a pacienti, u nichž selhala léčba bosutinibem mohli podle rozhodnutí investigátora přejít do ramene s asciminibem. Primární výsledky studie k 25. květnu 2020 při mediánu sledování 14,9 měsíce referoval Andreas Hochhaus. K tomuto datu pokračovalo v původní léčbě asciminibem 61,8 % a bosutinibem 30,3 % pacientů, což bylo snad způsobeno iniciální dávkou bosutinibu (500 mg/den), která byla stanovena při zahájení studie. (Dnes je zřejmé, že pacienty je lépe snášená dávka 400 mg.) Nedostatečná účinnost po 6 měsících léčby byla pozorovaná u 10,8 % pacientů na asciminibu a 25 % na bosutinibu. Po 6 měsících léčby také více pacientů dosáhlo nejen velkou a hlubokou molekulární odpověď s asciminibem (25,5 a 10,8 %) než s bosutinibem (13,2 a 5,3 %) ale také kompletní cytogenetickou odpověď (40,8 versus 24,2 %). Pro nežádoucí účinky ukončilo studii



více nemocných na bosutinibu 21,1 % (u asciminibu pouze 5,8 %). Výsledky studie podporují zavedení asciminibu do praxe s indikací u rezistentních nebo netolerujících pacientů doposud léčených alespoň dvěma TKI (11). Byly zveřejněny také další výsledky studií BFORE a OPTIC, které úspěšně řešily optimalizaci dávkování bosutinibu u nově diagnostikovaných pacientů s CML a ponatinibu u nemocných v minulosti léčených minimálně dvěma TKI nebo měli mutaci T315I (12,13). Zatímco bosutinib ve studii fáze III prokázal ve finální pětileté analýze při použití iniciační dávky 400 mg denně ve všech stanovených cílech lepší účinnost než imatinib (12), u ponatinibu byla průběžnou analýzou potvrzena přímá závislost účinku na dávce se současnou bezpečností snížení dávky po dosažení hladiny BCR-ABL transkriptu $\leq 1\%$ a to při poměrně malém zvýšení rizika arteriálních ischemických příhod (13). Japonští autoři prezentovali výsledky studie, jejíž provedení se vždy označovalo jako nepravděpodobné (14). Šlo o prospektivní randomizované srovnání účinnosti dasatinibu a nilotinibu u nově diagnostikovaných pacientů s CML se zaměřením na podíl dosažených hlubokých molekulárních odpovědí, jako výsledku s potenciálem pro následné přerušení léčby v TFR. Podíly dosažených léčebných odpovědí v obou ramenech studie byly fakticky identické a autoři nepopsali ani žádná neočekávaná bezpečnostní rizika. Celkově větší účinnost obou TKI ve srovnání se studiemi provedenými s pacienty v Evropě a Americe vysvětlovali autoři v diskuzi nižší hmotností japonských pacientů (14).

Na obě vybraná témata (Ph-CMO a CML) odezněla řada dalších zajímavých příspěvků, o nichž se bude možné alespoň v krátkosti zmínit při prezentaci. Je nezbytné zdůraznit, že virtuální průběh konference s návštěvami po pracovní době (byť skýtající možnost návratu k prezentacím během následujících dvou týdnů) nelze s variantou vidět vše „naživo“ srovnávat. Doufejme tedy, že pokud ne ještě Pražské hematologické dny, tak 2. hematologický sjezd v Olomouci už bude moci proběhnout v plném rozsahu přímo v kongresovém centru NH hotelu.

Literatura

1. Williams N, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 2): LBA-1.
2. Van Egeren D, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 7-8.

3. Marinaccio C, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 1.
4. Marcault C, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 36.
5. Mascarenhas J, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 29-31.
6. Kremyanskaya M, et al. 2020. Blood 136v (Suppl 1): 33-35.
7. Mascarenhas J, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 39-40.
8. Verstovsek S, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 51-52.
9. Gisslinger H, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 33.
10. Huhtanen J, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 4-5.
11. Hochhaus A, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 2): LBA-4.
12. Brümmendorf TH, et al. Blood 136 (Suppl 1): 41-42.
13. Cortes JE, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 44-45.
14. Matsumura I, et al. 2020. Blood 136 (Suppl 1): 40-41.

E02

ANÉMIE VE STÁŘÍ A KLONÁLNÍ HEMATOPOEZA

Čermák J.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

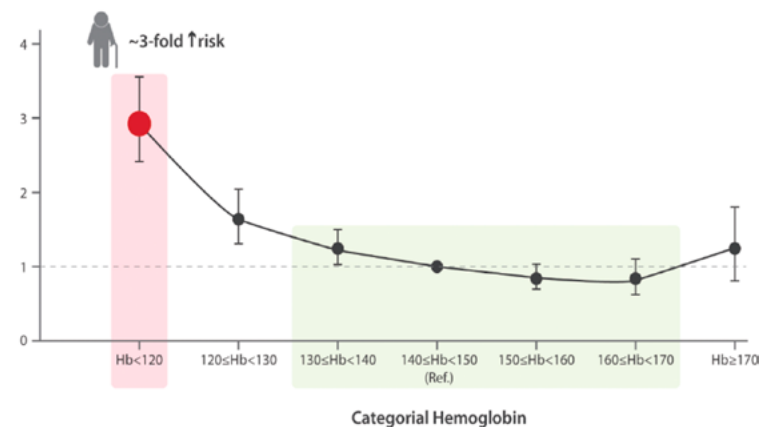
Anémie ve stáří není stále ještě jasně definovanou jednotkou, především se diskutuje, jaká je dolní norma hodnoty hemoglobinu (Hb) vzhledem věku. V současnosti se považuje u nemocných starších 60 let dolní hranice hodnot Hb u mužů mezi 120-135 g/l, u žen pak 115-125 g/l. Anémie stáří se vyskytuje cca u 12% nemocných nad 60 let věku a u 25% nemocných starších 80 let. Nález anémie u starších nemocných není jen náhodným benigním nálezem, ale může být spojen se závažnými důsledky, na Obr. 1 vidíte zvyšující se riziko mortality při poklesu hladiny Hb až na 3x vyšší riziko u mužů při hodnotách Hb < 120 g/l. V současnosti jsou příčiny anémie ve stáří rozděleny do 3 skupin. První skupinu tvoří nutriční deficity (nedostatek železa, vitamínu B12, kyseliny listové), druhou skupinu tvoří anémie při chronickém onemocnění (chronické infekce či záněty), kdy příčinou je sekvestrace železa v makrofázích s následným jeho deficitem pro krve tvorbu díky cytokiny indukované zvýšené sekreci hepcidinu. Třetí skupinu tvoří tzv. nevysvětlené případy. U některých nemoc-



ných může jít o souběh několika komorbidit (40% nemocných starších 80 let má 4 a více komorbidit). Podpůrnými mechanismy mohou být snížená produkce či snížená citlivost na erythropoetin, snížená sekrece androgenů u mužů, deficit vitaminu D a také tzv. chronický lehký zánětlivý stav o nízké aktivitě, u něhož zřejmě dochází k indukci tvorby hepcidinu chronickou zvýšenou hladinou prozánětlivých cytokinů spojených s akumulací poškozených molekul a zvýšenou tvorbou toxických kyslíkových radikálů.

Významným faktorem uplatňujícím se v rozvoji dříve nevysvětlitelných typů anémie u starších nemocných se dnes ukazuje být postupná selekce mutovaných klonů kmenových hematopoetických buněk vedoucí k rozvoji klonální hematopoézy. Téměř u poloviny populace může být přítomna mutace některého z genů a výskyt mutací stoupá s věkem, zejména ve věku nad 50 let. Mutace mohou vést k tvorbě abnormálního genového produktu, jenž může alterovat s funkcí normální kmenové krvetvorné buňky. Studie provedené během posledních 5 let ukázaly, že mutace některých genů fungujících jako epigenetické regulátory jakými jsou DNMT3A, TET2 či ASXL1 či genů regulujících sestříhové mechanismy (SF3B1) mohou být iniciačními mutacemi procesu vedoucímu ke klonální proliferaci krvetvorby. Přehled mutací vyskytujících se u zdravých starších nemocných je uveden v Tab. 1.

Adjusted Hazard Ratio



Obr. 1 Zvyšující se riziko mortality u mužů ve vztahu k poklesu hladiny Hb

Obvyklé (>50)		Méně obvyklé (10-49)		Neobvyklé (5-9)	
DNMT3A	403	TP53	33	GNAS	8
TET2	72	JAK2	31	BRCC3	6
ASXL1	62	SF3B1	27	CREBBP	6
		GNB1	22	NRAS	6
		CBL	12	RAD21	6
		SRSF2	11	SETDB1	6
				U2AF1	5
				SETD2	5

Tab. 1 Mutace pozorované u skupiny zdravých jedinců starších 58 let.

Řada nemocných s nejasnou anemií je řazena do skupiny idiopatických cytopenií nejasného významu (ICUS). Kritériem je více než 6 měsíců trvající cytopenie v jedné či více krevních řadách ($Hb < 110 \text{ g/l}$, $NS < 1.5 \times 10^9/\text{l}$, $PLT < 100 \times 10^9/\text{l}$) nevysvětlitelná jinou chorobou a současně nepřítomnost známek



dysplasie. Genové mutace jsou přítomny u cca 30% nemocných (většinou 1 mutace, nicméně u poloviny nemocných dochází během 6 let k rozvoji klonální proliferace a u 90% nemocných dochází k vývoji do lokální cytopenie bez známek MDS (CCUS). Jako tzv. CHIP (klonální hematopoéza neurčeného potenciálu) je označován stav, kdy je přítomen klon vznikající bodovou mutací či malou inzercí/delecí mutací v genech s potenciálem iniciovat následnou leukemogenezu. Jako kritérium klonality se dnes považuje přítomnost mutované alely (VAF) u $\geq 2\%$ buněk. CHIP není omezena věkem, vyskytuje se i u lidí mladších 50 let, nicméně její incidence stoupá s věkem, u nemocných starších 70 let je přítomna u cca 10–15% jedinců. CHIP je třeba vždy odlišit od klonální hematopoézy vznikající ve vyšším věku, která není ve vztahu s mutacemi iniciujícími klonální proliferaci. Klonální cytopenie bez přítomnosti kritérií pro MDS je označována je CCUS, u CCUS je 13x vyšší riziko progresu do MDS než u ICUS. Někteří autoři považují určité formy CCUS jako MDS bez známek dysplasie. Srovnání jednotlivých jednotek je v Tab.2.

Faktory hrající úlohu v klonálním vývoji CHIP nejsou ještě zcela objasněny, je známo, že CHIP může být po řadu let stabilní bez známek klonální expanze. Nicméně, akvizice dalších somatických mutací je považována za důležitý faktor klonální evoluce CHIP, přítomnost mutací DNMT3A, ASXL1 a TET2 výrazně přispívá ke klonální instabilitě. Nestabilita a abnormální zkrácení telomér může rovněž přispívat k chromosomální instabilitě.

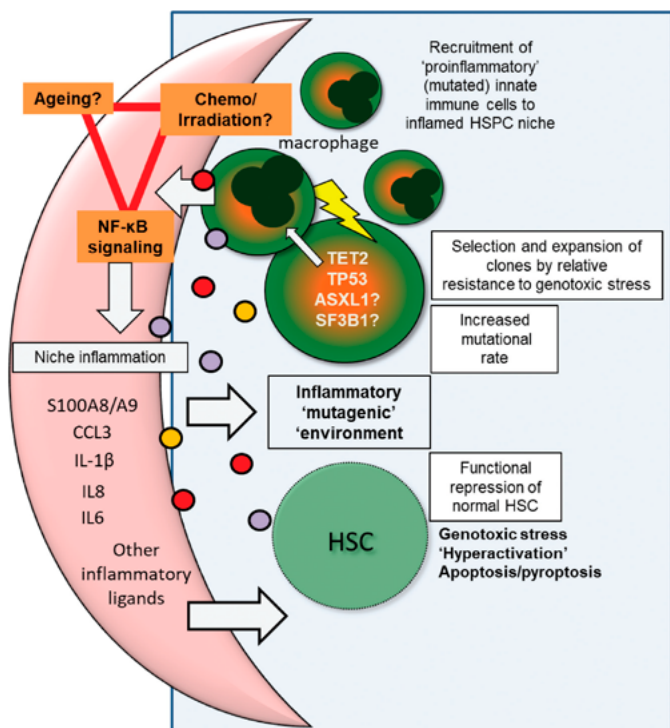
Rozdíly v chování patologického klonu u různých nemocných a pozorování, že klonus může být přítomen po dlouhou dobu bez známek progresu při neměnicí se náloži mutované alely ukazují na přítomnost dalších faktorů hrajících roli v klonální proliferaci. Chronická zánětlivá reakce doprovázející klonální proliferaci může tlumit proliferaci kmenových buněk a přispívat k instabilitě genomu. Zvýšená hladina volných kyslíkových radikálů při přetížení železem při inefektivní erythropoéze a podávání transfuzí může zvyšovat riziko nových mutací.

Table 1. Comparison of genetic characteristics between CHIP, CCUS, and MDS

	CHIP unselected population	CCUS at diagnosis	CCUS prior to MDS/AML progression	MDS all risk groups
Commonly mutated genes	DNMT3A, TET2, ASXL1, PPM1D, JAK2, TP53	TET2, DNMT3A, ASXL1, SRSF2, TP53	TET2, SRSF2, ASXL1, U2AF1, DNMT3A	SF3B1, TET2, ASXL1, SRSF2, DNMT3A
Mean # of mutations	~1	~1.6	~2	~2.6
Typical VAF	9–12%	30–40%	~40%	30–50%
Incidence	About 10–15% of 70-year olds	About 35% of ICUS	About 90% of ICUS	May be less than 50% of cytopenic patients

AML, acute myeloid leukemia; CCUS, clonal cytopenias of undetermined significance; CHIP, clonal hematopoiesis of indeterminate potential; ICUS, idiopathic cytopenias of undetermined significance; MDS, myelodysplastic syndrome.

Tab.2 Srovnání typu a počtu mutací, velikosti klonu mutované alely (VAF) a incidence u CHIP, CCUS a MDS.



Obr. 2 Úloha hemopoetického mikroprostředí v rozvoji klonální proliferace.

Různé faktory mohou vést k aktivaci tvorby zánětlivých mediátorů /vlevo/, které vytvářejí zánětlivé mutagenní mikroprostředí. Dochází ke zvýšení genotoxického stresu, jenž poškozuje normální krvetvorné buňky (HSC) a vede k jejich apoptóze, současně dochází k selekci mutovaných buněk rezistentních ke genotoxickému stresu, jejich klonální proliferaci a k tendenci akvizice nových mutací k instabilitě genomu. Zvýšená hladina volných kyslíkových radikálů při přetížení železem při inefektivní erytropoéze a podávání transfuzí může zvyšovat riziko nových mutací.

V současné době je velká pozornost věnována úloze hematopoetického mikroprostředí v kostní dřeni. Přehledný referát o současných poznatcích o úloze hematopoetického mikroprostředí přednesl na kongresu EHA 2020 Raaijmakers. V mezenchymálních buňkách hematopoetického mikroprostředí dochází k zánětlivé stimulaci, vyvolávajícími faktory mohou být stárnutí, poškození chemickými látkami či zářením či sekrece zánětlivých mediátorů mutovanými buňkami imunitního systému (makrofágy). Vzniká lokální zánětlivé „mutagenní“ mikroprostředí ovlivňující progenitorové buňky. Dochází ke zvýšení genotoxického stresu, což negativně ovlivňuje proliferaci normálních kmenových buněk a vede k jejich apoptóze a k selekci mutovaných buněk resistentních na genotoxický stres a produkují mutované imunitní buňky. Takto vznikají předpoklady pro klonální proliferaci a akvizici dalších mutací (Obr.2). Tyto teorie potvrzují presentace z letošního kongresu ASH, prokazující vnitřní rezistenci mutovaných buněk na zánětlivé mediátory při rozvoji klonální proliferace.

Závěrem je možno shrnout, že anémie, resp. pancytopenie u starších nemocných není pouze nevýznamným nálezem a nemusí vždy být přídatným projevem chronického onemocnění, ale může být také projevem rozvíjející se klonální proliferace s možností progresu do leukemizace procesu. Terapeutické ovlivnění klonální proliferace spočívá zejména v hledání možných inhibitorů zánětlivých mediátorů, ve fázi klinického zkoušení jsou některé monoklonální protilátky inhibující signální dráhy zánětlivého procesu a jejich možná kombinace s již užívanými látkami /bortezomib, lenalidomid, ibrutinib/, jež mají určitý efekt na zánětlivé dráhy a mohly by tak potencovat účinek zkoušených inhibitorů.

LITERATURA

- » Andres E. et al. Anemia in elderly patients: new insight into an old disorder. *Geriatr Gerontol Int* 2013; 13: 519-527.
- » Jaiswal S et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014; 371: 2488-2498.
- » Malcovati L et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood* 2017; 129: 3371-3378.



- » Steensma DP et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015; 126: 9-16.
- » Valent et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget* 2017;18: 73483-73500
- » Steensma DP Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indetermined potential. *Blood Adv* 2018; 2: 3404-3409.
- » Raaijmakers M The MDS Niche: inflammation driving bone marrow failure and clonal evolution.; Education Update in Hematology Book, *Hemasphere* 4 (S2), 161-163.
- » Avagyan S Mosaic mutagenesis in vivo reveals mutant blood stem cells intrinsically resistant to inflammatory mediators in clonal hematopoiesis. *Blood* 2020; suppl. 1, paper ID 382.

E03**TROMBÓZA A HEMOSTÁZA VE SVĚTLE
AKTUÁLNÍ POZNATKŮ**

Penka M.

Oddělení klinické hematologie FN Brno

Nelze v současné době začít jakékoliv sdělení než na téma COVID-19. A v souvislosti s koagulopatií je to tak i více než namístě.

Koagulopatie provázející COVID-19 je klinickým fenoménem, který má v případě dané infekce komplexní charakter, modifikuje onemocnění, může významně ovlivňovat prognózu onemocnění a může vést i k trvalým následkům.

Nepřekvapuje, že reaktivní systémy, jakými jsou systémy krevního srážení, jsou dotčeny procesy spojenými se závažnými infekty, a takto jsme zvyklí koagulační změny vidat v důsledku nejrůznějších infekcí, především závažnějších a ústících do sepsí, či SARS. Jsou to změny, které se dle původce infekce mohou lišit, liší se však především z důvodu individuální vnímavosti organismu na různé škodliviny. Většinou mají charakter koagulopatie provázené konzumpcí, mající nakonec generalizovaný charakter s diseminací intravaskulární

trombózy a krvácením, jež je důsledkem druhotných změn, vyčerpání mechanismů kompenzačních možností a vzniku biologicky aktivních fragmentů, které jsou za normálních okolností likvidovány ještě před rozvinutím jejich účinku.

Porucha koagulace, lze říci, má tedy charakter diseminované intravaskulární koagulopatie a hned první doporučení, která byla cestou ČSTH u nás zveřejněna, počítala s odstupňovaným zajištěním především antitrombotickou profylaxí (**1, 2**). S narůstajícími poznatky a zkušenostmi s různými modifikacemi klinického obrazu virového onemocnění, s jeho afinitou k plicím, s tím, že byla pozorována i krvácení provázející onemocnění, či plicní embolie, případně i tepenné trombózy charakteru srdečních a mozkových příhod, někdy velmi dramatických, stoupal i požadavek různě odstupňované intenzity diagnostiky a léčby těchto nestejných projevů a závažných komplikací.

Objevila se schémata stratifikující či skórující laboratorní ukazatele – dle míry zvýšení D-dimerů (DD) (**3**), či fibrinogenu sledující jeho úroveň do vyšších než běžně vydávaných hodnot (**4**), popřípadě posuzování diferenciálního rozpočtu z hlediska eosino- a lymfopenie, popř. dalších ukazatelů včetně vypočítávání infekčního skóre intenzivní péče (intensive care infection score – ICIS) (**5**).

Podobně byla posuzována koagulopatie provázející COVID-19 i po stránce léčebných intervencí. U závažnějších komplikací se doporučovalo podávání vyšší dávky antitrombotické profylaxe LMWH či UFH, v některých případech dokonce i léčba trombolytická (**6**). Z důvodu hrozby tepenných příhod byla doporučena i profylaxe protidestičkovou medikací (ASA, clopidogrel **7, 8**). Zde se však s ohledem na charakter poruchy vyžadovala možnost posouzení určení kontraindikace podání protidestičkových léků. V současné době jsou k dispozici nové verze doporučení, které všechny zmíněné aspekty zohledňují (**9**) a navíc i další společnosti vydaly doporučení, která odrážejí vývoj poznatků z hlediska nejen celé složitosti problému koagulopatie, ale také poznatků a zkušeností nejen z akutního období ale i rekonvalescence či recidiv nemoci (**10, 11**).

**COVID-19 – zajištění prevence a léčby trombotických komplikací či krvácení****Laboratorní hematologická vyšetření k určení profilu nemocného (12) a sledování léčby**

- Základní hematologické vyšetření – krevní obraz s diferenciálním rozpočtem leukocytů, PT, APTT
- KO lze doplňovat dle potřeby o stanovení retikulocytů, či další parametry s ev. určením ICIS
- Koagulační vyšetření dále obsahuje:

Stanovení fibrinogenu do vyšší hodnoty (12 g/l) dle Clause
Stanovení D-dimerů (DD) kvantitativní metodou
Stanovení anti-Xa aktivity dle použitého preparátu (LMWH, pentasacharidu, api-, rivaro- či edoxabanu)
Dilutovaný trombinový čas ke stanovení koncentrace dabigatranu
Testy primární hemostázy – PFA-100 či agregace krevních destiček po indukci ADP, kolagenem, kys. arachidonovou
Tromboelastografie k posouzení celého průběhu koagulace

IMPROVE rizikové skóre žilního tromboembolismu (VTE) použijeme ke stanovení naléhavosti a stupně rizika VTE

Rizikový faktor	VTE riziko
Předchozí VTE	3
Známá trombofilie	2
Současná pareza DK	2
Malignita	2
Pobyť na JIP	1
Imobilizace > 1 den	1
Věk > 60 let	1

Prevence trombotických komplikací u nemocných s prokázanou infekcí COVID-19 a nutnou hospitalizací na standartním oddělení (13)

- U všech je nutné postupovat dle obecných principů zajištění antitrombotické péče, jako u pacientů bez infekce COVID-19, včetně udržení již zavedené protisrážlivé či protidestičkové léčby

prevence/profylaxe antitrombotickou medikací

- Paušální či adjustovaná medikace LMWH/pentasacharidy s kontrolou a docílením anti-Xa aktivity v profylaktickém nastavení tj. 0,2-0,4 IU/ml
- Tam, kde nelze provádět stanovení anti-Xa aktivity podávat spíše adjustovanou dávku LMWH 50-100 j./kg těl. hmotnosti
- Pentasacharidy (Arixtra) se podávají běžně v paušální dávce 2,5 mg s.c./24 hod.

léčba antitrombotickou medikací

Prokázanou hlubokou žilní trombózu či plicní embolizaci bez bezprostředního ohrožení života léčíme:

- terapeutickou dávkou LMWH (cca 100 j./kg těl. hm. a a na JIP 12 hodin) s dosahováním 0,6 – 1,0/1,2 IU/ml anti-Xa aktivity
- Alternativou je UFH s dvojnásobným prodloužením APTT, příp. terapeutickým dosažením anti-X aktivity
- Alternativou by mohla být i DOAC s nastavením laboratorní kontroly a po konzultaci hematologa

alternativní možnosti antitrombotické profylaxe

- UFH hepariny za daných podmínek většinou v profylaxi využíváme ve vybraných případech
- DOAC jsou perorální alternativou, mají možnost sledování (dabigatran – APTT či *Hemoclot*, apixaban, rivaroxaban či edoxaban – PT (pro rivaroxaban) a anti-Xa aktivita dle použitého preparátu); zatím jsou alternativou k v případě problémů s využitím LMWH/UFH
- Warfarin je alternativou, zejména u nemocných, u nichž je již podáván v dlouhodobé léčbě

**prevence/profylaxe protideštičkovou medikací**

- kdy je již zavedena z důvodu předchozí indikace
- Stav nemocného stav vyústil v nutnost profylaktické indikace (např. nově anginózní obtíže, TIA.....)
- zhoršení celkového stavu ať již v důsledku COVID-19 nebo jiného onemocnění či komplikace s rizikem či komplikací tepenné trombotické příhody

Prevence/profylaxe antitrombotickou medikací za hospitalizace na oddělení intenzivní péče (14)

- LMWH – v adjustované dávce s dosahováním vyšší profylaxe s nastavením anti-Xa aktivity na 0,4 – 0,5 IU/ml s.c. (příp. v kontinuální i.v. infuzi)
- Pentasacharidy jsou alternativou – s kontrolou anti-Xa aktivity
- UFH v kontinuální infuzi (cca 1000 j./hod.) s dosahováním cca 1,5 – 2 násobného prodloužení APTT

– prevence/profylaxe kombinací medikace

- Profylaxe žilní trombózy LMWH a souběžná prevence tepenné trombózy protideštičkovou léčbou – tam, kde není vysoké riziko krvácení nebo je vysoké kardiiovaskulární riziko
- prevence LMWH (viz výše) za sledování anti-Xa aktivity +
- preventivní podávání kyseliny acetylosalicylové v dávce 100 - 200 mg/24, kdy není kontraindikována a kdy laboratorní testy (pokud je lze provést) nevykazují hlubší poruchu primární hemostázy

– léčba antitrombotickou medikací

- Prokázaná hluboká žilní trombóza či plicní embolizace bez bezprostředního ohrožení života
- terapeutická dávka LMWH (cca 100 j./kg těl. hm. a 12 hodin) s dosahováním 0,6 – 1,0/1,2 IU/ml anti-Xa aktivity
- Alternativou je UFH s dvojnásobným prodloužením APTT, příp. terapeutickým dosažením anti-X aktivity (*má výhodu snazší manipulace a je k dispozici antidotum – protamin*)

- Alternativou by mohla být i DOAC s ev. laboratorní kontrolou a po konzultaci hematologa
- Závažnější stavy mohou být řešeny trombolytickou léčbou t-PA dle běžných kautel po konzultaci kardiologa či neurologa, popř. hematologa

– léčba tepenné trombózy

- Dle typu příhody je indikovaná bezodkladná konzultace kardiologa, či neurologa, popř. cévního chirurga a hematologa

Protisrážlivá či protideštičková léčba v ambulantním ošetřování (15)

- Může navazovat na předchozí ústavní péči a je doporučena v propouštěcí zprávě
- nebo je součástí ambulantní péče a pak je ordinována praktickým lékařem, kde by měla v případě pozitivty COVID-19 zohledňovat všechna rizika a okolnosti onemocnění s určením indikace dle rizikového profilu nemocného.
- Délka jejího podávání se odvíjí od průběhu onemocnění a trvání rizikových okolností či komplikací. Ukončit profylaxi (pakliže není z jiného důvodu indikována k dlouhodobému podávání) lze dle většiny doporučení po cca 30 dnech
- Stav lze konzultovat v tomto směru s hematologem.

Krvácení či jeho hrozba u COVID-19 +

- U pacientů s COVID-19 s krvácením je nutno revidovat či upravit dosavadní antitrombotickou léčbu při zvážení rizik úpravy dávky nebo typu antitrombotika či dokonce přerušení antikoagulace. Doporučený postup České společnosti pro trombózu a hemostázu ČLS JEP, verze 2020-11-11 3
- Při současném krvácení je možné podávat transfuze destiček s cílem udržet jejich počet nad $50 \times 10^9/l$, čerstvě zmraženou plazmu (15-25 ml/kg) nebo fibrinogen 2 g a více dle jeho hladiny
- Podání koncentráту faktorů protrombinového komplexu je na zvážení v případě těžké koagulopatie a potřeby redukovat riziko oběhového přetížení nebo když nelze použít plazmu.
- V případě vysokého rizika krvácení u nekrvácejících nemocných je na zvážení transfuze destičkových přípravků s cílem udržet počet destiček nad $20 \times 10^9/l$.



- Tranexamové kyselina nemá být u DIC v rámci COVID-19 asociované koagulopatie rutinně podávána (**16**).
- Proti podávání rekonvalescentní plazmy není ze strany hematologa, resp. koagulopatie námitky. Její indikace je dána doporučením ČSTL. Diskutovanou otázkou je přítomnost a možnost přenosu antifosfolipidových protilátek (APA); vyjádření v tomto směru v literatuře nejsou k dispozici

Nové možnosti v léčbě hemofilie jako další progresivní kapitola současné hemostazeologie

Další progresivně se rozvíjející kapitolou zasahující problematiku krevního srážení je změna v léčbě hemofilie. Poté co se věnovala pozornost především přenosu infekčních chorob, byla pozornost zaměřena na účinnost a současné odlehčení zátěže léčbou substitučním preparáty se snížením jejího objemu prodloužením času biologického účinku léků. K tomu byly využity různé cesty vývoje léku - vazba Fc fragmentu, albuminu či pegylace. Dosáhlo se tím prodloužení intervalu podávání přípravku se zajištěním potřebného biologického účinku. Tím se stala léčba pohodlnější a přijatelnější pro řadu nemocných, kteří ji dosud – především v profylaktické formě – třebas i odmítali (**17**). Dnes je tato léčba řízena sofistikovaným způsobem za pomoci elektronických medií s umožněním individualizace léčby (**18**).

V pravdě průlomovou změnou je pak „nefaktorová“ léčba hemofilie. Je to způsob, který podobně jako v jiných odvětvích medicíny využívá biologické léčby, resp. monoklonální protilátky, v tomto případě ke korekci koagulační poruchy. Současným cílem této léčby je hemofilie A s inhibítorem, kdy bifázická monoklonální protilátka se svou specifickou vazbou faktoru IX na jedné a faktoru X plazmatického systému krevního srážení na straně druhé překlene defektní místo koagulace, kterou nechá proběhnout do finální fáze přeměny fibrinogenu na fibrin. Tato léčba je převratem v dosavadní a dosud v podstatě jediné léčbě, která byla založena na substituci a omezena řadou limitů (**19**).

V současné době se nefaktorová léčba uplatňuje i u nemocných s hemofií A bez přítomnosti inhibítoru a v poslední době je doporučována i u nemocných se získanou hemofií (**18**) a dokonce umožňuje i zajistit potřebnou péči hemofilikům typu A s probíhající covidovou infekcí (**20**).

Použitá literatura

1. Shrnutí konsenzuálního doporučení k antitrombotické terapii během pandemie COVID-19 Doporučení_ČSTH. 2020: e1-e4
2. American Society of Hematology. COVID-19 and VTE/anticoagulation: frequently asked questions. 2020. <https://www.hematology.org/covid-19/covid-19-and-vteanticoagulation>
3. Yao Y et al. 2020, *J Intensive Care* 49: e2-e11
4. Eljilany I et al. 2020 *Vasc Health Risk Manag.* 16:e455-e462
5. van der Geest PJ et al. 2016 *Critical Care* 20:180
6. Barnes GD, et al. 2020 *J thrombosis thrombolysis* 50: e72-e81.
7. Bianconi V et al. 2020 *Drugs* 80: e1383-e1496
8. Li Y, et al. 2020 *Medicine* 99(32), e21380.
9. COVID_tromboprofylaxe_doporučení_ČSTH_final_2020: e11-e13
10. Bikdeli B et al. 2020 *J Am Coll Cardiol.* 75(23): e2950-e2973.
11. Chow JH et al. 2020 *Anesthesia & Analgesia* e1-e41
12. McElvaney OJ al. 2020 *EBioMedicine*, 220, 61: 103026.
13. Moores LK 2020 *CHEST* 58(3):1143-1163.
14. Spyropoulos AC 2020 *J Thromb Haemost* 18(8):1859-1865.
15. Thachil J et al. 2020 *J Thromb Haemost.* 18(5): 1023–6.
16. Pavoni V et al. 2020 *Thrombosis research* 196, 313-317.
17. Komrska V 2016 *Remedia* 26: 157–161
18. Konkle BA et al. 2020, 62nd ASH Meeting, abstr. No 856
19. Gelbenegger G et al 2020. *Thromb Haemost* 120: e1357-e1370
20. Rivas-Pollmar MI et al. 2020. *J Thromb* 18: e2202-e2204

**E04****IMUNOLOGIE COVID-19 A PÉČE
O HEMATOONKOLOGICKÉ PACIENTY**

Hrušák O.

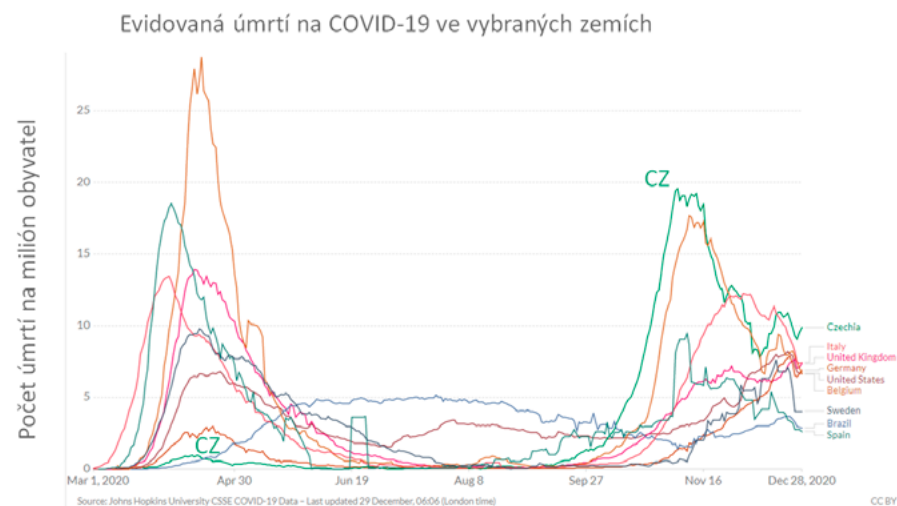
CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN v Motole

Průběh pandemie

Během své existence si nový druh koronaviru, SARS-CoV-2, vyžádal 1,8 mil. evidovaných obětí, citelné ekonomické ztráty ve všech civilizovaných zemích, celosvětové zatížení zdravotnického systému a změnu formátu Pražských hematologických dnů 2021. Mezi primárně nehmotnými negativními důsledky pandemie bylo omezení migrace a setkávání lidí, s dopady na turistiku a na profesionální, přátelské a rodinné kontakty. Ukázala rozdíly mezi zeměmi v disciplinovanosti, ve schopnosti společnosti diskutovat o datech či o dosud nenaplněných hrozbách a rovněž rozdíly v kapacitě zdravotnického systému. Pozitivních následků pandemie není mnoho, rozhodně je mezi nimi vývoj nového typu RNA vakcíny, rychlost vývoje nových i osvědčených typů vakcín, necílené omezení šíření jiných infekčních chorob včetně chřipky, otestování flexibility zdravotnického systému, zlepšení počítačové komunikační gramotnosti a řada důsledků z kategorie „co tě nezabije, to tě posílí“ (stmelily se rodiny, které se nerozpadly; kdo dává přednost datům před desinformacemi, mohl se vylepšit v jejich interpretaci, ...).

Pro pochopení některých imunologických jevů je vhodné si připomenout, že v Česku měla pandemie několik výjimečných parametrů. První vlna přišla do země začátkem března, tj. o měsíc později než do značné části Evropy (Francie, Německo, Itálie, Rusko, Británie, Finsko, Španělsko a Belgie). I když Česko zavedlo restriktce stejně jako většina Evropy kolem 15.3., bylo to z pohledu vývoje počtu případů relativně brzy. Nepřekvapí tedy, že i méně přísná opatření dokázala zpomalit šíření infekce a česká první vlna přinesla málo infikovaných (1% z počtu za rok 2020), hospitalizovaných i zemřelých. Období letního pomalého nárůstu (květen až srpen) přineslo pak necelý dvojnásobek potvrzených infekcí a disproporčně méně úmrtí. Vláda více slyšela na bagatelizující hlasy, takže v létě byl přístup Česka daleko méně restriktivní než

bylo v Evropě obvyklé. Další vlna postihla Česko v září až listopadu, již s více než 9 tisíci úmrtími a poslední probíhá od prosince 2020.



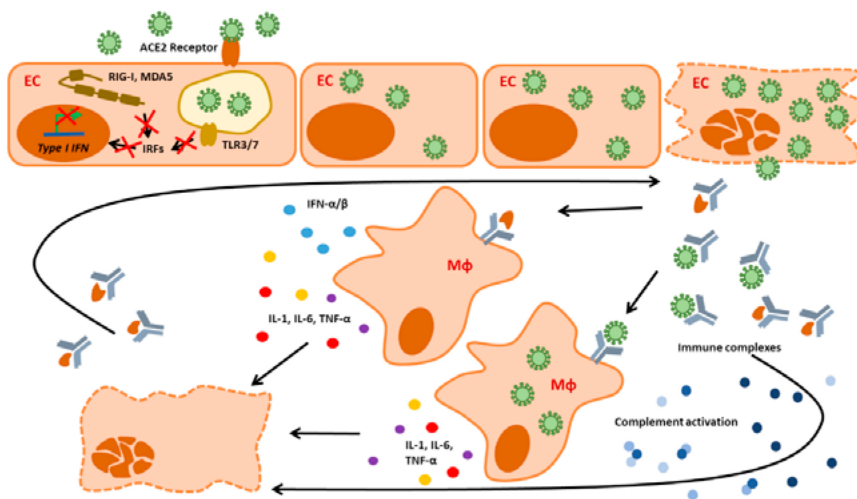
Obr. Úmrtnost na SARS-CoV2 v čase. <https://ourworldindata.org/coronavirus>

Infekce virem SARS-CoV-2 a aktivace imunity

SARS-CoV-2, podobně jako příbuzné koronaviry SARS-CoV a MERS-CoV, vniká do buňky prostřednictvím svého proteinu Spike s transmembránovým Angiotensin-konvertujícím enzymem (ACE2). Tímto způsobem napadá v dýchací soustavě alveolární epitel produkující surfaktant, pohárkové buňky i řasinkový epitel. ACE2 je rozšířený v mnoha tkáních včetně myokardu, střevního epitelu, endotelu cév apod¹. Příbuzný virus SARS-CoV vniká do některých buněk imunitního systému, kde se předpokládají i jiné mechanismy než přes ACE2 (např. fagocytóza) – význam alternativních způsobů vniknutí do buňky zatím u SARS-CoV-2 není stanoven. Jakmile virion vnikne do buňky, je jeho RNA rozpoznatelná pomocí molekul jako je Toll-Like Receptor (TLR)3 nebo TLR7 a přes další mediátory spouští produkci interferonů typu I a dalších prozánětlivých



cytokinů, jejichž cílem je potlačení infekce. Jednotlivé kroky této kaskády jsou ale koronavirem napadány, což vyústí v pomnožení viru, uhynutí napadené buňky a vylití jejího obsahu včetně virionů. Jsou-li v tomto okamžiku přítomny protilátky, navážou se na viriony nebo jejich části, vytvoří imunitní komplexy, aktivují komplement a makrofágy a následně se aktivují další buňky imunitního systému včetně specifických T a B lymfocytů. Ty jsou stimulovány k tvorbě (dalších) protilátek a cytotoxických T lymfocytů.



Obr. Aktivace imunitního systému při infekci SARS-CoV2. Schéma převzato z ref ¹.

I když poinfekční hladiny protilátek proti SARS-CoV-2 postupně klesají, paměťové buňky jsou přítomny a produkci protilátek lze rychle obnovit. Zastoupení jednotlivých klonů anti-SARS-CoV-2 T lymfocytů v této době studujeme u pacientů s COVID-19 v anamnéze, po očkování nebo při PIMS-TS (níže).

Těžký průběh infekce SARS-CoV-2

Různorodost tíže klinického obrazu od asymptomatických po těžké formy je od počátku vnímána jako charakteristická pro infekce SARS-CoV-2. Těžké for-

my se vyskytují typicky nad 65 lety věku. Jak věk, tak obezita a některá onemocnění od počátku spojovaná s těžkým průběhem COVID-19, mohou ovlivnit klinický obraz přes imunitní odpověď na infekci. Přes lavinu studií, které se na toto téma objevily, není dosud znám jednotící prvek určující těžký průběh. Studie zabývající se srovnáním parametrů imunitního systému ukazují rozdíly mezi pacienty s těžkým a lehčím průběhem, ale tyto rozdíly nelze prvoplánově interpretovat. Například vysoká hladina interferonu alfa u osob s těžkým průběhem² by mohla vést k názoru, že interferon alfa „škodí“. Na druhou stranu je již prokázáno, že interferony třídy I pomáhají infekci překonat (mezi mladými pacienty s těžkým průběhem byly signifikantně častější osoby s mutacemi v genech pro interferony, případně s protilátkami proti interferonu³).

Snahy vysvětlit častější těžký průběh u seniorů jejich sníženou imunitou vyvolaly řadu otázek z pohledu hematologie a onkologie. Protinádorová chemoterapie potlačí mnoho složek nespecifické i specifické imunity. Pokud by některá z nich byla klíčová pro zdolání infekce, byla by příslušná část pacientů v ohrožení bez ohledu na věk. Když se k nám během první vlny nedostala zpráva, že by české nebo zahraniční pracoviště dětské hematologie a onkologie řešilo epidemii fatálního průběhu COVID-19, dotázali jsme se aktivně na mnoha pracovištích celého světa. Výsledky tohoto bleskového průzkumu potvrdily první očekávání: infekce SARS-CoV-2 nebyla u dětských hematologických pacientů častá (pravděpodobně díky ochraně ústenkami a omezením kontaktů) a nehrozil zvýšený výskyt fatálního průběhu⁴. Naše pozorování upřesnil globální registr, kde 4,1% z 1238 (aktualizace k 31.12.2020) nakažených dětí zemřelo na COVID-19 (<https://global.stjude.org/en-us/global-covid-19-observatory-and-resource-center-for-childhood-cancer/registry.html>). Fatální průběh byl častější po transplantaci krvetvorných progenitorů a při současné infekci dalším patogenem. V případě infekce COVID-19 je tedy nutné zvážit rizika plynoucí z infekce samotné a z přerušení onkologické léčby.

Pediatrický zánětlivý multisystémový syndróm s časovou souvislostí s COVID-19 (PIMS-TS)

S odstupem 5 týdnů po vlně nemocných s COVID-19 byla v několika zemích včetně Česka pozorována vlna pacientů se záhadným onemocněním⁵ s ho-



rečkami, často břišní symptomatologií a u části se symptomy připomínajícími Kawasakiho nemoc. PIMS-TS může mít závažný průběh, navazuje většinou na infekci COVID-19 s mírným průběhem, postihuje takřka výhradně dosud zdravé děti a jeho podklad je předmětem zkoumání.

Vakcína – jak funguje a kdo ji má/smí dostat?

Šanci na zvládnutí pandemie máme díky vakcínám, které byly vyvinuty a testovány během necelého roku. Vakcína s názvem Comirnaty je založena na novém principu, kdy se převážně do svalových buněk vpraví upravená mRNA pro protein Spike. První úprava spočívá v nahrazení uridinových nukleotidů pseudouridinem, což umožní mRNA uniknout okamžitému odmítnutí buňkou. Dále jsou dvě aminokyseliny nahrazeny rigidním prolinem, díky čemuž má Spike správný tvar v prostoru i bez přítomnosti dalších proteinů. Dále byly synonymně (bez změny aminokyselin) nahrazeny některé báze na 3. pozici v kodonu za G nebo C, čímž se zvýší produkce proteinu. Celková účinnost dvou dávek vakcíny je 95%⁶, srovnatelná s podobnou vakcínou firmy Moderna (94,5%). Z dalších vakcín se k nám dostane AZD1222 firmy AstraZeneca a University of Oxford (až 90%), přehled všech vakcín je na <https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-vaccine-tracker.html>. Pacienti a personál na hematologických odděleních mají mít vysokou prioritu při distribuci vakcín.

Reference

1. Felsenstein S, Hedrich CM. SARS-CoV-2 infections in children and young people. *Clinical Immunology*;220.
2. Perlman S. COVID-19 poses a riddle for the immune system. *Nature* 2020;584(7821):345–346.
3. Meffre E, Iwasaki A. Interferon deficiency can lead to severe COVID. *Nature* 2020;587(7834):374–376.
4. Hrusak O, Kalina T, Wolf J, et al. Flash survey on severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infections in paediatric patients on anticancer treatment. *Eur J Cancer* 2020;13211–16.

5. Whittaker E, Bamford A, Kenny J, et al. Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2. *Jama* 2020;1–11.
6. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020;2603–2615.

E05

PALIATIVNÍ MEDICÍNA V HEMATOLOGII NA ASH: 62TH ANNUAL MEETING

Rusinová K.¹, Hrdličková L.^{2,3}, Kouba M.^{1,4}

¹Klinika paliativní medicíny, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. LF UK, Praha

²Tým dětské podpůrné péče, FN Motol, Praha

³Klinika dětské hematologie a onkologie FN Motol a 2. LF UK Praha

⁴Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Rok 2020 přinesl do paliativní medicíny v hematologii řadu nových poznatků a konceptů prezentovaných v rámci 62. kongresu Americké hematologické společnosti. Tento článek shrnuje novinky a trendy v pediatričké i dospělé hematologii, a navíc přináší i zkušenosti tří dlouhodobě fungujících paliativních týmů v České republice, které se hematologickou problematikou zabývají v následujících institucích: Všeobecná fakultní nemocnice, Ústav hematologie a krevní transfuze a Fakultní nemocnice Motol.

Úvod – definice a přehled indikací

Paliativní medicína je nový, dynamicky se vyvíjející obor, který reaguje na komplexní potřeby pacientů se závažným onemocněním, jejichž délka života se díky moderním medicínským technologiím prodlužuje. Paliativní péče se zaměřuje na komplexní léčbu symptomů závažné nemoci a současně má expertní erudici v tzv. netechnických dovednostech (komunikace, etická rozvaha, formulace cíle péče, podpora blízkých a pečovateli). Komplexní týmově-založený přístup k pacientům se závažným onemocněním je schopen zajistit nej-



lepší možnou kvalitu života po co nejdelší dobu s respektem k hodnotám a preferencím pacienta a jeho blízkých.

Indikace paliativní péče

Současný **indikační trend** předpokládá spolupráci s paliatrem často **již v okamžiku stanovení diagnózy závažného onemocnění**. Je to ideální období pro nastavení dobré komunikace, vyjasnění, jak budou v průběhu nemoci sdělovány informace včetně nepříznivých zpráv, a pro základní orientaci v hodnotách a preferencích pacienta (tzv. paliativní screening potřeb).

V pokročilejších fázích onemocnění se přidává plánování budoucí péče a sestavení plánu pro možné zhoršení stavu (advanced care planning). S progresí onemocnění význam paliativní péče roste a v závěru života a při truchlení po zůstalých je její význam dominantní.

Často zmiňovanou indikací pro zahájení paliativní péče (pokud ještě nebyla zahájena) je tzv. **surprise question**. Pokud na otázku „*Překvapilo by vás, kdyby váš pacient zemřel v průběhu následujících 6 měsíců?*“ lékař odpoví „NE“, znamená to, že se jedná tuto chvíli jedná o nejzazší moment, kdy by měla být paliativní péče indikována.

Obecná a specializovaná paliativní péče

Hlavním poskytovatelem **obecné paliativní péče** jsou sami oboroví specialisté (hematologové). Pro pacienty s komplexní symptomovou zátěží nebo širšími potřebami může být přínosná spolupráce s paliatrem. **Specializovaná paliativní péče** bývá poskytována nejčastěji multidisciplinárním konziliárním týmem paliativní péče, který má k dispozici lékaře, sestry, sociálního pracovníka a kaplana.

Paliativní péče v pediatrické hematologii

Na letošním ASH byl problematice paliativní medicíny v dětské hematologii program věnován spíše okrajově. Paliativní péče se uplatňuje především u dětských pacientů s pokročilým stádiem hematologických malignit. Velkým přínosem je zapojení paliativní péče u dětí, jejichž symptomy nejsou dostatečně monitorovány nebo dokonce kontrolovány. Pravidelný monitoring symp-

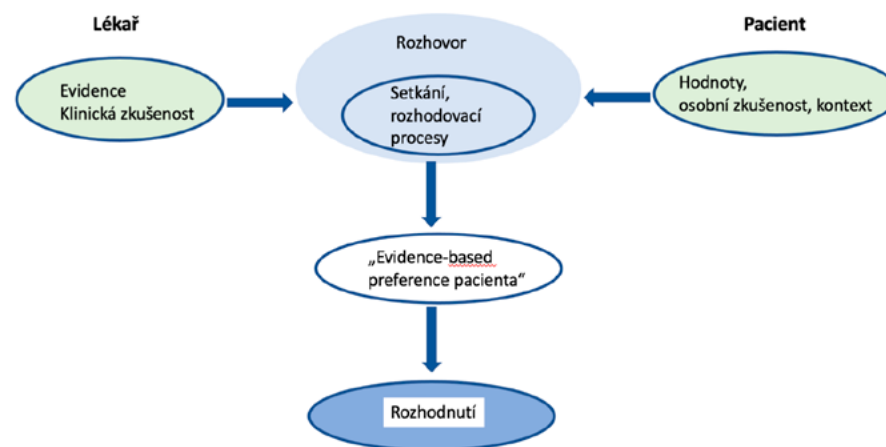
tomů, evaluace bolesti a dalších příznaků, využívání škálovacích systémů, průběžná úprava a hodnocení účinnosti symptomatické léčby prokazatelně zlepšují kvalitu života dětských pacientů. Paliativní medicína nabízí také řadu nefarmakologických metod podpůrné péče.

Vhodné načasování zahájení paliativní péče a zapojení podpůrných profesí do péče o dětského pacienta v klinické praxi usnadňuje vytvoření doporučených postupů (guidelines). V závěru života se dětská paliativní péče uplatňuje především při sestavení plánu péče, který se opírá o hodnoty a preference nemocného dítěte a jeho rodičů. Paliativní tým pomáhá umírajícímu dítěti a jeho rodině zajistit důstojný závěr života, fyzický a psychický komfort, efektivní management symptomů, včetně domácího prostředí.

Sdílené rozhodování u pacientů s AML (prezentace Dr. Alison R. Walker)

Motto: „Existuje celá řada léčebných možností – ale jak se rozhodnout?“

Sdílené rozhodování



Obr. 1 Sdílené rozhodování – propojení hodnot pacienta a evidence-based medicíny



Sdílené rozhodování (shared decision making) je komunikační strategie, kdy pacient a lékař spolupracují a snaží se dobrat nejlepšího možného rozhodnutí v souladu s tím, na čem pacientovi nejvíce záleží (Obr.1). Hlavní tři komponenty jsou následující:

1. popis rizik, přínosů a zátěže pro pacienta pro každou alternativu, včetně možnosti další péče bez medicínské intervence
2. erudice a praxe lékaře v komunikaci a její přizpůsobení konkrétnímu pacientovi
3. pacientovy cíle, poučené preference i obavy, včetně zátěže, které přináší léčba.

Základní principy

Sdílené rozhodování se nejlépe uplatňuje v situacích, kde existuje více „správných“ alternativ léčebného postupu, pomáhá najít optimální terapeutické možnosti a zlepšit dlouhodobé výsledky. V léčbě AML může jít o situaci, kdy volíme indukční terapii (intenzivní chemoterapie versus hypometylační látky), nebo když rozhodujeme o vhodné postremisní terapii u starších komorbidních pacientů s vysoce rizikovou AML (transplantační versus netransplantační přístup). Během tohoto procesu s pacientem sdílíme alternativy, včetně rizika a přínosů. Podporujeme pacienty v tom, aby zvážili své osobní preference a rozhodnutí nebo volba postupu odrážely hodnoty, na kterých jim nejvíce záleží.

„Three-talk model“ – třístupňový model sdíleného rozhodování



Obr. 2 Třístupňová rozvaha o léčbě v rámci sdíleného rozhodování

Sdílené rozhodování bylo vyvinuto jako přehledný nástroj pro klinickou praxi a bývá rozděleno do tří částí (Obr.2). Jednotlivé kroky se mohou překrývat, a struktura tak zůstane skryta v mysli lékaře, nebo může jít o tři časově oddělené rozhovory, kdy je rozdělení explicitní:

1. „team talk“ – „*pojďme na tom rozhodnutí pracovat spolu*“ – navázání terapeutického vztahu, aktivní naslouchání, nabídka podpory, představení možností, explorace hodnot a preferencí
2. „option talk“ – „*pojďme si možnosti porovnat*“ – detailní popis možností léčby, využití principů komunikace o rizicích (velmi dobře funguje metoda nejlepšího, nejhoršího a nejpravděpodobnějšího scénáře pro každou možnost)
3. „decision talk“ – „*pojďme se společně rozhodnout*“ – potvrdit si zjištěné preference a navrhnout možnost, která nejvíce odpovídá pacientovým hodnotám (rovnováha mezi silou doporučení lékaře a respektem k autonomii pacienta je vždy individuální a ovlivněná osobnostmi lékaře i pacienta).

Ukazuje se, že ve srovnání s pacienty, kteří byli od počátku pouze instruováni lékařem, jsou nemocní, kteří se podílejí na výběru léčby nejen mnohem lépe informováni o tom, jak léčba probíhá a zda povede ke zlepšení celkového stavu, ale bývají zároveň i výrazně spokojenější s léčbou. Protože naše pacienty



léčíme dlouhodobě, mnohdy po zbytek života, je jejich spokojenost velmi důležitým ukazatelem – přestože terapie nemusí vést vždy k uzdravě.

Nejdůležitější body

1. sdílené rozhodování předpokládá, že „léčíme pacienta, nikoliv jeho nemoc“
2. integrace sdíleného rozhodování neprodluhuje délku rozhovoru lékaře s pacientem, ale mění její strukturu
3. hodnoty a preference pacienta se stávají důležitým faktorem klinického rozhodnutí
4. sdílené rozhodování by nemělo být pouhým „bodovým seznamem“, ze kterého si pacient vybírá
5. sdílené rozhodování má jednoznačně pozitivní vliv na spokojenost pacienta, nižší incidenci konfliktů a celkovou kvalitu terapeutického vztahu pacient – lékař.

Zkušenosti tří zavedených pracovišť paliativní medicíny: VFN, ÚHKT a FN Motol

Mezi nejčastější požadavky i intervenci paliativního týmu patří především kontext nově sdělené závažné diagnózy se silnou emoční reakcí pacienta (a obtížná komunikace obecně), dále komplexní psychosociální podpora po ukončení specifické léčby a plán intervencí pro pacienty ve složité životní situaci (např. mladí pacienti s malými dětmi, složitá sociální problematika ovlivňující compliance pacienta s léčbou apod.). Při každé další hospitalizaci si většinou pacienti vyžadují pokračování v podpoře paliativním týmem sami.

Kdy integrace paliativní medicíny funguje nejlépe?

1. když je zahájena časně – ideálně souběž s kurativní léčbou
2. když se na pracovišti podaří vytvořit atmosféru důvěry a úzké spolupráce s paliativním týmem (vyžaduje čas a explicitně formulovaný zájem a potřebu ze strany hematologa)
3. v souvislosti s covid-19 je paliativní tým častěji volán k nastavení léčby refrakterních symptomů (delirantní stavy u respirační insuficience, indikace a vedení paliativní sedace, apod.)

„Hidden benefits“ (skrytý přínos spolupráce): z naší několikaleté zkušenosti vyplývá, že častěji volají o konzultaci s paliativním týmem rezidenti/lékaři v přípravě na atestaci, častěji mají zájem se přímo konzultace účastnit, což vede ke zlepšení jejich komunikačních dovedností a zlepšení znalostí obecné paliativní péče.

Závěr

Zkušenosti ze spolupráce hematologů a paliatrů mohou být velmi rozdílné mezi institucemi. Strukturovaný model časného sdílení péče hematologem a paliativním multidisciplinárním týmem je cestou, jak přinést pacientovi expertízu obou odborností bez stigmatizace paliatra a předávání do péče novému týmu až ve chvíli léčebného neúspěchu nebo krize. Přínosem vzájemné spolupráce je vedle přímého prospěchu pacienta i kultivace erudice v obecné paliativní péči a komunikačních dovednostech. Pravidelný monitoring symptomů u dětí v pokročilém stádiu hematologické malignity umožňuje efektivní terapii příznaků a zlepšuje kvalitu života nemocného dítěte a jeho blízkých.

Literatura

1. Elwyn Glyn, Durand Marie Anne, Song Julia, Aarts Johanna, Barr Paul J, Berger Zackary et al. A three-talk model for shared decision making: multistage consultation process BMJ 2017; 359:j4891

E06

PEDIATRIE NA ASH 2020

Pospíšilová D.

Dětská klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci

Novinky v diagnostice a léčbě anémií a polycytémií

Mezinárodní registr pacientů s deficitem pyruvátkinázy

Deficit pyruvátkinázy (PK) je vzácně se vyskytující vrozená enzymopatie způsobená mutacemi genu pro pyruvátkinázu. Výsledný defekt glykolýzy vede



ke snížení produkce ATP s následnou chronickou hemolýzou. Aktivita Harvardovy University v Bostonu v roce 2017 vedla ke vzniku mezinárodní akademické studie s názvem PK Deficiency Natural History Study, na které se podílí i Česká republika.

Do registru bylo zařazeno do konce roku 2019 původně 151 dětských i dospělých pacientů z klinických pracovišť 6 zemí světa. Po ukončení této akademické studie byl registr přetaven do tzv. **PEAK Registry**, retrospektivního a prospektivního registru, který doplňuje a analyzuje nové pacienty a jejich data, současně z 20 zemí světa s cílem získat údaje alespoň od 500 pacientů s deficitem PK z celého světa. Registr je uváděn jako příklad vynikající mezinárodní spolupráce. (1)

Do 24. 3. 2020 byla doplněna kompletní data 141 pacientů (55 dětí a 86 dospělých pacientů) s deficitem PK. U 50 pacientů byla k dispozici data ze sledování v délce 2 let (sledování v rámci registru Harvardovy university). 91 pacientů bylo zařazeno později.

Deficit PK je chronické onemocnění s významným dopadem na kvalitu života. Závažné komplikace se mohou objevit již v kojeneckém věku a zhoršovat v raném dětství. Chronická hemolýza vede k systémovým komplikacím, které mohou postihovat různé orgány a postupně se zhoršují s věkem (přetížení železem, osteopenie, trombotické komplikace, endokrinopatie aj.). I u pacientů, kteří nejsou transfundováni, se v dětském věku může rozvinout přetížení železem. Vzniká při chronické aktivaci erytroferonu s vazbou na BMP2/6 s redukcí BMP, což následně vede k depresi produkce hepcidinu. Výsledkem je zvýšené vstřebávání Fe a riziko rozvoje přetížení Fe i bez podávání transfúzí. Transfúze rozvoj přetížení a dále potencují. Další komplikací jsou splenomegalie a osteopenie doprovázené četnými komplikacemi vznikajícími v důsledku komplexní patofyziologie. (2)

Využití stimulantu aktivity pyruvátkinázy (Mitapivat) v léčbě deficitu pyruvátkinázy jiných hemolytických anémií – hemoglobinopatie, poruchy membrány, hereditární xerocytóza. (3) Mitapivat snižuje 2,3-DPG a zvyšuje ATP, tímto mechanismem může redukovat polymerizaci HbS a srpkovitění erytrocytů u SSD. Je tedy vhodným kandidátem pro podpůrnou léčbu

Srpkovité anémie. Pozitivní efekt Mitapivatu byl prokázán již na myším modelu hereditární sférocytózy. (4)

Hereditární sférocytóza se vyznačuje mechanickou a metabolickou nestabilitou membrány a sníženým obsahem ATP. Studie byla zaměřena na změny metabolismu erytrocytů a hematologický fenotyp po podání Mitapivatu na myším modelu s homozygotní mutací v pruhu 4.2-/- . Mitapivat byl podáván 6 měsíců. Výsledkem bylo zvýšení stability erytrocytární membrány, redukci erytrocytárních mikrovezikul, redukci hemolýzy, zlepšení anémie a snížení ukládání Fe v játrech a slezině. (4)

Studie efektu Mitapivatu u výše zmíněných anémií byly zahájeny již v průběhu roku 2020.

Erytrocytózy

V rodině s dominantně dědičnou erytrocytózou byla po vyloučení mutací genu pro Hb s vysokou afinitou pro O₂, germinální mutace JAK2, EPOR, VHL, HIF2alfa, EPAS1, EGL1 u postižených členů rodiny prokázána dosud nepopsaná mutace genu pro EPO136 G-A varianta, která zvyšuje aktivitu luciferázového reportéru a je dále potencována overexpresí HIF2 alfa. Byl tedy popsán nový mechanismus vzniku vrozené erytrocytózy. Autoři doporučují zařadit sekvenaci genu pro EPO do panelu genů pro vrozenou erytrocytózu. (5)

Ostatní poruchy erytropoezy

MMSL22L jako nový významný faktor v procesu regulace erytropoezy. (6)

Inaktivace MMSL22L v časných erytroblastech má za následek výrazné snížení proliferace a diferenciac buněk způsobené zástavou cyklu v G1 současně s mírným zvýšením apoptózy. MMSL22L deplece selektivně narušuje vyžrávání erytroidní linie. Úprava narušené funkce může vést k úpravě erytroidního vyžrávání. Kombinovaná inaktivace MMS22L a CDAN1 u zebřiček: vede ke drastickému omezení erytropoezy. MMS22L je tedy novým důležitým regulátorem erytropoezy. (6)

Hladiny železa a jejich regulace cestou ALK2 signální dráhy a hepcidinu. (7)

Expres hepcidinu je částečně kontrolována TGF beta receptory včetně aktivin-receptor-like kinázy-2 (ALK-2). Dysregulace ALK-2 vede k nepřiměřeně



vysoké produkci hepcidinu a tím nedostatečnému transportu železa do kostní dřeně a k rozvoji anémie. KER-047 je selektivní ALK2 inhibitor, který má potenciál normalizovat ALK-2 signální dráhu a napravit anémii vznikající v důsledku vysoké hladiny hepcidinu. Profil tolerability KER-047 u zdravých dobrovolníků je slibný pro možné použití pro léčbu anémií způsobených vysokou hladinou hepcidinu.

Klonální hematopoeza u Diamondovy-Blackfanovy anémie.(8)

U pacientů s DBA je popisováno vyšší riziko rozvoje MDS, AML a solidních nádorů. Autoři vyšetřili soubor 11 pacientů s DBA a MDS/AML, věk dg. AML 44 let, věk dg. MDS 26 let. U 4 pacientů byly nalezeny mutace genů U2AF1, DNMT 3A, STAG1, SF3B1. Pacienti s DBA mají signifikantně nižší věk rozvoje klonální hematopoezy. Autoři plánují vyšetřit větší soubor pacientů.

Toxicita železa pro embrya těhotných se zánětem a nízkou hladinou železa.(9).

Nadbytek železa v organismu těhotné zvyšuje riziko poškození embrya indukovaného zánětem. Na železe závislá embryotoxicita je indukovaná TNF α a může způsobit letální apoptotické poškození embrya a endotelu placenty, kterému je možno předcházet antioxidační terapií. U žen vystavených nadměrnému množství železa a zánětu mohou být v riziku preventabilních komplikací v průběhu těhotenství.

Poznámky k novým poznatkům o metabolismu Fe

Erytroferon

Systémové komplikace u anémií s neefektivní erytropoezou mohou být způsobeny nebo exacerbovány **nadprodukcí erytroferonu** (ERFE). Jeho ovlivnění potenciálně může být užitečnou léčebnou strategií. **ERFE je erytroidní regulátor hepcidinu, jeho nadprodukce vede k rozvoji přetížení železem.**

Trf2

Delece Trf2 zlepšuje erytropoezu, předchází anémii, indukuje stabilní zlepšení hladiny Hb i počtu erytrocytů, pokud je k dispozici dostatek Fe.(9).

Studie souboru HLH u novorozenců.

71 pacientů z 8 států z USA, zkušenosti jednoho centra. Byla provedena analýza souboru novorozenců s diagnózou HLH. Medián prvních symptomů HLH byl 3.den života, medián diagnózy 17.den života, u všech novorozenců

do ukončení novorozeneckého věku. 38 % dětí se narodilo předčasně, 20 % dětí mělo fetální hydrops. U více než 90 % dětí byla přítomna hepatosplenomegalie a teplota. U více než 70 % dětí byla přítomna těžká trombocytopenie, anémie, hemofagocytóza, u všech byla výrazná hyperferitinémie. U většiny dětí byla hyperbilirubinémie, hepatopatie, prodloužení aPTT. Ve 24 % případů se jednalo o sekundární HLH, u 44 % o geneticky podmíněné onemocnění (PRF1, UNC13D mutace, Griscelliho syndrom, sourozenec s HLH). U zbývajících novorozenců nebyla příčina zjištěna. Dvouleté přežití v souboru bylo 27 %, dětí s geneticky podmíněným onemocněním pouze 16 %. K možností zlepšení osudu těchto pacientů je včasné genetické testování, použití nových růstových faktorů k překlenutí doby do transplantace kostní dřeně.(9)

1. Grace RF et al. Baseline Characteristics of Patients in Peak: A Global, Longitudinal Registry of Patients with Pyruvate Kinase Deficiency. Paper ID: 258
2. Al-Samkari H et al. Early-Onset Osteopenia and Osteoporosis in Patients with Pyruvate Kinase Deficiency. Paper ID: 1679
3. Minke AE et al. Secondary Deficiency of Pyruvate Kinase and Altered Red Cell Metabolism in Hereditary Xerocytosis Caused By PIEZO1 and KCNN4 Defects. Paper ID: 2580
4. Myší model hered.sf.
5. Lanikova L et al. Mutation of EPO 5'UTR Facilitates Interaction with HIF2 and Causes Autosomal Dominant Erythrocytosis. Paper ID: 83
6. Bustamante OQ et al. Correction of the Energetic Defects in Pyruvate Kinase Deficiency through Genome Editing in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. Paper ID: 85
7. Nash M et al. Clonal Hematopoiesis in Patients with Diamond Blackfan Anemia. Paper ID: 935
8. Ordóñez L et al. Administration of KER-047, a Novel ALK2 Inhibitor, Elicited Robust and Sustained Increases in Serum Iron in Healthy Participants.
9. Hong V et al. DISC-a, the First in a Novel Class of Potent and Selective Matriptase-2 Inhibitors for the Treatment of Hematologic Disorders Characterized By Low Hepcidin. Paper ID: 1690



10. Fisher A et al. Iron-Dependent Apoptosis Causes Embryotoxicity in Inflamed and Obese Pregnancy. Paper ID: 767
11. Bush KA et al. Real-World Clinical Outcomes in Previously Untreated and Minimally Treated Patients with Congenital Factor VIII Deficiency: The San Diego Experience. Paper ID: 1787
12. Vagreich A et al. Real-World Experience Using Efficizumab Prophylaxis for Hemophilia A: Single-Center Experience. Paper ID: 1791
13. Lam HP et al. Thrombosis and Risk Management in Paediatric Inflammatory Multisystem Syndrome – Temporally Associated with Sars-CoV2 (PIMS-TS). Paper ID: 1729
14. Young DJ et al. Long-Term Efficacy of Bone Marrow Failure Depletes Total Body Iron. Paper ID: 168
15. Hsi-Che Liu et al. The Dysregulation of Hepcidin-Ferroportin Axis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors after Completion of Chemotherapy. Paper ID: 2598
16. Brindley EC et al. RASA3 Regulates Stage-Specific AKT Signaling and Cell Cycle Progression in Mammalian Erythropoiesis. Paper ID: 10

B. Poruchy koagulace

Tromboembolické komplikace v průběhu léčby nově diagnostikovaných dětských pacientů s leukémií.

Tromboembolické projevy pozorovány u 6 % léčených dětských pacientů, u dětí s HR ALL a VHR ALL vedly ke zhoršení EFS (treatment-related mortality) u pacientů se středním a vysokým rizikem. Autoři zdůrazňují důslednou prevenci trombózy, ale i včasnou detekci a léčbu. (10)

Nefaktorová léčba hemofilie

Klinické výsledky u PUPs a MTP s hemofilií A – profylaxe Efficizumabem: zkušenost ze San Diego. (11)

Zkušenosti s profylaxí Efficizumabem u hemofilie. (12)

38 pacientů, z toho 18 dětí pod 12 let, průměrný věk 16,4 let, podobně jako v první práci dominuje minimum komplikací a velmi výrazné zvýšení kvality života léčených dětí.

Infekce COVID-19 a koagulace.

Pohled dětského hematologa na tromboembolismus u dětských pacientů s COVID indukovaným PIMS.(13)

Poznámky ke koagulaci a infekci COVID 19 – ASH Scientific workshop COVID 19

COVID-19 asociovaná koagulopatie je multifaktoriální: aktivace koagulace x poškození endotelu x venostáza. Významnou roli hraje komplement, trombocyty, tkáňový faktor a plazmatické faktory i endoteliální buňky (tkáňový faktor). Aktivace komplementu je spouštěna alternativní i klasickou cestou komplementu, které jsou potencovány MASP a MBL. To vede k aktivaci C3 a C5 složek komplementu a ke tvorbě komplexu schopného atakovat buněčné membrány. Leukocyty a trombocyty navzájem kooperují. Byla prokázána i přímá aktivace koagulace virem /Robert A.Campbell, UTAH/.

Alterace imunohemostatické odpovědi – některé společné rysy je možno nalézt při srovnání infekce Covid-19 a horečky Dengue. Významnou roli hraje NETosis (neutrophil extra cellular traps) – u infekce COVID-19 koreluje se závažností choroby.

Trombocyty jako hlavní hráč hemostázy a zánětu: **transkriptom trombocytů je u COVID-19 výrazně alterován**, byla prokázána zvýšená exprese selektinu a **zvýšení agregátů trombocytů a neutrofilů**

Aktivace endotelu a aktivace koagulace jsou společné např. pro malárii a infekci COVID-19. U mozkové malárie bylo popsáno **nahromadění multimerů ADAMTS 13** – informace u infekce COVID-19 tuto zkušenost potvrzují.

Průběh infekce COVID-19 významně ovlivňuje **hypoferémie**. Negativně koreluje s hladinou troponinu a nízká hladina Fe koreluje s komorbiditou ve smyslu poškození myokardu. Restrikce železa ovlivňuje transportní kapacitu Hb pro kyslík a pravděpodobně je jednou z příčin vysokého nároku na kyslík u paci-



entů s COVID-19. **Imunomodulační léčba zlepšuje dostupnost železa a tím i 02 pro buňky.**

E07 **MYELOM**

Špička I.

I. Interní klinika- klinika hematologie, 1. LF UK, Praha

Pokroky v léčbě mnohočetného myelomu (MM) patří k jednomu z největších úspěchů onkologie posledních desetiletí. Cílené preparáty první, druhé a třetí generace v různých kombinacích nyní představují páteřní léčbu myelomu. Dělíme je na proteazomové inhibitory (PI), imunomodulační léky (IMiDy), monoklonální protilátky (MoAb) a dále skupinu několika látek s rozdílným mechanismem účinku. U mladších pacientů vedou ještě před provedením ATKD téměř k 100% terapeutické odpovědi a více než 50% pravděpodobnosti dosažení kompletní remise. Desítky procent dosahují také vyšší stupně remisí, jako je „stringentní“ kompletní, resp. MRD negativní remise. Ta se stala novým terapeutickým cílem. Z analýzy v roce 2018 v USA vyplývá, že 5 let přežívá více než polovina nemocných (50,7%), přičemž po rozdělení podle revidovaného systému ISS (R-ISS) je pravděpodobnost 82%, 62% and 40% ve skupinách I, II a III. Další nedávná multianalýza vykázala 14,3% „statistical cure fraction“, přičemž ještě nemohla zohlednit přínos posledních generací nových preparátů. Nicméně stále platí, že ve většině případů dochází k relapsům a postupně se rozvíjí rezistence na terapii. Zůstává tak aktuální potřeba vývoje nových léků, které potenciálně synergizují s PI a IMiDy nebo překonávají rezistenci vůči nim. Novým trendem je využití rostoucího množství znalostí o komplexní biologii choroby a klíčových signálních drah. Vývoj nových terapeutických postupů samozřejmě neustal ani v tomto atypickém roce. Pokusíme se prezentovat nejzajímavější data z virtuálního meetingu ASH 2020.

E08 **CAR BUNĚČNÁ TERAPIE V LÉČBĚ** **LYMFOIDNÍCH MALIGNIT**

Pytlík R.^{1,2}, Polgárová K.^{2,3}

¹ Oddělení buněčné terapie, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

² 1. interní klinika 1. lékařská fakulty Univerzity Karlovy v Praze

³ Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Léčba buňkami s chimérickými antigenními receptory (CAR) představuje zcela novou metodu v hematologické onkologii a to nejen svým mechanismem účinku, ale i z hlediska legislativního. Na rozdíl od buněčných přípravků pro transplantace krvetvorných buněk je CAR buněčná léčba řazena mezi léčivé přípravky moderní terapie (LPMT) a regulována farmaceutickými zákony, v České republice konkrétně zákonem č. 398/2007 Sb. K naplnění tohoto zákona slouží náročné požadavky na zařízení, které tuto léčbu poskytují, a to jak na klinická pracoviště, tak i na pracoviště zpracovatelská (po stránce aferézy, manipulace s buňkami, jejich mražení a uchovávání). Je velkým úspěchem české medicíny, že se daří tuto léčbu etablovat i v naší republice.

CAR buněčná terapie je náročná i z organizačního a logistického hlediska. V současné době používané přípravky jsou vyráběny vesměs z autologních T lymfocytů (CAR-T buňky), tedy pro každého pacienta zvlášť na objednávku. Po vytypování vhodného pacienta je nutno naplánovat aferézu nestimulovaných periferních mononukleárů, tyto buňky zamrazit, zorganizovat jejich přepravu do výrobního zařízení, které může být i na jiném kontinentu, a zajistit transport a uskladnění hotového přípravku. Teprve poté může pacient dostat přípravou, takzvanou lymfodepleční terapii, následovanou jednorázovou infúzí CAR-T buněk. K tomu přistupuje nutnost schválení přípravku pojišťovnou. Od indikace pacienta k podání přípravku tak může uplynout šest i více týdnů. Podání produktu je spojeno s unikátními toxicitami, jako je syndrom uvolnění cytokinů (CRS) nebo neurotoxicita (ICANS). Produkty registrované ke klinickému použití nebo ty, u kterých je registrace očekávána brzo, jsou uvedeny v **Tabulce 1**¹⁻⁷.



Geny pro chimerický antigenní receptor (CAR) jsou konstrukty sestávající většinou ze dvou variabilních segmentů lehkých imunoglobulinových řetězců (scFv), spojených s genem pro CD3 řetězec a s kostimulačními molekulami. V současné době je ke kostimulaci používán buď fragment CD28 nebo 4-1BB. Tyto konstrukty se nazývají CAR druhé generace a jsou jimi vybaveny všechny dosud registrované buněčné přípravky. CD28 by měl teoreticky způsobovat rychlejší expanzi CAR buněk, což se prakticky zatím projevuje především vyšším množstvím zmíněných nežádoucích účinků, u 4-1BB se předpokládá, že povede k delší perzistenci geneticky modifikovaných buněk v organismu. Existují i pokročilejší konstrukty s více kostimulačními molekulami, s kazetami pro transkripční faktory pro cytokiny (např. IL-12) nebo s bezpečnostními pojistkami (gen pro inducibilní kaspázu 9 – iCAS9), aby v případě závažných nežádoucích účinků bylo možno CAR buňky snadno zlikvidovat. Klinické výhody těchto přístupů je však nutno teprve prokázat. Schéma nejčastějších typů CAR je na **Obrázku 1**. CAR může být vnesen do T lymfocytů, ale i do NK buněk. CAR-NK buňky mají oproti CAR-T teoretické – a v časných klinických studiích již i prakticky ověřené – výhody v nižším množství nežádoucích účinků a možnosti snazší výroby alogenních produktů na několika platformách (z pupečnickové krve, NK buněčných linií nebo z indukovaných pluripotentních kmenových buněk). Nevýhodami CAR-NK buněk je problematičtější in vivo expanze a persistence⁸.

Problematika CAR-T je tedy v současné době velmi živá a byla jí věnována i značná pozornost na proběhlém 62. virtuálním sjezdu ASH. Klíčové otázky je možno rozdělit do několika okruhů, přičemž důležité je zmínit i to, co na sjezdu nezaznělo.

V první řadě je nutné se ptát, zda se naděje vkládané do CAR-T terapie daří naplnit i v reálném životě (real-world experience). Tuto otázku je možné zodpovědět kladně⁹. Oproti klinickým studiím je dosahováno poněkud nižšího počtu odpovědí, což je však dáno tím, že CAR-T jsou nabízeny i pacientům, kteří by nemohli být zařazeni do studie (převážně z důvodu celkového stavu). V klinických studiích je také často nižší věkový medián než v běžné populaci. Fitzgerald analyzovala 77 pacientů s agresivními B-lymfomy nad 70 let, kteří dostali axi-cel nebo tisa-cel. Medián doby do progresu byl 12 měsíců a nebyl

rozdíl mezi pacienty mladšími či staršími 75 let. Pacienti starší než 75 let měli větší neurotoxicitu (ICANS)¹⁰. Pacienti, kteří dostanou před podáním CAR-T překlenovací léčbu (bridging) mají horší přežití než ti, kteří ji nedostanou, což je dáno agresivitou choroby. Na druhou stranu Khurana zjistil, že dosažení odpovědi po bridgingu je u pacientů s agresivními lymfomy spojeno s lepším přežitím bez progresu, i když ne s lepším celkovým přežitím¹¹. V reálném životě se nesetkáváme s vyšším rizikem těžkého CRS než byl pozorován ve studiích, což je dáno i častějším a časnějším používáním tocilizumabu, protilátky proti IL-6 receptoru, k jeho léčbě. Obavy, zda časně použití tocilizumabu neohroží efektivitu CAR-T terapie, se nepotvrdily. Marsal prezentoval soubor 70 pacientů s mnohočetným myelomem, u kterých časně podání tocilizumabu výrazně zkracovalo trvání CRS, ale nemělo vliv na odpověď na léčbu¹². Tocilizumab není ani spojen s vyšším rizikem infekčních komplikací po CAR-T, i když užití steroidů spolu s pokročilým onemocněním a 3 či více předcházejícími liniemi terapie u NHL ano¹³.

Druhou otázkou je rozšíření stávajících indikací pro léčbu CAR-T lymfocytů. Ve studii ZUMA-5 byl podán axi-cel u 146 pacientů s indolentním lymfomem (124 s folikulární lymfomem - FL, a 22 s lymfomem z buněk marginální zóny - MZL). Celková odpověď byla 94% u FL a 85% u MZL. PFS bylo 74% ve 12 měsících a grade 3-4 nežádoucí účinky byly přijatelné (6% CRS a 19% ICANS)¹⁴. Ve studii ZUMA-12 jsou léčeni pacienti s DLBCL s perzistující PET-pozitivitou po 2 cyklech chemoimunoterapie 1. linie. Interim analýza prvních 12 pacientů ukázala počty celkových remisí 75%, 75% z nich přetrvávalo v prvním roce¹⁵. Zatím nebyly prezentovány výsledky fází III klinických studií, které zkoumají použití CAR-T jako alternativy k ASCT u pacientů s agresivními NHL (NCT03391466 - ZUMA-7, NCT03575351 -TRANSFORM, NCT03570892 - BELINDA) nebo jako alternativy konvenční léčby 3. linie u mnohočetného myelomu (NCT03651128 - KarMMa-3). Na ASH 2020 byla však prezentována retrospektivní studie srovnávající podání ide-celu a konvenční léčby u pacientů s mnohočetným myelomem předléčených imunomodulačními látkami, inhibitory proteazómu a anti-CD138 protilátkami. Pacienti léčení ide-celem měli lepší celkovou odpověď (OR 5.11, $P < 0.001$), delší dobu do progresu (HR 0.55, $P < 0.001$) a lepší celkové přežití (HR 0.36, $P < 0.001$) než pacienti



po podání konvenční léčby¹⁶. Zarážející je, že na ASH nebyla prezentována téměř žádná data pro léčbu pacientů pomocí CAR-T s chronickou lymfatickou leukémií, i když studie na brexu-cel nebo na liso-cel s ibrutinibem jsou v běhu (NCT NCT03624036, NCT03331198). Bohužel nebyly prezentovány ani žádné nové léčebné výsledky u T-lymfomů.

Za třetí je nutné se zabývat problematikou rezistence na CAR-T lymfocyty. V současné době dosahujeme pouze 30–50% setrvalých odpovědí při léčbě existujícími preparáty. V případě akutní lymfoblastové leukémie je častý relaps CD19 negativního klonu, u agresivních NHL pak dochází k mutaci v doméně, na kterou se váže chimerický antigenní receptor. U CD19 negativních relapsů i u relapsů s mutacemi vazebné domény dává smysl v záchranné léčbě použít CAR buňky proti jinému antigenu nebo rovnou pacienty léčit CAR preparáty se dvojí specificitou (např. antiCD19 + antiCD22). Cui léčil 36 pacientů po selhání antiCD19 CAR-T buněk dvojími specifickými antiCD19-antiCD22 pozitivními CAR-T a dosáhl 78% kompletních remisí, s přežitím bez selhání léčby 70% v jednom roce¹⁷. Obdobný způsob léčby je studován i u agresivních NHL¹⁸. U akutní lymfoblastové leukémie je často používána konsolidace alogenní transplantací. Wang léčil 23 pacientů s relapsem ALL po alogenní transplantaci antiCD19 CAR-T buňkami a následnou druhou alogenní transplantací s ročním přežitím 68% a dvouletým přežitím 54%. Nezaznamenal žádný relaps, ale 22% úmrtí na potransplantační komplikace¹⁹. Je tedy nutné dále studovat, zda tento způsob managementu pacientů je lepší než CAR-T bez následné další alogenní transplantace. Selhání CAR-T léčby může být rovněž způsobeno expresí PD-ligandů na povrchu nádorových buněk nebo na buňkách nádorového mikroprostředí. Studie s protilátkami proti PD-ligandům probíhají (např. NCT03630159), některé byly prezenovány i na posledním ASH. Další možností je použití imunomodulačních léků. Thieblemont léčila 41 pacientů po selhání axi-celu či tisa-celu lenalidomidem s dosažením kompletní remise u devíti a parciální remise u sedmi z nich, dobré výsledky byly pozorovány zejména u pacientů, kteří dostali lenalidomid do dvou týdnů po infuzi CAR-T²⁰.

Nové přístupy k výrobě CAR-T preparátů směřují kromě výše zmíněných produktů třetí a následující generace především ke zjednodušení přípravy CAR buněk. Výroba autologních produktů přímo v místě podání by snížila náklady

na logistiku, dobu výroby i cenu produktů. Univerzální produkty z buněk zdravých dárců by umožnily výrobu většího počtu preparátů v rámci jedné šarže a přípravky by byly k dispozici okamžitě v případě potřeby. Yang prezentoval 24-hodinovou metodu přípravy CAR-T buněk s CD19/CD22 duální specificitou a prvních deset pacientů s ALL léčených tímto preparátem. Bezpečnostní profil přípravku a předběžné léčebné výsledky byly velmi dobré²¹. BALLI-1 (NCT04150497) je klinická studie fáze 1 zkoumající bezpečnost a účinnost antiCD22 univerzálních CAR-T buněk (UCART22), u nichž byla pomocí editační technologie TALEN deletována část genů pro TCR a CD52, což umožňuje použít v lymfodeplečním režimu anti-CD52 protilátku alemtuzumab. I zde jsou předběžné výsledky bezpečnosti velmi dobré²². FT819 je univerzální antiCD19 CAR-T produkt připravený z indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC). Gen pro CAR je zde vnesen přímo do lokusu pro konstantní řetězec alfa T-buněčného receptoru (TRAC), čímž dojde k disrupci TCR a tento produkt by tudíž neměl způsobovat nemoc štěpu proti hostiteli. Zatím jsou k dispozici pouze preklinické výsledky²³. FT576 je CAR-NK produkt rovněž připravený z iPSC se specificitou proti BCMA-1, s vneseným rekombinativním IL-15 signálním komplexem pro lepší in vivo expanzi, s enhancovaným receptorem pro Fc gamma a s knokautovaným genem CD38 pro léčbu mnohočetného myelomu. Tento produkt tedy může kromě BCMA-1 specificity i kooperovat s léčebnou antiCD38 protilátkou, aniž přitom dojde k lýze CAR-NK buněk. Produkt je rovněž v preklinickém zkoumání²⁴, obdobný produkt s antiCD19 specificitou však byl již úspěšně použit u prvního pacienta²⁵.

CAR-buněčná terapie představuje novou éru protinádorové imunoterapie. Lymfoidní malignity jsou první skupinou nádorových onemocnění, u kterých byl tento způsob úspěšně použit a jsou zde i první schválené produkty. Další vývoj bezesporu přispěje nejen k dalšímu rozšíření léčebných indikací, ale i ke zlepšení účinnosti a dostupnosti této léčby.

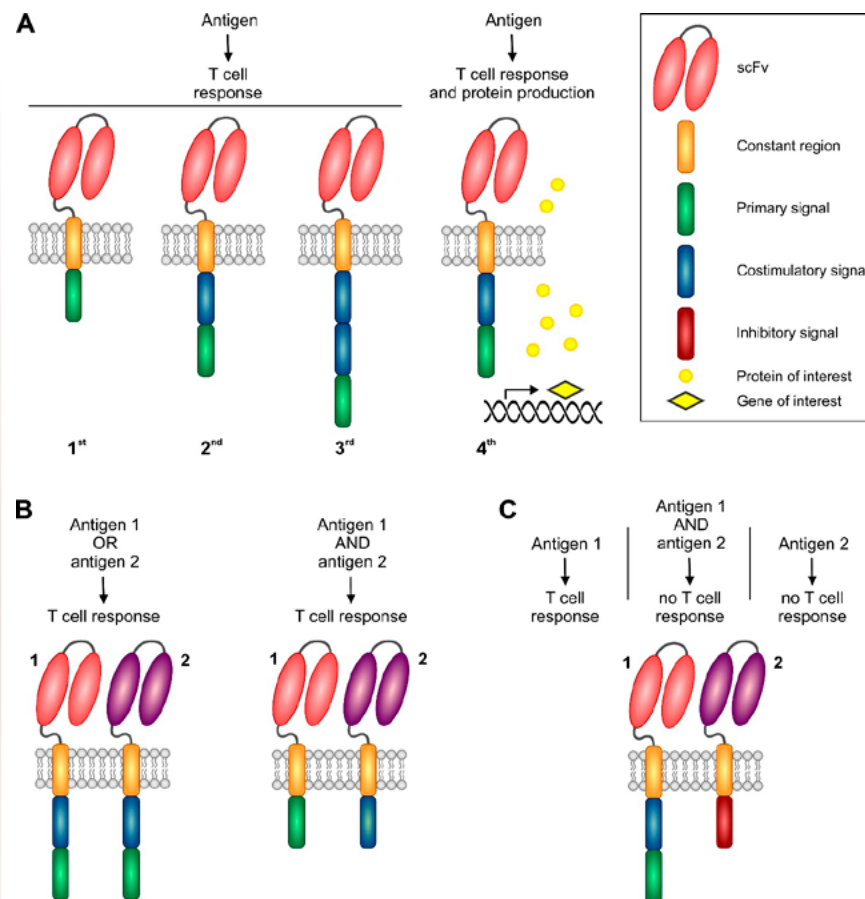


Produkt	Výrobce	Indikace	Registrační studie	Počet pacientů
Tisa-cel	Novartis	DLBCL, tFL	JULIETT ¹⁾	165
Axi-cel	Kite-Gilead	ALL	ELIANA ²⁾	75
Liso-cel	Bristol-Myers-Squibb	DLBCL, tFL, PMBL	ZUMA-1 ³⁾	111
Liso-cel	Bristol-Myers-Squibb	DLBCL, tFL, PMBL	TRANSCEND ⁴⁾	344
Brexu-cel	Kite-Gilead	MCL	ZUMA-2 ⁵⁾	74
Cilta-cel	Janssen	MM	CARTITUDE-1 ⁶⁾	113
Ide-cel	Bristol-Myers-Squibb	MM	KarMMa1 ⁷⁾	128 (36*)

Produkt	ORR (CR)	DOR	CRS celkem/gr 3-4	ICANS celkem/gr 3-4
Tisa-cel ALL	81% (81%)	59% at 12 m	77% (47%)	40% (13%)
Tisa-cel NHL	52% (40%)	63% at 12 m	58% (22%)	21% (12%)
Axi-cel	83% (58%)	Median 11 m	93% (13%)	34% (21%)
Liso-cel	73% (53%)	55% at 12 m	42% (2%)	30% (10%)
Brexu-cel	85% (59%)	PFS 61% at 12 m	91% (15%)	63% (31%)
Cilta-cel	97% (67%)	PFS 77% at 12 m	95% (4%)	21% (10%)
Ide-cel	85% (45%)	PFS median 11.8 m	76% (6%)	42% (3%)

Tabulka 1 – produkty buněčné terapie registrované nebo u nichž je očekávána brzká registrace

Zkratky: DLBCL – difuzní velkobuněčný B-lymfom, tFL – transformovaný folikulární lymfom, ALL – akutní lymfoblastová leukémie, PMBL – primární mediastinální B-lymfom, tindNHL – transformovaný indolentní ne Hodgkinův lymfom, MCL – mantle cell lymfom, MM – mnohočetný myelom, ORR – celkový počet odpovědí (overall response rate), CR – kompletní remise, DOR – trvání odpovědi (duration of response), CRS – cytokine release syndrom, ICANS – immune effector cells-associated neurotoxicity syndrom, gr – grade, NHL – ne Hodgkinův lymfom, m – měsíce, PFS – přežití bez progresu (progression-free survival). *) v publikovaném fulltextu



Obrázek 1. Schéma CAR 1.-4. generace. scFv – single chain variable fragment, variabilní fragment lehkého imunoglobulinového řetězce, constant region – konstantní část, tvořená spojovacím (hinge) a transmembránovým řetězcem, primary signal – nejčastěji CD3 řetězec, costimulatory signal – CD28, 4-1BB, OX40, ICOS aj., protein of interest – např. nekovalentně vázaný transkripční faktor pro IL-12 který se uvolní z CAR v případě jeho vazby na antigen. Převzato z Pytlík R et al, 2020. Vaccines, 8: E708⁸.

**Reference:**

1. Schuster S et al, 2019. *The New Engl J Med* 380: 45.
2. Maude SL et al, 2018. *The New Engl J Med* 378: 439.
3. Neelapu SS et al, 2017. *The New Engl J Med* 377: 2531.
4. Abramson JS et al, 2020. *Lancet* (published ahead of print).
5. Wang M et al, 2020. *The New Engl J Med* 382: 1331.
6. Madduri D et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #177.
7. Raje N et al, 2019. *The New Engl J Med* 380: 1726.
8. Pytlík R et al, 2020. *Vaccines*, 8: E708.
9. Yassine F et al, 2020. *Curr Res Trasnl Med* (published ahead of print).
10. Fitzgerald L et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #3038.
11. Khurana A et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #1222.
12. Marsal J et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #2353.
13. Neill L et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #3274.
14. Jacobson C et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #700.
15. Neelapu SS et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #405.
16. Shah N et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #1653.
17. Cui W et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #1937.
18. Hu Y et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #1182.
19. Zhang J et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #1445.
20. Thieblemont C et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #1115.
21. Yang J et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #159.
22. Jain N et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #163.
23. Park JH et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #3267.
24. Goodridge JP et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #1402.
25. Bachanova V et al, 2020. *Blood* 136 (Supplement 2): ASH meeting abstract #2356.

E09**NON-HODGKINOVY LYMFOMY****Co zaznělo na výročním kongresu Americké hematologické asociace (ASH) 2020**

Janíková A.

Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno a LF MU Brno

Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL)

DLBCL tvoří kolem 40% všech nově diagnostikovaných případů Nehodgkinových lymfomů (NHL) u dospělých. Přibližně 40-50% pacientů lze vyléčit kombinací chemoterapie s antracykliny a monoklonální protilátkou anti CD20 (1). Naopak polovina pacientů relabuje včetně asi 10% případů s progresí během léčby. Medián celkového přežití (OS) pacientů od relapsu DLBCL je 12 měsíců (2). Relaps DLBCL tedy představuje nadále závažný problém, neboť většina pacientů je starších 65 let a intenzivní léčbu (obvykle platinový režim) dostane v 1. relapsu jen asi 40% a pacientů a pouze 20% pacientů dospěje k vysoko-dávkované konsolidaci (autoPBSCT) (3). Je zde velmi naléhavá potřeba léku s dobrou účinností a současně s přijatelným profilem toxicity. V současné době je dostupná pro pacienty s 2. relapsem DLBCL léčba T-lymfocyty s anti-CD19 chimerickým antigenním receptorem (CAR-T). Léčba vykazuje u rekurentních B-lymfomů impozantní účinnost s vysokým procentem kompletních odpovědí



v řádu 40-60%, celkovým přežitím ve 2 letech 50.5% a přijatelnou toxicitou (4, 5). Tato slibná strategie má však zásadní limitaci v poměrně dlouhém technologickém čase (minimálně 3 ale v praxi obvykle 6 týdnů od odběru buněk po jejich podání). Přežití pacientů s rekurentním DLBCL, kteří "mohou na svou léčbu počkat" několik týdnů, bývá také velmi dobré (i bez CAR-T) a sice 42% v 5 letech (3). Léčba CAR-T není pro minimálně polovinu pacientů definitivním řešením, neboť i po této léčbě dochází k progresi.

Bispecifické protilátky v léčbě rekurentních B-Nehodgkinových lymfomů (B-NHL)

Velký počet sdělení byl věnován bispecifickým protilátkám antiCD20/CD3 testovaných jako monoterapie v několika různých nezávislých studiích fáze 1 a 2 u relabujících/refrakterních B-NHL (Odrontamab, Mosunetuzumab, Epcortamab, Glofitamab). U pacientů s relapsem DLBCL lze očekávat celkovou odpověď (ORR) mezi 55%-91%, z toho 45-55% kompletních remisí (CR), a to včetně pacientů starších 80 let (Mosunetuzumab). V případě folikulárních lymfomů (FL) byla ORR 80-90% s úrovní CR 50-70%. Mediány sledování byly v těchto studiích zatím poměrně krátké v řádu měsíců. Za pozornost také stojí dostupnost bispecifické protilátky k podkožnímu podání (Epcortamab) (6, 7, 8, 9, 10). Bispecifické protilátky představují potenciální alternativu CAR-T, neboť nepotřebují nezbytný logistický interval, vykazují srovnatelnou účinnost a přijatelnou toxicitu. Za pozornost jistě stojí i poměrně slibná účinnost bispecifických protilátek po selhání léčby CAR-T (ORR 33% a CR 21%).

Riziko relapsu v CNS u pacientů s DLBCL, monitorování zbytkové choroby u DLBCL

Relaps DLBCL v centrálním nervovém systému (CNS) je obávanou komplikací se špatnou prognózou (přežití v řádu měsíců od relapsu), která se vyskytuje u několika procent až desítek procent pacientů dle tzv. CNS-IPI skóre nebo histologického typu lymfomu. U pacientů s vysokým rizikem CNS relapsu je obvyklé podávání tzv. profylaxe vysokodávkovaným metotrexátem (MTX). Poměrně překvapivé zjištění plyne z retrospektivní studie prezentované na ASH 2020 u 906 pacientů s DLBCL léčených v letech 2012 až 2019. Medián sledo-

vání byl 35.3 měsíců a za tuto dobu vyvinulo relaps v CNS 44 (6.1%) pacientů. Pacienti s vysokým CNS-IPI tvořili 36% nemocných a profylaxi vysokodávkovaným MTX dostávalo 115 (35.5%) s vysokým CNS-IPI (medián 2 dávky). Je zajímavé, že k relapsu v CNS docházelo poměrně brzy od diagnózy DLBCL (medián 7.4 měsíce) s mediánem přežití od relapsu jen 7 měsíců. Efekt preventivně podávaného MTX na incidenci relapsu v CNS byl ve skupině s profylaxí 11.2% vs. 12.2% ve skupině bez profylaxe. Zdá se tedy, že profylaxe vysokodávkovaným MTX nesnižuje podstatně riziko relapsu v CNS (11).

Invaze agresivního lymfomu do CNS ať již v podobě primárního lymfomu mozku (PCNSL) nebo relapsu původně systémové DLBCL představuje často také diagnostický problém. V dnešní době lze pro potvrzení invaze do CNS prakticky využít pouze biotické vyšetření, neboť analýza likvoru (cytologicky, flow-cytometricky, stanovením klonality PCR) není dostatečně přesná. V posledních letech je z tohoto pohledu zajímavá tzv. cell-free DNA (cfDNA nebo také cirkulující nádorová DNA), která je unikátní pro daný typ nádoru a je detekovatelná v malém množství v plazmě a kopíruje do jisté míry celkovou masu tumoru (abstr No 530 a 531). Z praktického hlediska je velmi zajímavá studie identifikace cfDNA z mozkomíšního moku v průkazu PCNSL a také predikci postižení CNS u systémového DLBCL. Při analýze pacientů (n=8) s CNS lymfomem byla ve všech vzorcích likvoru specifická lymfomová cfDNA prokázána i při insuficienci detekce klonální DNA metodou PCR. Cell-free DNA je vysoce senzitivní v detekci parenchymového postižení CNS lymfomem. Průkaz lymfomové specifické cfDNA v mozkomíšním moku byl také dobrým prognostickým markerem relapsu DLBCL v mozku (12). Pokud by se tyto výsledky potvrdily v klinické praxi, znamenalo by využití technologie cfDNA velký posun v této oblasti.

Prognostický význam cfDNA ve sledování minimální zbytkové choroby u pacientů s DLBCL byl analyzován v další studii. Volná cirkulující DNA byla identifikována z primárního nádoru (77% dostupné DNA) a následně testována v periferní krvi před autoPBSCT a v produktu aferézy. Celkem bylo ve studii hodnoceno 154 pacientů, z toho 61 prospektivně a 20 pacientů dostávalo po autoPBSCT udržovací pembrolizumab. Pacienti s detekovatelnou cfDNA jak v aferetickém produktu anebo v krvi před autoPBSCT (36%) měli signifikantně horší přežití jak v PFS i OS (13).

Výsledky studií u periferních T lymfomů (PTCL)

PTCL jsou heterogenní skupinou poměrně agresivních lymfomů, které tvoří necelých 10% případů všech NHL v Evropě a USA. Ve srovnání s B-NHL je prognóza T-NHL podstatně horší. Navzdory velkému počtu podtypů T-NHL je léčba založena na kombinaci CHOP, avšak s nedostatečnou účinností. U mladších fit pacientů se jeví mít lepší účinnost intenzivnější léčba s etoposidem a eventuální konsolidací autoPBSCT. Pětileté přežití pacientů nad 40 let se i tak pohybuje kolem 50% (14). Pro T-NHL s pozitivitou antigenu CD30 (cca 50-60% T-NHL) je novým standardem léčby kombinace s brentuximabem, která pacientům přináší lepší léčebnou odpověď a signifikantně delší PFS i OS (15). Problémem nadále zůstávají zejména pacienti s T-NHL bez CD30 pozitivitu.

Novou nadějí pro tuto skupinu nemocných nepřinesla konečná analýza velké randomizované studie fáze 3 srovnávající CHOP vs. CHOP + romidespin (RoCHOP) u pacientů s PTCL. Do studie bylo v letech 2013-2017 zařazeno celkem přes 400 pacientů s mediánem věku 65 let. Mezi rameny studie nebyl prokázán signifikantní rozdíl v dosažené odpovědi ani přežití (PFS, OS). Délka trvání léčebné odpovědi byla lepší v rameni RoCHOP, avšak v tomto rameni byla zaznamenána i vyšší toxicita a méně pacientů dokončilo plánovanou léčbu (16).

Velmi pozoruhodné výsledky u pacientů s PTCL byly prezentovány v abstraktu No 40 s kombinovanou léčbou orálním azacitidinem (CC 486) + CHOP v rámci studie fáze 2. Do studie bylo zařazeno 21 pacientů s mediánem věku 66 let, 62% bylo mužů. Celková odpověď byla 75%, ale s téměř 75% CR, medián sledování pacientů ve studii v době analýzy byl 15 měsíců. Součástí studie byla i analýza epigenetické exprese, která ukázala vysokou asociaci léčebné odpovědi s TET2 (72%) a RHOA (39%) (17).

REFERENCE:

1. Coiffier B., Thieblemont C., Den Van Neste E. et al. (2010) Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2010; 116: 2040–2045.
2. Farooq U, Maurer MJ, Thompson CA et al. Clinical Heterogeneity of Diffuse Large B Cell Lymphoma Following Failure of Front-line Immunochemotherapy. *Br J Haematol* 2017; 179: 50-60.
3. Janikova A, Michalka J, Bortlíček Z et al. The interval between progression and therapy initiation is the key prognostic parameter in relapsing diffuse large B-cell lymphoma. Analysis from the Czech lymphoma study group database (NIHL). *Annals of Hematology* (under review).
4. Locke FL, Ghobaldi A, Jacobsen CA et al. Long-term safety and activity of axicabtabene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 2018 Nov
5. Schuster SJ, Bishop M, Tam C et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2019; 380: 45-56.
6. Bannerji R et al. Odronextamab (REGN1979), a Human CD20 x CD3 Bispecific Antibody, Induces Durable, Complete Responses in Patients with Highly Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma, Including Patients Refractory to CAR T Therapy. *Blood* 2020 abstr No 400.
7. Olszewski A et al. Single-Agent Mosunetuzumab Is a Promising Safe and Efficacious Chemotherapy-Free Regimen for Elderly/Unfit Patients with Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* 2020 abstr No 401.
8. Assouline SE et al. Mosunetuzumab Shows Promising Efficacy in Patients with Multiply Relapsed Follicular Lymphoma: Updated Clinical Experience from a Phase I Dose-Escalation Trial. *Blood* 2020 abstr No 702.
9. Hutchings M et al. Subcutaneous Epcoritamab Induces Complete Responses with an Encouraging Safety Profile across Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes, Including Patients with Prior CAR-T Therapy: Updated Dose Escalation Data. *Blood* 2020 abstr No 402.
10. Hutchings M et al. Glofitamab Step-up Dosing Induces High Response Rates in Patients with Hard-to-Treat Refractory or Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma. *Blood* 2020 abstr No 403.
11. Puckrin R et al. Lack of effectiveness of intravenous high-dose methotrexate for prevention of CNS relapse in patients with high-risk DLBCL: A retrospective analysis from Alberta, Canada. *Blood* 2020; ASH abstr No 477.



12. Olszewski A et al. Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis of Tumor-Specific Cell-Free DNA (cfDNA) As a Diagnostic and Prognostic Tool for Central Nervous System (CNS) Invasion in Lymphoma. *Blood* 2020 abstr 530.
13. Merryman RW et al. Prognostic Value of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Autologous Stem Cell Graft and Post-Transplant Plasma Samples Among Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* 2020 abstr 531.
14. Janikova A, Chloupkova R, Campr V et al. First-line therapy for T cell lymphomas: a retrospective population-based analysis of 906 T cell lymphoma patients. *Ann Hematol.* 2019 Aug;98(8):1961-1972.
15. Horwitz S, O'Connor OA, Pro B et al. Brentuximab vedotin with chemotherapy for CD30-positive peripheral T-cell lymphoma (ECHELON-2) a global, double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2019; 393: 229-40.
16. Bachy E et al. Final Analysis of the Ro-CHOP Phase III Study (Conducted by LYSA): Romidepsin Plus CHOP in Patients with Peripheral T-Cell Lymphoma. *Blood* 2020 abstr No 39.
17. Ruan J et al. Multi-Center Phase II Study of Oral Azacitidine (CC-486) Plus CHOP As Initial Treatment for Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL). *Blood* 2020 abstr No 40.

E10**I SOUČASNÉ TRENDY V LÉČBĚ HODGKINOVA LYMFOMU**

Mociková H.

Hematologická klinika FN Královské Vinohrady a 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Klasický Hodgkinův lymfom**První linie léčby***Počáteční stádia*

Standardem léčby počátečních stadií Hodgkinova lymfomu (HL) zůstávají 2 cykly ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastin, dakarbazin) a „involved site“ radioterapie 20 Gy. Cílem studie HD16 GHSG (German Hodgkin Study

Group) bylo dále redukovat dlouhodobou toxicitu. Vynechání radioterapie po 2 cyklech ABVD u PET2 negativních pacientů vedlo k významnému poklesu kontroly nad tumorem: pětileté přežití bez relapsu/progrese (PFS) bylo 86,1 % po ABVD a 93,4 % u kombinované léčby ABVD a radioterapie (HR 1,78), (1).

Intermediární stádia

Podle studie HD17 GHSG pro intermediární stadia HL vynechání radioterapie je možné u pacientů v kompletní metabolické remisi po 2+2, tj. po dvou cyklech chemoterapie eskalovaný BEACOPP (bleomycin, etoposid, doxorubicin, cyklofosamid, vincristin, prokarbazin, prednison) a dvou cyklech ABVD (2). Medián PFS byl 45 měsíců a medián celkového přežití (OS) 47 měsíců. Cílem studie bylo prokázat noninferioritu léčby řízené podle výsledku PET4 proti kombinované chemoradioterapii: pětileté PFS u pacientů léčených dle PET4 bylo 95,1 % vs. 97,3 % u kombinované léčby ($p=0,12$). Tento postup je novým standardem léčby GHSG pro intermediární stadia. Toxicita léčby je snížena, odpadá akutní a dlouhodobá toxicita radioterapie. Pozitivita PET4 (Deauville skóre, DS4) je významným rizikovým faktorem. Pětileté PFS pro DS4 je 81,6 % proti 98,1 % u PET4 negativních pacientů (DS1-3). Pětileté OS je 98,4 % pro PET4 řízenou léčbu a 98,8 % pro kombinovanou chemoradioterapii a radioterapii.

Studie fáze II Nivahl hodnotila výsledky podání PD-1 inhibitoru nivolumabu spolu s chemoterapií AVD a radioterapií 30 Gy „involved site“. Nivolumab byl podáván sekvenčně nebo souběžně s chemoterapií. Medián sledování: 24 měsíců. Výsledky dvouletého OS a PFS byly vynikající. Dvouleté PFS u současného podání nivolumabu bylo 100% a 98% u sekvenčního podání. Nejčastějším nežádoucím účinkem byla hypotyreóza s nutností hormonální substituce (3).

Pokročilá stádia

Studie HD18 GHSG. Nová strategie léčby byla určována podle výsledku PET2. Medián sledování 66 měsíců (4). Pětileté PFS u PET2 negativních pacientů prokázalo non-inferioritu 4 cyklů eskalovaného BEACOPP ve srovnání s 6/8 cykly (93,0% vs. 91, 2%). Významný pokles toxicity v pětiletém OS byl více patrný u 4 cyklů ve srovnání s 8 cykly a méně vyjádřený oproti 6 cyklům (98,1 % vs. 95,3 %), $p = 0,0038$. Faktory zodpovědné za rozdíl v OS: úmrtí



po 8 cyklech eskalovaného BEACOPP na akutní toxicitu nebo na sekundární leukémii/MDS.

Studie AHL 2011 (NCT01358747). Strategie zahájení léčby dvěma cykly eskalovaný BEACOPP a následně u PET2 negativních pokračování 4 cykly ABVD nemá horší výsledky oproti standardním 6 cyklům eskalovaného BEACOPP. PET4 pozitivita identifikuje pacienty s výrazně horší prognózou (5). Medián sledování 5,6 roku. Pětileté PFS bylo srovnatelné (87,5 % vs. 86,7 %, $p=0,67$) a stejně i pětileté OS (97,7 % v obou ramenou, $p=0,53$). Úprava léčby dle PET snižuje riziko infertility a zvyšuje šanci na spontánní otěhotnění.

U starších pacientů ve věku nad 60 let je kombinace brentuximab vedotinu (BV) s nivolumabem nebo BV s dakarabazinem alternativou standardní chemoterapie ABVD. Obě kombinace s BV mají akceptovatelnou toxicitu a vysoký podíl kompletních remisí (6).

Hodgkinův lymfom s lymfocytární predominancí (NLPHL)

Podle GHSG je prognóza pacientů s NLPHL v pokročilém stadiu III a IV srovnatelná s prognózou u klasického HL. Léčba u NLPHL se proto řídí léčebnými doporučeními pro klasický HL. GHSG analyzovala skupinu 86 pacientů zařazených do studie HD18, s úpravou léčby podle PET2. (7). Medián sledování byl 63 měsíců. Pětileté PFS bylo u NLPHL 82,8 %, u klasického HL až 90,6 %. U PET2 negativních NLPHL byl pětiletý PFS 90,4 % ale u PET2 pozitivních pouze 70,2 %. U PET2 negativních NLPHL nebyl patrný rozdíl mezi léčbou 4,6,8 cykly eskalovaného BEACOPP ($p=0,10$). Přidání rituximabu k 8 cyklům eskalovaného BEACOPP u PET2 pozitivních pacientů nezlepšilo pětileté PFS. Nebyl pozorován rozdíl mezi typickou histologií a variantní formou ($p=0,57$). Pětileté OS bylo 94,9 % a z 5 úmrtí ani jedno nebylo v důsledku progrese NLPHL.

Relaps Hodgkinova lymfomu

Podle analýzy dat registru EBMT (European Blood and Marrow Transplant) zavedení léčby BV, inhibitory PD-1 a podáním další (alogenní) transplantace došlo ke zlepšení prognózy pacientů s časným relapsem po autologní transplantaci kmenových buněk (ASCT). Čtyřleté OS v letech 2015-2017 bylo 61 %, v období 2006-2008 jen 35 % ($p=0,001$) (8).

Mezinárodní otevřená randomizovaná studie fáze 3 KEYNOTE-204 (NCT02684292) prokázala, že PD-1 inhibitor pembrolizumab významně zlepšuje medián PFS oproti BV u pacientů s relabovaným/refrakterním HL (12,6 měsíců vs. 8,2 měsíců, HR 0,62) a celkovou odpověď (65,6 % vs. 54,2 %, $p=0,025$), (9). Rozdíl ve prospěch pembrolizumabu byl patrný ve všech podskupinách pacientů. Proto při relapsu po autologní transplantaci kmenových buněk (ASCT) nebo u relabovaných pacientů nevhodných k ASCT je doporučeno upřednostnit pembrolizumab před brentuximab vedotinem.

Při relapsu po první linii léčby se podle studie fáze II doporučuje jako účinná kombinace pembrolizumabu s GVD (gemcitabin, vinorelbin a liposomální doxorubicin) (10). Z 34 hodnotitelných pacientů dosáhlo kompletní remise 94 % pacientů po 2-4 cyklech GVD a z toho 32 pacientů podstoupilo ASCT. Při krátkém mediánu sledování 9 měsíců a s dobrou tolerancí léčby, všichni pacienti zůstávají v remisi.

U pacientů s relabovaným/refrakterním HL s vysokým rizikem relapsu (tj. primárně refrakterní HL, relaps <1 roku po 1. linii léčby, extranodální postižení při relapsu, B symptomy při relapsu, použití >1 linie záchranné léčby, nedosažení kompletní remise před transplantací) se jeví jako výhodná konsolidace 8 cykly BV a nivolumabu, (11).

Při krátkém sledování – při mediánu 15,7 měsíců byl prokázán relaps jen u jednoho z 59 pacientů. Častěji se vyskytla periferní neuropatie a neutropénie.

Camidanlumab tesirin je konjugát IgG1 anti-CD25 monoklonální protilátky a pyrolobenzodiazepinového dimeru který byl použit ve studii fáze II u 47 pacientů při relapsu po BV a checkpoint inhibitory (12). Celkové odpovědi bylo dosaženo u 80,9 % (kompletní remise u 42,6 %) pacientů. Ze závažných nežádoucích účinků se vyskytl Guillainův-Barrého syndrom u 6,4 % pacientů a celkově v důsledku nežádoucích účinků bylo nutné léčbu předčasně ukončit u 12,8 % pacientů.

Použití checkpoint inhibitorů ve srovnání se záchrannou chemoterapií před alogenní transplantací nezvyšuje riziko graft-versus host disease (GVHD), ale naopak zlepšuje tříleté PFS a OS u pacientů, kteří po transplantaci dostávají cyklofosfamid v rámci profylaxe GVHD (13): Tříleté PFS 90 % vs. 65 % ($p=0,05$) a tříleté OS 94 % vs. 78 % ($p=0,17$).



Léčba pomocí CAR T je zavedena u relabovaných difuzních velkobuněčných B-lymfomů, ale zkouší se i v jiných indikacích, např. u Hodgkinova lymfomu. U 41 silně předléčených pacientů s relabovaným/refrakterním HL s lymfodeplecí po fludarabinu byla použita léčba pomocí CD30 CAR T s vysokým podílem celkové odpovědi 72 % (59 % kompletní remise) (14).

Při dlouhodobém sledování s opakovaným odběrem a analýzou mutací cirkulující nádorové DNA (ctDNA) byly zjištěny u relabovaných/refrakterních HL dva různé směry klonální evoluce spojené se senzitivitou (tzv. klonální „reshaping“) a rezistencí (klonální perzistence) na checkpoint inhibitory (15). V rámci somatických mutací genů se vyskytly před léčbou: STAT6 (50 %), SOCS1 (50 %), TN-FAIP3 (45 %), KMT2D (45 %), ITPKB (40 %), GNA13 (35 %). U pacientů, kteří dosáhli kompletní remise vymizely původní klony a byly nahrazeny novými klony (tzv. klonální „reshaping“). Při progresi přetrvávaly původní mutace. Rozdíl mezi klonálním „reshapingem“ a klonální perzistencí koreloval s výsledkem PET vyšetření a s mediánem PFS (39,5 vs. 9,5 měsíců; $p < 0,003$).

Závěr. Úprava léčby podle pozitronové emisní tomografie se stala standardní součástí léčebného postupu v první linii. Optimální využití brentuximab vedotinu a checkpoint inhibitorů v první linii léčby je nadále předmětem studií. Zavedení brentuximab vedotinu a checkpoint inhibitorů do léčby relapsů zlepšilo prognózu relabovaných/refrakterních pacientů.

Literatura

1. Fuchs M. et al. *J Clin. Oncol.* September 10, 2019; DOI <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00964>
2. Borchmann P. *EHA 2020. Abstr.S101.*
3. Bröckelmann P.J., et al. *ASH 2020. Abstr. 1153.*
4. Kreissl S., et al. *EHA 2020. Abstr.S222.*
5. Casasnovas O., et al. *ASH 2020. Abstr. 475.*
6. Yasenchak C.A. et al. *ASH 2020. Abstr. 471.*
7. Eichenauer D.A., et al. *EHA 2020. Abstr.S220.*
8. Bazarbachi A., et al. *ASH 2020. Abstr. 616.*
9. Kuruvilla J, et al. *ASCO 2020. Abstr. 8005.*
10. Moskowitz A.J. et al. *ASH 2020. Abstr. 470.*

11. Herrera A.F., et al. *ASH 2020. Abstr. 472.*

12. Herrera A.F., et al. *ASH 2020. Abstr. 474.*

13. Suman P. et al. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2020; 26: 1679–1688.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2020.06.012>

14. Ramos C.A. et al. *J Clin Oncol.* 2020; 38: 3794–3804.

15. Di Tirani M., et al. *EHA 2020. Abstr. EP1296.*

E11

NOVINKY V BIOLOGII CLL A MECHANISMECH CÍLENÉ LÉČBY

Mráz M.

Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno a LF MU CEITEC Masarykovy univerzity, Brno

Úvod

U CLL došlo v posledním desetiletí k objevům, které zásadním způsobem přispěli k pochopení patogeneze onemocnění a vedly k zavedení několika cílených léčiv. Inhibitory Brutonovy tyrosinkinázy (ibrutinib a acalabrutinib) spolu s inhibitorem BCL2 venetoclaxem jsou v současné době k dispozici v klinické praxi. Tyto léčiva se stávají preferovanými terapeutickými přístupy díky své pozoruhodné účinnosti, trvání remise a relativně mírným nežádoucím účinkům. V letošním roce byly oba kongresy ASH a EHA především zaměřeny u CLL na 3 základní okruhy výzkumu: **i)** mechanismy rezistence na cílenou léčbu BCR inhibitory/venetoclaxem a jak tyto léčiva účinně kombinovat **ii)** Genomické analýzy a mechanismy vzniku Richterovy transformace (RS), neboť RS zůstává obtížně léčitelnou komplikací CLL i při dostupnosti BCR inhibitorů/venetoclaxu **iii)** biologie použití check-point inhibitorů a CAR-T buněk u CLL/RS.

BCR inhibitory a rezistence na léčbu

BCR inhibitory (BCRi) fungují komplexnějším mechanismem, než se předpokládalo. Zároveň u pacientů léčených BCRi vznikají bodové i chromozomální aberace a změny ve fyziologii maligních B buněk, které jim poskytují rezistenci



k léčbě. Nejlépe popsánymi aberacemi je mutace PLC γ obcházející BCR signálozom a mutace BTK bránící kovalentní vazbě ibrutinibu. Relativní rezistence k léčbě BCR inhibitory může nastat i negenetickým adaptivním mechanismem spočívajícím v aktivaci alternativních drah a “kompenzací” inhibice BCR-asociovaných kináz (shrnutí v Kostalova a Mraz, 2019).

Na konferenci ASH zazněl příspěvek, v němž se autoři pokusili vysvětlit nízkou alelickou frekvenci BTK mutací u mnoha pacientů s rezistencí na ibrutinib, neboť zůstává otázkou jak je možné, že v některých případech <5% CLL buněk s BTK^{C481} mutací (mutace bránící vazbě ibrutinibu) je schopno způsobit rezistenci v mnohem větší části CLL klonu. Lipsky et al. usuzují na základě analýz exprese RNA a mutací DNA u jednotlivých buněk (tzv. single cell sekvenování), že pravděpodobným mechanismem je zde interakce BTK-mutovaných CLL buněk v mikroprostředí, která vede k produkci solubilních faktorů, které následně chrání „všechny“ CLL buňky. U BTK-nemutovaných CLL buněk, které koexistovaly s BTK-mutovaným subklonem, autoři nepozorovali jiný mutační mechanismus vzniku rezistence či kompenzatorní aktivaci BCR signalizace. Tyto pozorování však vycházejí z analýzy exprese RNA neumožňující přímou kvantifikaci aktivity BCR dráhy, která je spíše reflektována fosforylací/aktivitou proteinů, které ji pozitivně či negativně regulují. Naopak jiní autoři ukázali, že u maligních B buněk existují negenetické mechanismy adaptace na BCRi (shrnutí v Ondrisova a Mraz, 2020). Zdá se, že z pohledu evoluce nádorové rezistence může být CLL speciální případ, kde rezistence na BCRi je částečně parakrinne zprostředkována buňkami s BTK mutací (pravděpodobně v kombinaci s nějakým adaptačním mechanismem u zbytku CLL klonu).

U pacientů odpovídajících na léčbu BCRi, byl prezentován nepřímý efekt BCRi na interakce CLL buněk s T lymfocyty vedoucí k neschopnosti CLL buněk aktivovat CD40 dráhu v důsledku nižších hladin TRAF4 proteinu (Sharma et al.). Tyto data částečně vysvětlují výrazné efekty BCRi na proliferaci CLL buněk, neboť CD40 dráha je zásadním induktorem buněčného dělení. Forestieri et al. dále popsali, že v průběhu podávání ibrutinibu dochází u CLL buněk (analýza u pacientů s reziduální MRD) postupně k zvýšení hladin BCR receptoru a adhezivních molekul jako je CD49d. Zůstává nejasné, zda toto může být součástí adaptace na BCRi a autoři především poukázali na vznik mutací v MAPK dráze,

kteří podporují přežití buněk. Známým kompenzačním mechanismů na BCRi je upregulace BCL2, která dovoluje přežití buněk s inhibovanou BTK. Zde se tak nabízí potenciálně účinné terapeutické kombinace BCRi s venetoclaxem a na kongresech byly prezentovány slibné výsledky klinických studií takovéto terapie (Wierda et al.¹, Munir et al.). Primárními kandidáty pro kombinaci s BCRi jsou také anti-CD20 protilátky jako rituximab či obinutuzumab. V dřívější randomizované klinické studii se neprokázal benefit přidání rituximabu k ibrutinibu (Burger et al.), což bylo v principu vysvětleno jednak poklesem hladin CD20 způsobeným ibrutinibem a také off-target efektem ibrutinibu na ITK kinázu T lymfocytů, který vede k snížené schopnosti zprostředkovat cytotoxické efekty závislé na protilátkách (ADCC). Vlivu ibrutinibu na funkce dalších efektorových buněk se věnoval Zent a kolegové, kteří ukázali, že ibrutinib snižuje fagocytární schopnosti makrofágů, a to pravděpodobně off-target efektem na některou jejich kinázu (zatím neidentifikována). Klíčové je zde pozorování, že 2. generace selektivnějších BTK inhibitorů reprezentované acalabrutinibem tento nepříznivý efekt nemá a lze tedy předpokládat, že kombinace acalabrutinibu a anti-CD20 protilátkou by mohla být účinná klinicky (acalabrutinib snižuje hladiny CD20, ale neovlivňuje nepříznivě funkce makrofágů).

Genomické analýzy a vznik Richterovy transformace

U CLL byly již dříve několika skupinami publikovány výsledky celo-exomového (WES) a celo-genomového (WGS) sekvenování, které popsaly spektrum mutací u této choroby. V projektu CLL-1100 se konsorcium stejných laboratoří spojilo s cílem agregace všech dostupných WES/WGS (>1000 CLL) a saturatione analýzy tzv. „driver“ aberací. V prezentaci doposud analyzovaných dat (Knisbacher et al.) byly popsány nové „driver“ mutace např. v genech *RPS23*, *DICER*, *DIS3*, *MAP2K2* a ztráta chromozomální oblasti 7p22 (překvapivě zahrnující *CARD11*, který je považován za proto-onkogen u B lymfocytů).

Vzhledem k absenci jednotlicí genetické aberace u CLL se také věnuje pozornost studiu vzájemné „interakce“ dvou či více mutací/aberrací na vznik a agresivitu CLL. Ten Hacken et al. ukázala, že u myšího modelu CLL se ztrátou miR-15/16 (Klein et al.) lze pomocí Crispr technologie vnést do leukemických progenitorových buněk současně až 6 mutací vyskytujících se u RS



a vytvořit tak model této choroby v myši. Chakraborty et al. naopak využili TCL1 myší model a na tomto genetickém pozadí vnesly do buněk aberace TP53 a CDKN2A/B. V experimentech dále pozorovali, že takováto 3-násobná aberace (zisk TCL1, ztráta TP53 a CDKN2A/B) vede k vzniku RS, ale tyto buňky zůstávají dependentní na BCR, jehož cílené odstranění bránilo buňkám v proliferaci. Blakemore et al. prezentovali pozorování o aktivaci AKT dráhy u primárních vzorků RS. Prokázali, že po vnesení transgenu s konstitutivní aktivací AKT do TCL1 myšího modelu toto vyústí ve vznik buněk s RS fenotypem. Skupina Dr. Hernandez Rivase pak ve dvou prezentacích na ASHi (Carretero et al., Álamo et al.) shrnula výzkum na buněčných liniích, u nichž vytvořili kombinaci ztráty chromozomální oblasti 11q a ztráty genu BIRC3 (aberrace, které se často vyskytují společně), nebo kombinaci 11q delece se ztrátou funkce TP53 (aberrace vyskytující se společně spíše výjimečně: < 3% CLL). V obou studiích bylo prokázáno, že „dvojitě“ aberrace vedou k vyšší agresivitě maligních B buněk.

Biologie použití check-point inhibitorů a CAR-T buněk

Recentním konceptuálním posunem v onkologii je použití tzv. check-point inhibitorů a tím aktivace autologních T lymfocytů a jejich cytotoxický účinek na nádory. CLL je ale chorobou, která se zdá být rezistentní vůči použití inhibitorům PD1-PDL1 či CTLA4 dráhy a tyto léčiva jsou efektivní jen u části RS pacientů. Iyer et al. prezentovali, že možným prediktorem odpovědi na pembrolizomab (anti-PD-1) u RS/CLL je přítomnost vyššího množství T regulačních (Treg FOXP3+) lymfocytů. Toto pozorování je částečně kontrain intuitivní, neboť Treg lymfocyty jsou považovány za buňky modulující mikroprostředí spíše směrem k potlačení imunitní odpovědi. Iyer et al. však ukázali, že Treg buňky u RS mají schopnost produkovat cytolytický faktor perforin a mohou se tak potenciálně podílet na eliminaci CLL buněk.

Na ASHi byla také prezentována klinická data z podání CD19 CAR-T buněk u RS (Benjamini et al.) a v této studii 6 z 9 pacientů dosáhlo klinické odpovědi (všichni CR) a 3 byli refrakterní. Dále byla prezentována slibná data z klinické studie fáze I pro kombinaci liso-cel (CD19 CAR-T) s ibrutibem u relabované/refrakterní CLL (n=19; Wierda et al.²). V této studii bylo kromě očekávaného profilu toxicity reportováno vysoké množství léčebných odpovědí (ORR 95%,

CR/CRi: 62%). Mechanismy, kterými CLL buňky limitují aktivaci CD19 nebo ROR1 CAR-T buněk (bez přidání ibrutinibu) byly analyzovány s pomocí sofistikovaných ko-kultivačních modelů v prezentaci Collinsové a kolegů. Autoři dospěli k závěru, že aktivace CLL buněk například CD40 ligandem nebo anti-CD40 agonistickou protilátkou by pravděpodobně zvýšila aktivaci CAR-T buněk po kontaktu s takovými CLL buňkami in vivo.

Poděkování: Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR (grant č. NU20-03-00292) a Grantovou agenturou ČR (grant č. 20-02566S). Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

Literatura

- » Álamo MO, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 661
- » Benjamini O, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 545
- » Blakemore S, et al. 2020. EHA Library: abstract ID: S153
- » Burger JA, et al. 2019. Blood. Mar 7;133(10):1011-1019.
- » Carretero CP, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 664
- » Collins M, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 351
- » Forestieri G, et al. 2020. EHA Library: abstract ID: S154
- » Chakraborty S, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 663
- » Iyer P, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 349
- » Klein U, et al. 2010 Cancer Cell. Jan 19;17(1):28-40.
- » Knisbacher BA, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 660
- » Kostalova a Mraz. 2019. Transfuze a hematologie dnes, 25, No. 4, p. 301–308
- » Lipsky A, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 348
- » Munir T, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 124
- » Ondrisova L, Mraz M. 2020. Front Oncol. 10:591577.
- » Sharma S, et al. 2020. EHA Library: abstract ID: S152
- » Ten Hacken E, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 659
- » Wierda WG, et al.¹. 2020. ASH Library: abstract ID: 123
- » Wierda WG, et al.². 2020. ASH Library: abstract ID: 544
- » Zent CS, et al. 2020. ASH Library: abstract ID: 352

**E12****TRANSPLANTACE KMENOVÝCH BUNĚK
KRVETVORBY U DĚTÍ S AKUTNÍ LYMFATICKOU
LEUKÉMIÍ, PO 50 LETECH UŽ VÍME KDY A JAK?**

Sedláček P.

Klinika dětské hematologie a onkologie, FN v Motole a 2.LF UK, Praha

Akutní lymfatická leukémie (ALL) je u dětí nejčastějším maligním onemocněním. Během posledních 50 let došlo k výrazným pokrokům v diagnostice i léčbě, které zásadním způsobem změnilly její primárně infaustní prognózu. Cykly kombinované chemoterapie s pokroky v podpůrné léčbě vedly k dosažení a udržení remise u většiny pacientů. Postupně zaváděné metody genetické a imunologické umožnily nově definovat různé podskupiny ALL s různým prognostickým významem. Spolu se sledováním kinetiky minimální reziduální nemoci v průběhu chemoterapie nám tyto metody umožnily cíleněji modifikovat intenzitu chemoterapie a v případě její nedostatečné účinnosti indikovat pacienty k léčbě alogenní transplantací kmenových buněk krvetvorby (HSCT). Od roku 1970 se alogenní HSCT v léčbě leukémie stala prvním úspěšným příkladem biologické léčby (Graw 1970). Imunitní systém dárce napadá a likviduje reziduální leukemické klon v rámci tzv. „reakce štěpu proti leukémii“. Již v roce 1987 v časopise Lancet (Butturini 1987) autoři porovnali výsledky léčby relapsu ALL u 871 dětí chemoterapií s nebo bez následné alogenní HSCT a ukázali na lepší výsledky u pacientů s časným relapsem léčených též s pomocí HSCT. Širšímu využití HSCT ale bránila okolnost, že většina pacientů nemá vhodného HLA identického dárce v rodině. Registry nepříbuzenských dárců pomalu vznikaly od roku 1975. První transplantace od nepříbuzného dárce pro pacienta s ALL byla provedena v roce 1980. Teprve větší nábor dárců do mezinárodně využitelných registrů po roce 1990 a především zavedení molekulárně-genetických metod na analýzu alel I. a II. třídy HLA v následujících letech zvýšili šanci na dostupnost vhodného dárce pro většinu pacientů indikovaných k HSCT. V prvních deseti letech byly přesto výsledky po HSCT štěpu nepříbuzných dárců horší ve srovnání s výsledky transplantací štěpů odebraných od HLA identických sourozeneckých dárců. Bylo to jednak z důvodu vyšší toxi-

city, ale i výběrem pacientů s prognosticky závažnější formou leukémie a tedy vyšším rizikem relapsu po transplantaci. Přestože je většinu dětí a dospívajících s ALL možné vyléčit současnými chemoterapeutickými režimy, u některých jedinců stále přetrvávají špatné výsledky. V takových situacích indikujeme pacienty k HSCT. Při velkém počtu různých národních léčebných schémat při vysoké variabilitě podskupin ALL nebylo možno desítky let dobře posoudit, které postupy jsou vhodnější. Nejednotná kritéria pro indikace k transplantaci, načasování výkonu, nejednotný přístup při volbě vhodného přípravného režimu a účinné a bezpečné farmakologické profylaxe GvHD, to vše vedlo k tomu, že ještě v roce 2000 jsme mohli konstatovat, že jsme od roku 1970 nevyužili všech možností k získání validních dat.

Abychom dětem s leukémií indikovaným k alogenní HSCT mohli nabídnout nejlepší dostupné možnosti léčby, je nutná úzká spolupráce v rámci mezinárodních studijních skupin pro primární léčbu, léčbu relapsu i pro transplantaci. Ta se uskutečňuje v rámci velkých léčebných konsorcií pro dětskou leukémii (např. IBFM-SG, IntReALL, NOPHO, UKALL, AIEOP, FRALLE a další) a v komunitě pediatrických transplantací (např. EBMT-PD WG, IBFM-SC SCT, GETMON, GITMO). Studijní skupiny pro léčbu ALL hodnotí výsledky léčby dosahované v rámci prospektivních protokolů a stratifikují pacienty dle rizika relapsu do skupin se standardním rizikem, se středním rizikem a s vysokým rizikem. Na rozdíl od dospělých pacientů jsou pro alogenní HSCT způsobilí pouze pacienti s vysokým rizikem relapsu. Tím se snažíme ochránit většinu dětí před potenciálními dlouhodobými pozdními následky myeloablace a reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). Prognosticky závažné rizikové faktory lze identifikovat dokonce i při stanovení diagnózy (O'Connor 2018). Odpověď na indukční léčbu měřenou pomocí MRD má navíc silnou prediktivní hodnotu a definuje v dnešní době mnoho indikací k alogenní HSCT (Bader 2019).

Během posledního desetiletí bylo v prospektivních evropských pediatrických studiích prokázáno, že výsledky HSCT štěpy HLA identických dárců se zásadním způsobem neliší, i když byl dárce identický sourozenec (MSD) či HLA identický nepříbuzný dárce z registru (MUD). Při použití standardizovaných intenzivních myeloablativních přípravných režimů u pediatrických pacientů s vy-



sokým rizikem relapsu kleslo riziko toxických úmrtí a snížil se počet relapsů (Peters 2015, Balduzzi 2019, Dalle 2018/2020). Především výskyt pozdních následků po celotělovém ozáření byl důvodem zjistit, zda se můžeme v léčbě ALL alogenní HSCT bez ozařování obejít (Willasch 2020). Na tuto otázku měla odpovědět prospektivní studie ALL SCT FORUM.

V rámci konference ASH zazněl příspěvek s průběžnými výsledky prospektivní randomizované studie ALL SCT FORUM). Analyzováno bylo 380 dětských pacientů ve věku 4-18 let, transplantovaných v dětských centrech 5 kontinentů a 17 států. 194 dětí bylo randomizováno do větve přípravné chemoterapie s celotělovým ozářením (12Gy) v kombinaci s etoposidem, 186 dalších mělo v přípravě kombinaci chemoterapie s fludarabinem a thiotepou s busulfanem (n=96) či treosulfanem (n=90). Výsledky byly zklamáním, protože primárním cílem studie bylo prokázat stejnou bezpečnost a efektivitu kombinované myeloablativní chemoterapie proti ozařování s předpokladem dlouhodobého sníženého rizika pozdních následků po ozařování (Lawitschka 2018). Rameno s ozářením ale signifikantně prokázalo nejnižší riziko úmrtí v důsledku časně toxicity (TRM), nejnižší riziko relapsu (CIR) a nejlepší přežití bez příhody (EFS). Ve studii nebyl signifikantní rozdíl v dosažených výsledcích při použití busulfanu (v plné dávce, s úpravou dávek dle hladin; TDM) či treosulfanu. Randomizace byla předčasně ukončena a studie dál pokračuje s doporučením kombinace ozáření s etoposidem jako zlatého standardu pro děti starší 4 let. V rámci multivariantní analýzy nebyl ve všech třech analyzovaných skupinách rozdíl v charakteristice pacientů v závislosti na věku, pohlaví, imunofenotypu leukémie, dárci (MSD vs MUD), remisi (CR1 vs CR2), typu relapsu (dřeň vs kombinovaný relaps).

	TBI	Busulfan	Treosulfan	P value
Primary Endpoint				
Death				
Deaths/patients	19/194	22/96	20/90	
2-year OS (95% CI)	0.91 (0.85–0.94)	0.77 (0.66–0.85)	0.77 (0.65–0.85)	<0.001
Secondary endpoints				
Any failure				
Relapse, second malignancy or death/patients	30/194	30/96	33/90	
2-year EFS (95% CI)	0.85 (0.79–0.90)	0.64 (0.52–0.74)	0.58 (0.45–0.69)	<0.001
Relapse				
Relapses/patients	23/194	23/96	24/90	
2-year CIR (95% CI)	0.12 (0.08–0.17)	0.30 (0.19–0.41)	0.31 (0.20–0.42)	0.004
Non-leukemia death				
Death in CR/patients	7/194	7/96	9/90	
2-year cumulative incidence of TRM (95% CI)	0.03 (0.01–0.06)	0.06 (0.03–0.13)	0.12 (0.06–0.20)	0.114

Literatura

Graw RG Jr, Brown JA, Yankee RA, et al.

Transplantation of HL-A identical allogeneic bone marrow to a patient with acute lymphocytic leukemia.

Blood. 1970 Dec;36(6):736-47.

Butturini A, Rivera GK, Bortin MM, et al.

Which treatment for childhood acute lymphoblastic leukaemia in second remission? Lancet. 1987 Feb 21;1(8530):429-32.



O'Connor D, Enshaei A, Bartram J, et al.

Genotype-Specific Minimal Residual Disease Interpretation Improves Stratification in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia
J Clin Oncol. 2018 Jan 1;36(1):34-43.

Bader P, Salzmann-Manrique E, Balduzzi A, et al.

More precisely defining risk peri-HCT in pediatric ALL: pre- vs post-MRD measures, serial positivity, and risk modeling.
Blood Adv. 2019 Nov 12;3(21):3393-3405

Peters C, Schrappe M, von Stackelberg A, et al.

Stem-cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia: A prospective international multicenter trial comparing sibling donors with matched unrelated donors-The ALL-SCT-BFM-2003 trial.
J Clin Oncol. 2015 Apr 10;33(11):1265-74.

Balduzzi A, Dalle JH, Wachowiak J, et al.

Transplantation in Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia from a Matched Donor versus an HLA-Identical Sibling: Is the Outcome Comparable? Results from the International BFM ALL SCT 2007 Study.
Biol Blood Marrow Transplant. 2019 Nov;25(11):2197-2210.

Dalle JH, Balduzzi A, Bader P, et al.

Allogeneic Stem Cell Transplantation from HLA-Mismatched Donors for Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated According to the 2003 BFM and 2007 International BFM Studies: Impact of Disease Risk on Outcomes.
Biol Blood Marrow Transplant. 2018 Sep;24(9):1848-1855.

Dalle JH, Balduzzi A, Bader P, et al.

The impact of donor type on the outcome of pediatric patients with very high risk acute lymphoblastic leukemia. A study of the ALL SCT 2003 BFM-SG and 2007-BFM-International SG.
Bone Marrow Transplant. 2020 Aug 4. doi: 10.1038/s41409-020-01014-x.

Lawitschka A, Peters C.

Long-term Effects of Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia.
Curr Oncol Rep. 2018 Aug 3;20(9):74.

Willasch AM, Peters C, Sedláček P, et al.

Myeloablative conditioning for allo-HSCT in pediatric ALL: FTBI or chemotherapy?-A multicenter EBMT-PDWP study.
Bone Marrow Transplant. 2020 Aug;55(8):1540-1551

Peters C, Dalle JH, Locatelli F, et al.

TBI or Chemotherapy-Based Conditioning for Children and Adolescents with ALL: the FORUM Trial on Behalf of the AIEOP-BFM-ALL SG, IBFM-SG, INTREALL-SG and EBMT-PD WP
ASH 2020 oral presentation

E13

AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE NA 62. ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION

Ráčil Z.

Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha

62. ASH Annual Meeting and Exposition v oblasti AML přinesl spíše než jasné výsledky měnící klinickou praxi, řadu nadějných léčebných strategií – zejména četné lékové kombinace použité v iniciální i záchranné terapii AML; sub-analýzy již dostupných dat umožňující preciznější vedení již dostupné léčby; a konečně výsledky studií rané fáze u několika velmi nadějných léků.

**Léčba de novo AML u nemocných mladších 60-65 let****Kombinace s venetoklaxem**

Byla představena první data, která prokázala schůdnost a mimořádnou efektivitu venetoklaxu (400 mg/den D1-14) přidaného k FLAG-IDA indukci a konsolidaci v iniciální léčbě AML. I přes malou skupinu nemocných bylo dosaženo souhrnné kompletní remise (CRc = CR+CRi+CRh) u 26/28 nemocných (90 %) a 96 % z nich dosáhlo MRD negativitu. OS v 1 roce pak byl mimořádných 94 % (Lachowietz et al – abstrakt 332).

Podobně byla prezentována první data ukazující schůdnost kombinace venetoklaxu se standardním režimem 3+7. Maximální tolerovaná dávka venetoklaxu v indukci byla 400 mg den D1-11, avšak pro toxicitu pouze ve věkové skupině do 60 let (Stone et al. – abstrakt 1038).

FLT3 ITD/TKD pozitivní AML

Sierra et al. představil srovnání midostaurinu přidaného k indukci 3+7 s idarubicinem nebo s daunorubicinem (kombinace použita v registrační studii). Studie prokázala stejnou efektivitu, a stejnou bezpečnost při použití kombinace s idarubicinem, a to i přes to, že ve skupině s idarubicinem byl větší podíl nemocných vyššího věku a s horším ECOG (abstrakt 632).

Pratz et al. (abstrakt 24) ve studii fáze 1 prokázal zejména bezpečnost gilteritinibu v dávce 120 mg/den přidaného k indukční (3+7) a konsolidační (HD ARA-C) chemoterapii a následně podaného v udržovací léčbě. 81,6 % nemocných dosáhlo CRc a u 84,6 % z nich vymizela FLT3-ITD mutace před zahájením udržovací léčby (ultrasenzitivní NGS monitoring). Při follow upu 35,8 měsíce byl medián DFS 13,3 měsíců a medián OS nebyl dosud dosažen. Úmrtí spojené s léčbou bylo pouze v jednom případě. Na základě těchto výsledků byla iniciována randomizovaná studie srovnávající přidání midostaurinu nebo gilteritinibu ke standardní léčbě de novo AML.

Léčba de novo AML u starších nemocných

Recentně publikovaná studie kombinující azacitidin s venetoklaxem vedla k dosažení CR u 37 % a CR/CRi u 67 % nemocných s nově diagnostikovanou AML, kteří nebyli indikováni k intenzivní léčbě. Tato studie změnila paradigma současné léčby starších nemocných s AML. Kadia et al. (abstrakt 25)

na ASH 2020 prezentoval u stejné skupiny nemocných výsledky studie fáze 2, která kombinovala venetoklax s LD ARA-C a s kladribinem v indukci. V konsolidaci pak byl použit stejný režim střídavě s režimem venetoklax s azacitidinem. Dosažené výsledky byly mimořádné – z 54 nemocných 42 (78 %) dosáhlo CR (z toho 93 % MRD negativitu) a 93 % dosáhlo CR/CRi (z toho 84 % MRD negativitu). OS a RFS v 1 roce byl 70 % a 66 %. Při dosažení MRD negativitu pak OS v 1 roce byl dokonce 93 %. Naopak u nemocných spadajících do nepříznivé cytogenetické skupiny byl OS v 1 roce 33 %. 30 % pacientů u kterých došlo k léčebné odpovědi pak podstoupilo alogenní HSCT. Konečně uvedený režim, nebyl spojen s významnou toxicitou.

Léčba relabující/ refrakterní AML**CC-486 – perorální azacitidin**

Perorální azacitidin (AZA) je na základě studie fáze 3 (QUAZAR AML-001) v současné době již schválen FDA pro použití v udržovací léčbě po dosažení 1. CR intenzivní léčbou u nemocných s AML, kteří nejsou schopni podstoupit alogenní HSCT. V této indikaci perorální AZA v dávce 300 mg/den 14 dní v měsíci prokázal signifikantní prodloužení OS a RFS. Součástí protokolu této studie byla možnost navýšení dávky perorálního AZA na 300 mg/den 21 dní v měsíci v případě záhytu incipientního relapsu (záchyt 5-15 % blastů v kostní dřeni). Döhner et al. (abstrakt 111) na ASH 2020 informoval o výsledcích této podskupiny nemocných, kdy při dobré toleranci navýšené dávky CC-486 bylo u 23 % (vs. 11 % v rameni s placebem) dosaženo opětovné CR/CRi AML.

Kombinace s venetoklaxem

Jednoznačně největší počet studovaných režimů v záchranné terapii AML představovali kombinace s venetoklaxem.

U mladších nemocných byla nejvýznamnější kombinace VEN s FLAIDA (Lachowietz et al. – abstrakt 332) s výsledným CRc u 67 % nemocných (z nich 69 % s MRD negativitou), CRc + MLFS u 72 % léčených jedinců a OS v 1 roce 68 %. Režim byl excelentním mostem do transplantace krvetvorné tkáně - 46 % nemocných s R/R AML následně podstoupilo alogenní HSCT a OS v 1 roce po alogenní HSCT bylo mimořádných 78 %.



V další studii byla srovnávána intenzivní záchranná chemoterapie s neintenzivní léčbou kombinací VEN s decitabinem 10 dní (Maiti et al – abstrakt 637). Neintenzivní léčba kombinací VEN + DEC10 vedla u 54 nemocných s R/R AML (46 % bylo mladších 60 let) ke stejné frekvenci dosažení CRc jako záchranná intenzivní chemoterapie – 41 % vs. 30 % (při započtení morfologicky stavu bez leukémie – MLFS dokonce k lepším výsledkům – 59 % vs. 31 %), stejnému OS a dokonce lepšímu EFS. Signifikantně více nemocných léčených VEN + DEC10 podstoupilo alogenní HSCT. Zásadní pak byla dramaticky nižší toxicita neintenzivního režimu VEN + DEC10. Neintenzivní léčba VEN + DEC10 tak představuje plnohodnotnou alternativu dosud používaných záchranných chemoterapeutických režimů, a to i u mladších nemocných.

U pacientů s R/R AML s FLT3 ITD/TKD mutací byla prezentována analýza podávání venetoklaxu 400 mg/ den v kombinaci s gliteritinibem 120 mg/den. U 43 pacientů s R/R FLT3 ITD/TKD pozitivní AML (kdy 65 % bylo již předléčeno FLT3 inhibitory a 32 % podstoupilo dříve alogenní HSCT) vedla tato kombinace k dosažení CRc u 34,1 % a CRc + MLFS u 85,4 % léčených (Daver et al. – abstrakt 333). Kombinace tedy přinesla významně větší efektivitu než recentně publikovaná monoterapie gliteritinibem v indikaci R/R AML s FLT3-ITD/TKD mutací (studie ADMIRAL).

Nové léky

ASH 2020 meeting přinesl také první informace o efektivitě a bezpečnosti několika velmi nadějných přípravků.

Magrolimab

Magrolimab je anti-CD47 monoklonární protilátka, která díky bloádě CD47 na makrofázích, představuje „makrofágový check-point inhibitor“, jehož efektivitu in vitro zvyšuje AZA. Sallman et al. (abstrakt 330) představil první výsledky studie 1b kombinující magrolimab s AZA u nemocných s de novo AML, kteří nejsou kandidáti pro intenzivní léčbu. Ve skupině 43 nemocných (kdy 70 % spadalo do ELN vysokého rizika a 73 % mělo mutaci TP53) bylo dosaženo CRc u 54% nemocných a CRc + MLFS u 61 % pacientů. Mimořádně zajímavá jsou data u pacientů s TP53 mutací, kdy výsledky byly podobné – CRc 59 % a CRc + MLFS 66 %. Medián OS u TP53 nemutovaných byl 18,9 měsíců a u TP53

mutovaných 12,9 měsíců. Celkové výsledky jsou tedy podobné výsledkům kombinace VEN s AZA, a ve skupině pacientů s AML s TP53 mutací dokonce významně lepší. Tyto výsledky vedly k iniciaci srovnávací studie fáze 3 pro TP53 mutované AML VEN + AZA versus VEN + magrolimab.

Flotetuzumab

Flotetuzumab je bispecifická protilátka anti-CD3 a anti-CD123 (antigen CD123 je over-exprimován na povrchu leukemických kmenových buněk). Aldoas et al. (abstrakt 381) představil výsledky studie fáze 1/2 u nemocných s R/R AML. Podání flotetuzumabu bylo sice doprovázeno syndromem z uvolnění cytokinů (CRS) u všech nemocných, grade 3 však rozvinul pouze 1 nemocný. Podobně neurotoxicita grade 3 a více byla přítomna pouze ve 4 případech. Ze 44 nemocných 31,8 % dosáhlo CRc (38,6 % CRc + MLFS) a více jak poloviny z nich podstoupila následně alogenní HSCT.

KO-539

KO-539 je vysoce potentní, selektivní perorálně podávaný inhibitor menin-KMT2A (MLL) komplexu. Po AML s FLT3-ITD/TKD a s IDH1/2 mutací, tak AML s přestavbou MLL genu představuje další potenciální podskupinu AML pro cílenou léčbu. Wang et al. (abstrakt 115) představila výsledky od prvních nemocných s R/R AML, kterým byl tento přípravek podán.

62. ASH meeting tedy svými prezentacemi na poli léčby AML pokračoval v trendu posledních 3 let – nacházíme se v éře, která zásadně mění naše dosud platná paradigmat – je zřejmé, že léčba AML bude stále více cílenější; že nové již v monoterapii vysoce účinné léky přidané ke konvenční chemoterapii, ale zejména pak v kombinacích mezi sebou dosahují mimořádné efektivitu; a že tyto kombinace jsou pak minimálně rovnocenné, ale velmi pravděpodobně efektivnější a zcela jistě bezpečnější než dosavadní intenzivní chemoterapeutické režimy. Všechny tyto poznatky pak již nyní, a ještě více v průběhu velmi blízké doby konečně významně zlepší prognózu našich nemocných s akutní myeloidní leukémií. A je jisté, že 63. ASH v roce 2021 bude v tomto trendu pokračovat.



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

ONLINE

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

64

**OCENĚNÉ PRÁCE
ČHS ČLS JEP
ZA ROK 2019**



INTEGRATION OF COO INTO THE CLINICAL CNS INTERNATIONAL PROGNOSTIC INDEX IMPROVES CNS RELAPSE PREDICTION IN DLBCL

Magdalena Klanova,¹⁻³ Laurie H. Sehn,⁴ Isabelle Bence-Bruckler,⁵ Federica Cavallo,⁶ Jie Jin,⁷ Maurizio Martelli,⁸ Douglas Stewart,⁹ Umberto Vitolo,¹⁰ Francesco Zaja,¹¹ Qingyuan Zhang,¹² Federico Mattiello,¹³ Gila Sellam,³ Elizabeth A. Punnoose,¹⁴ Edith Szafer-Glusman,¹⁴ Christopher R. Bolen,¹⁵ Mikkel Z. Oestergaard,¹⁶ Guenter R. Fingerle-Rowson,³ Tina Nielsen,³ and Marek Trneny¹

¹1st Department of Medicine, Charles University General Hospital, Prague, Czech Republic

²Institute of Pathological Physiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

³Pharma Development Clinical Oncology, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland

⁴British Columbia Cancer Agency, Centre for Lymphoid Cancer, Vancouver, BC, Canada

⁵The Ottawa Hospital and Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, ON, Canada

⁶Division of Hematology, University of Torino, Azienda Ospedaliero-Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino, Turin, Italy

⁷Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University College of Medicine, Zhejiang, China

⁸Department of Cellular Biotechnologies and Hematology, Sapienza University, Rome, Italy

⁹Tom Baker Cancer Centre, Department of Oncology, Calgary, AB, Canada

¹⁰AOU Citta' Della Salute e della Scienza, SC Ematologia, Turin, Italy

¹¹S.C. Ematologia Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Trieste, Italy

¹²Department of Medical Oncology, Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin, China

¹³Pharma Development Biometrics Biostatistics, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland

¹⁴Oncology Biomarker Development, Genentech Inc., South San Francisco, CA, USA

¹⁵Bioinformatics, Genentech Inc., South San Francisco, CA, USA

¹⁶Oncology Biomarker Development, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland

Central nervous system (CNS) relapse carries a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Integrating biomarkers into the CNS International Prognostic Index (CNS-IPI) risk model may improve identification of patients at high risk of developing secondary CNS disease. CNS relapse was analyzed in 1,418 DLBCL patients treated with obinutuzumab or rituximab plus CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) chemotherapy in the phase III GOYA study (NCT01287741). Cell-of-origin (COO) was assessed using gene expression profiling. BCL2 and MYC protein expression were analyzed by immunohistochemistry. The impact of CNS-IPI, COO, and BCL2/MYC dual-expression status on CNS relapse was assessed using a multivariate Cox regression model (data available in $n = 1,418$, $n = 933$, and $n = 688$, respectively). High CNS-IPI score (hazard ratio [HR], 4.0; 95% confidence interval [CI], 1.3–12.3; $P = .02$) and activated B-cell-like (ABC) (HR, 5.2; 95% CI, 2.1–12.9; $P = .0004$) or unclassified COO subtypes (HR, 4.2; 95% CI, 1.5–11.7; $P = .006$) were independently associated with CNS relapse. BCL2/MYC dual-expression status did not impact CNS relapse risk. Three risk subgroups were identified according to the presence of high CNS-IPI score and/or ABC/unclassified COO (CNS-IPI-C model): low risk (no risk factors, $n = 450$ [48.2%]); intermediate risk (one factor, $n = 408$ [43.7%]); and high risk (both factors, $n = 75$ [8.0%]). Two-year CNS relapse rates were 0.5%, 4.4%, and 15.2% in respective risk subgroups. Combining high CNS-IPI and ABC/unclassified COO improved CNS relapse prediction and identified a patient subgroup at high risk of developing CNS relapse.

Citace:

Integration of cell of origin into the clinical CNS International Prognostic Index improves CNS relapse prediction in DLBCL. Klanova M, Sehn LH, Bence-Bruckler I, Cavallo F, Jin J, Martelli M, Stewart D, Vitolo U, Zaja F, Zhang Q, Mattiello F, Sellam G, Punnoose EA, Szafer-Glusman E, Bolen CR, Oestergaard MZ, Fingerle-Rowson GR, Nielsen T, Trneny M. **Blood.** 2019 Feb 28;133(9):919-926



GENOMIC LANDSCAPE OF PEDIATRIC B-OTHER ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Marketa Zaliová^{1,2,3}, Jan Stuchly^{1,2}, Lucie Winkowska^{1,2}, Alena Musilova^{1,2}, Karel Fiser^{1,2}, Martina Slamova^{1,2}, Eliska Potuckova^{1,2}, Lenka Hovorkova^{1,2}, Julia Starkova^{1,2}, Martina Vaskova^{1,2}, Ester Mejstrikova^{1,2,3}, Ondrej Hrusak^{1,2,3}, Lucie Sramkova^{1,2,3}, Jan Stary^{1,2,3}, Jan Zuna^{1,2,3} and Jan Trka^{1,2,3}

¹CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague;

²Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University

³University Hospital Motol, Prague

Novel biological subtypes and clinically important genetic aberrations (druggable lesions, prognostic factors) have been described in B-other acute lymphoblastic leukemia (ALL) during the last decade; however, due to a lack of studies on unselected cohorts, their population frequency and mutual associations still have to be established. We studied 110 consecutively diagnosed and uniformly treated childhood B-other patients using single nucleotide polymorphism arrays and whole exome/transcriptome sequencing. The frequency of DUX4-rearranged, BCR-ABL1-like, ZNF384-rearranged, ETV6-RUNX1-like, iAMP21 and MEF2D-rearranged subtypes was 27%, 15%, 5%, 5%, 4%, and 2%, respectively; 43% of cases were not classified into any of these subtypes (B-rest). We found worse early response to treatment in DUX4-rearranged leukemia and a strong association of ZNF384-rearranged leukemia with B-myeloid immunophenotype. Of the druggable lesions, JAK/STAT-class and RAS/RAF/MAPK-class aberrations were found in 21% and 43% of patients, respectively; an ABL-class aberration was found in one patient. A recently described negative prognostic factor, IKZF1plus, was found in 14% of patients and was enriched in (but not exclusive for) BCR-ABL1-like subtype. PAX5 fusions (including 4 novel), intragenic amplifications and P80R mutations were mutually exclusive and only occurred in the B-rest subset, altogether accounting for 20% of the B-other group. PAX5 P80R was associated with a specific gene expression signature, potentially defining a novel leukemia subtype. Our study showed unbiased

European population-based frequencies of novel ALL subtypes, recurrent (cyto) genetic aberrations and their mutual associations. This study also strengthened and widened the knowledge of pediatric B-other ALL and provided an objective basis for optimization of current genetic diagnostics.

In a related study we focused on ERG gene deletions that occur recurrently in acute lymphoblastic leukemia, especially in the DUX4-rearranged subtype. The ERG-deletions were shown to positively impact prognosis of patients harboring the IKZF1-deletion (a negative prognostic marker) and its presence thus precludes assignment into IKZF1plus group, a novel high-risk category on AIEOP-BFM ALL trials. We analyzed the impact of different methods on ERG-deletion detection rate, evaluated ERG-deletion as a potential marker for DUX4-rearranged leukemia, studied its associations with molecular and clinical characteristics within this leukemia subtype, and analyzed its clonality. Using single-nucleotide-polymorphism array, genomic polymerase chain reaction (PCR) and amplicon-sequencing we found ERG-deletion in 34% (16 of 47), 66% (33 of 50) and 78% (39 of 50) of DUX4-rearranged leukemia, respectively. False negativity of ERG-deletion by single-nucleotide-polymorphism array caused IKZF1plus misclassification in 5 patients. No ERG-deletion was found outside the DUX4-rearranged cases. The ERG-deletion positivity by PCR was associated with better outcome [5-year event-free survival (EFS), ERG-deletion-positive 93% vs. ERG-deletion-negative 68%, $P=0.022$; 5-year overall survival (OS), ERG-deletion-positive 97% vs. ERG-deletion-negative 75%, $P=0.029$]. Ultra-deep amplicon sequencing revealed distinct co-existing ERG-deletions in 22 of 24 patients. In conclusion, our data demonstrate inadequate sensitivity of single-nucleotide-polymorphism array for ERG-deletion detection, unacceptable for proper IKZF1plus classification. Even using more sensitive methods (PCR/amplicon-sequencing) for its detection, ERG-deletion is absent in 22–34% of DUX4-rearranged leukemia and does not represent an adequately sensitive marker of this leukemia subtype. Importantly, the ERG-deletion potentially stratifies the DUX4-rearranged leukemia into biologically/clinically distinct subsets. Frequent polyclonal pattern of ERG-deletions shows that late origin of this lesion is more common than has been previously described.



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

ONLINE

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

67

PŘEDNÁŠKOVÁ SDĚLENÍ (ABSTRAKTY O01 – O10)



001

MAJOR MOLECULAR RESPONSE IS THE THRESHOLD FOR NGS ANALYSIS AND RESISTANT BCR-ABL1 MUTATION DETECTION IN CML

Machová Poláková K.¹, Benešová A.¹, Martelli M.², Polívková V.¹, Koblihová J.¹, Pecherkova P.¹, Klamová H.¹, Srbova D.¹, Žížková H.¹, Hochhaus A.³, Soverini S.²

¹⁾ Ustav hematologie a krevni transfuze, Praha, Česko

²⁾ Hematology/Oncology „Lorenzo e Ariosto Seràgnoli“, University of Bologna, Bologna, Itálie

³⁾ Abteilung Hämatologie/Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, University of Jena, Jena, Germany

Introduction. In chronic myeloid leukemia (CML), the advantages of sensitive BCR-ABL1 kinase domain (KD) mutation detection promote the use of next generation sequencing (NGS). Early recognition of an emerging resistance to tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy associated with BCR-ABL1 KD mutations is important for successful patient (pt) management. Previous studies suggested that fluctuating levels of BCR-ABL1 transcript levels around 0.1 %^{IS} (unstable major molecular response – MMR) during TKI therapy may be an early indicator for mutation testing.

Aims. The aim of this EUTOS study was to take advantage of NGS to investigate the role of BCR-ABL1 KD mutations in CML pts with unstable MMR on TKI therapy.

Material and Methods. A total of 90 pts with unstable MMR on TKI therapy were divided into 2 groups. Group A (14/90) included pts on TKI therapy (1st line, n=13; 5th line, n=1) who had initially achieved deep molecular response (DMR), but BCR-ABL1 transcripts had subsequently increased to the levels of unstable MMR. Group B (76/90) consisted of pts who had achieved no better response to TKIs (1st line, n=53; 2nd or subsequent line, n=23) than unstable MMR. NGS of the BCR-ABL1 KD was performed in duplicate on an Illumina

MiSeq. The NextGene software (Softgenetics) and the in-house bioinformatic tool NextDom were applied for data processing, error filtering and mutation calling at significant levels (median 1.5 % of a particular mutation in total BCR-ABL1 transcripts, range 1.0-3.7 %; p-value ≤0.05).

Results. In Group A, NGS has so far been performed in 11/14 pts and mutations have been detected in 6/11 (54%). Mutations were confirmed by NGS analysis in subsequent follow-up samples in 4/11 pts (36%). Pts with M244V and V379I mutations were switched to dasatinib and achieved DMR (Figure 1). Another pt with M244V mutation maintained unstable MMR for 18 months as long as imatinib dose was reduced due to intolerance, but obtained DMR after the full dose was restored. Pt with G250E and Y253H remained in MMR for 10 months, followed by a 1-log BCR-ABL1 increase. Two pts with low-level mutations remain in unstable MMR. The low-level mutations were detected in one of the duplicates only and were not confirmed in subsequent analyses. In Group B, 65/76 pts were sequenced so far and variants were detected in 9/65 (14%). The pt with confirmed T315I during unstable MMR subsequently relapsed to blast crisis in one month. Imatinib-resistant mutations were detected in 4 pts, who were switched to a 2nd generation TKI and achieved stable MMR or better with a median follow-up of 12 months (range, 6-18). Finally, 4 pts with low-level variants detected in one of the duplicates remain in unstable MMR with a median follow-up of 68.5 months (range, 33-144).

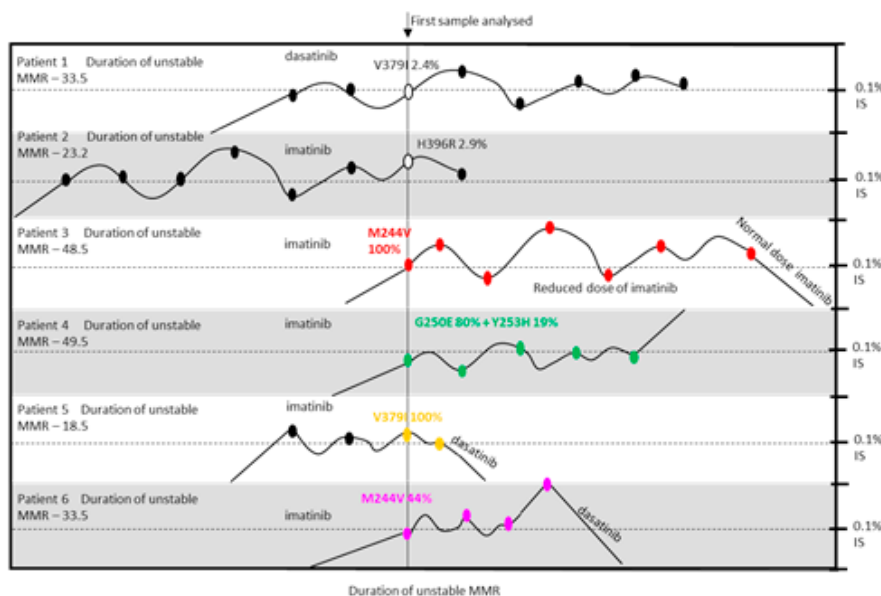
Conclusions. Our data suggest that loss of DMR followed by BCR-ABL1 increase to the level of MMR is an early indicator for NGS mutation testing. In contrast, the probability of mutation detection in pts who do not achieve better response than unstable MMR seems to be low. MMR is the level of measurable residual disease above which NGS of BCR-ABL1 can successfully be performed. However, mutation testing in MMR samples should be done in duplicate and results should be evaluated carefully. It is unclear whether low-level variants detected only in one of the duplicates of the investigated sample can be artefacts that occur during processing of low-copy BCR-ABL1 samples.



Hence, follow-up testing in subsequent samples should be performed to monitor mutation kinetics.

Support EUTOS2018, MZCR 00023736

Figure 1 Scheme illustrates mutation detection in patients at the time of unstable MMR. For the imagination the group A of patients is presented.



Legend: Unstable MMR is depicted by the wavy black line of BCR-ABL1 transcript corresponding to 0.1% IS $\pm$ 0.16 (the uncertainty of measurement); the $\pm$ 1log increase or decrease of BCR-ABL1 is depicted by the black line; dashed line illustrates the 0.1% IS level of BCR-ABL1; black dots represent the BCR-ABL1 measurement of unstable MMR; coloured dots depict a mutation detected by NGS; empty dots depict variants that have been detected in one parallel only.

002

DIAGNOSTIC YIELD OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE (BAL) IN HAEMATOLOGICAL PATIENTS - SINGLE CENTRE 14 YEARS EXPERIENCE

Palacková M.¹, Kocmanová I.^{2,1}, Lengerová M.^{3,1}, Kartáková Švábová H.³, Mayer J.^{3,1}, Ráčil Z.⁴

¹Masarykova Univerzita Brno, Brno

²Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno, Brno

³Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno, Brno

⁴Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Background

The major cause of mortality and morbidity in haematology patients (pts.) are lung infections. Intensification of cytostatic treatment increases their prevalence and lung infiltrates during neutropenia are present in 15% to 25% pts. Early diagnostics of the specific pathogen causing this infections and early relevant treatment improves outcome of this pts.

Aim

The aim was to evaluate the contribution of the BAL to the final diagnosis of lung infection and adjustment of therapy.

Methods

Retrospective analysis was undertaken at University Hospital Brno from 1/2005 until 12/2018. All samples from adult pts. with haematological malignancy and pulmonary infiltrates on radioimaging were included to the analysis. For each infection episode only the first bronchoscopy was included to the analysis. The BAL was performed within 1 to 2 days after detection of pulmonary infiltrates. BAL sample was obtained from the area where the infiltration was most severe. All pts. signed informed consent with the procedure. Treatment changes or modifications are defined as addition, change or prolongation of anti-infective agents.

**Results**

390 BAL from 359 pts. met our criteria and were included to the analysis (male 63.0%, female 36.9%) The median age at the time of BAL was 54 years (range 18–79 years). Severe neutropenia ($ANC < 0.5 \times 10^9/L$) was present in 176 (45%) cases, moderate neutropenia ($ANC < 1.0 \times 10^9/L$ but $\geq 0.5 \times 10^9/L$) in 40 (10%) cases. 85 BALs were from pts. after allogeneic SCT (allo), 53 BALs from pts. after autologous SCT (auto) and 252 BALs from other haematological pts.

Fever was recorded in 82% of cases, dyspnoea in 44% cases. Bilateral lung infiltrates were present in 277 (71%) of cases, unilateral in 113 (29%) of cases. Anti-infective agents were administered pre-emptively or empirically before or immediately after BAL in 356 (91%) of cases, hereof broad-spectrum antibiotics 354 (91%), antifungals 176 (45%) and antivirals 26 (7%).

In our analysis, BAL provides specific infectious diagnosis in 47% (184) cases. Bacterial pathogens were present in 25% (98) samples, viral pathogens in 5% (18) samples, fungal pathogens in 16% (61) samples, *Pneumocystis spp.* was detected in 7% (27) samples and two or more pathogens in 5% (16) samples. 53% (205) of procedures were non-diagnostic.

As mentioned above, in 91% of cases anti-infective treatment was already administered. Changing of the treatment according to BAL results were done in 30% (116/390). When only positive BAL are taken to the analysis this number increases to 60% (111/184).

Conclusions

Our study proved the importance of BAL for microbiological evidence of pulmonary infiltrates. The routine use of molecular and serological techniques in the assessment of BAL fluid contributes to a rapid detection of infections and allow targeted treatment.

Table 1: BAL results – 2005-2008 vs. 2009-2013 vs. 2014-2018

	2005-2008 (n=148)	P value	2009-2013 (n=113)	P value	2014-2018 (n=129)
Fever, n (%)	132 (89.1%)	.4122	97 (85.8%)	.0063	92 (71.3%)
Dyspnoea, n (%)	75 (50.7%)	.0037	37 (33%)	.0292	60 (46.5%)
Bilateral infiltrates, n (%)	82 (55.4%)	.0003	87 (77%)	.1868	108 (83.7%)
Anti-infectives, n (%)	136 (91.9%)	.5552	106 (94%)	.1415	114 (88.3%)
Antibiotics, n (%)	136 (91.9%)	.9681	104 (92%)	.3421	114 (88.3%)
Antifungals, n (%)	43 (29%)	.0001	59 (52.5%)	.9362	68 (52.7%)
Antivirals, n (%)	6 (4%)	.1096	10 (8.8%)	.7565	10 (7.7%)
Specific infectious dg., n (%)	72 (48.6%)	.6672	58 (51.3%)	.0002	96 (44.8%)
Bacterial pathogen, n (%)	47 (31.7%)	.2846	29 (25.6%)	.0403	49 (22.9%)
Fungal pathogen, n (%)	17 (11.5%)	.0203	25 (22.1%)	.4009	23 (10.7%)
Viral pathogen, n (%)	2 (1.4%)	.0657	6 (5.3%)	.7641	8 (3.7%)
Two and more pathogens, n (%)	5 (3.4%)	.1738	8 (7.1%)	.8414	10 (4.7%)
Changing of the treatment according to BAL results, %	35.8%	.0384	23.9%	.4777	28%
Changing of the treatment in positive BAL cases, %	70.8%	.0049	46.6%	.1336	34.4%



003

IDENTIFICATION OF NOVEL REGULATORY PATHWAY FOR IMMUNOGLOBULIN PRODUCTION PROVIDES RATIONAL TREATMENT FOR BORTEZOMIB-RESISTANT MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

Šimíček M., Vdovin A., Durech M., Jelínek T., Ševčíková T., Bago J. R., Žihala D., Hrdinka M., Šnaurová R., Šahinbegović H., Popková T., Hájek R.
Klinika Hematoonkologie, Fakultní Nemocnice Ostrava, Ostrava

Introduction

Monoclonal immunoglobulin (Ig) is a valuable diagnostic marker in patients with multiple myeloma (MM). An inevitable consequence of extensive Ig synthesis is overload of misfolded proteins that saturate proteasome capacity making the myeloma cells highly sensitive to proteasome inhibitors (PI). Even though PI are regularly used in the clinic, resistance often emerges leaving clinicians with limited treatment options. Therefore, there is a need for a robust marker selecting MM patients for precise PI-based combination therapy.

Methods

We performed a multiple database search for genes associated with Ig production and MM patients' survival. Additionally, we compared gene expression profiles (RNAseq) of primary MM cells with low and high Ig levels. Next, we validated the identified hits by shRNA knockdown and overexpression studies using myeloma cell lines, primary MM samples, and mouse models. We also applied mass spectrometry-based proteomic analysis, advanced biochemical approaches, and genetic models to reveal the Ig production pathway components and function. Finally, we performed a limited rational drug screening to select suitable compounds for combination treatment.

Results

RNAseq and database mining revealed a strong association between the expression of plasma cell-specific deubiquitinase OTUD1, Ig production, and MM patient survival. Suppression of OTUD1 with shRNAs in RPMI8226

and MM1.S cell lines reduced Ig levels, increased proliferation, and induced bortezomib resistance. Conversely, inducible OTUD1 overexpression enhanced Ig production, slowed down proliferation, and increased bortezomib sensitivity. In the xenografts mouse models cells with high OTUD1 levels synthesized more Ig and developed smaller tumors.

Intriguingly, the transcription of Ig genes was not influenced by OTUD1 expression suggesting that OTUD1 functions as a posttranslational regulator of Ig assembly. To gain mechanistic insight into the Ig pathway regulation by OTUD1, we utilized the biotin proximity labeling method (Turbo-ID) combined with mass spectrometry analysis. We found several novel OTUD1 interaction partners including the E3 ubiquitin ligase KEAP1 and endoplasmic reticulum (ER) redox protein PRDX4. We demonstrated that KEAP1 acts upstream of OTUD1 by regulating OTUD1 ubiquitination and stability. Consistently, survival analysis revealed that MM patients with high KEAP1 expression (low OTUD1) had a worse prognosis than patients with low levels of KEAP1 (high OTUD1). PRDX4 regulates disulfide bonds formation during protein folding and is uniquely expressed in fully differentiated plasma cells. Here, we revealed that OTUD1 specifically deubiquitinates and thus stabilizes PRDX4 inside the ER. Additionally, we performed rescue genetic experiments and found a direct link between the OTUD1-PRDX4 axis and Ig production. The increase in OTUD1 expression (high Ig) led to a dramatic increase in the total pool of ubiquitinated proteins formed mainly by misfolded Ig, while OTUD1 knockdown (low Ig) had an opposite effect. We showed that changes in the level of ubiquitinated proteins correlated with PI sensitivity. Of note, OTUD1 did not affect the expression of proteasome subunits, either their enzymatic activity.

Our mechanistic findings prompted us to propose a novel therapeutic opportunity in PI resistant MM patients. We hypothesize that the resensitization of Ig low MM cells to PI could be achieved by enhancing ER stress leading to an increase in misfolded proteins that would ultimately saturate proteasomes. Indeed, from clinically relevant drugs tested so far, the HSP-90 inhibitor (17-AAG) reverted the PI resistance in OTUD1 low (Ig low) myeloma cells. An in vivo validation of the combination treatment and testing of Ig involvement in PI sensitivity and proliferation of MM cells is ongoing.

**Conclusion**

Here we present the discovery of a novel regulatory mechanism for Ig production in plasma cells. Based on our results and previously published studies, we conclude that Ig synthesis is a clinically significant factor related to PI response and MM patient survival. Our findings suggest that the intracellular Ig level is an important biomarker to identify patients benefiting the most from PI-based therapies. Finally, we provide a rational solution for selective, combination therapy to overcome PI resistance in MM patients with a decreased capacity to synthesize Ig.

004

miR-29 INFLUENCES CD40 SIGNALING IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL): AND AXIS AFFECTED BY BCR INHIBITORS

Sharma S.^{1,2,3}, Mladonicka Pavlasova G.^{1,2}, Seda V.^{1,2}, Amruz Cerna K.^{1,2}, Vojackova E.^{1,2,3}, Filip D.^{1,2}, Ondrisova L.^{1,2}, Sandova V.^{1,2}, Kostalova L.^{1,2}, Zeni P.F.^{1,2,3}, Medkova M.^{1,2,3}, Zelinkova M.^{1,2}, Vecera J.^{1,2}, Boudny M.^{1,2}, Oppelt J.², Liskova K.⁴, Kren L.⁴, Janikova A.¹, Pospisilova S.¹, Fernandes S.M.⁵, Shehata M.⁶, Rassenti L.Z.⁷, Jaeger U.⁶, Doubek M.¹, Davids M.S.⁵, Brown J.R.⁵, Mayer J.¹, Kipps T.J.⁷, Mraz M.^{1,2}

¹⁾ IHOK, FN Brno, Brno, Česko

²⁾ CEITEC MU, Brno, Česko

³⁾ Faculty of Science MU, Brno, Česko

⁴⁾ Dept. of Pathology, FN Brno, Brno, Česko

⁵⁾ Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Spojené státy

⁶⁾ Medical University of Vienna, Vienna, Rakousko

⁷⁾ University of California San Diego, La Jolla, Spojené státy

Background. B cell receptor (BCR) signaling and T cell interactions play a pivotal role in CLL pathogenesis and disease aggressiveness. We and others have previously shown that microRNAs (miRNAs) can regulate BCR signaling

in CLL, however, it is unknown if miRNAs are involved in modulating T cell interactions in CLL.

Methods. We performed complex profiling of short non-coding RNAs (miRNA-seq, Illumina) in the context of microenvironmental interactions by comparing CXCR4/CD5 intraclonal cell subpopulations (CXCR4[dim] CD5[bright] vs. CXCR4[bright] CD5[dim] cells). Next, we describe the targets and functional relevance of selected miRNAs by in vitro and in vivo techniques.

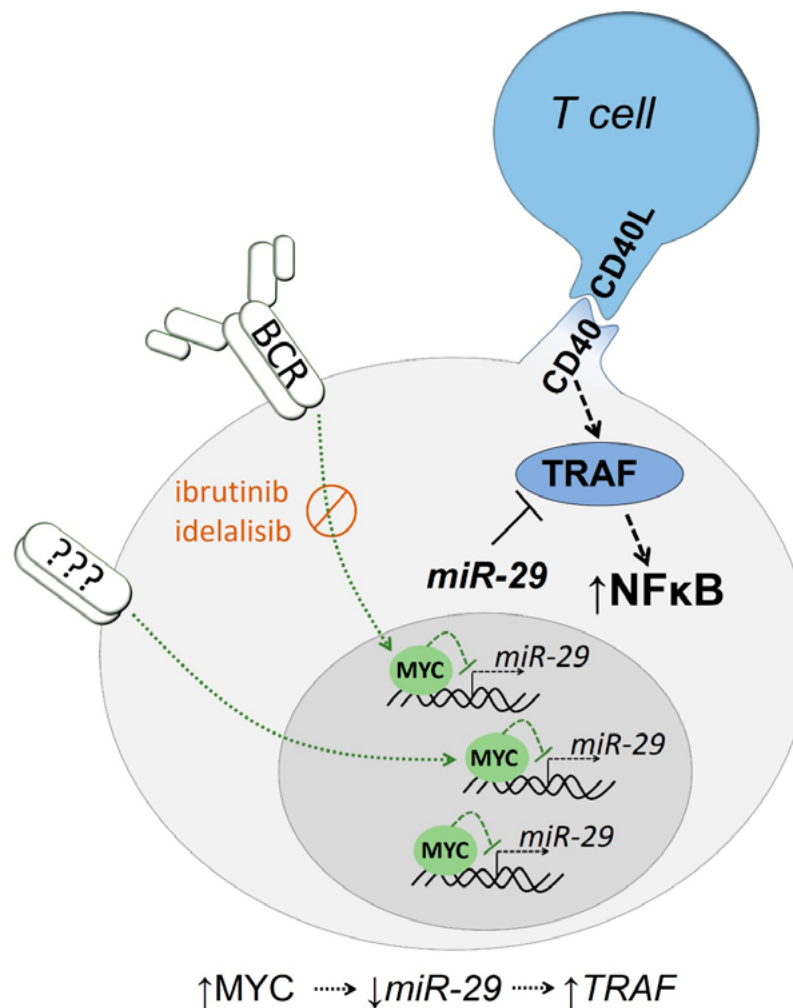
Results. Analysis of CXCR4/CD5 subpopulations identified dozens of differentially expressed miRNAs, including several that have previously been shown to modulate BCR signaling (*miR-155*, *miR-150*, and *miR-22*), but also other candidates for a role in microenvironmental interactions. Notably, all three *miR-29* family members (*miR-29a/b/c*) were consistently down-modulated in the immune niches (~2-fold, $P < 0.001$). We further identified a Tumor-Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 4 (TRAF4) family member as a novel direct target of all *miR-29*s and revealed that higher TRAF4 levels increase CLL responsiveness to CD40 activation and downstream NFκB signaling. We have further shown that BCR activation in CLL cells (by anti-IgM) leads to MYC-dependent repression of *miR-29*, and a subsequent increase in TRAF4 levels. The data demonstrate that BCR signaling acts to coordinate increased CLL cells' responsiveness to the CD40 ligand provided by T cells by modulating *miR-29*-TRAF4 levels. This also provides potential mechanisms for the observed concurrent synchronous activation of both BCR and CD40, which is required to properly induce entry of B cells into the cell cycle (Luo W *et al.*, Immunity, 2018). In a large CLL cohort (n=100), lower *miR-29(a/b/c)* levels and higher TRAF4 levels associated with significantly higher responsiveness to BCR crosslinking (assessed as calcium flux after anti-IgM [10 ug/ml]) and shorter overall survival (*miR-29a* HR: 3.1, CI: 1.3-7.4; *miR-29b* HR: 3.6, CI: 1.3-10.2; *miR-29c* HR: 3.4, CI: 1.4-8.3; *TRAF4*: HR: 2.4, CI: 1.2-4.9; all $P < 0.05$). We have also shown that BCR inhibitors ibrutinib or idelalisib (as single agents) lead *in vivo* to lower MYC levels and significant *miR-29* upregulation, while its target, TRAF4, is repressed. The CLL cells obtained from patients on ibrutinib



therapy are less responsive ($P < 0.001$) to CD40 ligation when compared to paired samples from the same patient obtained before therapy ($n = 10$ pairs). This suggests that the disruption of the miR-29-TRAF4 regulatory loop by “BCR inhibitors” (ibrutinib/idelalisib) has an *in vivo* relevance, and might contribute to the inhibition of CLL cell proliferation.

Conclusion. In summary, we showed for the first time that a miRNA-dependent mechanism acts to activate CD40 signaling/T-cell interactions in the CLL microenvironment. We describe a novel *miR-29*-TRAF4-CD40 signaling axis modulated by BCR activity and disrupted by BCR inhibitors such as ibrutinib or idelalisib.

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement No 802644). Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant nr. NV18-03-00054 and NU20-03-00292. All rights reserved. Supported by the Czech Science Foundation (20-02566S), Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the project CEITEC 2020 (LQ1601). Supported by MH CZ - DRO (FNBr, 65269705), MUNI/A/1395/2019 and MUNI/A/1595/2020. We acknowledge the CF Genomics of CEITEC supported by the NCMG research infrastructure (LM2018132 funded by MEYS CR) for their support with obtaining scientific data.





005

SINGLE-CELL PROFILING OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS IN PEDIATRIC T-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA BY MASS CYTOMETRY: DISSECTING JAK/STAT AND PI3K/AKT/MTOR ACTIVE SIGNALLINGKužílková D.¹, Kalina T.¹, Bugarin C.², Rejlová K.¹, Thurner D.¹, Semerák P.², Stuchlý J.¹, Biondi A.², Gaipa G.²¹ CLIP (Childhood Leukemia Investigation Prague), KDHO 2. LF UK a FN Motol, Praha, Česko² Fondazione Tettamanti, Clinica Pediatrica Università degli Studi Milano Bicocca, Monza (MB), Itálie**Background**

Acute leukemia is the most common malignancy of childhood. Most of pediatric acute leukemias are derived from B-cell precursor, and about 15% are from T-cell origin and lead to T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Despite recent progress in treatment, the prognosis of T-ALL patients is worse, and ~30% of cases relapse (Pui CH, Seminars in hematology 2009). Despite the need for targeting molecules to treat resistant and high risk pediatric T-ALLs, *in vitro* drug testing may not be predictive of efficacy *in vivo* due to the complexity of the signalling network and to the cell heterogeneity within the individual's sample. High-resolution analysis of signalling profile at single-cell level may represent an innovative tool in the comprehension of signalling network and its role in the response to drugs (Bodenmiller B et al, Science signaling 2010). Currently mass cytometry (CyTOF) technique allows the measurement of more than 30 parameter per single cell (Bendall SC et al, Science 2011), rendering this approach an ideal method to investigate the complex biology of T-ALL (Girardi T et al, Blood. 2017) and to assay drug candidates for cellular targeting.

Methods

Using single-cell mass cytometry we developed panel of 39 metal-labeled monoclonal antibodies (moAbs) identifying T-ALL blasts and non-malignant

T-cells. Using phospho-specific moAbs and moAbs targeting proliferation and apoptosis we detected signal transduction upon *in vitro* treatment of 17 diagnostic and 5 relapse T-ALL samples with IL-7 (Jak/STAT5 pathway activator), BEZ-235 (inhibitor of PI3K and mTOR), and Pervanadate (inhibitor of tyrosine phosphatases). We have used sample barcoding by anti-CD45 antibodies to unify sample preparation and acquisition for all treatment conditions and we resolved the cells of interest by manual gating. We evaluated both, the individual change in p-kinases and the overall changes using dimensionality reduction approach.

Results

T-ALL cells showed constitutive activation of various signaling pathways as well as proliferation markers compared to residual bone marrow T-cells and T-cells isolated from healthy donors. Up-regulated activity of PI3K-mTOR pathway (p4E-BP1, pAkt, pS6), proliferation rate (pRb, Ki-67), MAPK pathway (p-p38, pErk1/2), translation (pCREB) in T-ALL cells was detected, whereas lower levels of anti-apoptotic protein Bcl2 in T-ALL cells were detected. Interleukin 7 (IL-7) activates three main signalling pathways such as STAT5, PI3K/Akt/mTOR and MEK/Erk, leading to the promotion of leukemia cell viability, cell cycle progression and growth. Thus we interrogated T-ALLs in their ability to respond to IL-7 *in vitro*. We used an hierarchical clustering analysis (with Euclidean distance metrics and an average linkage) and we were able to divide T-ALL samples in IL-7 responder (6 out of 17) and IL-7 non responder (11 out of 17). Of note, no significant differences in IL7Ra (CD127) expression was observed between the two groups. Interestingly IL-7 responders had higher levels of pRb and Ki-67 proliferation markers as compared to both IL-7 non-responders and non-malignant T-cells. Moreover IL-7 non-response correlate with poor response *in vivo* to prednisone and higher level of minimal residual disease (MRD) at day15 of remission induction treatment. Finally T-ALL cells were treated *ex vivo* with PI3K/Akt/mTOR dual inhibitor BEZ-235. Of the 17 T-ALL patients tested, 9 responded to BEZ-235 but not to IL-7, by contrast 4 did not respond to BEZ-235 being IL-7 responders, two patients responded both to IL-7 activation and BEZ-235 inhibition. One single patient did not respond neither to IL-7 nor to BEZ-235



Conclusions

In summary we characterized pediatric T-ALL samples demonstrating the feasibility of CyTOF-based single-cell profiling of signal transduction pathways in this setting. We detected constitutively active pathways in T-ALL blasts as compared to residual non-malignant T-cells. Importantly we identified by functional read outs distinct clusters of IL-7 and BEZ-235 T-ALL responders patients, supporting the notion of a mutual exclusivity between JAK-STAT (or Ras) pathway genomic alterations and PI3K-AKT pathway alterations (Liu et al. Nat Genet. 2017). Our observation can contribute to the better understanding of the complex signalling network governing T-ALL behaviour and response to therapy.

006

TARGETING ANTI-APOPTOTIC MCL1 PROTEIN WITH S63845 IS HIGHLY EFFECTIVE IN AGGRESSIVE B-CELL NON-HODGKIN LYMPHOMAS WITH NON-EXPRESSION OF BCL2

Klanova M.¹⁻², Kazantsev D.³, Zikmund T.³, Behounek M.³, Vockova P.¹⁻², Karolova J.¹⁻², Tuskova D.¹⁻², Pokorna E.¹, Trneny M.¹, Klener P.¹⁻²

¹ Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

² First Department of Medicine-Hematology, Charles University General Hospital in Prague, Czech Republic

³ Biotechnology and Biomedicine Center in Vestec, Czech Republic

Background: The ability to block mitochondrial apoptosis is a hallmark of B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL). Anti-apoptotic MCL1 protein is highly expressed in aggressive B-NHL, including diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and Burkitt lymphoma (BL). S63845 is a selective small-molecule MCL1 inhibitor, which binds to MCL1 with subsequent release of proapoptotic proteins and apoptosis induction.

Aims: In this study, we analyzed mechanisms of sensitivity of DLBCL and BL to S63845.

Methods: A panel of 13 DLBCL and 5 BL cell lines was used for in vitro experiments. Establishment of lymphoma clones with transgenic overexpression of BCL2, western blotting, and immunoprecipitation experiments were carried out as previously described (Klanova et al, Clin Cancer Res, 2016). Lymphoma clones with biallelic BIM deletion were established using CRISPR/Cas9 technology. Experimental therapies with S63845 and venetoclax were implemented using six patient-derived xenograft models (PDX) of aggressive lymphoma and carried out as described previously (Prukova et, Clin Cancer Res, 2019).

Results: We demonstrated that the majority of DLBCL (8 out of 13, 61.5%) and BL (4 out of 5, 80%) cell lines were sensitive to MCL1 inhibition by S63845 (defined as > 50% apoptosis after 24-hour exposure to 1µM S63845). Importantly, BCL2 protein expression / non-expression was a key determinant of sensitivity/resistance to S63845. DLBCL clones with transgenic expression of BCL2 or biallelic deletion of BIM were established from two S63845 sensitive BCL2-negative cell lines: SU-DHL-5^{BCL2cDNA} and UPF4D^{BCL2cDNA} clones were less sensitive to S63845 compared to controls. Similarly, SU-DHL-5^{BIMdel} and UPF4D^{BIMdel} cell lines were less sensitive to S63845 compared to controls. Using protein immunoprecipitation we demonstrated that pro-apoptotic protein BIM displaced from MCL1 after its pharmacological inhibition was sequestered by BCL2 thus preventing activation of BAX/BAK1 and induction of apoptosis. These experiments confirmed the key role of BCL2 and BIM proteins in mediating resistance to S63845.

Interestingly, while the total level of MCL1 expression did not correlate with sensitivity to S63845, the occupational status of MCL1 with proapoptotic proteins proved as an important determinant of S63845 sensitivity. Specifically, BCL2-positive cell lines harboring MCL1 protein occupied by BIM (a pro-apoptotic direct activator) were sensitive to S63845, while BCL2-positive cell



lines, in which the MCL1 was occupied by NOXA (a pro-apoptotic sensitizer) were resistant to S63845.

Using a panel of 6 PDX models (derived from patients with DLBCL (n=3), BL (n=1) and Richter syndrome (n=2)) we tested experimental pro-apoptotic treatment strategies for patients with relapsed / refractory (R/R) aggressive B-NHL. We demonstrated that single-agent S63845 was highly effective in BCL2 - negative lymphomas and that co-targeting of MCL1 and BCL2 (with S63845 and venetoclax) induced additive to synergistic anti-lymphoma effect in all tested PDX models. The data represent preclinical substantiation for novel salvage therapy of this prognostically adverse group of B-NHL patients.

Conclusion: Targeting MCL1 with S63845, single-agent or in combination with BCL2 inhibitor venetoclax, represents an innovative treatment strategy for patients with R/R B-NHL.

Key Words: diffuse large B-cell lymphoma, Burkitt's lymphoma, S63845, MCL1

O07**BAYESIAN NETWORK MODELLING AS A NEW TOOL IN PREDICTING OF THE EARLY PROGRESSION OF DISEASE IN FOLLICULAR LYMPHOMA PATIENTS**

Procházka V.¹, Matuščíková Š.², Fürst T.³, Belada D.⁴, Janíková A.⁵, Benešová K.⁶, Móciková H.⁷, Ďuraš J.⁸, Pirnos J.⁹, Kopečková K.¹⁰, Campr V.¹¹, Michalka J.¹², Pytlík R.¹³, Papajík T.¹⁴, Trněný M.¹⁵

¹ Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital In Olomouc, Olomouc

² Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Olomouc

³ Department of Mathematical Analysis and Applications of Mathematics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

⁴ 4th Department of Internal Medicine - Hematology, Charles University, Hospital and Faculty of Medicine, Hradec Králové, Hradec Králové

⁵ Department of Hematology and Oncology, Masaryk University Hospital Brno, Brno

⁶ 1st Dept Medicine, 1st Fac Medicine, Charles University, General Hospital, Prague, Prague

⁷ Department of Internal Medicine and Haematology, Faculty Hospital Kralovske Vinohrady and Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague

⁸ Department of Haematology, University Hospital Ostrava, Ostrava

⁹ Hospital Ceske Budejovice, Ceske Budejovice

¹⁰ University Hospital Motol, Prague, Prague

¹¹ Department of Pathology and Molecular Medicine, University Hospital in Motol, Prague, and Second Faculty of Medicine, Prague

¹² Masaryk University, Brno, Brno

¹³ 1st Department of Medicine - Hematology, First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Praha 2, Prague

¹⁴ Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc, Olomouc

¹⁵ First Dept. of Medicine- Hematology, Charles University General Hospital and First Faculty of Medicine, Praha 2, Prague



Background: Twenty percent of patients (pts) with high-tumor burden follicular lymphoma (FL) develop progression/relapse of disease within 24 months of frontline immune-chemotherapy (POD24). Those ultra-high-risk cases are at 50% risk of dying within 5-years since the POD event. Unmet need is to identify such pts at the time of initial treatment. The traditional approach used for building predictive scores (such as FLIPI, PRIMA-PI) is multivariable logistic regression (LR). LR is the tool of choice in case of many predictors (continuous or categorical) and a single binary (yes/no) outcome. Bayesian network (BN) offer an alternative strategy which may overcome several drawbacks of LR (risk of overfitting, missing data handling, problems of odds ratio interpretation), brings more insight into the complex relations among the variables, and offer an individualized prediction.

Aim: The goal was to build a model to predict the risk of POD24 from the parameters known at diagnosis and compare LR to BN approach.

Methods: The study (ClinicalTrials.gov No NCT03199066) comprised 1394 FL (grade I-IIIA) patients from the Czech Lymphoma Study Group registry treated with frontline rituximab-containing regimen and diagnosed between 10. 4. 2000 and 28. 12. 2016. The following parameters were analyzed: gender, age at diagnosis, clinical stage, lymphoma grade, no. of LNs regions, bone marrow involvement, no. of extranodal localizations, longest tumor diameter, systemic symptoms, performance status, LDH, beta-2-microglobulin, hemoglobin, and leucocyte, lymphocyte, and thrombocyte counts, induction regime, radiotherapy, ASCT, maintenance application, response to treatment, and OS, PFS and POD24 as outcome parameters. POD24 was defined as relapse, progression, change of therapy for 24 months since the induction started. Only parameters known at diagnosis were used for the prediction of POD24.

Results: The median age was 59 yrs (range 26-89 yrs) with female predominance (59.2%), advanced disease stage (III/IV) was seen in 85.9% of the cases and FLIPI risk groups distribution was as follows: low (18.8%),

intermediate (30.9%) and high (50.3%). The most frequent regime used was R-CHOP (76.8%), followed by R-CVP (12.4%), R-bendamustine (4.7%), intensive protocols (3.3), and fludarabine-based (2.8%). Consolidative IF-radiotherapy was applied in 5.1% and up-front ASCT in 2.9% of the pts. Maintenance immunotherapy was given in 67.1% of the pts. Response to therapy was known in all but 28 pts (98%) with CR/CRu 67.9%, PR 26.6%, SD 1.8%, and PD in 3.2% of the cases. After a median follow-up of 7.64 yrs, 484 (34.7%) of the pts progressed or relapsed and 316 (22.6%) have died. POD24 was recorded in 266 (19.0%) of the pts. The 5-year OS reached 86.4% and 5-year PFS 64.2%. LR model (PFS) building strategy included testing for significance as this model performed better than the model with all parameters. Overfitting was prevented by splitting the data into training (75%) and testing (25%) set. The performance of the model was assessed using the AUC criterion computed on the ROC curve. The LR model reached AUC of 0.69, and at 80% specificity, it reached about 51% sensitivity. Next, the BN (Augmented Naïve Bayes Classifier) was trained. Links of all predictors to POD24 were forced and all links to age and gender were forbidden, otherwise the network structure was inferred from the data. The performance of the BN was similar to the LR – AUC of 0.67 and about 50% sensitivity at the specificity of 80%. Both these models were compared to the standard PRIMA-PI risk classifier and were found to better stratify the population into risk groups (Table 1). An example of a patient is presented who was low-risk according to PRIMA-PI but actually experienced the POD24 event. The BN estimated the probability of the event to 91% (Figure 1).

Conclusion: Lymphoma-related death following POD24 remains the most frequent cause of mortality in FL patients. BN modelling is a non-inferior prognostic tool compared to LR in term of POD24 prediction. Unlike LR, it also allows visualisation of complex relations among the predictors and individualized prediction of the patient's POD24 risk, even if some of the predictors are unknown. Both "ad hoc" trained LR and BN were found to better stratify the population into risk groups with respect to POD24 event than the traditional PRIMA-PI score.



Acknowledgement: MZ Czech Republic DRO grant (FNOL, 00098892).

Table 1 – Results of used models for testing set. The specificity and the sensitivity are valid for stated threshold.

	Model	AUC	Threshold	Specificity	Sensitivity
Diagnostic variables	Logistic regression	0.68	0.21	80%	48%
Augmented Naive Bayes	0.68	0.308	80%	47%	
Diagnostic and treatment variables	Ridge regression	0.82	0.18	80%	66%
Logistic regression	0.81	0.18	80%	69%	
Augmented Naive Bayes	0.78	0.263	80%	67%	

Figure 1 - Augmented Naive Bayes structure for classifying ePOD24. Nodes represent used variables and edges represent dependencies. Nodes are coloured: white for diagnostic variables, grey for treatment variables and black for class variable. The edge width corresponds to the size of statistical dependence, edges indicate correlations between variables but not necessarily causal relationships.

RISK	Model			The size of a group
	PRIMA-PI	Logistic regression	BN network	
Low	12%	10%	11%	40%
Intermediate	19%	17%	16%	30%
High	28%	36%	36%	30%

Table 1 – Comparison of the three methods for POD24 risk classification. Two thresholds were set for LR and BN to stratify the population into three risk groups. The thresholds were set so that the proportion of patients in each group is the same for all the three classifiers – 40, 30, and 30 percent respectively. In each risk group, the proportion of patients who actually experienced POD24 event is reported. Logistic regression and BN network were tested on the test set to avoid overfitting and PRIMA-PI was tested on the whole dataset.

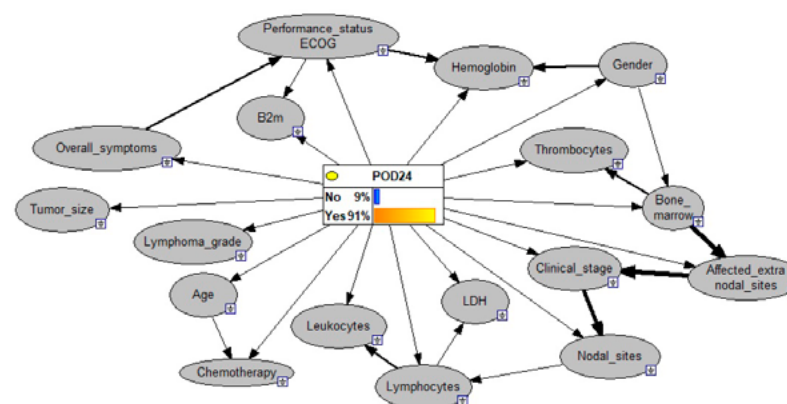


Figure 1 – Illustrative case of individualized prediction using Augmented Naive Bayes (ANB) network: 63 y.o. female with ECOG 3, FL 3A, CS IVB, with 4 LNs regions, no BM involvement, low B2M level, high LDH, treated with R-CHOP. Low risk (13%) of developing POD24 (PRIMA-PI), but 91% risk according to the ANB. Nodes represent variables and edges represent dependencies. Arrow width corresponds to the strength of statistical dependence, edges indicate correlations between variables but not necessarily causal relationships.



008

**IN VITRO AND IN VIVO PRECLINICAL
MODELS FOR TESTING NEW THERAPIES FOR
AZACITIDINE-RESISTANT MDS/AML**

Stopka T.¹, Minařík L.¹, Schaffartzik A.¹, Kulvait V.¹, Zikmund T.¹,
Zemanová Z.², Sedláček R.³, Králová Viziová P.³, Jonášová A.¹

¹1. interní klinika a BIOCEV, 1. LF UK a VFN Praha, Praha

²Oddělení nádorové cytogenetiky, VFN, Praha

³CCP, Ústav molekulární genetiky, Praha

Background: Azacitidine (AZA) resistance represents very difficult task for clinicians. While over a half of high-risk MDS patients responds to AZA, the response duration is relatively short. Recently, a set of mutations (ASXL1, BCOR, DNMT3A, RUNX1, NF1, TP53) indicative of HMA resistance was associated with negative impact on OS (Nazha et al. 2019).

Aims: To further delineate key molecular pathways involved in AZA resistance (AZA-R) as well as to identify novel therapies, one needs to utilize appropriate cellular and/or murine system/s. We herein established new preclinical cellular and murine-PDX models for testing therapies for AZA resistance.

Methods: AZA-sensitive (AZA-S) MDS/AML cell lines (MOLM13, MDSL, OCI-M2, SKM1, IC50=0.05-2mM) were cultured in presence of AZA to produce AZA-R subclones (IC50=5-13mM). The AZA-R subclones were characterized using MDS gene panel, Whole Exome Sequencing (WES), and multicolor FISH (mFISH). PDX AZA-R/S models were generated by intra-osseal injection into immunodeficient NSG-S mice.

Results: AZA-R cell lines (N=6) were sequenced using 33-gene MDS panel that detected several high-impact variants of ASXL1 and TP53, however no variant was newly gained compared to AZA-S cells. AZA-R subclones were next characterized using mFISH. While we noted that AZA-R subclones had higher percentage of polyploidy, no additional chromosomal mutation was

gained in AZA-R cells. Next, we used WES that identified 19 AZA-R-specific overlapping high impact variants (VAF~40-60%). While most variants (15) created stop codons/frameshifts, only few created a structural interaction variant, including the variant of AKT1. Based on structural predictions the AZA-R-specific AKT1 mutation provides a much shorter side chain and therefore makes the Serine 473 side chain more accessible for phosphorylation. We therefore hypothesized that AKT1 variant inhibits AZA-mediated cell death leading to AZA-R phenotype. As indicated by western blotting, the AZA-R cells indeed consistently increased phosphorylation of pAKT-473. In addition, another prosurvival molecule STAT3 became hyperphosphorylated at Tyr705. STRING interaction tools identified proximity of activated AKT1 with RALBP1 (catalyzing transport of glutathione conjugates/xenobiotics and contributing to multidrug resistance) and ERCC1 (DNA excision repair). Another proximity was noted between RBMX (tumor suppression), DDX3X (ATPase stimulated by DNA substrates) and EEF1A1 (GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes). AZA-R subclones were next exposed to a set of inhibitors and followed the cell metabolism using WST1 assay in vitro, which revealed some previously not yet considered options (Sorafenib, Venetoclax, Dasatinib, Ruxolitinib, Panobinostat, Nelfinavir) to target AZA-R. To further develop preclinical model for in vivo drug testing, we generated AZA-R/S-PDX models. As indicated by histology, engrafted myeloid sarcomas contained CD45 CD33 CD71 cells that can be visualized in vivo using Luciferase detected by bioluminescence. The median OS was ~50 days.

Summary/Conclusion: We herein present a well-characterized AZA-R cellular and PDX model. Preliminary evidence indicates the involvement of pro-survival pathway leading to AZA resistance.

Keywords: Akt, Azacitidine, Mouse model



009

**RANDOMIZED OPEN-LABELED ACADEMIC TRIAL
COMPARING 'G-CSF PRIOR AZA' WITH STANDARD
AZA THERAPY IN HIGH RISK MDS PATIENTS.**

Stopka T.¹, Minařík L.¹, Schaffartzik A.¹, Kulvait V.¹, Pešta M.²,
Zemanová Z.³, Dusilková N.¹, Jonášová A.¹

¹⁾ 1. interní klinika a BIOCEV, 1. LF UK a VFN, Praha

²⁾ MFF UK, Praha

³⁾ Oddělení nádorové cytogenetiky, VFN, Praha

Background: Based on the Prague Charles University General Hospital registry (N=164, median age 73), the Azacitidine (AZA) therapy in higher-risk MDS patients resulted in median OS 13.8 Mo with ORR 48.5%. We also noted from our retrospective data that AZA-treated patients with higher G-CSF consumption had significantly reduced occurrence of Grade 4 neutropenias and longer OS (19 vs 16 Mo, p value 0.039). Both AZA and also decitabine were shown to induce myeloid differentiation in vitro and this effect was enhanced by G-CSF.

Aims: To improve poor clinical outcomes we initiated a randomized open labeled academic trial that compares standard AZA therapy (A) with novel AZA-based therapy combination involving use of G-CSF added prior AZA (GA).

Methods: GA/MDS-2013 study (EudraCT No 2013-001639-38) currently enrolled 70 patients (GA arm N=39, A arm N=31) with median age 74 years, M:F ratio 39:31 (GA 22:17, A 15:16), median IPSS-R 6, median follow up 11.2 Mo, median cycles of therapy 6. Diagnosis [included:MDS](#) (EB1, EB2) with IPSS int-2/high (67%), MDS/AML<30% MB (18,5%), CMML II (8,5%) and MLD (6%). Transplant candidates were excluded. Randomization is 2:1 for GA vs A arm. Primary endpoints: OS, PFS, time to AML transformation, ORR, infections & QoL. Secondary endpoints: biomarkers.

Therapy schedule: 75mg/m² of AZA 5-2-2, in GA: G-CSF s. c. injected 48 hrs before dose 1 and dose 6. G-CSF is measured in patient sera (prior therapy), myeloid surface markers are determined by flow cytometry (day -2, day 1, and day 9 of cycle 1). NGS data were generated using a panel of 33-MDS genes. Statistics involves longitudinal multivariate data analysis including the joint models for the OS and response.

Results: The presented data include 2.5 years since the beginning of the trial. Median survival for GA arm was 22 vs 14 months in the A arm. ORR (CR, CRm, PR, HI) was 56% in GA arm vs 33% in the A arm. Transformation to AML for both arms was comparable. The stratified longitudinal Cox proportional hazards model containing time-varying covariates together with the ordinal multilevel logistic mixed model were utilized. From this joint fitted model, a negative coefficient for the G-AZA treatment (significant p-value 0.0442) can be noticed in the case of the Cox Proportional Hazard part of the model. This means that G-AZA treatment improves patient survival. The estimated odds for the GA arm that responded to the therapy with remission rather than progression is 12.4x higher than for the A arm, controlling for the remaining patients' characteristics (p-value 0.0016). Both the GA and A arms are comparably tolerated. Data on serious infections and neutropenia gr4 were not yet available. The levels of G-CSF in sera prior the study in both arms (GA vs A) were comparable. Flow cytometry revealed G-CSF mediated upregulation of FCgRI (CD64) in the GA but not in the A arm. Multivariate analysis indicates the following: mutated genes: DNMT3A (p-value 0.0157), EZH2 (p-value 0.0091), TP53 (borderline p-value 0.0510), & CSF3R (p-value 0.0057) shorten the overall survival. The significant negative effects on response was noted for mutated EZH2 (p-value 0.0208) and CSF3R (p-value 0.0424) genes.

Summary/Conclusion: Our data indicate expected beneficial effect of G-CSF pre-treatment to standard AZA therapy in higher risk MDS patients at the levels of OS and ORR. Biomarker study indicates adverse affects of variants in EZH2, DNMT3A, TP53, & CSF3R.



Support: NV19-08-00144, 18-01687S, 19-03586S, UNCE/MED/016, RVO-VFN64165, RVO 68378050, LM2015040, LQ1604, CZ.1.05/2.1.00/19.0395.

Keywords: AML, Azacitidine, G-CSF, Myelodysplasia

O10**MethScore AS A NEW PROGNOSTIC TOOL FOR COMPLEX DNA METHYLATION CHANGES ASSESSMENT IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA**

Šestáková Š.^{1,2}, Šálek C.^{1,2}, Kunderát D.¹, Ježisková I.³, Mayer J.³, Ráčil Z.¹, Cetkovský P.¹, Remešová H.¹

¹⁾ Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²⁾ Ústav klinické a experimentální hematologie 1. LF UK v Praze a ÚHKT, Praha

³⁾ Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno, Brno

Many studies have reported the prognostic significance of aberrant DNA methylation in patients with acute myeloid leukemia (AML). We aimed for a complex evaluation of DNA methylation changes in AML and designed a sequencing panel targeting 239 regions previously described in literature as having a prognostic impact or being commonly associated with AML pathogenesis.

We used DNA from adult intensively treated AML patients divided into test (n=128) and validation cohort (n=50). Libraries were prepared using SeqCap Epi Enrichment System (Roche) and sequenced on MiSeq (Illumina). Data were processed in Linux and analyzed in R.

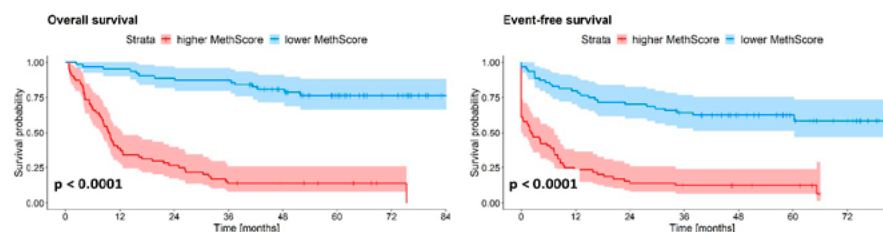
For each sample, we measured methylation levels of nearly 50000 CpGs. In the testing cohort, we evaluated the effect of each CpG's methylation level on overall survival (OS) using univariate Cox regression. As a result, we found 1961 CpGs significantly affecting the OS ($p < 0.05$). Next, we used linear combination of methylation levels and Cox's regression coefficients for each CpG to count a summarizing value that we called MethScore. Patients with lower MethScore (n=64) had markedly longer survival than patients with higher MethScore (n=64, $p < 2e-12$). We confirmed these results in multivariate

Cox analysis where MethScore was the most significant variable ($p = 2e-12$) together with transplantation in the first remission ($p < 0.001$). MethScore prognostic ability was verified on the independent validation cohort where it remained significant for patients' survival in Kaplan-Meier analysis ($p < 0.03$) and also Cox multivariate regression ($p < 0.004$). We further showed that MethScore is able to reliably stratify patients within intermediate risk group ($p < 0.001$ in multivariate analysis) that would mostly benefit from a better prognostication.

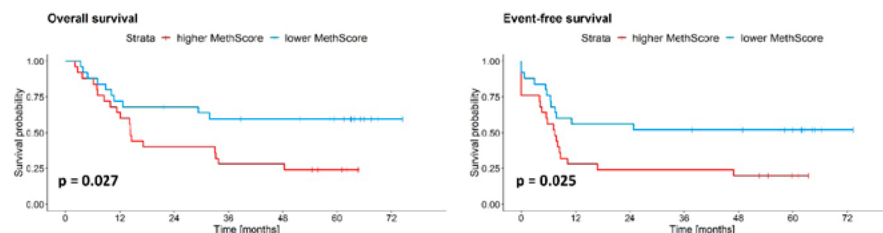
MethScore represents a new approach for comprehensive evaluation of DNA methylation changes in AML patients and may serve as a surrogate marker refining the prognosis especially in case of intermediate risk patients.

This study was supported by MZČR (00023736, IHBT).

Kaplan-Meier analysis of the test cohort (n = 128)



Kaplan-Meier analysis of the validation cohort (n = 50)





21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

ONLINE

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

82

POSTEROVÁ SEKCE



P01

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MECHANISMS RESPONSIBLE FOR THE DEVELOPMENT OF EXTRAMEDULLARY DISEASE IN MYELOMA AND POTENTIAL NOVEL THERAPEUTIC TARGETS USING TRANSCRIPTOMIC AND EXOME PROFILING

Žihala D.^{1,2}, Ševčíková T.^{1,2}, Šimíček M.^{1,2},
Popková T.², Ploková H.², Broskevičová J.², Vrana J.^{1,2},
Bago J.R.^{1,2}, Hájek R.^{1,2}, Stracquandano G.³, Jelínek T.^{1,2}

¹⁾ Ostravská univerzita, Ostrava, Česko

²⁾ Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava, Česko

³⁾ University of Edinburgh, Edinburgh, Spojené království

Introduction:

Multiple myeloma (MM) is the second most common blood cancer, and despite recent treatment advances, the majority of patients will ultimately die due to progression. Extramedullary disease (EMD) is a less frequent manifestation of MM often occurring during the course of disease where tumor plasma cells become independent of bone marrow microenvironment and infiltrate other tissues and organs. The development of EMD is always considered a high-risk feature with poor prognosis.

Aim:

To identify molecular mechanisms responsible for the development of EMD using DNA and RNA sequencing and thus reveal potentially novel druggable targets. Currently, available anti-myeloma agents are not effective in patients with EMD. Thus it is critical to perform this kind of translational research that will ultimately lead to discovering new treatment strategies in this prognostically poor subset of MM patients.

Methods:

We collected a unique set of FACS/MACS sorted aberrant plasma cells from 4 freshly obtained EMD samples from relapse and their respective

cryopreserved bone marrow samples from diagnosis (available in 3 cases). In the 3 longitudinal ND and EMD samples we analyzed somatic mutations in the whole-exome sequencing data (Illumina, Sure select V6) using a combination of Mutect2 and Strelka2. To analyze differential gene expression, we used Deseq2 R package and Salmon for read mapping and quantification and Cytospace for the pathway enrichment analysis. Besides, to investigate the effect of cryopreservation on the gene expression in longitudinal samples from diagnosis, we compared all 4 EMD samples with 5 fresh unrelated BM samples from ND patients with PET/CT confirmed lack of EMD.

Results:

Analysis of somatic mutations revealed an only partial overlap of mutated genes between ND and respective EMD sample (23% on average) and 1.49x increased number of variants in EMD. In our samples (ND and EMD), we identified 11 mutated myeloma drivers (Walker 2018) that mostly affected epigenetic processes and MAPK pathway, with the latter being mutated in all three patients in both stages. Interestingly, we identified two genes, both exclusively mutated only in 2/3 EMD samples and not mutated in any ND sample, DNAJC16 and HERC1. DNAJC16 is a member of heat shock proteins (Hsp40; Kampinga 2009). HERC1 is an E3 ubiquitin ligase that regulates p38 signaling and cell migration (Padrazza 2020), and thus, it represents a potentially interesting target for further analysis of EMD development.

Differential expression analysis of 3 paired ND-EMD samples revealed 131 deregulated transcripts with the TNFSF9 (CD137L) ligand, HECW1 ubiquitin ligase, and UNC13C gene being top upregulated genes. Among the top downregulated were immunoglobulin genes and S1PR4 signaling receptor, MPO myeloperoxidase, and SLAMF1 (CD150) signaling lymphocytic activation molecule. Analysis of a larger cohort of fresh unpaired 5 ND and 4 EMD samples resulted in more distinct clusters of ND/EMD samples and the total number of 673 deregulated genes (Fig. 1). EMD downregulated genes mostly belong to cell adhesion, chemokine signaling pathway, and neutrophil activation process. Upregulated genes belong to proliferation, cell cycle, and DNA damage signaling pathways. Evaluation of currently



available druggable targets revealed that only LAG3 (lymphocyte activation 3 protein) is significantly downregulated in EMD. For three upregulated genes (FGFR3, NTRK3, EZH2), we found interaction with potential cancer inhibitors (Erdafitinib, Entrectinib, Tazemetostat). Notably, the latter agent targeting EZH2 methyltransferase gene has been recently approved by the FDA for follicular lymphoma treatment, and clinical trials for MM are ongoing.

Conclusion:

Here, we report the preliminary analysis of the genomic and transcriptomic profile of EMD samples with their respective paired samples from the new diagnosis. The genomic alterations proved to be heterogeneous; though, we were able to identify 2 genes exclusively mutated in EMD samples. Moreover, deregulated transcriptome clearly separated ND and EMD stage in unrelated cohorts and pointed to rapid proliferation and increased DNA damage response pathways and pinpointed several potential drug targets. However, our findings warrant a more in-depth analysis on the bigger patient cohort.

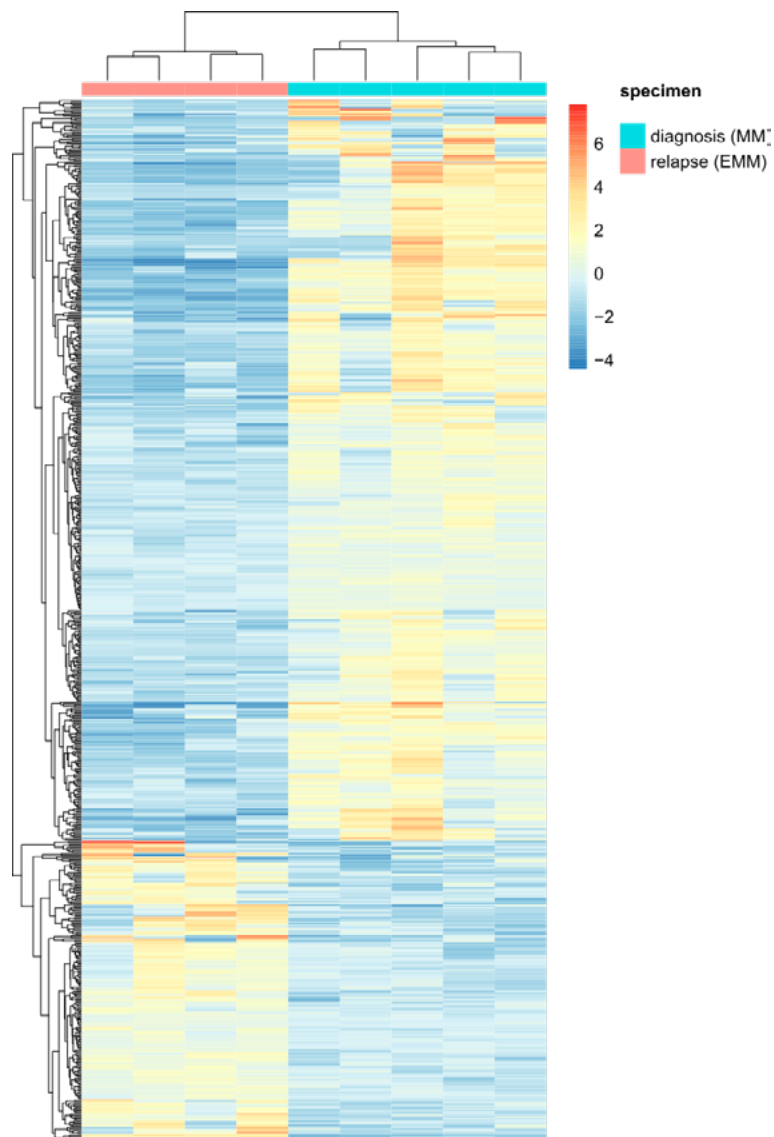


Fig. 1: Heat map showing differential gene expression between cohort of 4 EMD samples and 5 unrelated ND MM samples.



P02

A PHASE Ib, OPEN-LABEL, RANDOMIZED STUDY TO ASSESS SAFETY AND PRELIMINARY EFFICACY OF TAFASITAMAB (MOR208) OR TAFASITAMAB + LENALIDOMIDE IN ADDITION TO R-CHOP IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA: ANALYSIS OF THE SAFETY RUN-IN PHASE

Belada D.¹, Nowakowski G.², Burgues J.M.B.³, André M.⁴, Kopeckova K.⁵, Trněný M.⁶, Stevens D.^{6,7}, Brugger W.⁸, Burke J.⁹

¹ 4. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, Česko

² 2Division of Hematology, Mayo Clinic, Rochester, Spojené státy

³ 3Hematology, Hospital San Pedro de Alcantara, Alcantara, Španělsko

⁴ 4Department of Haematology, Université Catholique de Louvain, Namur, Belgie

⁵ Fakultní nemocnice v Motole, Fakultní nemocnice v Motole, Praha, Česko

⁶ First Medical Faculty, Charles University and General University Hospital, Prague, Praha, Česko

⁷ Norton Cancer Institute, St. Matthews Campus, Louisville, KY, Spojené státy

⁸ MorphoSys AG, Morphosys AG, Planegg, Německo

⁹ US Oncology Hematology Research Program, US Oncology Research and Rocky Mountain Cancer Centers, Aurora, CO., Spojené státy

Approximately 15–20% of treatment-naïve patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) have CD20-low tumors, while CD19 is homogeneously expressed in >90% of cases of DLBCL. CD20-low DLBCL is associated with poor response to rituximab-based regimens (Johnson NA, et al. 2009). CD19 functions as a positive regulator of B-cell receptor signaling and is important for B-cell activation and proliferation and is therefore an attractive therapeutic target in addition to CD20. Tafasitamab (MOR208) is a humanized, Fc-enhanced, anti-CD19 monoclonal antibody with improved antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis. Monotherapy with tafasitamab has shown clinical activity in relapsed/refractory (R/R) non-Hodgkin's lymphoma (Jurczak W, et al. 2018). In the Phase II, single-

arm L-MIND study (NCT02399085) in patients with R/R DLBCL, combined treatment of tafasitamab with lenalidomide resulted in a high proportion of patients having a complete response (Salles GA, et al. 2020). First-MIND (NCT04134936) is a Phase Ib, randomized study of tafasitamab + R-CHOP (Arm A) or tafasitamab + lenalidomide + R-CHOP (Arm B) in patients with newly diagnosed DLBCL. Here, we report data from the safety run-in phase.

Study design and methods

Patients must be aged ≥18 years, treatment naïve, with histologically confirmed DLBCL not otherwise specified and have intermediate- to high-risk disease (International Prognostic Index [IPI] 2–5) and an ECOG performance status of 0–2. Known double- or triple-hit lymphoma and transformed lymphoma are excluded. Treatment consists of six 21-day cycles of tafasitamab (12 mg/kg intravenously [IV], on Day [D] 1, 8 and 15) in addition to R-CHOP (Arm A) or tafasitamab (12 mg/kg IV, on D1, 8 and 15) + lenalidomide (25 mg orally, on D1–10) in addition to R-CHOP (Arm B). Granulocyte-colony stimulating factor prophylaxis was mandatory in all patients. The study includes a safety run-in phase and a main phase. In the safety run-in phase, 24 patients were enrolled. The primary objective is to assess safety; secondary objectives include ORR, PET-CR rate at end of treatment, PFS, event-free survival, long-term safety, pharmacokinetics and immunogenicity of tafasitamab. Exploratory objectives include the assessment of circulating cell-free tumor DNA. Approximately 60 patients will be recruited in 9 countries across Europe and the US.

Results

Recruitment is ongoing. Thirty-six patients were randomized; 18 in each arm. The data presented for the safety run-in phase consist of 24 patients: 13 patients in Arm A and 11 patients in Arm B. All completed the first treatment cycle; 88% of patients entered into Cycle 2 and 50% of patients entered into Cycle 3 of treatment. At baseline, their median age was 67 years (range: 47–76; Arm A) and 65 years (range: 40–74; Arm B). Overall, 33% of patients were male and 67% female; IPI scores were: IPI 2, 33%; IPI 3, 42%; IPI 4, 25%. Most patients had advanced stages III/IV (92%) and approximately



50% had bulky disease. Cell of origin was determined to be germinal center B-cell (GCB) DLBCL in 13%, non-GCB DLBCL in 42% and not yet classified in 46% of cases. A total of 248 treatment-emergent adverse events (AEs) by system organ class were documented: 111 in Arm A and 137 in Arm B. Grade ≥ 3 neutropenia was observed in 54% (Arm A) and 46% (Arm B) of patients. Thrombocytopenia Grade ≥ 3 was observed in 8% (Arm A) and 18% (Arm B) of patients. Diarrhea, fatigue and vomiting were comparable between the two arms. Febrile neutropenia was uncommon in both arms, with one event each (Figure 1). To date, 23 serious AEs were observed: 11 in Arm A (Grade 2, 1; Grade 3, 6; Grade 4, 4) and 12 in Arm B (Grade 2, 3; Grade 3, 7; Grade 4, 2). One suspected unexpected serious adverse reaction was reported in Arm B – pneumocystis jirovecii pneumonia. No treatment-associated deaths occurred.

Conclusions

R-CHOP can be safely combined with tafasitamab or tafasitamab + lenalidomide in patients with treatment-naïve DLBCL. Toxicities appear to be similar to what is expected with R-CHOP alone or in combination with lenalidomide.

P03

CLONAL HEMATOPOIESIS WITH SOMATIC MUTATIONS IN „AYA“ GENERATION OF PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Koblihová J.¹, Polívková V.¹, Benešová A.¹, Žižková H.¹, Čuřík N.^{1,2}, Lázníčka A.¹, Pepek M.³, Stoklosa T.³, Marková Šťastná M.¹, Klamová H.^{1,4}, Srbová D.¹, Machová Poláková K.^{1,2}

¹*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Česko*

²*Institute of Pathophysiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko*

³*Department of Immunology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Polsko*

⁴*Institute of Clinical and Experimental Hematology of the 1st Medicine Faculty, Charles University and Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Česko*

Introduction:

The clonal hematopoiesis with somatic mutations is age-related phenomenon with a frequency around 10% for population older than 65 years in contrast to population younger than 50 years with frequency of 1%. Mutations in genes involved in epigenetic modification and RNA splicing, which are recurrently mutated in myeloid neoplasms and associated with increased risk of hematologic cancer, seem to represent a premalignant condition. Generally, *ASXL1* mutations are frequently found in myeloid malignancies. Patients with chronic myeloid leukemia (CML) diagnosed at the age of 15 to 39 years, also called adolescent and young adults (AYAs), have a worse prognosis and response to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) compared to elderly patients. Little is known about the molecular background differing AYA from the common group of CML patients.

Objectives:

To determine, whether the worse prognosis and response to therapy of CML AYAs is associated with the clonal hematopoiesis with somatic mutations.

**Methods:**

Samples from 22 AYAs were retrospectively analyzed at the time of diagnosis (aged 18-37; Table 1). Of them, 20 patients failed on TKI or relapsed after allo-HSCT (allogeneic hematopoietic stem cells transplantation). In 6/20 AYAs, mutations in the kinase domain of BCR-ABL1 were detected at the time of TKI failure (M244V, T315I, E255K/V + Q252H, F317L + M351T, V379I, L284S). Two responders were included for comparison. Sequencing of custom myeloid panel (Roche), partly or fully covering 36 genes frequently mutated in myeloid malignancies, was performed on MiSeq (Illumina). Data was analyzed in NextGENe software (Softgenetics). The detected variants were characterized by open-source databases (VarSome, Ensembl, COSMIC, NCBI – dbSNP) and confirmed by Sanger sequencing and/or ASO-ddPCR.

Results:

At the time of diagnosis, somatic mutations were identified in *ASXL1* (n=4), *CSF3R* (n=1), *TET2* (n=1), *PCDHA12* (n=1), *SETD2* (n=1), *ATRX* (n=1), and *SIRT1* (n=1) in 10/20 AYAs, who subsequently failed on treatment (Table 1). Overall, 6 missense, 3 frameshift mutations and one nonsense mutation were detected. In patients #21 and #22 with optimal response to TKIs, no mutations were detected at diagnosis. In patient #10, *ASXL1* mutation E773X was confirmed at the time of TKI failure and also at the allo-HSCT relapse. In patient #6, G645delinsGWfs was found at the diagnosis and on the 3rd line

nilotinib treatment. Another *ASXL1* mutation, S795delinsCLfs, was found in a patient #1 only at diagnosis. In patient #19, *ASXL1* mutation T1372delinsTCfs found at diagnosis will be followed during the TKI treatment. In patient #3, the *CSF3R* mutation A593V was found at diagnosis and confirmed 14 months after the imatinib initiation. In patient #8, who relapsed after 2nd allo-HSCT, the *RUNX1* D198N was found in the same clone bearing *BCR-ABL1* T315I, both confirmed by ASO-ddPCR also before 1st allo-HSCT. This clone was, in the follow-up treatment, responsible for the relapse to CNS and also the relapse even after 3rd allo-HSCT and patient died.

Conclusions:

The preliminary data of this work outlined that somatic mutations in the myeloid genes are frequently found in CML AYAs, who failed on the TKI or relapsed after allo-HSCT, alone or together with mutated *BCR-ABL1*. The most frequently mutated gene was *ASXL1*, which is in line with the work by Ernst et al. (2018) even though on younger patients including children. Despite the clonal hematopoiesis with somatic mutations is considered as age-related phenomenon, in AYA CML patients, it may represent a critical problem in achieving sustained molecular response on solo TKI therapy, or even worse, it may result in higher risk of therapy failure and disease progression.

Supported by MZCR 00023736



AYA patient	Age at diagnosis	Transcript	Diagnosis		TKI failure				Relapse after allo-HSCT		
			BCR-ABL1 % IS	Mutation	TKI	Months from dg	BCR-ABL1 % IS	Mutation	Months from allo-HSCT	BCR-ABL1 % IS	Mutation
#1	30	b2a2	86	ASXL1 S795delinsCLFs (33%)	DASA	30	29	wt			
#2	29	b2a2	191	wt	IM	15	3	ABL1 M244V (56%)			
#3	22	b3a2	13	CSF3R A593V (53%)	IM	14	2	CSF3R A593V (55%)			
#4	26	b2a2	338	wt	IM	12	1	wt			
#5	20	b3a2	16	wt	IM	7	8	ABL1 E255V (70%) ABL1 E255K (13%) ABL1 Q252H (3%)			
#6	28	b3a2	95	ASXL1 G645delinsGWfs (39%)	NILO (3rd line)	36	143	ASXL1 G645delinsGWfs (50%)	24	46	ASXL1 G645delinsGWfs (5%)
#7	33	b2a2	138	wt	DASA (2nd line)	28	24	wt			
#8	25	b2a2	37	wt	IM	9	50	ABL1 T315I positive by ddPCR RUNX1 D198N (25%)	51*	271	ABL1 T315I (28%) RUNX1 D198N (17%)
#9	19	b2a2	51	wt	IM	55	23	wt	4	30	wt
#10	30	b3a2	325	ASXL1 E773X (47%)	IM	23	80	ASXL1 E773X (44%) ABL1 F317L (21%) ABL1 M351T (67%)	36	16	ASXL1 E773X (21%)
#11	30	b3a2	133	wt	IM	36	37	wt			
#12	37	b3a2	24	TET2 H1868D (9%)	NILO	33	82	TET2 H1868D (2%)			
#13	30	b2a2	44	SIRT1 E536K (49%)	IM	18	18	SIRT1 E536K (54%)			
#14	37	b2a2	101	PCDHA12 S584P (53%)	IM	20	41	PCDHA12 S584P (51%)			
#15	36	b3a2	63	SETD2 Y2152C (50%) ATRX H865Q (46%)				ongoing			
#16	33	b3a2	17	wt				ongoing			
#17	35	b3a2	11	wt				ongoing (ABL1 V379I 100%)			
#18	36	b2a2	96	wt				ongoing (ABL1 L284S 21%)			
#19	18	b2a2	22	ASXL1 T1372delinsTCfs (37%)				ongoing			
#20	36	b2a2, b3a2	53	wt				ongoing			
#21	31	b2a2	14	wt				optimal response			
#22	22	b3a2	81	wt				optimal response			

wt= wild type

*from 2nd allo-HSCT



P04

ANTI-ANGIOGENIC THERAPY WITH BEVACIZUMAB IS EFFECTIVE IN VIVO IN IBRUTINIB-RESISTANT MANTLE CELL LYMPHOMA

Vočková P.^{1,2}, Klánová M.^{1,2}, Pokorná E.², Kupcová K.³, Pacheco-Blanco M.³, Havránek O.^{3,1}, Keša P.⁴, Trněný M.¹, Kleiner P.^{1,2}

¹⁾ 1.interní klinika - hematologie, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Praha

²⁾ Ústav patologické fyziologie 1. LF UK v Praze, Praha

³⁾ BIOCEV, Vestec

⁴⁾ CAPI, Praha

Purpose: Role of angiogenesis in growth, spread and survival of malignant lymphomas remains largely unexplored. Bevacizumab, a monoclonal antibody against human vascular endothelial growth factor (hVEGF), has been approved for treatment of several types of solid tumors including colorectal carcinoma or breast carcinoma, in all cases in combination with chemotherapy. Mantle cell lymphoma (MCL) is a type of B-cell non-Hodgkin lymphoma characterized by frequent relapses. In recent years the outcome of patients with MCL significantly improved by modification of front-line treatment strategies and implementation of novel targeted agents, especially Bruton tyrosine-kinase inhibitors ibrutinib and acalabrutinib. Unfortunately, majority of patients still relapse even on BTK inhibitors. Relapses after failure of ibrutinib tend to be highly aggressive and outcome of patients remains dismal with no effective “standard” treatment besides adoptive immunotherapy with genetically modified T-cells. Our aim was to investigate the effect of anti-angiogenic agent bevacizumab in experimental therapy of chemotherapy and ibrutinib-refractory MCL.

Methods: Two MCL cell lines (JEKO1 and HBL2) and four MCL patient-derived xenografts (PDX) (VFN-M1, VFN-M2, VFN-M11, VFN-M12) were used for in vitro and in vivo experiments. VFN-M11 and VFN-M12 were derived from patients with ibrutinib-resistant MCL. Level of human VEGF (hVEGF) was analyzed by commercially available ELISA-based method. Cell clones with

hVEGF upregulation were derived from JEKO1 and HBL2 cell lines using pLenti-C-Myc-DDK-P2A-Puro transfection system. *In vitro* proliferation was assessed using WST8-based Cell Proliferation Assay. Anti-tumor efficacy of bevacizumab in vivo was evaluated by its ability to inhibit growth of subcutaneous (SC) PDX tumors compared to untreated controls.

Results: Compared to untreated controls bevacizumab significantly inhibited in vivo growth of MCL tumors in all tested models. Interestingly, the best anti-lymphoma effect of bevacizumab was observed in two PDX-models derived from patients with ibrutinib-resistant MCL (VFN-M11, VFN-M12). The levels of hVEGF analyzed in different PDX tumors obtained from the untreated mice revealed positive correlation with anti-lymphoma efficacy of bevacizumab: the highest hVEGF levels were found in the VFN-M11 and VFN-M12 PDX tumors. In vivo ultrasound examination confirmed significantly lower microvessel density of VFN-M11 and VFN-M12 tumors from bevacizumab-treated mice compared to untreated controls.

Despite the observed inhibition of growth of lymphoma tumors, bevacizumab did not prevent systemic spread of SC PDX tumors to other murine organs (spleen, liver, lymph nodes) when compared to untreated controls.

In vitro proliferation rates of JEKO1 and HBL2 clones with upregulation of VEGF were not significantly different compared to the original cell lines. In sharp contrast, SC xenotransplant of the “VEGF” clones resulted in accelerated engraftment and tissue-invasive tumor growth. In vivo ultrasound examination confirmed significantly higher microvessel density and different pattern of growth in case of tumors that formed after injection of the JEKO1 and HBL2 “VEGF” clones (compared to original cell lines).

Conclusions: Our data suggest that patients, who fail after ibrutinib, might profit from implementation of anti-angiogenic therapy into post-ibrutinib salvage therapy regimen.



P05

LIMITED EFFICACY OF DARATUMUMAB IN MULTIPLE MYELOMA WITH EXTRAMEDULLARY DISEASE

Jelínek T.¹, Ševčíková T.¹, Popková T.¹, Černá L.¹, Broskevičová L.¹, Brožová L.², Říhová L.³, Bezděková R.³, Plonková H.¹, Jungová A.⁴, Minařík J.⁵, Pour⁶, Pavlíček P.⁷, Špička I.⁸, Maisnar V.⁹, Radocha J.⁹, Šimíček M.¹ Hájek R.¹

¹Department of Hematooncology and Faculty of Medicine, University Hospital Ostrava and University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

²Institute of Biostatistics and Analyses, Ltd., Brno, Czech Republic

³Department of Clinical Hematology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁴Hematology and Oncology Department, Charles University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic

⁵Department of Hematooncology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Olomouc, Czech Republic

⁶Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology and Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁷Department of Internal Medicine and Hematology, University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

⁸1st Medical Department – Clinical Department of Haematology of the First Faculty of Medicine, General Teaching Hospital Charles University, Prague, Czech Republic

⁹4th Department of Internal Medicine – Hematology and Faculty of Medicine in Hradec Králové, University Hospital Hradec Kralove and Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

Background:

The anti-CD38 monoclonal antibody, daratumumab, has become one of the most important new agents for the treatment of multiple myeloma (MM), both in relapsed/refractory (RR) setting as well as a first-line therapy. Addition of daratumumab to standard of care regimens has improved the number and depth of responses as well as progression free survival (PFS) across

all major patients subgroups, except high-risk cytogenetics that cannot be fully overcome. Efficacy of daratumumab in MM patients with extramedullary disease (EMD) is largely unknown, as well as the expression level of CD38 antigen on plasma cells (PCs) from EM site.

Aims:

To evaluate efficacy of daratumumab monotherapy in RRMM patients with EMD in terms of median PFS. To investigate the expression level of CD38 antigen on PCs from EM mass.

Methods:

Forty-two RRMM patients were treated with a single agent daratumumab in 7 Czech hematological centers after fulfilling indication criteria (more than 3 previous lines of therapy including PI and IMiD and progressing during the last line of therapy). The presence of EMD was evaluated according to institutional guidelines by low dose CT, PET/CT or MR imaging; both bone-related and soft-tissue EM lesions were considered as EMD. The efficacy was evaluated in terms of median PFS, which was assessed using Kaplan-Meier methodology, log-rank test was used to estimate the statistical significance of differences between curves. The expression level of CD38 antigen using median MFI (mean fluorescence intensity) was evaluated by 8-colour flow cytometry on independent cohort of patients untreated with daratumumab. CD38 expression level of PCs from EM site was compared to the bone marrow (BM) PCs from newly diagnosed MM and from relapsed MM patients. Moreover, expression of CD38 gene at RNA level was determined using qRT-PCR on 3 paired samples of BM PCs from new diagnosis and PCs from EMD at time of EM lesion development. Results were calculated as relative expression of CD38 and hGUSB housekeeping gene using relative standard curve.

Results:

Between May 2016 and October 2019, 42 RRMM patients with median of 5 (range 3-8) previous lines of therapy were treated with a single agent daratumumab. ORR for whole cohort was 37.8% with median PFS of



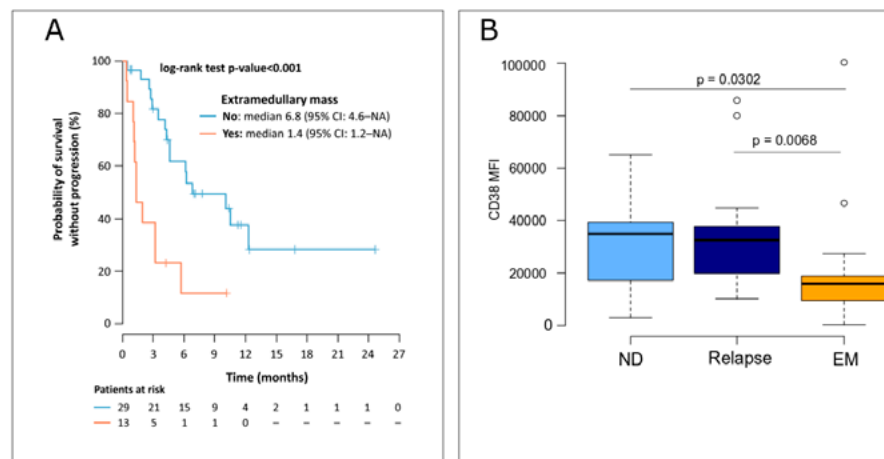
4.6 months. EMD was present in 31% (13/42) of patients. Median PFS for patients with EMD was significantly shorter vs. those without EMD (1.4 months vs. 6.8 months; $p < 0.001$); Figure 1A. Expression level of CD38 determined by flow cytometry revealed approximately 2 times lower expression of CD38 on EM PCs ($n=15$) compared to BM PCs from NDMM ($n=20$) (median MFI 15 946 vs. 34 958; $p = 0.03$). CD38 antigen was also significantly less expressed on EM PCs compared to BM PCs from relapsed MM ($n=20$) (median MFI 15 946 vs. 32 500; $p = 0.0068$); Figure 1B. Similarly, RNA level of CD38 gene was decreased in EMD vs. new diagnosis (median 3.2x, $p = 0.06$), the difference in 3 paired samples was with a clear statistical trend.

Conclusion:

The efficacy of daratumumab as a single agent is very limited in RRMM patients with EMD reaching median PFS of only 1.4 months. The expression level of CD38 antigen on EM PCs is lower compared to BM PCs from newly diagnosed or relapsed MM both on protein and transcriptional level. To the best of our knowledge, this is the first analysis reporting the impaired activity of daratumumab in myeloma with EMD. The down-regulation of CD38 expression on EM PCs may be one of the underlying mechanisms of decreased efficacy of daratumumab.

Acknowledgment:

This work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. 17-30089A) and the Institutional Development Plan of University of Ostrava and The Ministry of Education, Youth and Sports (IRP03_2018-2020).





P06

HOW TO TREAT ELDERLY PATIENTS OVER 80 YEARS WITH DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA: ALL BENEFIT FROM RITUXIMAB AND SELECTED ONES FROM R-CHOP

Vodička P.¹, Janíková A.², Sýkorová A.³, Procházka V.⁴, Móciková H.⁵, Klener P.¹, Šálek D.², Belada D.³, Ďuraš J.⁶, Pirnos J.⁷, Benešová K.¹, Pytlík R.⁸, Dlouhá L.¹, Blahovcová P.⁹, Boudová L.¹⁰, Campr V.¹¹, Jakša R.¹², Trněný M.¹

¹)I. interní klinika – hematologie 1. LF UK a VFN, Praha

²)Interní hematologická a onkologická klinika, LF MUNI a FN Brno, Brno

³)IV. interní hematologická klinika, LF UK a FN Hradec Králové, Hradec Králové

⁴)Hemato-onkologická klinika, LF UPOL a FN Olomouc, Olomouc

⁵)Interní hematologická klinika, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha

⁶)Klinika hematoonkologie, LF OU a FN Ostrava, Ostrava

⁷)Onkologické oddělení, Nemocnice České Budějovice, České Budějovice

⁸)Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha

⁹)Kooperativní lymfomová skupina, Praha

¹⁰)Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň, Plzeň

¹¹)Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

¹²)Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

Background. The management of elderly patients over 80 years with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) remains challenging, and evidence-based data for optimal treatment of these patients with decreased fitness and frequent comorbidities are lacking. In the real world, the anthracycline-based chemotherapy (CHT-A) regimens are frequently subject to attenuation or the patients are provided with different less intense chemotherapy.

Aims. The aim of this observational population-based multicentric study was to evaluate clinical features, treatment and outcomes of patients over 80 years with DLBCL prospectively, and to compare efficacy and safety of varying regimens of chemotherapy.

Methods. From the total of 4473 patients diagnosed with de novo DLBCL during a 16-year period 1999-2014 in the Czech Republic (median age 64 years), 420 (9.4%) patients 80 years of age or older were analyzed. Of them, 372 patients with complete medical records and follow-up entered the final analysis. Chemotherapy was applied in 319 patients (85.8%). A total of 152 patients (40.8%) received first-line CHT-A regimens, from which 115 patients (30.9%) received CHT-A with rituximab, and 37 patients (9.9%) obtained CHT-A without rituximab. Remaining 167 patients (44.9%) received other than CHT-A regimens with (n=97; 26.1%) or without (n=70; 18.8%) rituximab. This study was a part of registered observational project NiHiL (NCT03199066).

Results. Median follow-up of the whole cohort was 42 months. The studied 372 elderly patients (median age 82 years; range 80 - 94) were diagnosed with advanced clinical stage (III-IV) in 45.1%, worse performance status (2-4) in 49.2%, and higher IPI (3-5) in 52.5%. Patients treated with CHT-A and rituximab regimens were significantly younger (age median 81 vs. 82 years, p=0.001) and had better initial performance status comparing to other patients (PS ≥ 2 34.8% vs. 50.3%; p=0.035); no other differences in baseline characteristics were found. The application of rituximab was significantly more frequent in CHT-A regimens (75.7%) than in non-CHT-A regimens (58.1%), with continuously increasing proportion in time, reaching 94.9% in CHT-A vs. 73.8% in non-CHT-A regimens during the last four years of observation. The addition of rituximab led to improvement of both PFS, and OS in CHT-A regimens (2-year PFS 55.4% vs. 35.1%, HR 0.66, p=0.037; 2-year OS 59.8% vs. 40.5%, HR 0.68, p=0.064) as well as in non-CHT-A regimens (2-year PFS 40.4% vs. 15.2%, HR 0.55, p<0.001; 2-year OS 48.4% vs. 20.7%; HR 0.59; p=0.002). Patients treated with CHT-A and rituximab reached a complete remission significantly more often and experienced a superior 2-year PFS (55.4% vs. 27.5%, HR 0.57, p<0.001) as well as 2-years OS (59.8% vs. 32.8%, HR 0.59, p<0.001), when compared to other chemotherapy regimens.



Conclusion. In the real world, there is a need to assess the tolerability of treatment in the intention-to-treat population of patients over 80 years with DLBCL. Fit patients in this age-specific subgroup could profit from the current standard treatment for younger patients CHT-A with addition of rituximab. Vulnerable patients, who are not eligible for treatment with anthracyclines, might profit from addition of rituximab to any non-CHT-A therapy.

P07

DO NOT WASTE THE DATA: A PIPELINE FOR EVALUATION OF BCR-ABL1 KINASE DOMAIN MUTATION USING INDIVIDUAL THRESHOLDS

Benešová A.¹, Polívková V.¹, Pecherková P.², Koblihová J.¹, Klamová H.^{2,3}, Srbová D.², Žižková H.¹, Machová Poláková K.^{1,4}

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

²) Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

³) Ústav klinické a experimentální hematologie 1. LF UK, Praha

⁴) Ústav patologické fyziologie 1. LF UK, Praha

Background. Next-generation sequencing (NGS) is technology enabling to detect low-level BCR-ABL1 mutations, thus to early reveal a resistant clone of chronic myeloid leukemia (CML) to tyrosine kinase inhibitors (TKI). For reliable data evaluation, it is important to set up a threshold of sensitivity to distinguish artificial variants from true mutations. In the previous works, it has been shown that the error frequency and distribution depend on the sequence context and that some of the nucleotide changes occur in higher frequencies.

Aim. To count the individual thresholds for mutations detected through the entire kinase domain (KD) of BCR-ABL1 by NGS and to implement the bioinformatic pipeline into the routine laboratory practice.

Methods. RNA samples from leukocytes were isolated from 30 healthy donors and the transcript was subsequently analysed for ABL1 KD nucleotide variants.

The NGS libraries were prepared using Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) and sequenced on the Miseq platform. Data were processed with the NextGENe software (Softgenetics). From the numbers of each nucleotide on each sequenced position of 30 healthy donors, the values of the limits of blank (LoB), detection (LoD) and quantification (LoQ) were counted.

Results. Sequenced amplicons of ABL1 KD of healthy donors were 1429 bp long and covered the amino acids V33-K508 (ref. seq. NM_005157). Only those nucleotide positions with minimum of 1000 reads both in forward and reverse reads were used and number of reads were normalized to 3000 total reads to count the limits. The LoQ of specific nucleotide change across the amplicon was 30 for the transversions, as for the transitions it was 68 for A/G, 28.5 for C/T, 35 for G/A and 68.5 for T/C. Detection of mutations was improved by calculation of LoQs for each nucleotide position. The limits of sensitivity of top 24 resistant mutations were counted (LoQ/3000*100) with the median 1.5% (1.0-3.7%) of mutated BCR-ABL1 from total BCR-ABL1 (Figure 1). In every routine analysis two healthy controls are included and examined using LoDs to avoid possible error spots of the particular analysis. For an automatic processing of the evaluations of sequences of CML patients the inhouse programme called NextDOM was created using Matlab software. NextDOM controls the quality of the data by counting the number of reads of particular positions and excluding positions with inadequate numbers of reads. NextDOM analyses the data after primary processing with NextGENe software and additionally implements the threshold set giving the statistically significant variants as an outcome (p-value = 0.05).

Conclusion. Published studies applied the threshold of sensitivity for BCR-ABL1 mutation detection by NGS to 1%, 3% or 5% uniformly for the whole sequenced region. Here, the innovative approach using sequencing data from samples of healthy donors was applied to calculate the threshold levels for each sequenced position individually. This approach represents an economical work with data, which does not “waste” variants at significant levels - true mutations - that may be filtered out using universal thresholds of 5% or 3%.



On the other hand, the universal threshold 1% cannot be applicable for many variants with high probability of false-positive mutation calling.

Support MZCR 00023736

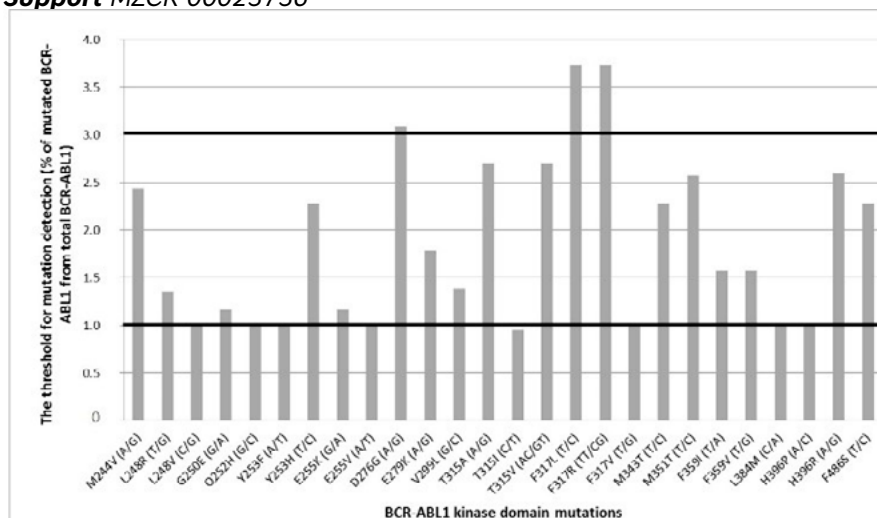


Figure 1. The graph represents the calculated values of individual thresholds for top 24 clinically relevant mutations of BCR-ABL1 kinase domain. The bold lines highlight the most frequently used uniform thresholds levels - 1% and 3%.

P08

PROTON RADIOTHERAPY FOR MEDIASTINAL HODGKIN LYMPHOMA: THEORETICAL BACKGROUND AND CLINICAL EXPERIENCE

Dědečková K.¹, Zapletalová S.¹, Móciková H.², Gahérová L.², Marková J.^{1,2}, Kubeš J.¹, Vondráček V.¹, Andrlík M.¹

¹ Oddělení protonové terapie, Proton Therapy Center Praha, Praha 8

² Interní hematologická klinika 3. LF UK a FNKV, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

Introduction:

Radiotherapy (RT) plays important role in the treatment of Hodgkin lymphoma (HL). However, the results are suboptimal for a significant group of patients. Use of the most safe radiotherapy technique is crucial. Proton therapy (PT) is a modern radiation technique based on use of particles. Compared to conventional radiotherapy, PT allows higher protection of healthy tissues. This is associated with lower risk of significant acute toxicity (radiation pneumonitis, severe dysphagia) and late toxicity (cardiovascular, secondary malignancies).

Methods:

Between May 2013 and December 2019, 129 patients (pts) received mediastinal PT via pencil beam scanning (PBS) technique. Seventy-three patients with a minimum follow up of 2 years, were analyzed for acute toxicity and treatment response. Median follow-up was 44.5 months (23.4-79.7 months), median age at the time of PT was 32.2 years (18.5-79.2 years). Median dose applied was 30 GyE (20-40 GyE). PT for PET positive disease was performed in 13 pts. Deep inspiration breath hold technique was used in 57 patients, other patients were treated under free breathing condition after 4D-CT control.

Results:

Seventy-one patients (97%) achieved complete remission, two patients progressed outside of irradiated field. Acute toxicity was mild, mostly



dysphagia, radiodermatitis, transient xerostomia, dysgeusia. No case of symptomatic pneumonitis was observed. No patient required growth factor application or blood supplementation. To date, no case of Lhermitt's syndrome or late pulmonary toxicity was reported.

Conclusion:

PT offers safe possibility for mediastinal RT. PT via PBS in deep inspiration breath hold is to be the most sparing radiotherapy approach for mediastinal lymphoma. Our clinical data support this statement.

P09

IDENTIFICATION OF PML-RARA, CBFB-MYH11 AND RUNX1-RUNX1T1 GENOMIC FUSION SEQUENCES IS FEASIBLE AND ENABLES UNAMBIGUOUSLY INTERPRETABLE AND SENSITIVE MONITORING OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE

Lukeš J.^{1,2}, Zwyrtkova M.^{1,2}, Winkowska L.^{1,2}, Sramkova L.^{1,2,3}, Stary J.^{2,3}, Trka J.^{1,2,3}, Zuna J.^{1,2,3}, Zaliava M.^{1,2,3}

¹⁾ CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague, Prague

²⁾ Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague

³⁾ University Hospital Motol, Prague

Background: Minimal residual disease (MRD) monitoring in acute myeloid leukemia (AML) assists in outcome prediction, risk-stratification and therapy adjustment and enables early detection of impending relapse. Fusion genes and their transcripts represent possible targets for quantitative PCR (qPCR) based MRD monitoring in a subset of AML. Unlike transcripts, the copy number of genomic fusions per leukemic cell is uniform (usually one), enabling unambiguous assessment of MRD levels. However, the laboriousness of PCR-based identification of genomic fusions has been handicapping the "fusion gene-based" (FG) MRD monitoring. On the other hand, fusion genes

expression in leukemic cells at diagnosis varies significantly (> 2 logs), and although the "fusion transcript-based" (FT) approach has been widely used so far, its sensitivity in patients with lower expression is limited.

Aims: We aimed to assess 1) feasibility of the identification of genomic fusion sequences using a modern sequencing technology, 2) feasibility of FG MRD monitoring using patient-specific qPCR systems, and 3) concordance of MRD levels obtained by FG versus FT approaches.

Methods: We analyzed 23 children with AML positive for the three common fusions: PML-RARA (n=11), CBFB-MYH11 (n=7) and RUNX1-RUNX1T1 (n=5). Genomic fusion sequences were identified via targeted sequencing utilizing hybridization-based target enrichment with custom-designed probes (total target region including all fusions – 149 kb; Illumina technology). The identified sequences were used to design patient-specific qPCR assays. MRD was measured using in-house established FG, and routinely available standardised FT qPCR assays (Gabert et al., Leukemia 2003) in 265 follow-up samples (median 11/patient). Published guidelines were used to determine assay sensitivity, quantitative range and MRD levels (van der Velden et al., Leukemia 2007; Gabert et al.)

Results: With a median sequencing output of 504 k reads mapped to target region, genomic fusion sequences were successfully identified in all analyzed patients. In 19/23 patients, ≥ 2 fusion sequences were identified (reciprocal fusions, fusions to additional loci in more complex rearrangements). Thanks to the uniqueness of fusion sequences and virtual absence of nonspecific amplification, FG qPCR assay optimization (1 per patient) was straightforward and fast and sufficiently deep quantitative range (10^{-4}) and sensitivity (10^{-4} to 10^{-5}) were achieved in all 23 patients. MRD was negative and positive by both methods in 136 and 100 samples, respectively, positive only by FG approach in 24 and only by FT approach in 5 samples. Out of 100 "double-positive" samples, in 61 MRD levels differed by ≤ 1 log (n=51) or they were non-quantifiably positive (NQP) by both methods (n=10); in 32 samples, MRD



was higher by > 1 log using FG compared to FT approach ($n=4$) or was NQP by FT approach ($n=28$), and in 7 samples MRD was higher by > 1 log using FT compared to FG approach ($n=6$) or was NQP by FG approach ($n=1$).

Summary/Conclusion: We show that detection of PML-RARA, CBFB-MYH11 and RUNX1-RUNX1T1 genomic fusion sequences via targeted next generation sequencing is feasible and enables to perform FG MRD monitoring which is superior to the so far widely used FT MRD monitoring in terms of sensitivity, and which, thanks to a fixed and uniform target-to-cell ratio, provides MRD data that are unambiguously interpretable. The FG MRD monitoring in respective AML subtypes may thus provide better insight into the molecular remission depth or enable earlier detection of molecular relapse.

Support: AZV grant NV19-07-00329, NU20-07-00322

P10

DYNAMIC CHANGES OF INHIBITORY KILLER-IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS ON NK CELLS AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION: AN INITIAL STUDY

Jindra P.¹, Dekojová T.¹, Houdová L.², Pitule P.³, Caputo V.S.⁴, Ostašov P.³, Fatka J.², Gmucová H.¹, Holubová M.^{1,3}, Lysak D.¹

¹Hematologicko-onkologické, FN Plzeň, Biomedicínské centrum LFK UK Plzeň, Plzeň

²NTIS, Faculty of Applied Science, University of West Bohemia, Plzeň

³Laboratory of Tumor Biology and Immunotherapy,, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Plzeň

⁴Department of Immunology and Inflammation, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, Spojené království

Killer-immunoglobulin-like receptors (KIRs) are critical natural killer (NK) cell regulators. The expression of KIRs is a dynamic process influenced by many factors. Their ligands—HLA (Human Leukocyte Antigen) class I molecules—

are expressed on all nucleated cells that keep NK cells under control. In hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), NK cells play an essential role in relapse protection. In the presented pilot study, we characterized the dynamic expression of inhibitory KIRs (iKIRs), which protect cells against untoward lysis, in donors and patients during the first three months after HSCT using flow cytometry. The expression of all iKIRs was highly variable and sometimes correlated with patients' clinical presentation and therapy regiment. Post-transplant Cyclophosphamide (Cy) in the graft-versus-host disease (GvHD) prevention protocol downregulated KIR2DL1 to just 25% of the original donor value, and the FEAM (Fludarabine + Etoposid + Ara-C + Melphalan) conditioning protocol reduced KIR2DL3. In lymphoid neoplasms, there was a slightly increased KIR2DL3 expression compared to myeloid malignancies. Additionally, we showed that the ex vivo activation of NK cells did not alter the level of iKIRs. Our study shows the influence of pre- and post-transplantation protocols on iKIR expression on the surface of NK cells and the importance of monitoring their cell surface.

P11

ACTIVE THROMBIN BOUND TO D-DIMERS AND ITS VALUE: NEW APPROACH TO DIAGNOSIS OF THROMBOSIS?

Štikarová J., Dyr J. E.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Background:

The diagnosis of thrombosis is heavily dependent on D-dimers determination. Evaluation of D-dimers is one of the most used and most useful diagnostic tools for assessment of thrombogenic state, but its all-embracing meaning is hindering the diagnostic value. The determination of active thrombin bound to D-dimers might be an additional, independent and important value in the D-dimers assay.

**Aim:**

Aim of this study was to determinate the presence of active thrombin bound to D-dimers in various pathological condition.

Method:

Patients samples were obtained in accordance with The Ethic committees of participating institutions (IHBT, Prague and MUH, Prague). Qualifying criterions were elevated D-dimers and consent to the study. From 98 patients, medical history and treatment protocols were acquired from 83 of them.

Results:

The presence of active thrombin bound to D-dimers was shown to be linked with thrombotic diagnosis - more than 60 % cases of thrombogenic states had active thrombin bound to D-dimers. More than 33 % of other pathological conditions had active thrombin bound to D-dimers - out of them 70 % was linked with complications or death.

Conclusion:

The presence of active thrombin bound to circulating D-dimers has been proposed to help to differentiate between thrombogenic state and other pathological conditions linked with elevated D-dimers¹. Detection of active thrombin bound to D-dimers might be used as a qualitative advance in the assessment of the patient's condition and prognosis.

Acknowledgement:

Authors would like to highlight the contribution of M Maly, J Suttar, O Kucerka, J Louzil, P Salaj, M Zemanova, E Ceznerova, K Svobodova and I Hrachovinova to the acquisition of samples.

This work was supported by the ERDF and the state budget of the Czech Republic (project AIIHHP: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007428, OP RDE, Ministry of Education, Youth and Sports), by the Ministry of Health, Czech Republic (project 00023736; grant NV18-08-00149) and by ERDF OPK (CZ.2.16/3.1.00/24001).

1. Dyr JE, Stikarova J, Suttar J, et al. Measurable Amount of Active Thrombin Is Bound to Circulating D-Dimers. Is There Any Impact on Diagnosis and Pathophysiology of Thrombosis? 2016;128(22):2570. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/2570.abstract>.

P12**SURVEY OF TRANSPLANT ASSOCIATED MACROPHAGE ACTIVATION SYNDROME (TAMAS) FOLLOWING ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN CHILDREN AND YOUNG ADULTS**

Sedláček P.¹, Diaz de Heredia C.², Yesilipek A.³, Merli P.⁴, Marwah P.⁵, Ramprakash S.⁶, Ottaviano G.⁷, Corbacioglu S.⁸

¹ University Hospital Motol, 2nd Medical School, Charles University Prague, Prague, Czech Republic

² Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, Barcelona, Spain

³ Akdeniz University Medical School, Antalya, Turkey,, Antalya, Turkey

⁴ IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy, Roma, Italy

⁵ Bangalore, India, Bangalore, India

⁶ Jaipur, Jaipur, India

⁷ Ospedale San Gerardo, Clinica Pediatrica dell'Università, Monza, Italy, Monza, Italy

⁸ University Regensburg, Germany, Regensburg, Germany

Background: Macrophage activation syndrome (MAS) is a serious and historically rare life-threatening complication now increasingly observed in recipients of allogeneic HSCT. Excessive uncontrolled and dysregulated immune activation with proliferation of T lymphocytes and macrophages leads to hyperinflammatory responses with hypercytokinemia and hemophagocytosis. Similar but different from other primary or secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) there is no suitable definition for transplant associated MAS (TAMAS). Available HLH criteria do not reflect the specificity of MAS presenting in patients following allogeneic HSCT and therefore should be used cautiously. A retrospective survey was initiated



by the Pediatric Diseases Working Party (PDWP) of the EBMT for a better understanding of the particularities and features of TAMAS. Our aim is to propose a definition for TAMAS based on this survey, which in the future may help to collect valid prospective data. Universally accepted criteria may help to identify the disease early and initiate efficient targeted therapies.

Methods: Twenty-one centers from 11 countries (Austria, Denmark, Germany, Hungary, India, Italy, The Netherlands, Poland, Slovakia, Spain and Turkey) participated in this retrospective study. Data of 45 patients age 0.5–21.6 years (median 9), who underwent their first alloHSCT since 2005 and were diagnosed with TAMAS according to local center criteria, were collected. Transplant indications were malignant diseases (n=20), primary immunodeficiencies (n=5), bone marrow failure syndromes (n=18) and others (n=2). Conditioning regimens varied substantially, reflecting a wide spectrum of diseases, but were defined as myeloablative (MAC) in 33 patients or reduced (RIC) in 12 patients respectively. Primary grafts were bone marrow (n=26), cord blood (n=4), peripheral blood stem cells (n=7) or in vitro T-cell depleted peripheral blood stem cells (n=8). Seven patients were transplanted from MSD, 21 from MUD and 17 from haploidentical family donor.

Results: Following first HSCT 13 patients failed to reach primary engraftment, further 32 engrafted granulocytes on day 9–33 (median 21). Eighteen (40%) patients had to be infused with a second allogeneic graft for graft failure 23–560 days (median 75) after 1.HSCT. TAMAS was diagnosed in median 34 days (11–672) following 1.HSCT (n=38) or 2.HSCT (n=7). 13 patients (29%) suffered from aGvHD grade II–IV; in 23 patients (51%) viremia was detected. Seventeen patients (38%) died due to TRM 0–294 days (median 33) after diagnosis of TAMAS, further 2 died of primary disease progression. Twenty-six patients are alive (OS 26/45; 58%) after 1st (n=16) or 2nd HSCT (n=10) 1–104 months (median 18) after presentation of TAMAS.

Strenght of association of clinical and laboratory manifestations to TAMAS:

Strong: primary or secondary cytopenia in 42/45 (93%), ferritin above 5 000 ng/mL in 36/41 (88%), persistent fever in 39/45 (87%), triglycerides above 265 mg/dL in 15/17 (88%)

Moderate: marrow hemophagocytosis in 20/33 (61%), max sCD25 above 2400 UI/mL in 8/15 (53%)

Weak: splenomegaly in 17/42 (40%), fibrinogen below 150 mg/dL in 8/36 (22%), any neurological involvement in 12/45 (27%)

Conclusions: TAMAS is a serious complication associated with high mortality. Current criteria for HLH should be adapted for patients developing TAMAS.

Clinical Trial Registry: for Pediatric Diseases Working Party EBMT

Disclosure: nothing to declare

Keywords: transplant - associated macrophage activation sy, transplant – associated mortality, children, graft failure, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation



P13

STORAGE OF UV LIGHT AND RIBOFLAVIN TREATED RBC AFTER CRYOPRESERVATION AND RECONSTITUTION IN AS-3 ADDITIVE SOLUTIONKutac D.^{1,2}, Bohonek M.^{1,3}, Landova L.¹, Kostrouchova B.¹, Staskova E.¹, Blahutova M.¹, Lovecky J.⁴¹⁾ Department of Hematology and Blood Transfusion, Central Military Hospital Prague, Prague²⁾ Faculty of Military Health Sciences, University of Defence Brno, Hradec Kralove³⁾ Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague⁴⁾ St. Sisters of Mercy Hospital Karel Boromejsky in Prague, Prague**Background:**

For sudden need of blood it is desirable to have stock of RBCs units group O and also units with a low or high frequent antigen, that will be available immediately. This need can be mitigated by building an inventory of cryopreserved red blood cells (CRBC). With emerging infectious threats, pathogen reduction technology (PRT) is promoted in civilian and military transfusion medicine. Many studies for evaluation of quality parameters of frozen red blood cells (RBC) have been published. However, the impact of Riboflavin/UV light PRT (Mirasol® PRT System, Terumo BCT, USA) on CRBC has not been evaluated.

Aims:

Methods of PRT are successfully used for treating plasma, fresh platelets and fresh whole blood. This study explores the impact of Mirasol treatment on subsequent freezing of RBCs, with the goal of comparing in vitro quality parameters of reconstituted CRBC from PRT-treated and untreated WB.

Methods:

A comparative study of PRT-treated (T-CRBC) and untreated (C-CRBC) CRBC was performed. Following WB collection units underwent Mirasol treatment (n=23) or remained untreated (n=20). Post-PRT treatment the buffy

coat was removed and units were in-line leucocyte-depleted and processed per standard procedures. The RBCs from all units were glycerolised in 40% glycerol (wt/vol) and frozen at -80 °C, followed by a thaw and multiple wash cycles. The deglycerolised RBC units were reconstituted in Nutrice1 (AS-3) and stored at 4±2 °C for 21 days. After reconstitution of CRBCs in AS-3 the following assays were performed on days 0, 1, 7, 14 and 21: WBC, HCT, volume, HB/TU, pH, % hemolysis, hemoglobin (HB) in supernatant, K, P, NH₃, osmolality, ATP, and 2,3-diphosphoglycerate.

Results:

Hct for all units ranged between 0.35 and 0.57, meeting the EU guidelines of 0.35 to 0.70 for reconstituted CRBC. Mean unit volumes on the day of reconstitution was comparable, with 291±8 mL for the T-CRBC and 288±7 mL for the C-CRBC. Total Hb per unit for the T-CRBC exceeded the required 36g with a mean of 45.3±2.6g while some of the C-CRBC had values were <36g(38.8±3.9g). The pH values decreased at a similar rate with the T-CRBC lower than the C-CRBC (Td1=6.42±0.04, Td7=6.38±0.05, Td14=6.36±0.04, Td21=6.33±0.03, Cd1=6.56±0.08, Cd7=6.52±0.06, Cd14=6.50±0.05 and Cd21=6.43±0.10). Mean % hemolysis was similar between arms on days 1 and 7, but deviated from each other on days 14 and 21, with the T-CRBC higher than the C-CRBC (Td1=0.19±0.08, Cd1=0.22±0.08, Td7=0.45±0.20, Cd7=0.41±0.13, Td14=0.76±0.37, Cd14=0.59±0.17, Td21=0.92±0.34 and Cd21=0.76±0.24). HB in the supernatant was in the same range for T-CRBC and C-CRBC (Td1=0.11±0.14 g/unit, Cd1=0.07±0.13 g/unit). K (mmol/L) was consistently higher for T-CRBC than C-CRBC (Td1=0.92±0.22, Td7=40.7±3.8, Td14=50.7±4.8, Td21=54.4±4.7, Cd1=0.71±0.14, Cd7=12.5±2.0, Cd14=18.2±3.0, Cd21=21.9±3.3). P was similar between arms, while NH₃ for T-CRBC was nearly 2x that of the C-CRBC. Osmolality was <340 mOsm/L for all units. ATP for T-CRBC was slightly higher than C-CRBC on d1 and d7, but similar on d14 and d21. 2,3-DPG was higher for T-CRBC than C-CRBC on d1 and rapidly depleted for d7, 14 and 21.

**Summary / Conclusions:**

Cryopreserved RBCs from Mirasol-treated WB can be thawed, reconstituted and stored for emergency use 7 days. This provides additional protection against infectious threats for stockpiled RBCs.

P14

MUTUAL COMPETITION BETWEEN IMATINIB AND CARNITINE INTAKE THROUGH THE OCTN2 TRANSPORTER IN CML AND MUSCULAR CELLS

Burda P.^{1,2}, Hlaváčková A.¹, Polívková V.¹, Čuřík N.^{1,2}, Klamová H.^{1,3}, Koblihová J.¹, Sutttnar J.¹, Machová-Poláková K.^{1,2}

¹⁾ Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague

²⁾ Institute of Pathophysiology, 1st Medicine Faculty, Charles University, Prague

³⁾ Institute of Clinical and Experimental Hematology, 1st Medicine Faculty, Charles University and Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague

Introduction: The identified SNPs in regulatory regions of *SLC22A4* (*OCTN1*) and *SLC22A5* (*OCTN2*) genes encoding influx transporters have been showed to be significantly associated with the response of CML patients to imatinib in first line therapy (Jaruskova, Machova et al. JECCR 2017). Moreover, the SNP rs460089, located in the promotor of *SLC22A4*, was significantly associated with a probability of TFR in EURO-SKI patients after imatinib cessation (Machova, Pfirrmann et al. EHA 2019). *OCTN1* gene is located 75kb upstream from *OCTN2* at chromosome 5 and both genes are probable evolutionary copies. The SNP rs460089 was identified to be in high linkage disequilibrium with seven other regulatory SNPs located in introns of both genes. Thus, the regulatory loci of the *OCTN1* may regulate expression of *OCTN2* and vice versa. This work focused on the imatinib intake efficacy by the OCTN2.

Methods: Cells: KCL-22 (CML), HTB-153 (human rhabdomyosarcoma). RT-PCR and the RT² Profiler™ PCR Array Human Drug Transporters. Proteins: WB. Concentration of imatinib and carnitines): quantitative LC-MS/MS MRM

mode. Chromatographic separation- XBridge Amide column (150x2.1mm, 5µm; Waters, Milford (MA), USA) coupled to tandem MS QTRAP 4000 (Sciex, USA).

Results: Expression analysis in KCL-22 showed a significantly higher expression of OCTN2 compared to other transporters (OCT1, OCT2, OCT3, OAT1, OAT2, OAT3, OCTN1) with affinity to imatinib. Comparable OCTN2 expression as in KCL-22 was confirmed in HTB-153 cells. In both cell lines the OCTN1 expression was about 5times lower to OCTN2. Using sublethal imatinib concentrations, we observed its rapid intake in KCL-22 and HTB-153. The intracellular imatinib concentration 18nM was detected at 10min, 20nM (3hrs) and 25nM (24hrs) in KCL-22. Similar trend was observed in HBT-153. To follow, whether imatinib is preferentially transported by highly expressed OCTN2, the OCTN2 specific substrates (carnitines) were applied as markers. The carnitines cell intake was slower compared to imatinib (ex. 0.4nM (10min); 36nM (3hrs); 110nM (24hrs) in KCL-22, similar trend in HBT-153) and about two times more effective at all timepoints. To test the mutual impact on the intracellular intake of imatinib and carnitines, the cells were pre-incubated for 20hrs with imatinib, carnitines were added for last 3hrs. A significantly reducing cell intake rate of carnitine with increasing levels of imatinib in pre-incubation was observed. On the contrary, pre-incubation with carnitines does not significantly reduce imatinib cell intake in both cell lines. An inhibition activity of OCTN2 by vinorelbine (relatively specific inhibitor of OCTN2 -the expression of other analyzed transporters (n=83) after VNR were changed only slightly) resulted in the carnitines cell intake suppression to about 2% in average. The imatinib cell intake under the same conditions was suppressed to 84% in average

Conclusions: The OCTN2 specific carnitines intake was significantly reduced in the presence of imatinib, while high doses of carnitines in preincubation did not influence imatinib cell intake capacity. The observed non-equal competition between imatinib and carnitine intake can lead to the carnitine intracellular deficiency manifested by a disruption of skeletal muscle mitochondrial density



and can cause side effects like fatigue, muscle pain or cramp associated with rhabdomyolysis, often seen in CML patients treated with imatinib. The knowledge of mutual transporting interferences between imatinib and naturally essential substrates of cell metabolism represents an important topic to investigate biological background of imatinib therapy side effects.

Supported by GACR18-18407S, MZCR00023736

P15

ATYPICAL DELETIONS OF THE LONG ARM OF CHROMOSOME 5 WITH RETAINED COMMONLY DELETED REGIONS (CDR) IN MDS

Zemanova Z.¹, Brezinova J.², Svobodova K.¹, Lhotska H.¹, Izakova S.¹, Lizcova L.¹, Vidlakova D.¹, Pavlistova L.¹, Hodanova L.¹, Ransdorfova S.¹, Mendlikova I.², Michalova K.¹, Siskova M.³, Neuwirtova R.³, Stopka T.³, Cermak J.², Jonasova A.³

¹⁾ Center of Oncocytogenomics, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital, Prague

²⁾ Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague

³⁾ 1st Medical Department, General University Hospital, Prague

Background: The interstitial deletion of the long arm of chromosome 5 – del(5q) – is a recurrent cytogenetic aberration in bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes (MDS). The extent of the del(5q) varies in individual cases, but chromosome region 5q31 is deleted in most of them. Two different commonly deleted regions (CDRs) have been identified: the proximal 5q31.2 region is associated with a high-risk MDS, and the distal CDR 5q32–5q33 is involved in the pathogenesis of MDS with isolated del(5q). However, rare cases of atypical deletions of 5q that do not include defined CDRs have also been reported.

Aims: The aim of this study was to determine the frequency and clinical significance of atypical deletions of 5q in a large cohort of MDS patients.

Methods: In the 1993–2019 we examined bone marrow cells of 3714 MDS patients by conventional G-banding. Deletions of 5q31 region were confirmed with I-FISH (Abbott, MetaSystems). Extent of del(5q) was analyzed using multicolor banding (mBAND; MetaSystems) and/or array CGH/SNP (CytoChip Focus Hematology, Illumina or SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray, 4x180K, Agilent).

Results: del(5q) was detected in 920/3714 patients (24,8%). Most of them had large deletions spanning whole 5q31 region and both defined CDRs. Atypical deletions with retained CDRs were identified in 9/920 cases (1%; four males, five females; median age, 73 years). The diagnoses, according to the WHO 2016 classification, were as follows: MDS/MPN-U, one patient; MDS-SLD, two patients; MDS-EB-2, one patient; AML-MRC, two patients; and MDS-U, three patients. In five cases del(5q) was a sole abnormality, in four patients it was detected in combination with additional unbalanced chromosomal aberrations. In all cases, deletion was localized proximally to the 5q31 region. The size of the deleted segment ranged from 25.46 to 53.19 Mb (median 38.51 Mb) and the region 5q14.3 – q21.3 (26.79 Mb) was deleted in all nine patients. Many candidate genes, whose haploinsufficiency could lead to malignant transformation, have been identified in this region (for example *CCNH*, *CHD*, *MAN2A1*, *ARRDC3*, *ELL2*, etc.). Of the nine patients, eight died (median OS 12 months) and one patient lives (5 months from diagnosis).

Conclusions: Our results suggest that del(5q) may occur outside the defined CDRs. Although these findings are extremely rare, they show that also genes located outside known CDRs highly probably contribute to the malignant progression of MDS. The identification of these genes will lead to better understanding of the MDS pathogenesis and may contribute to identification of new therapeutic targets.

Supported by RVO-VFN64165, IHBT-00023736, AZV CR 1627790A, GACR 18-01687S.



P16

INDIVIDUAL MOLECULAR RESPONSE EVALUATION ON BOTH DNA AND mRNA BCR-ABL1 LEVEL DIMINISHED DIFFERENCES IN TIME TO MOLECULAR RESPONSE ACHIEVEMENT BETWEEN CML PATIENTS WITH e13a2 vs e14a2 TRANSCRIPT TYPE

Machová Poláková K.¹, Salmon M.², Žižková H.¹, Gottschalk A.³, Motlová E.¹, Jurček T.⁴, Zuna J.⁵, Hovorková L.⁵, Koblihová J.¹, Klamová H.¹, Šťastná Marková M.¹, Srbová D.¹, Benešová A.¹, Polívková V.¹, Žáčková D.⁶, Mayer J.⁶, Roeder I.³, Glauche I.³, Hochhaus A.⁷, White H.², Cross N.²

¹⁾ Ustav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko

²⁾ Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury NHS Foundation Trust, Salisbury, Spojené království

³⁾ Institute for Medical Informatics and Biometry (IMB), Carl Gustav Carus Faculty of Medicine, TU Dresden, Dresden, Germany

⁴⁾ Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Internal Hematology and Oncology Clinic, Faculty Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁵⁾ CLIP, Dept. of Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

⁶⁾ Internal Hematology and Oncology Clinic, Faculty Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Brno, Czech Republic

⁷⁾ Abteilung Hämatologie/Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, University of Jena, Jena

Introduction. Several studies have shown that e14a2 CML patients achieve a major molecular response (MMR) on tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy earlier than e13a2 patients. In contrast, transcript type had no effect on long-term survival. This raises the question whether the observed disparity in molecular responses is driven by biological differences or technical aspects of BCR-ABL1 qPCR. The same primers and probe are standardly used to quantify e13a2 and e14a2, however, the different length of amplicons may impact the PCR efficiency.

Aim. This EUTOS study aimed to investigate differences in molecular response between CML patients with e13a2 and e14a2 based on quantification of BCR-ABL1 at both genomic DNA and mRNA levels.

Methods. The cohort consisted of 67 newly diagnosed CML patients with BCR-ABL1 genomic fusions characterized by NGS. qPCR assays were established to detect patient-specific gBCR-ABL1 (g=genomic) fusion and the quantity in follow up samples was calculated relative to the diagnostic sample (gBCR-ABL1_{RelDg}). For RNA analysis, BCR-ABL1 was expressed on the International Scale (BCR-ABL1^{IS}) using GUSB as a reference gene. A bi-exponential mixed effect model was used to analyse differences in the biphasic decline in BCR-ABL1 levels, which is characterized by an initial steep decline (slope) followed by a second moderate decline (slope). The transcript types (e13a2 vs e14a2) were included as covariates. Wald tests were applied to assess the statistical significance of the fixed-effect group effects. A calibrated dilution series of e13a2 and e14a2 BCR-ABL1 plasmids was prepared for comparative qPCR analysis.

Results. Serial quantitation of BCR-ABL1 mRNA showed that the time to MMR since diagnosis or TKI start was shorter for patients expressing e14a2 compared to e13a2 ($p \leq 0.05$), concordant with published studies. At the DNA level, however, cumulative analysis of the time to a 3-log reduction of gBCR-ABL1_{RelDg} from diagnosis or start of TKI therapy showed no difference between e13a2 vs e14a2. Furthermore, the bi-exponential mixed effect model showed no difference in and slopes of gBCR-ABL1_{RelDg} during TKI therapy between e13a2 (n=27) vs e14a2 (n=40). Further analysis indicated a lower BCR-ABL1^{IS} level at diagnosis in patients with e14a2 (median 33.6%, range 2.9-58.3) compared to e13a2 (median 41.6%, range 17.5-101.5). Finally, the quantity of BCR-ABL1 transcripts was calculated in relation to the corresponding quantity in the diagnostic sample (BCR-ABL1_{RelDg}), i.e. assessment of individual molecular response. Similarly, to that seen for gBCR-ABL1_{RelDg}, no effect of transcript type was found on the bi-phasic decline during TKI therapy and no differences in time to 3 log reduction was seen since diagnosis or TKI



start. Although these differences could be caused by a generally lower level of expression of e14a2, they are also consistent with a lower efficiency of e14a2 amplification. Indeed, using plasmid dilutions, we found that e14a2 amplification is on average 2.8% less efficient than e13a2 amplification ($P=0.0026$; t-test), which is expected to translate approximately to a 2-fold difference in estimated target numbers over 30 cycles of PCR amplification.

Conclusion. The observed differences in time to achieve MMR between e13a2 and e14a2 CML patients may be at least partially explained by differences in efficiency of amplification of the two transcript types by qPCR. A multicentre study is underway to assess how widespread this issue is, and how it may be addressed.

Support EUTOS2018, AZV15-31540A, MZCR 00023736

P17

THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE MONITORING BY WT1 GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD BEFORE AND AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN AML PATIENTS

Válková V., Vydra J., Šťastná Marková M., Vítek A., Cerovská E., Belíčková M., Nováková L., Čemusová B., Koubová M., Cetkovský P.
TJ/JIP, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha 2

Background:

The aim was to confirm our previous experience with prognostic relevance of WT1-MRD status before allo-SCT in AML patients in complete remission. Another aspect was to assess the significance of WT1-MRD monitoring in these patients after allo-SCT.

Methods:

The expression of WT1 gene was measured by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood according to the European Leukemia Net recommendations. Between 2005-2019, we have analyzed 147 consecutive AML pts with high WT1 expression at diagnosis, transplanted in CR1 or CR2. Median age was 46 years (range; 21-66), 76 men, 21 good risk, intermediate risk 91, high risk 35. A total of 116 pts were transplanted in CR1 and 31 pts in CR2. In 128 pts PBPC were used, in 19 pts bone marrow. The donors were identical siblings in 30 pts, 9 haploidentical, matched unrelated donors in 73 pts and mismatched UDs in 35 pts. Conditioning was myeloablative in 117 pts, RIC in 30 pts. At the time of allo-SCT 107 pts were WT1-negative ($WT1 < 50$ copies) and 40 pts were WT1-positive.

Results:

Median follow-up was 21 months. Estimated 5-years OS and EFS was significantly better in WT1 neg cohort (65% and 57% vs 37% and 25% resp, $p=0.0003$ and <0.0001), as well as 5-years RI was significantly lower in WT1 neg group (25% vs 60%, $p<0.0001$). 5-years NRM was not significantly different (24% and 27%). Multivariate analysis revealed WT1-MRD positivity and aGVHD grade 3-4 as significantly negative prognostic factors for OS. Overall 50 pts developed WT1-MRD positivity in post-transplant period, in forty cases the therapeutic intervention was done. Haematological relapse occurred in 42 pts, in all relapsed patients where WT1-MRD was monitored (38 pts) we detected the positivity, in median of 28 days (0-485) before haematological relapse. 3-years OS in pts with molecular relapse only (12 pts) was 56% vs 74% in non-relapsed group ($p=ns$).

Conclusions:

The results of the analysis confirmed our previous experience that WT1 status before allo-SCT is a strong prognostic factor for both OS and relapse risk. Our experience suggests that this marker is also useful for monitoring MRD after allo-SCT. Well-defined clinical studies will be needed to assess the importance of therapeutic intervention based on WT1-MRD positivity.



P18

ANALYSIS OF CMV REACTIVATION RISK AFTER T CELL REPLETE HAPLOIDENTICAL AND MATCHED DONOR ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATIONČemusová B.¹, Vydra J.¹, Hubáček P.², Válková V.¹, Marková Šťastná M.¹, Nováková L.¹, Cetkovský P.¹¹ TJ/JIP, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha 2² FN Motol, Praha 5**Background:**

Cytomegalovirus reactivation is a frequent complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. We analyzed retrospectively the incidence of CMV reactivation after haploidentical donor transplantation using post-transplant high dose cyclophosphamide (ptCy) in comparison with standard matched sibling or unrelated donor transplants.

Methods:

Data on patients who underwent first alloHCT at Institute of Hematology and Blood Transfusion in Prague between 2/2010 and 7/2019 was extracted from our transplant database. CMV was measured in peripheral whole blood by Q-PCR every week in early post-transplant period and later usually less frequently during outpatient controls. Detected CMV quantity was normalized to 10000 human genome equivalents assessed by quantification of albumin gene in the sample. Time to first clinically significant positivity (more than 100 copies of CMV per genomic equivalent) was calculated. Cumulative incidence estimates were calculated using R 3.6. GvHD prophylaxis was CSA+MMF in MSD transplants, CSA+MMF+ATG in MUD transplants and CSA+MMF+ptCy in Haplo transplants.

Results:

434 patients were included in the analysis: Donors were haploidentical (Haplo) in 11,3%, matched sibling (MSD) in 27% or match unrelated (MUD) in 61,8% of patients. Median age was 50/49/53 in Haplo/MSD/

MUD group, respectively. Myeloablative regimen was administrated to 301 patients (70,3%), reduced intensity conditioning to 127 patients (29,7%). Majority of patients received peripheral blood progenitor cell grafts (90,6%), remaining patients received bone marrow. Allogeneic transplantation was performed mainly for acute myeloid leukemia (198 patients, 45,6%), acute lymphoblastic leukemia (62 patients, 14,3%), myeloproliferative diseases (51 patients, 11,8%) and myelodysplastic syndrome (50 patients, 11,5%). Donor-recipient CMV serology status was negative/negative in 12% (16% haplo, 9% MSD, 12,5% MUD), positive/negative in 36% (29,5% haplo, 14% MSD, 46% MUD), negative/positive in 11% (11% haplo, 14% MSD, 9% MUD), positive/positive in 41% (43% haplo, 61% MSD, 33% MUD). Overall survival of the whole cohort was 57% and was not different among the groups. Cumulative incidence of CMV reactivation was 13%, 29% and 31% after MSD, MUD and haploidentical donor transplantation ($p = 0.001$). In a subgroup analysis according to patient/donor CMV serostatus and donor type, the incidence of CMV reactivation did not differ significantly among groups except in patient positive/donor negative subset, where we have observed significantly lower incidence in MSD patients (9%) compared to haplo (42%) and MUD (54%), $p = 0.005$. Low number of patients in most serostatus/donor type groups limits the value of this analysis.

Conclusions: We observed no difference in the incidence of CMV reactivation after allogeneic HCT from haploidentical and matched unrelated donors. Patients who received transplant from matched sibling donors had significantly lower risk of CMV reactivation.



P19

RARE TRANSLOCATIONS IN BONE MARROW CELLS OF PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML)

Ransdorfová Š.¹, Valeriánová M.¹, Onderková M.¹, Mendlíková I.¹, Svobodová K.², Lizcová L.², Izáková S.², Markova J.³, Šálek C.⁴, Martová J.⁴, Zemanová Z.², Březinová J.¹

¹) Cytogenetika, ÚHKT, Praha 2

²) Centrum nádorové cytogenomiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK, Praha 2

³) Laboratoř PCR diagnostiky leukémií, ÚHKT, Praha 2

⁴) Klinické odd., ÚHKT, Praha 2

Background:

Genetic abnormalities, particularly chromosome rearrangements generating gene fusion, are associated with clinical characteristics and prognosis in acute myeloid leukemia (AML). Some of them are recurrent, however, in some cases rare and/or cryptic aberrations are detected. Identification of such rearrangements brings new insights into the disease origin. Aims: To reveal and identify genes and their fusion partners that may be responsible for the pathogenesis and development of AML in rare and cryptic chromosomal aberrations.

Methods:

During the last year we examined bone marrow cells of 62 newly diagnosed AML patients using classical cytogenetic analysis in combination with cytogenomic techniques: FISH (Abbott, MetaSystems), mFISH/mBAND (MetaSystems). We used RT-PCR followed by direct sequencing to detect rare fusion genes. We isolated RNA from mononuclear cells with TRIzol reagent and prepared cDNA using random hexamers and SuperScript II. We processed the PCR product with ExoSAP-IT and directly sequenced it on ABI Prism 310 genetic analyzer using the Big Dye Terminator v. 3.1 kit. Results: In 12/62 patients (19%) we proved recurrent translocations: t(15;17)(q22;q21), t(16;16)(p13;q22) or inv(16)(p13.1q22). In 25 patients (40%) we found other

chromosomal rearrangements and in eight of them we confirmed a complex karyotype. In 3/25 patients we detected cryptic rearrangements (5%; 1M/2F). In the first patient (a 33-year-old female, AML M0) a classical cytogenetic analysis showed a complex karyotype, multicolor FISH (mFISH) confirmed the rare variant translocation t(3;9;21)(q26;p23;q11) with monosomy 7. Multicolor banding technique (mBAND) was used to detect breakpoints on chromosomes 3 and 21. Based on the results of mBAND technique we assumed presence of *MECOM/NRIP1* fusion gene using RT-PCR and direct sequencing confirmed this finding. In the second patient (a 74-year-old male, AML M0) we proved translocation t(5;12)(q31.1;p13) but expected rearrangement of the *PDGFRb* gene was not confirmed. RT-PCR and direct sequencing revealed *ACSL6* gene as a fusion partner of *ETV6* gene. In the third patient (a 81-year-old female, AML M5b) classical cytogenetic analysis and mFISH showed a complex karyotype with translocation t(11;17)(q23;p13) and tetrasomy 8. RT-PCR and direct sequencing proved very rare fusion gene *KMT2A/GAS7*. Specific primers and probe were designed to monitor minimal residual disease during an intensive therapy treatment of patient carrying *MECOM/NRIP1* fusion.

Summary/Conclusion:

Using combination of conventional karyotyping and cytogenomic techniques, we detected three rare translocations in patients with AML. Results of these analyses are important not only for monitoring of the disease but also for determination of the clinical entity and epidemiology of patients with these rare aberrations. Given the rarity of these cases, each new patient with a rare rearrangement adds knowledge of the clinical and biological profile of the disease. The identification of these fusion genes can contribute to a better understanding of the pathogenesis of the disease.

Supported by MH CZ -DRO (IHBT, 00023736), RVO-VFN64165.

Keywords: Acute myeloid leukemia, Adult, Genetic instability



P20

lncRNA PROFILING REVEALS THAT THE DEREGLATION OF H19, WT1-AS, TCL6, AND LEF1-AS1 IS ASSOCIATED WITH HIGHER-RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROME

Dostálová Merkerová M.¹, Szikszai K.¹, Krejčík Z.¹, Kléma J.², Hruštinová A.¹, Kundrát D.¹, Pecherková P.¹, Čermák J.¹, Jonášová A.³, Belíčková M.¹

¹⁾ Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²⁾ České vysoké učení technické, Praha

³⁾ Všeobecná fakultní nemocnice, Praha

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a hematopoietic stem cell disorder with an incompletely known pathogenesis. Long noncoding RNAs (lncRNAs) play multiple roles in hematopoiesis and represent a new class of biomarkers and therapeutic targets, but information on their roles in MDS is limited. Here, we aimed to characterize lncRNAs deregulated in MDS that may function in disease pathogenesis.

We performed microarray expression profiling of lncRNAs and protein-coding genes (PCGs) in the CD34+ bone marrow cells of MDS patients. Expression profiles were analyzed in relation to different aspects of the disease (i.e., diagnosis, disease subtypes, cytogenetic and mutational aberrations, and risk of progression). lncRNA-PCG networks were constructed to link deregulated lncRNAs with regulatory mechanisms associated with MDS. We found several lncRNAs strongly associated with disease pathogenesis (e.g., H19, WT1-AS, TCL6, LEF1-AS1, EPB41L4A-AS1, PVT1, GAS5, and ZFAS1). Of these, downregulation of LEF1-AS1 and TCL6 and upregulation of H19 and WT1-AS were associated with adverse outcomes in MDS patients. Multivariate analysis revealed that the predominant variables predictive of survival are blast count, H19 level, and TP53 mutation. Coexpression network data suggested that prognosis-related lncRNAs are predominantly related to cell adhesion and differentiation processes (H19 and WT1-AS) and mechanisms such as chromatin modification, cytokine response, and cell proliferation and death

(LEF1-AS1 and TCL6). In addition, we observed that transcriptional regulation in the H19/IGF2 region is disrupted in higher-risk MDS, and discordant expression in this locus is associated with worse outcomes.

In conclusion, we identified specific lncRNAs contributing to MDS pathogenesis and proposed cellular processes associated with these transcripts. Of the lncRNAs associated with patient prognosis, the level of H19 transcript might serve as a robust marker comparable to the clinical variables currently used for patient stratification.

Supported by AZV CR (17-31398A), GA CR (20-19162S), and MZ CR (00023736).

P21

LABORATORY DIAGNOSTICS OF 21 UNRELATED FAMILIES FROM CZECH REPUBLIC WITH DYSFIBRINOGENEMIA AND HYPOFIBRINOGENEMIA

Ceznerová E.¹, Štikarová J.¹, Havlíček M.¹, Kaufmanová J.², Suttar J.¹, Kotlín R.¹, Dyr J.E.¹

¹⁾ Biochemie, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha 2

²⁾ Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha 6

Fibrinogen, as a one of the major plasmatic glycoproteins, plays a crucial role in the hemostasis. Structurally, it is a heterodimer composed of the three pairs of polypeptide chains (A, B and γ). Each chain is encoded by a distinct gene (*FGA*, *FGB* and *FGG*). Congenitally abnormal fibrinogen results from a mutation in one of the genes. The disorders caused by this abnormality are diverse and can be classified into quantitative (afibrinogenemia and hypofibrinogenemia) and qualitative (dysfibrinogenemia) groups. Here, we evaluated 36 patients, belonging to 21 unrelated families, with heterozygous missense fibrinogen mutations. We investigated these mutations by a set of biochemical methods, including fibrin polymerization, fibrinolysis, kinetics



of fibrinopeptides release, tandem mass spectrometry, and electron and confocal microscopy. In some cases, the viscoelastic properties of fibrin clots were measured. Dysfibrinogenemia was diagnosed in 27 cases, mostly in exon 2 of *FGA* gene, around thrombin cleavage site in N-termini of A chain. Hypofibrinogenemia was found in 9 remaining cases, associated with 3 novel mutations (Trp3Stop, Thr34Ala and B Tyr416Stop). Clinical features of patients manifested asymptotically in 24 cases, 9 cases were associated with bleeding and 3 cases with thrombosis. Our observations support the variability of clinical phenotypes caused by wide spectrum of mutations and provide a better understanding of the behavior and role of inherited abnormal fibrinogen in blood coagulation.

This work was supported by the project of the Ministry of Health, Czech Republic, for conceptual development of research organization 00023736, by Grant from the Academy of Sciences, Czech Republic nr. P205/12/G118 and 19-02739S, and by ERDF OPK CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007428.

P22

KINETICS OF BONE MARROW BLASTS AND USEFULNESS OF DAY 14 AND DAY 21 ASSESSMENT DURING INDUCTION OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Ráčil Z., Šálek C., Mikulenková D., Hanáková M., Marinov I., Cetkovský P.
Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Background: Assessment of early response to induction therapy in acute myeloid leukemia (AML) is typically performed on day 14 after the start of treatment. While the decision to wait until bone marrow (BM) recovery (in the absence of residual disease, usually defined as < 5% of blasts in BM aspiration) or to start the re-treatment (in presence of significant residual disease, usually defined as $\geq 20\%$ blasts) is generally accepted, most of the dilemma occurs in patients with low residual blast count (5 - 20% blast on day 14). BM re-analysis at day 21 is recommended in this subgroup to make the decision to begin a second induction.

Aims: We aimed to analyse whether: 1. BM assessment on day 21 can modulate day 14 findings in the group of patients with < 5% of blasts, 2. BM analysis on day 21 in patients with 5-20% of blasts on day 14 could identify the subgroup with high probability to achieve complete remission (CR) without second induction, 3. BM minimal residual disease (MRD) assessed by flowcytometry on day 14 can already identify this subgroup.

Methods: Early response assessment (BM cytology, BM MRD – LAIP/ DfN) in patients with AML treated with 3+7 induction was performed on day 14. In the group of patients with < 5% of blasts, as well as in patients with 5-20% of residual blast BM re-analysis was performed on day 21. Majority of patients with $\geq 20\%$ blasts on day 14 routinely received second induction, already based on this first BM assessment.

Results: 281 patients treated between 2011-2019 were available for this retrospective study. BM analysis on day 14 identified 58 (20,6%) of patients with $\geq 20\%$ blasts and only 3,5% did not received the second induction and achieved complete remission (CR). 152 (54,1%) patients had < 5% of blasts on day 14 BM assessment and 87,5% of them achieved CR without second induction. BM re-analysis in this favourable subgroup on day 21 identify “paradoxical” increase of blast percentage to $\geq 5\%$ in 63,3% of patients. However, while reflecting BM recovery, this finding did not influence the CR rate (91,5% of these patients achieved CR without re-treatment). In the group of 71 (25,2%) patients with 5 - < 20% blasts on day fourteen, 47,8% did not require re-treatment and achieved CR. During recommended re-assessment on day 21 majority (63,4%) of patients from this subgroup had again inconclusive BM blast percentage (5 - < 20%) with 51,1% chance to achieve CR without re-treatment. However, when (based on data from favourable group) cut-off of blast percentage at day 21 was increased to 10%, two subgroups with significantly different chance to achieve CR without the second induction could be identified (BM blasts on day 21 < 10% - n = 32, CR rate 65,6% vs. > 10% - n = 39, CR rate 33,3%; p = 0,009). Moreover, day 14 BM MRD assessment in this group of 71 patients with 5 - < 20% blasts on day



14 using LAIP/DfN cut-off 2% (identified by ROC analysis) found already on day 14 two separate groups – patients with BM MRD on day 14 < 2% - n = 36, CR rate 69,4% vs. ≥ 2% - n = 35, CR rate 25,7%; p = 0,003).

Summary/Conclusion: Finding of < 5% during early BM assessment in AML patients treated with 3+7 is highly predictive for achieving CR without second induction. BM re-assessment on day 21 identifies “paradoxical” increase of BM blasts in majority of these patients, which is not associated with the lack of treatment response. In most questionable group of patients with 5 - < 20% blasts on day 14, BM MRD with LAIP/DfN < 2% on day 14 or BM blast percentage < 10% during re-assessment on day 21 is significantly predictive for achievement of CR without second induction.

P23

REZISTENCE NA IMATINIB U CML LINIE K562: EXOSOMY Z REZISTENTNÍCH BUNĚK NESOU SPECIFICKÉ MEMBRÁNOVÉ MARKERY A POMÁHAJÍ PŘEŽÍT SENZITIVNÍM BUŇKÁM

Toman O.¹, Hrdinová T.¹, Dresler J.², Klimentová J.³, Petrák J.⁴, Vyoral D.¹, Krijt M.¹, Živný J.⁵, Šalovská B.⁶

¹⁾ Proteomiky, ÚHKT, Praha 2

²⁾ Vojenský zdravotní ústav, Praha 6

³⁾ Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Brno

⁴⁾ BIOCEV, Vestec

⁵⁾ Ústav patologické fyziologie 1. If, Praha 2

⁶⁾ Ústav molekulární genetiky, Praha 4

Chronická myeloidní leukémie (CML) je maligní porucha krvetvorby, která se vyznačuje přítomností fúzního onkogenu BCR-ABL1 s konstitutivní tyrosin-kinázovou aktivitou. Cílená terapie CML specifickými inhibitory tyrosinkináz (TKI) vede k výraznému zlepšení přežívání pacientů a kvality jejich života. U podskupiny pacientů však zůstává kritickým problémem léčby

vznik rezistence na TKI. Nejběžnější příčinou jsou četné bodové mutace v genu BCR-ABL1, po nichž následují méně časté a na mutacích nezávislé mechanismy. Nedávno bylo prokázáno, že exosomy, což jsou extracelulární váčky produkované normálními i nádorovými buňkami, sehrávají roli mimo jiné i v progresi rakoviny a rezistenci na léky. Cílem této studie bylo charakterizovat exosomy produkované CML buňkami K562 (K562IR) rezistentními na imatinib. Exosomy odvozené od K562IR byly internalizovány buňkami K562 senzitivními na imatinib, což zvýšilo jejich přežití v přítomnosti 2 μM imatinibu. Exosomální proteiny byly následně analyzovány pomocí „label free“ proteomické analýzy za účelem identifikace markerů asociovaných s rezistencí. Bylo identifikováno > 3 000 exosomálních proteinů, z nichž 35 bylo diferenciálně exprimováno. Přítomnost celkem 3 membránových proteinů IFITM3, CD146 a CD36 byla výrazně posílena v exosomech pocházejících z buněk K562IR. Zvýšená exprese těchto proteinů byla ověřena v exosomech K562IR a také v buňkách K562IR. Pomocí průtokové cytometrie byl na buňkách K562 demonstrován potenciál CD146 jako markeru buněčného povrchu spojeného s rezistencí na imatinib. Tyto výsledky naznačují, že exosomy a jejich příslušné povrchové proteiny mohou být potenciálními diagnostickými markery rezistence na TKI v terapii CML.



P24

NELFINAVIR INHIBITS THE TCF11/Nrf1-MEDIATED PROTEASOME RECOVERY PATHWAY IN MULTIPLE MYELOMAFassmannová D.^{1,2,3}, Sedlák F.^{1,3,2,4}, Sedláček J.^{1,3}, Špička I.^{2,4}, Grantz Šašková K.^{1,3}¹IOCB AS CR, Prague²First Faculty of Medicine, Charles University, Prague³Department of Genetics and Microbiology, Charles University, Prague⁴1st Department Medicine - Department of Hematology, Charles University, Prague

Proteasome inhibitors are the backbone of multiple myeloma therapy. However, disease progression or early relapse occur due to development of resistance to the therapy. One important cause of resistance to proteasome inhibition is the so-called bounce-back response, a recovery pathway driven by the TCF11/Nrf1 transcription factor, which activates proteasome gene re-synthesis upon impairment of the proteasome function. Thus, inhibiting this recovery pathway potentiates the cytotoxic effect of proteasome inhibitors and could benefit treatment outcomes. DDI2 protease, the 3D structure of which resembles the HIV protease, serves as the key player in TCF11/Nrf1 activation. Previous work found that some HIV protease inhibitors block DDI2 in cell-based experiments. Nelfinavir, an oral anti-HIV drug, inhibits the proteasome and/or pAKT pathway and has shown promise for treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. Here, we describe how nelfinavir inhibits the TCF11/Nrf1-driven recovery pathway by a dual mode of action. Nelfinavir decreases the total protein level of TCF11/Nrf1 and inhibits TCF11/Nrf1 proteolytic processing, likely by interfering with the DDI2 protease, and therefore reduces the TCF11/Nrf1 protein level in the nucleus. We propose an overall mechanism that explains nelfinavir's effectiveness in the treatment of multiple myeloma.

P25

CAPTURE-BASED NGS PANEL FOR DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN AND T-CELL RECEPTOR GENE REARRANGEMENTS IN DNA SAMPLES FROM PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIAJelínková H.¹, Navrkalová V.^{1,2}, Plevová K.^{1,2}, Porc J.², Hynšt J.², Pál K.^{2,3}, Reigl T.², Darzentas N.^{2,3}, Doubek M.^{1,2}, Ženatová M.¹, Marečková A.¹, Pospíšilová Š.^{1,2}¹Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno, Brno, Česko²CEITEC, Brno, Česko³Department of Internal Medicine II - Hematology, Oncology, University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Německo

Monitoring of minimal residual disease (MRD) is a strong prognostic factor of clinical outcome in ALL patients [1]. There are several different techniques available for MRD detection [2]. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with patient-specific primers represents a method well standardized by EuroMRD Working Group, which is still widely used despite great advances in next-generation sequencing [3]. Acquiring of individual immunoglobulin (IG)/T-cell receptor (TR) junctional region sequences for primer design using traditional Sanger sequencing is often difficult due to the presence of polyclonal background and due to the necessity of multiplex PCR usage for IG/TR gene amplification.

Our aim was to assess applicability of our recently established versatile NGS panel for characterization of clonal IG/TR rearrangements in ALL samples.

Our capture-based NGS panel integrates analysis of various molecular markers including gene mutations, chromosomal aberrations and antigen receptor rearrangements. Regarding IG/TR, it targets all functional genes including rarely analyzed IGL and TRA loci (Tab.1). We tested 8 bone marrow samples from adult ALL patients including 7 samples with 77-98% leukemic blasts collected at diagnosis and one sample containing 9% blasts from relapse. We compared IG/TR clonotypes detected by our approach with the ones obtained using two other NGS techniques, a two-step IG/TR NGS assay developed by



EuroClonality-NGS Working Group [4] and a one-step LymphoTrack® NGS assay (Invivoscribe). Both techniques are amplicon-based and the libraries were sequenced on MiSeq® (Illumina). Our capture NGS libraries were prepared using SureSelect XT HS kit (Agilent) and sequenced on NextSeq (Illumina). ARRest/Interrogate pipeline was employed for EuroClonality and capture NGS sequencing data analysis, whereas the data from LymphoTrack® NGS were analyzed with software provided by the manufacturer (Tab.2). We used 5% cut-off to score a rearrangement clonal.

Our capture NGS panel identified 44/49 (90%) clonal rearrangements detected with at least one of the three methods used (Tab. 3). Five missed clonotypes were scattered across different targets and different samples. On the other hand, we identified 12 (24%) additional clonal rearrangements that were not found with the other methods. Eight of these unique clonotypes were from IGL and TRA loci that are not included in either EuroClonality or LymphoTrack® NGS assays (Tab. 3). Two others were incomplete IGH-DJ rearrangements that were targeted but undetected with EuroClonality NGS. One clonotype was detected in TRB locus which is not fully covered with amplicon-base approaches. The remaining clonotype in TRG locus was missed with EuroClonality NGS but was not tested with LymphoTrack® NGS assays. In comparison to our panel, EuroClonality and LymphoTrack® NGS reached similar detection rate identifying 35/41 (85%) and 19/21 (90%) clonotypes. Overall, there was a good congruence among the detected clonotypes using either of the methods.

We showed that the clonality can be easily detected in ALL patients using our recently implemented capture-based NGS panel. The panel efficiently target all IG/TR loci including IGL and TRA that are rarely examined with amplicon-based NGS approaches and hence, it extends the choice of markers available for MRD detection. Moreover, a possibility of comprehensive analysis of diverse molecular markers makes from our NGS panel a very convenient tool for an integrated analysis of ALL samples for both research and clinical purposes within a single simultaneous workflow.

EUROPEAN
HEMATOLOGY
ASSOCIATIONCAPTURE-BASED NGS PANEL FOR DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN AND T-CELL
RECEPTOR GENE REARRANGEMENTS IN DNA SAMPLES FROM PATIENTS WITH
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIAJ. JELÍNKOVÁ¹, V. NAVRKALOVÁ¹, K. PLEVDVÁ¹, J. PORC¹, J. HYNŠT¹, K. PÁČ¹, T. REICL¹, N. DARTENTAS¹, M. DOUBEK¹, M. ŽENATOVÁ², A. MARČKOVÁ³ and S. POSPIŠILOVÁ¹
¹ Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Czech Republic; ² Central European Institute of Technology, Masaryk University Brno, Czech Republic; ³ Department of Internal Medicine II – Hematology, Oncology, University Medical Center Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

INTRODUCTION

Monitoring of minimal residual disease (MRD) is a strong prognostic factor of clinical outcome in ALL patients [1]. There are several different techniques available for MRD detection [2]. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with patient-specific primers represents a method well standardized by EuroMRD Working Group, which is still widely used despite great advances in next-generation sequencing [3]. Acquiring of individual immunoglobulin (IG)/T-cell receptor (TR) junctional region sequences for primer design using traditional Sanger sequencing is often difficult due to the presence of polyclonal background and due to the necessity of multiple PCR usage for IG/TR gene amplification.

OBJECTIVE

Our aim was to assess applicability of our recently established versatile NGS panel for characterization of clonal IG/TR rearrangements in ALL samples.

METHODS

Our capture-based NGS panel integrates analysis of various molecular markers including gene mutations, chromosomal aberrations and antigen receptor rearrangements. Regarding IG/TR, it targets all functional genes including rarely analyzed IGL and TRA loci (Tab.1). We tested 8 bone marrow samples from adult ALL patients including 7 samples with 77-98% leukemic blasts collected at diagnosis and one sample containing 9% blasts from relapse. We compared IG/TR clonotypes detected by our approach with the ones obtained using two other NGS techniques, a two-step IG/TR NGS assay developed by EuroClonality NGS Working Group [4] and a one-stop LymphoTrack[®] NGS assay (Invivoscribe). Both techniques are amplicon-based and the libraries were sequenced on MiSeq[®] (Illumina). Our capture NGS libraries were prepared using SureSelect[®] XT HS kit (Agilent) and sequenced on NextSeq[®] (Illumina). ARREST/Interrogate pipeline was employed for EuroClonality and capture NGS sequencing data analysis, whereas the data from LymphoTrack[®] NGS were analyzed with software provided by the manufacturer (Tab.2). We used 5% cut-off to score a rearrangement clonal.

Target loci	Location	No. of V gene	No. of J gene	No. of Constant regions	Resolution	Tab. 1
IGH	14q32.33	41	23	6	9	IG/TR loci targeted with our capture-based NGS panel
IGK	2p11.2	38	-	5	1	
IGL	22q11.2	33	-	5	4	
TRA	14q11.2	45	-	50	1	
TRB	7q34	48	1	13	2	
TRG	7p14	6	-	5	2	
TRD	14q11.2	3	3	4	1	

RESULTS

Our capture NGS panel identified 44/49 (90%) clonal rearrangements detected with at least one of the three methods used (Tab.3). Five missed clonotypes were scattered across different targets and different samples. On the other hand, we identified 12 (24%) additional clonal rearrangements that were not found with the other methods. Eight of these unique clonotypes were from IGL and TRA loci that are not included in either EuroClonality or LymphoTrack[®] NGS assays (Tab. 3), two others were incomplete IGH-DJ rearrangements that were targeted but undetected with EuroClonality NGS. One clonotype was detected in TRB locus which is not fully covered with amplicon-based approaches. The remaining clonotype in TRG locus was missed with EuroClonality NGS but was not tested with LymphoTrack[®] NGS assays. In comparison to our panel, EuroClonality and LymphoTrack[®] NGS reached similar detection rate identifying 35/41 (85%) and 19/21 (90%) clonotypes. Overall, there was a good congruence among the detected clonotypes using either of the methods.



Tab. 2
Capture-based NGS detection of clonal IGHV2-26J6 rearrangement in an ALL patient using ARREST/Interrogate pipeline.

Target loci	No. of detected clonotypes (at least one method)	Capture-based NGS panel	EuroClonality NGS	LymphoTrack NGS (Invivoscribe)
IGH-VDJ	5	0	0	0
IGH-DJ	3	0	2	NA
IGK	6	1	1	1
IGL	3	0	NA	NA
TRA	5	0	NA	NA
TRB	7	1	1	1
TRD	9	2	0	NA
TRG	11	1	2	0
Total	49	5 (10%)	6 (12%)	2 (10%)

Tab. 3
Numbers of detected and missed clonotypes across different targets using three NGS methods. Not all targets could be tested with all the methods (NA).

CONCLUSIONS

We showed that the clonality can be easily detected in ALL patients using our recently implemented capture-based NGS panel. The panel efficiently target all IG/TR loci including IGL and TRA that are rarely examined with amplicon-based NGS approaches and hence, it extends the choice of markers available for MRD detection. Moreover, a possibility of comprehensive analysis of diverse molecular markers makes from our NGS panel a very convenient tool for an integrated analysis of ALL samples for both research and clinical purposes within a single simultaneous workflow.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funded by AZV NV19-03-00091, TACR TH01000013 and TJ02000133, MEYS-CZ MUNI/A/1395/2019, MZ-CR RVO 65269705.

REFERENCES

- Briggemann M et al. Acute lymphoblastic leukaemia: monitoring minimal residual disease by a multiplexed pipeline. *Nature Reviews* 2017; 19:1-17-57.
- Daghighi S et al. Next-Generation Sequencing for Minimal Residual Disease Detection in B-Cell Lymphoid Malignancies. *J Clin Med* 2020; 9:2001-2010.
- van der Velden WJM et al. Analysis of minimal residual disease by specific gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007; 21:1091-102.
- Schijven B et al. Next-generation sequencing of immunoglobulin gene rearrangements for clonality assessment: a technical evaluation by EuroClonality NGS. *Leukemia* 2017; 31:2027-2035.

CONTACT INFORMATION

Jelinkova Jiana & Trnava Z
Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Czech Republic



P26

FUNCTIONAL ANALYSIS OF NEW VARIANT GP1BA GENE IN INHERITED MACROTROMBOCYTOPENIASkalníková M.^{1,2}, Staňo Kozubík K.¹, Vrzalová Z.^{1,2}, Réblová K.^{1,2},
Trizuljak J.^{1,2}, Štika J.¹, Radová L.¹, Pospíšilová Š.^{1,2}, Doubek M.^{1,2}¹⁾ Medical genomics, Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno²⁾ Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno

Inherited thrombocytopenias (IT) are a heterogeneous group of familial haematopoietic disorders (FHD). It is important to reveal the molecular basis of IT because mutation in proper genes increases the malignant disease onset for their carriers. The determination of a correct diagnosis is essential for specialized care, therapy, and risk assessment for the offspring of affected IT patients.

Using high-throughput genomic technologies of massive parallel sequencing (MPS), many variants in genes responsible for the IT phenotype have been identified. If a novel variant with uncertain significance (VUS) is detected, functional testing is necessary to determine its phenotypic effect. The interpretation of rare genetic VUSs, which are often characterized as unique and family-specific, is very important in human molecular genetics.

The aim of our study is to investigate germline gene variants leading to the development of IT by modern genomic methods (whole exome sequencing, *in silico* prediction). It is of significant importance to determine the impact of VUSs on a patient's phenotype.

We recently identified the novel VUS in *GP1BA* gene in a family with an inherited autosomal dominant (AD) macrothrombocytopenia, a monoallelic Bernard Soulier Syndrome (BSS). The structural effect of sequence variant of the *GP1BA* gene (c.98G>A, p.C33Y) was analysed using *in silico* prediction to be possibly damaging at the protein level. Using proteomic assays, we verified the known and novel interacting partners of wild-type and mutant variants of the GP1BA protein expressed in the mammalian cell line. Using

differential expression analysis (RNA seq) combined with flow cytometry and electron microscopy, we have verified the causality of the *GP1BA* variant on cell phenotype. Our results show that the variant in *GP1BA* gene does not endanger its carrier with life-threatening bleeding and higher risk of malignant disease onset.

We believe that the novel identification of VUSs of genes could introduce more appropriate care and treatment of IT patients and predict complications associated with germline IT variants (e.g. malignancies). The variant may be novel, specific for the family, thus of uncertain pathogenic and clinical significance. In these cases, functional studies aimed at determining the effect of variants on protein function are useful in the diagnostic process. However, it is a very complex analysis that is not easy to put into routine practice.



P27

HBV AND HCV EPIDEMIOLOGY AMONG NEWLY DIAGNOSED NHL PATIENTS IN REAL WORLD ANALYSIS (NIHIL)

Dlouhá L.¹, Janíková A.², Belada D.³, Móciková H.⁴, Procházka V.⁵,
Đuraš J.⁶, Kopečková K.⁷, Pirnos J.⁸, Benešová K.¹, Šálková J.¹,
Sýkorová A.³, Vodička P.¹, Blahovcová P.⁹, Urbánek P.¹⁰, Trněný M.¹

¹) I. interní klinika - hematologie, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česko

²) Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity, Brno, Česko

³) IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy, Hradec Králové, Česko

⁴) Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česko

⁵) Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

⁶) Klinika hematoonkologie, Fakultní nemocnice Ostrava a Lékařská fakulta Ostravské univerzity, Ostrava, Česko

⁷) Onkologická klinika, Fakultní nemocnice v Motole a 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česko

⁸) Onkologické oddělení, Nemocnice České Budějovice, Praha, Česko

⁹) I. Interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Datacentrum Kooperativní lymfomové skupiny, Praha, Česko

¹⁰) Interní klinika, Ústřední vojenská nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česko

Background: The risk of reactivation of hepatitis B after treatment by rituximab in patients with lymphoma as well as the fact that hepatitis C is one of the etiology factors in patients with lymphoma is well known. The prevalence of positive anti-HCV antibodies (anti-HCV+) in the Czech Republic was determined as 0.2% in 2001 and 1.67% in 2015. The prevalence of HBsAg positivity (HBsAg+) was 0.56% in the Czech population in 2001, the prevalence of HBsAg+ according to another study in 2013 was only 0.06%.

Aims: The aim of our study was to determine an existence of a relationship between hepatitis B, hepatitis C and lymphomas.

Methods: The patient's population consisted of 9448 patients with newly diagnosed lymphoma from NiHiL project (NCT03199066) between years 2010-2018. The diagnosis was based on the WHO classification of 2008. In these years, HBsAg was examined in 76.9% to 92.7% and anti-HCV antibodies in 70.4% to 90.3% of the diagnosed patients, with an ascending trend of examined patients in the last years. The patient sample corresponds to 7923 (84%) patients tested for HBsAg and for anti-HCV antibodies to 7422 (78%) patients in total.

Results: There were 54 patients HBsAg+ (0.7%) and 7869 patients HBsAg negative (HBsAg-) in the cohort of 7923 patients (median age 65 years, 51.1% males, diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) 40.0%, follicular lymphoma (FL) 19.6%, mantle cell lymphoma (MCL) 8.8%, marginal zone lymphoma (MZL) 9.6%). There were 53 patients anti-HCV+ (0.7%) and 7369 patients anti-HCV negative (anti-HCV-) in the cohort of 7422 patients (median age 65 years, 51.1% males, DLBCL 39.9%, FL 20.1%, MCL 9.0%, MZL 9.3%). In the cohort of patients with newly diagnosed DLBCL there were 0.7% HBsAg+ and 1.0% anti-HCV+. In the group of patients with newly diagnosed FL, there were 0.7% HBsAg+ and 0.4% anti-HCV+. In the group of patients with newly diagnosed MCL there were 0.1% HBsAg+ and 0.9% anti-HCV+. In the group of patients with newly diagnosed MZL there were 0.9% HBsAg+ and 0.8% anti-HCV+.

There were significant differences observed among the clinical characteristics of patients HBsAg- and HBsAg+ in patients with DLBCL in median age ($P < 0.0004$, 66 years and 57 years, respectively) and in an enlargement of the spleen ($P < 0.0001$, 16.3% and 54.6%, respectively). Among clinical characteristics of patients anti-HCV- and anti-HCV+ there were significant differences in patients with DLBCL in an enlargement of the spleen ($P < 0.004$, 16.5% and 37%, respectively), in patients with FL in median age ($P < 0.046$, 62 years and 51 years, respectively) and in patients with MZL in sex ($P < 0.01$, 57%



female and 100% female, respectively). There were no significant differences in the OS (overall survival) or the PFS (progression free survival) in patients with newly diagnosed DLBCL, FL, MCL, MZL anti-HCV- or anti-HCV+, nor in patients HBsAg- or HBsAg+.

Summary/Conclusion: There were no significant differences found in the OS or the PFS in patients with major subtypes of lymphoma anti-HCV- vs. anti-HCV+, nor HBsAg- vs. HBsAg+ patients.

P28

SOMATIC MUTATIONS IN HLA-loci IN PATIENTS WITH MYELOID LEUKEMIA

Půbalová Š., Neupauerová J., Vraná M., Nazarova S., Šálek C.
ÚHKT, Praha

Introduction:

In the HLA department of Institute of hematology and blood transfusion in Prague we deal with HLA typing of hematological patients and their related/unrelated donors. The best donor compatibility is important for successful hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

Materials and methods:

Using NGS (Omixon, Hungary), we investigated more than 3000 patients and their HSC donors. For confirmation of the new allele second high resolution HLA typing was performed.

Results:

From our recent studies (2017 - 2020), in our cohort of patients, 23 new alleles were detected. Two of them were a somatic mutation in patients suffering from acute myeloid leukemia (AML); one was in the HLA-B and the other in the HLA-C locus. In both cases, the somatic mutation represents a single nucleotide polymorphism.

Conclusion:

Our findings are in agreement with the known genome instability in AML. In the HLA region, somatic mutations are not so common, however, they should be given more attention since they can affect disease progression and may impact also on HSCT. Our future studies will focus on the precise identification of the new alleles and their characterization in HLA typing.

Supported by the Ministry of Health, Czech Republic-conceptual development of research organization (CZ00023736, ÚHKT).

P29

SÉROVÉ HLADINY VYBRANÝCH CYTOKINŮ U AKUTNÍ LYMFBLASTICKÉ LEUKEMIE DOSPĚLÝCH A JEJICH SOUVISLOST S PROGNOSTICKÝMI FAKTORY A PŘEŽITÍM

Horáček J.M.¹, Kupsa T.¹, Vaněk J.¹, Jebavý L.¹, Žák P.²

¹ Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové

² IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a LF UK Hradec Králové, Hradec Králové

Cíle:

Vyhodnocení sérových hladin vybraných cytokinů u akutní B-lymfoblastické leukemie (B-ALL) při diagnóze a v kompletní remisi (CR), a jejich souvislost s prognostickými faktory, přežitím bez relapsu (RFS) a celkovým přežitím (OS).

Metody:

Do této studie bylo zařazeno 42 pacientů s nově diagnostikovanou B-ALL (medián věku 49, rozmezí 19–75 let; 28 mužů; 19 BCR/ABL pozitivních). Byla použita Cytokine IV Array (Randox) obsahující následující analyty: solubilní receptor α pro IL-2 (sIL-2R α), solubilní receptor pro IL-6 (sIL-6R), solubilní receptor pro TNF- α typu I a II (sTNFR-1, sTNFR-2) a matrix metaloproteináza 9 (MMP-9). Všechny analyty byly měřeny při diagnóze a v CR pomocí biočipového



technologie na analyzátoru Evidence Investigator. Byly hodnoceny korelace mezi cytokiny, uznávanými prognostickými faktory, RFS a OS. Hodnoty pravděpodobnosti (p) < 0,05 po korekci na vícenásobné testování byly považovány za statisticky významné.

Výsledky:

Při diagnóze B-ALL byly ve srovnání s CR zjištěny významně vyšší hladiny sIL-2R α , sIL-6R, sTNFR-1, sTNFR-2 a nižší hladiny MMP-9 (p < 0,001 ve všech případech). V CR sIL-2R α koreloval se sIL-6R, sTNFR-1, TNFR-2 (p < 0,001) a sIL-6R koreloval se sTNFR-2 (p < 0,001). BCR/ABL pozitivní pacienti měli při diagnóze vyšší hladiny sIL-2R α (r = 0,484; p = 0,014). V naší kohortě bylo CR po 1 cyklu indukční terapie dosaženo u 88 % pacientů, 1-letý RFS byl 74 % a 1-letý OS 86 %. Sérové hladiny hodnocených cytokinů nebyly spjaté s dosažením CR po 1 cyklu indukční terapie, RFS nebo OS.

Závěr:

Sérové hladiny všech hodnocených cytokinů jsou významně alterované u nově diagnostikované B-ALL, což odráží aktivitu onemocnění. Byla zjištěna statisticky významná korelace mezi BCR/ABL pozitivitou a hladinami sIL-2R α při diagnóze. Zatím jsme nenalezli významné korelace s odpovědí na indukční terapii, RFS nebo OS. Budou potřebné další studie s větší paletou cytokinů a delším sledováním.

Podpora: DZRO 1011 (FVZ UO), MZ ČR-RVO (FNHK, 00179906)

P30**SEARCHING FOR OTHER TOPICS OF QUALIFICATION PLANS IN THE TRANSPLANT PROGRAM CLINICAL PART - THE ONE CENTER EXPERIENCE**

Dobrovolná M.¹, Vydra J.²

¹ Úsek pro akreditace a kvalitu, ÚHKT, Praha, Česko

² TJ/JIHeP Klinický úsek, ÚHKT, Praha, Česko

Background: As initial accredited centre (JACIE v.6.01) we reviewed all procedures and processes to implement the requirements of the JACIE v7 Standards.

Compliance with C.4.13 and D.4.13 directly followed the already established system of defined requirements for critical manufacturers, vendors, equipment, supplies, reagents, facilities and services and performed validations.

The requirements of the new text of B.4.13 were a challenge to consider whether other areas are also suitable for the qualification plans formulation, not just for the marrow collection and processing or for the clinical procedure's technical aspects only. After all, the qualification plan in the broader sense is the answer to the question „What must be done to ...?“

Methods: The process diagram of the clinical part of the institutional Transplant Program was analysed and a number of topics suitable for the formulation of qualification plans were found.

Outcomes: In clinical care we defined the possibilities of qualification plans, e.g. for HSCT indication of patients, for choice of the best available donor, for the new treatment procedure implementation or for removal and disposal of the cryopreserved cell therapy product.

The new treatment procedure qualification plan for CAR-T therapy was defined. The plan consist of the type of treatment (approved/experimental), availability of external information sources, cooperation of other facilities, treatment indication, patient information, informed consents, patient specific risks and complications management, technical support, personal education



training and competency, requirements of cell collection, products processing and storage, transport, application workflow, related records and data management, safety aspects and quality management.

Further to the issued recommendations of the Czech Hematology Society, we proceeded to establish criteria for long-term storage of cryopreserved cell therapy, which we have not yet clearly defined.

We used the Qualification Plan Points to create a specific checklist forms that allow us to clearly identify compliance with the Qualification Plan in practice and detect possible deviations.

Discussion: So far, we have used this approach to introduce a new immunotherapeutic procedure (CAR-T19) and optimize related procedures and documentation (SOP structure and content).

We also defined institutional policy for cryopreserved cell therapy products long term storage.

Specific checklists are routinely used for all related bone marrow donations realized in cooperation with external facilities.

Similarly, we verify the continuity and accuracy of recipient and donor medical documentation and stored electronic data.

We want to use this approach wherever we work on new topics or where the evaluation of established quality management shows us that there is higher probability of deviations or potential risks. However, this is always based on the conditions, established procedures and control mechanisms specific to the center.

Conclusion: Formulation of qualification plans for other areas, not required by JACIE standards only, according to the centre's experience, enables better preparation of new processes and procedures, more effective internal control activities and better long-term adherence to daily practice with defined procedures.

P31

IMPACT OF FIBRINOGEN POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS ON ITS STRUCTURE AND FUNCTION

Sovová Ž.¹, Štikarová J.¹, Sutttnar J.¹, Kaufmanová J.², Májek P.¹, Šácha P.³, Loužil J.⁴, Maly M.⁵, Kučerka O.⁵, Dyr J.E.¹

¹ Oddělení biochemie, Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha 2

² Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 6

³ Proteázy lidských patogenů, Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Praha

⁴ Centrum trombózy a hemostázy, Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha 2

⁵ Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 1. LF UK a ÚVN, Ústřední vojenská nemocnice Praha, Praha 6

Background: Post-translational modifications (PTMs) may result into alternations of protein functional and binding sites and secondary structure by changing charge and/or structure of their amino acid side-chains. PTMs of fibrinogen are associated with thrombosis, vascular diseases and other (pato) physiological stages.

Aims: Molecular dynamic simulations are used to describe an impact of selected fibrinogen PTMs detected either *in vivo* or *in vitro* on atomistic level.

Methods: Fibrinogen was *in vitro* modified by malondialdehyde, sodium hypochlorite or 3- morpholinosydnonimine. Fibrinogen from patients samples was purified from citrated plasma by precipitation with a 25% saturated ammonium sulfate. Samples were analyzed with an LC-MS/MS.

Molecular dynamics simulations of fibrinogen were performed in Gromacs software with Gromos 54a7 force field. PTMs were introduced into the truncated crystal structures 3GHG and 2A45 by Vienna-PTM 2.0 server.

Results: Different PTMs have various effect of fibrinogen behavior. Citrullination of gR375 (Figure 1) results into release of calcium cation that is necessary for proper fibrin polymerization and into disturbances of a-hole fold.



PTMs in the coiled-coil region may destabilize α -helices, have no effect or reconstruct helix from unstructured part of the g chain. Disturbances of α -helices are located at least 10 amino acids apart from the PTM. There seems to be some regions, like bY172 – bS174, that are more prone to unfolding than the others.

Conclusions: PTMs may or may not influence structure and function of fibrinogen in dependence on their nature and position. Their influence on fibrin clot properties ranges from negligible to severe.

P32

SÉROVÉ HLADINY VYBRANÝCH CYTOKINŮ A SOLUBILNÍCH ADHEZNÍCH MOLEKUL U NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÉ AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE: SOLUBILNÍ RECEPTOR PRO INTERLEUKIN-2 JE PREDIKTOREM CELKOVÉHO PŘEŽITÍ

Kupsa T.¹, Horáček J.M.¹, Vaněk J.¹, Jebavý L.¹, Žák P.²

¹⁾ Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové

²⁾ IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a LF UK Hradec Králové, Hradec Králové

Cíl:

Posoudit využití cytokinů a adhezních molekul jako prognostických markerů u akutní myeloidní leukemie (AML).

Metodika:

Byl studován soubor 80 pacientů s nově zjištěnou AML. Medián věku byl 58,5 let. Nemocných starších 65 let bylo 20. Všichni byli léčeni indukční chemoterapií „3+7“. Alogenní transplantace byla provedena u 57 nemocných. Vysoké riziko dle běžných prognostických markerů bylo ve 33 případech. Biomarkery byly stanoveny biochip array technologií a analyzátoru Evidence

Investigator (Randox). Byly měřeny sérové hladiny interleukinů IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, EGF, VEGF, IFN- γ , Monocyte Chemotactic Protein-1, TNF- α , GM-CSF, Macrophage Inflammatory Protein-1 α , α -podjednotka solubilního receptoru IL-2 (sIL-2R α), solubilní receptor IL-6, Matrix-Metalloproteinase-9, solubilní receptor TNF- α typ I a II (TNFR-1,2), E-selectin (E-SEL), P-selectin, L-selectin, ICAM-1, VCAM-1. Biomarkery byly analyzovány s ohledem na věk, hyperleukocytózu, vysoké riziko AML, LDH nad pětinásobkem normálních hodnot, mutace FLT3-ITD a NPM-1, přežití do progresu nemoci (PFS) a celkové přežití (OS). Pro hodnocené biomarkery byly vypočteny ROC křivky.

Výsledky:

Žádný z hodnocených faktorů nebyl ovlivněn věkem ani nesouvisel s vysokým rizikem AML. Nemocní se vstupní hyperleukocytózou měli vyšší E-SEL ($P<0,001$) a TNFR-I ($P=0,020$). FLT3-ITD souvisela s NPM-1 a vyšším E-SEL ($P=0,002$). Nemocní s významnou elevací LDH měli nižší EGF ($P=0,048$). OS bylo nepříznivě ovlivněno relapsem nemoci ($P<0,001$), vysokým rizikem AML ($P=0,001$) a vyšším věkem ($P=0,033$). Alogenně transplantovaní byli mladší ($P=0,009$) a přežívali déle ($P=0,010$). Zvýšená LDH byla spojena s horším přežitím u nemocných s nízkým a středním rizikem. V univariantské analýze souviselo 9 biomarkerů s PFS a 15 biomarkerů s OS. Po korekci P na vícenásobné testování sIL-2R α predikoval OS ($P=0,001$). TNFR-1 měl blízko statistické významnosti pro OS ($P=0,053$) i PFS ($P=0,075$).

Závěr:

Nemocné s AML lze dále prognosticky diferencovat. Vstupní hladiny sIL-2R α a TNFR-1 mohou být využity v prognostické stratifikaci nemocných.

Podpora: DZRO 1011 (FVZ UO), MH CZ – DRO (UHHK, 00179906)



P33

**VLIV POUŽITÉ METODY IZOLACE DNA
NA VÝSLEDNOU KVANTIFIKACI PRO
MONITOROVÁNÍ BUNĚČNÉHO CHIMERISMU**Josefusová K., Stefflová L., Čížková B., Hrabáková P., Přerovská R.,
Staňková M., Březinová D., Čechová H.*HLA, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha 2*

Chimerismus je stav, kdy je v jednom organismu současně přítomno více buněčných populací, které se geneticky liší. Tento stav nastává mimo jiné po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Potransplantační monitoring buněčného chimerismu je vhodným markerem pro sledování dynamiky přijetí štěpu, aktivity dárcovské krevetvorby, ale zejména je důležitý pro detekci návratu autologní krevetvorby, která značí možné riziko relapsu nemoci. Pro kvantifikaci buněčného chimerismu jsou v současnosti využívány především molekulárně genetické metody vyžadující izolaci DNA.

V rámci interní validace byly porovnávány dvě metody izolace DNA - vysolovací metoda dle Millera, kdy je DNA z vodného prostředí získávána precipitací ethanolom a automatická izolace, kdy je DNA vázána na povrchu paramagnetických kuliček.

Izolovaná DNA byla použita pro kvantifikaci buněčného chimerismu. Metoda byla vybrána dle míry očekávaného chimerismu, tzn. očekávaného zastoupení minoritního genotypu ve vzorku. Při podílu $\geq 1\%$ chimerismu byla použita PCR amplifikace Short Tandem Repeats (STR) polymorfizmů s následnou fragmentační analýzou a citlivostí 1%. V případě podílu očekávaného chimerismu $< 1\%$ byla použita metoda kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) krátkých inzercí a delecí s citlivostí 0,035%.

Z 62 vzorků periferní krve nebo kostní dřeně byla izolována DNA oběma způsoby a analyzována pomocí STR nebo qPCR. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí neparametrického Wilcoxonova testu. U výsledků kvantifikace robustnější metodou STR byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl ($p=0.9339$), zatímco při kvantifikaci citlivější metodou qPCR již rozdíl významný ($p=0.0019$).

Ze získaných výsledků vyplývá, že robustnost a citlivost metody ovlivňuje výslednou kvantifikaci.

Pro potransplantační monitorování buněčného chimerismu je zásadní sledovat trend míry chimerismu v čase. Pro zajištění relevantnosti a kontinuity výsledků je vhodné používat stejný způsob izolace, a to zejména při použití citlivé metody qPCR. Rutinně je tedy DNA na našem pracovišti izolována metodou dle Millera, pouze při statimových vyšetřeních nebo u hypobuněčných vzorků je použita automatická izolace.

Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví ČR) koncepčního rozvoje výzkumné organizace (00023736, ÚHKT).



Amruz Cerna K.	O04	Čuřík N.	P03 , P14	Hrabáková P.	P33
André M.	P02	Darzentas N.	P24 , P25	Hrdinka M.	O03
Andrlík M.	P08	Davids M.S.	O04	Hrdinová T.	P23
Bago J.R.	P01	Dědečková K.	P08	Hrdličková L.	E05
Behounek M.	O06	Dekořová T.	P10	Hrušák O.	E04
Belada D.	O07 , P02 , P06 , P27	Díaz de Heredia C.	P12	Hruštinová A.	P20
Beličková M.	P17 , P20	Dlouhá L.	P06 , P27	Hubáček P.	P18
Benešová A.	O01 , P03 , P07 , P16	Dobrovolná M.	P30	Hynšt J.	P25
Benešová K.	O07 , P06 , P27	Dostálová Merkerová M.	P20	Izáková S.	P19
Bezděková R.	P05	Doubek M.	O04 , P24 , P25 , P26	Izakova S.	P15
Biondi A.	O05	Dresler J.	P23	Jaeger U.	O04
Blahovcová P.	P06 , P27	Đuraš J.	O07 , P06 , P27	Jakša R.	P06
Blahutová M.	P13	Đurech M.	O03	Janíková A.	E09 , O07 , P06 , P27
Bohonek M.	P13	Dusilková N.	O09	Jebavý L.	P28 , P29 , P32
Boudny M.	O04	Dyr J.E.	P21 , P31	Jelínek T.	O03 , P01 , P05
Boudová L.	P06	Faber E.	E01	Jelínková H.	P24 , P25
Brezinová J.	P15	Fassmannová D.	P24	Ježíšková I.	O10
Broskevičová J.	P01	Fatka J.	P10	Jindra P.	P10
Brown J.R.	O04	Ferdandes S.M.	O04	Jonášová A.	O08 , O09 , P20
Brugger W.	P02	Filip D.	O04	Josefová K.	P33
Březinová J.	P19	Fürst T.	O07	Jurček T.	P16
Bugarin C.	O05	Gahérová L.	P08	Kalina T.	O05
Burda P.	P14	Gaipa G.	O05	Karlova J.	O06
Burgues J.M.B.	P02	Gmucová H.	P10	Kaufmanová J.	P20 , P21 , P31
Burke J.	P02	Gottschalk A.	P16	Kazantsev D.	O06
Campř V.	O07 , P06	Grantz Šašková K.	P24	Keša P.	P04
Caputo V.S.	P10	Hájek R.	O03 , P01 , P05	Kipps T.J.	O04
Cerovská E.	P17	Hanáková M.	P22	Klamová H.	O01 , P03 , P07 , P14 , P16
Cetkovský P.	O10 , P17 , P18 , P22	Havlíček M.	P20 , P21	Klanová M.	O06
Ceznerová E.	P20 , P21	Havránek O.	P04	Kléma J.	P20
Corbacioglu S.	P12	Hlaváčková A.	P14	Klener P.	O06 , P04 , P06
Cross N.	P16	Hodanová L.	P15	Klimentová J.	P23
Čechová H.	P33	Hochhaus A.	O01 , P16	Kobliňová J.	O01 , P03 , P07 , P14 , P16
Čemusová B.	P17 , P18	Holubová M.	P10	Kocmanová I.	O02
Čermák J.	E02 , P20	Horáček J.M.	P28 , P29 , P32	Kopečková K.	O07 , P27
Černá L.	P05	Houdová L.	P10	Kostalova L.	O04
Čížková B.	P33	Hovorková L.	P16	Kostrouchova B.	P13



Kotlín R.	P21	Mayer J.	002 , 004 , 010 , P16	Plevová K.	P24 , P25
Kouba M.	E05	Medkova M.	004	Plonkova H.	P05
Koubová M.	P17	Mendlíkova I.	P15	Pokorna E.	006
Králová Viziová P.	008	Mendlíková I.	P19	Pokorná E.	P04
Krejčík Z.	P20	Merli P.	P12	Polgárová K.	E08
Kren L.	004	Michálka J.	007	Polívková V.	001 , P03 , P07 , P14 , P16
Krijt M.	P23	Michalova K.	P15	Popková T.	003 , P01 , P05
Kubeš J.	P08	Mikulenkova D.	P22	Porc J.	P24 , P25
Kučerka O.	P31	Minařík L.	008 , 009	Pospíšilová D.	E06
Kulvait V.	008 , 009	Mladonicka Pavlasova G.	004	Pospíšilová Š.	P24 , P25 , P26
Kundrát D.	010 , P20	Móčíková H.	007 , P06 , P08 , P27	Procházka V.	007 , P06 , P27
Kupcová K.	P04	Motlová E.	P16	Přerovská R.	P33
Kupsa T.	P28 , P29 , P32	Mráz M.	E11	Půbalová Š.	P28
Kutac D.	P13	Navrkalová V.	P24 , P25	Pytlík R.	E07 , E08 , 007 , P06
Kužilková D.	005	Nazarova S.	P28	Ráčil Z.	E13 , 002 , 010 , P22
Landova L.	P13	Neupauerová J.	P28	Radocha J.	P05
Lázníčka A.	P03	Neuwirtova R.	P15	Radová L.	P26
Lengerová M.	002	Nováková L.	P17 , P18	Ramprakash S.	P12
Lhotska H.	P15	Nowakowski G.	P02	Ransdorfová Š.	P19
Liskova K.	004	Onderková M.	P19	Réblová K.	P26
Lizcova L.	P15	Ondrisova L.	004	Reigl T.	P24 , P25
Loužil J.	P31	Oppelt J.	004	Rejlová K.	005
Lovecky J.	P13	Ostašov P.	P10	Remešová H.	010
Lukeš J.	P09	Ottaviano G.	P12	Roeder I.	P16
Lysák D.	P10	Pacheco-Blanco M.	P04	Rusinová K.	E05
Machová Poláková K.	001 , P03 , P07 , P16	Pál K.	P24 , P25	Říhová L.	P05
Maisnar V.	P05	Palacková M.	002	Salmon M.	P16
Májek P.	P31	Papajík T.	007	Sandova V.	004
Maly M.	P31	Pavlíček P.	P05	Sedláček J.	P24
Marečková A.	P24 , P25	Pavlistova L.	P15	Sedláček P.	E12 , P12
Marinov I.	P22	Pecherková P.	P07 , P20	Sedláček R.	008
Marková J.	P08	Penka M.	E03	Sedlák F.	P24
Marková Šťastná M.	P03 , P18	Pepek M.	P03	Semerák P.	005
Martelli M.	001	Pešta M.	009	Sharma S.	004
Martová J.	P19	Petrák J.	P23	Shehata M.	004
Marwah P.	P12	Pirnos J.	007 , P06 , P27	Schaffartzik A.	008 , 009
Matušíková Š.	007	Pitule P.	P10	Siskova M.	P15



Skalníková M.	P26	Tuskova D.	O06
Soverini S.	O01	Urbánek P.	P27
Sovová Ž.	P31	Valeriánová M.	P19
Sramkova L.	P09	Válková V.	P17 , P18
Srbová D.	P03 , P07 , P16	Vaněk J.	P28 , P29 , P32
Staňková M.	P33	Vdovin A.	O03
Staňo Kozubík K.	P26	Vecera J.	O04
Starý J.	P09	Vidlakova D.	P15
Staskova E.	P13	Vítek A.	P17
Stefflová L.	P33	Vočková P.	P04
Stevens D.	P02	Vodička P.	P06 , P27
Stoklosa T.	P03	Vojackova E.	O04
Stopka T.	O08 , O09 , P15	Vondráček V.	P08
Stracquadanio G.	P01	Vrana J.	P01
Stuchlý J.	O05	Vraná M.	P28
Sutttnar J.	P14 , P20 , P21 , P31	Vrzalová Z.	P26
Svobodova K.	P15	Vydra J.	P17 , P18 , P30
Sýkorová A.	P06 , P27	Vyoral D.	P23
Szikszai K.	P20	White H.	P16
Šahinbegovic H.	O03	Winkowska L.	P09
Šácha P.	P31	Yesilipek A.	P12
Šálek C.	O10 , P19 , P22 , P28	Zaliova M.	P09
Šálková J.	P27	Zapletalová S.	P08
Šálovská B.	P23	Zelinkova M.	O04
Šeda V.	O04	Zemanová Z.	O08 , O09 , P19
Šestáková Š.	O10	Zeni P.F.	O04
Ševčíková T.	O03 , P01 , P05	Zikmund T.	O06 , O08
Šimiček M.	O03 , P01 , P05	Zuna J.	P09 , P16
Šnaurová R.	O03	Zwyrtkova M.	P09
Špička I.	E07 , P05 , P24	Žáčková D.	P16
Štika J.	P26	Žák P.	P28 , P29 , P32
Štikarová J.	P11 , P21 , P31	Ženatová M.	P24 , P25
Thurner D.	O05	Žihala D.	O03 , P01
Toman O.	P23	Živný J.	P23
Trizuljak J.	P26	Žižková H.	O01 , P03 , P07 , P16
Trka J.	P09		
Trněný M.	O07 , P02 , P04 , P06 , P27		



21. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2021 28.–29. 1. 2021
POST-ASH

ONLINE

PŘEHLED PARTNERŮ A VYSTAVOVATELŮ

122

GENERÁLNÍ PARTNER



VYSTAVOVATEL 6 m²



HLAVNÍ PARTNER



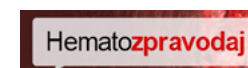
VYSTAVOVATEL 3 m²



PARTNER



Mediální partneři



VŠEM PARTNERŮM A VYSTAVOVATELŮM DĚKUJEME ZA ÚČAST A PODPORU!