



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023

POST-ASH

*KAM NÁS POSOUVÁ TO NEJLEPŠÍ Z LOŇSKÉ
SVĚTOVÉ HEMATOLOGIE*

18.–20. 1. 2023

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

**PROGRAM KONFERENCE
A SBORNÍK ABSTRAKTŮ**





OBSAH	2
ÚVODNÍ SLOVO	3
POŘADATEL	4
SCHÉMA ODBORNÉHO PROGRAMU	6
PODROBNÝ PROGRAM KONFERENCE	8
L LÉKAŘSKÝ PROGRAM	9
> STŘEDA 18. 1. 2023	9
> ČTVRTEK 19. 1. 2023	10
> PÁTEK 20. 1. 2023	17
L OŠETŘOVATELSKÝ PROGRAM	19
> ČTVRTEK 19. 1. 2023	20
> PÁTEK 20. 1. 2023	21
SATELITNÍ SYMPOZIA	22
SBORNÍK ABSTRAKTŮ	29
ABECEDNÍ REJSTŘÍK AUTORŮ	145
VŠEOBECNÉ INFORMACE	149
PLÁN PROSTOR A VÝSTAVY	153
PŘEHLED PARTNERŮ A VYSTAVOVATELŮ	154





Vážené kolegyně, vážení kolegové,

dovolujeme si vás přivítat na konferenci HEMATOLOGIE 2023 (23. pražských hematologických dnech).

Jsme moc rádi, že se můžeme opět osobně setkat. Připravili jsme pro vás velmi atraktivní program, který se skládá z několika oblastí.

Při slavnostním zahájení budeme mít tu čest vyslechnout speciální přednášku prezidentky Evropské hematologické asociace (EHA) profesorky Elizabeth Macintyre. Slavnostní Heřmanského přednášku přednese profesor Uwe Platzbecker na téma myelodysplastického syndromu, slavnostní Neuwirtovu přednášku, shrnující vývoj transplantací na Slovensku, pronese docent Martin Mistrík.

V roce 2022 byla publikována nová WHO klasifikace hematologických malignit, ale i návrhy alternativních klasifikací. Proto jsme zařadili speciální blok, v němž shrnou problematiku přední světoví odborníci prof. Elias Campo a prof. Hans Kvasnicka. V tomtéž bloku zhodnotí novinky v oblasti lymfomů Dr. Jason Westin z MD Anderson Cancer Center.

Celkem bude předneseno 14 edukačních sdělení shrnující aktuální stav problematiky ve vybraných oblastech hematologie i novinky, které byly prezentovány na výročním sjezdu Americké hematologické společnosti (ASH) v prosinci 2022.

Rozšířili jsme počet „Meet the expert“ sekcí na čtyři, dvě se věnují problematice laboratorní a dvě problematice klinické.

V oblasti originálních sdělení bylo přihlášeno celkem 63 prací, z nich 26 bylo prezentováno v roce 2022 na sjezdu ASH, 16 na sjezdu EHA a 9 na dalších mezinárodních konferencích. U dvaceti čtyř abstraktů je první autor mladší 35 let. Práce budou prezentovány ve formě ústních sdělení a zejména posterů, na které klademe velký důraz jako na místo osobního setkání a diskusí.

Ještě jednou gratulujeme všem aktivním účastníkům a moc se těšíme na osobní setkání s celou hematologickou obcí při této mimořádné příležitosti ukazující aktuální trendy v jednotlivých oblastech hematologie a zároveň stav a přínos české hematologie.

Prof. MUDr. Petr Cetkovský, Ph.D., MBA
prezident konference

Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.
předseda organizačního a vědeckého výboru



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:

Petr Cetkovský

Emeritní prezident:

Pavel Klener

Předseda organizačního a vědeckého výboru:

Marek Trněný

Organizační a vědecký výbor, členové:

Jaroslav Čermák
Ondřej Hrušák
Anna Jonášová
Pavel Klener jr.
Roman Kotlín
Tomáš Kozák
Jan Kvasnička
Jan Starý
Tomáš Stopka
Lucie Šrámková
Jan Trka

Garanti ošetřovatelského programu:

Darja Hrabánková
Lucie Vylitová
Lenka Turková
Jitka Wintnerová



HODNOTITELÉ ABSTRAKTŮ

Jan Blatný (Brno)
Jaroslav Čermák (Praha)
Michael Doubek (Brno)
Pavel Jindra (Plzeň)
Anna Jonášová (Praha)
Pavel Klener (Praha)
Roman Kotlín (Praha)
Tomáš Kozák (Praha)
Jan Kvasnička (Praha)

Jiří Mayer (Brno)
Marek Mráz (Brno)
Tomáš Papajík (Olomouc)
Tomáš Stopka (Praha)
Lucie Šrámková (Praha)
Jan Trka (Praha)
Marek Trněný (Praha)
Pavel Žák (Hradec Králové)

Vědecký výbor konference děkuje všem, kteří se podíleli na hodnocení abstraktů.

ORGANIZAČNÍ ZAJIŠTĚNÍ KONFERENCE

Meritis, s.r.o.

Obrovského 644
141 00 Praha 4

e-mail: phd2023@meritis.cz

tel.: 272 774 065

www.phd.cz

Alžběta Matějovská
organizace konference
tel.: 731 109 563
matejovska@meritis.cz

Dita Bílková
sponzoring, vystavovatelé
tel.: 739 571 536
bilkova@meritis.cz

Jitka Dobrevová
registrace, ubytování
tel.: 737 287 522
dobrevova@meritis.cz





SCHÉMA ODBORNÉHO PROGRAMU

	místo	8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	20:00
STŘEDA 18. 1. 2023	sál ZENIT	12:00 – 19:00 REGISTRACE												
	sály TYCHO/KEPLER	12:00 – 19:00 REGISTRACE												
ČTVRTEK 19. 1. 2023	sál ZENIT	7:30 – 19:00 REGISTRACE												
	sály TYCHO/KEPLER	7:30 – 19:00 REGISTRACE												
PÁTEK 20. 1. 2023	sál ZENIT													
	sály TYCHO/KEPLER	8:00 – 13:00 REGISTRACE												

Přestávka na kávu

19:30
Uvítací večer
(hotel Clarion,
restaurace Veduta)

Přestávka na kávu

Oběd

Přestávka na kávu

18:30
Posterová sekce
s večeří
(sál Meridian)

Přestávka na kávu

Přestávka na kávu

13:15
ZAKONČENÍ
KONFERENCE,
OBĚD

Legenda:

- EDUKAČNÍ PROGRAM
PŘEDNÁŠKY E01 – E14
- PŘEDNÁŠKOVÁ SDĚLENÍ
PŘEDNÁŠKY 001 – 012
- MEET THE EXPERT
WORKSHOP
- OŠETŘOVATELSKÝ PROGRAM
- SATELITNÍ SYMPOZIA



Schůze výborů a jednání na základě osobního pozvání

STŘEDA 18. 1. 2023

→ SALÓNEK STELLA (3. PATRO, vedle registrace)

10:00 - 11:30

Schůze výboru České hematologické společnosti ČLS JEP

12:00 - 13:00

**Zasedání redakční rady časopisu Transfuze
a hematologie dnes**

ČTVRTEK 19. 1. 2023

→ SALÓNEK ZODIAC (2. PATRO)

7:30 - 8:30

Zasedání HEMATOLOGIE-online.cz

→ SALÓNEK STELLA (3. PATRO, vedle registrace)

16:50 - 18:00

Workshop WHO klasifikace

Účast na základě pozvánky.

→ SALÓNEK STELLA (3. PATRO, vedle registrace)

20:00 - 21:00

Zasedání spolku Hodgkinův lymfom

PÁTEK 20. 1. 2023

→ SALÓNEK STELLA (3. PATRO, vedle registrace)

13:15

Schůze výboru Transplantační sekce ČHS ČLS JEP



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023 18.–20. 1. 2023
POST-ASH



PODROBNÝ PROGRAM KONFERENCE



středa 18. 1. 2023

STŘEDA 18. 1. 2023→ **SÁL ZENIT**

15:00 – 16:35

Odborný program – Blok I

Předsedající: Mayer J. (Brno), Šálek C. (Praha), Trka J. (Praha)

15:00 – 15:05

Představení posterů

15:05 – 15:25

E01 **Minimální reziduální nemoc u BCR::ABL1-pozitivní akutní lymfoblastické leukémie: odlišný význam u typické ALL a u CML-like onemocnění**

Zuna J. (Praha) a spol.

15:25 – 15:40

O01 **ASH 2022****Single Cycle of Blinatumomab Followed by High-Dose Chemotherapy in the Induction Therapy for Ph-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. Primary Endpoint Analysis of the Blina-Cell Trial**

Šálek C. (Praha) a spol.

15:40 – 16:00

E02 **Ph- negativní myeloproliferativní onemocnění na ASH 2022**

Bělohávková P. (Hradec Králové)

16:00 – 16:15

O02 **EHA 2022****Zlepšení diagnostiky chronické myeloidní leukémie implementováním nových molekulárních metod a technologií**

Machová Poláková K. (Praha) a spol.

16:15 – 16:35

E03 **Terapie akutní myeloidní leukemie starších nemocných nevhodných k intenzivní terapii - novinky a co přinesl ASH 2022**

Jonášová A. (Praha)

16:35 – 17:00 **Přestávka na kávu**

17:00 – 19:00

SLAVNOSTNÍ ZAHÁJENÍ KONFERENCE

Předsedající: Cetkovský P. (Praha), Hrabánková D. (Praha), Jonášová A. (Praha), Kozák T. (Praha), Penka M. (Brno), Starý J. (Praha), Trněný M. (Praha), Žák P. (Hradec Králové)

17:00 – 17:30

Zahájení konference

17:30 – 18:00

SPECIÁLNÍ PŘEDNÁŠKA
EHA AND THE EVOLVING PLACE OF DIAGNOSTICS
Macintyre E. (Paris; France) - EHA president

18:00 – 18:30

NEUWIRTOVA PŘEDNÁŠKA
VÝVOJ TRANSPLANTACIÍ KRVOTVORNÝCH BUNIEK NA SLOVENSKU
Mistrík M. (Bratislava; SK)

18:30 – 19:00

HEŘMANSKÉHO PŘEDNÁŠKA
MDS 2023: STANDARDS AND PERSPECTIVES
Platzbecker U. (Leipzig; Germany)19:30 **Uvítací večer (restaurace Veduta, 2. patro)**



čtvrtek 19. 1. 2023

ČTVRTEK 19. 1. 2023

10:00 – 11:00

→ **SÁL ZENIT**

Meet the expert workshop 1:

Jak vyšetřit genom (aneb genomická diagnostika hematologických malignit v rukou expertek)

*Beličková M. (Praha)
Kubričanová Žaliová M. (Praha)
Plevová K. (Brno)*

10:00 – 11:00

→ **SÁLY TYCHO + KEPLER**

Meet the expert workshop 2:

Podpůrná péče - infekce včetně COVID u hematologických pacientů

*Karas M. (Plzeň)
Kolář M. (Olomouc)
Procházka V. (Olomouc)
Trojánek M. (Praha)*

11:00 – 11:15 **Přestávka**

11:15 – 13:10

→ **SÁL ZENIT**

Odborný program – Blok II

Předsedající: Divoký V. (Olomouc), Kozák T. (Praha), Penka M. (Brno)

11:15 – 11:20

Představení posterů

11:20 – 11:40

E04 ■ Anémie ASH 22
Čermák J. (Praha)

11:40 – 11:55

003 ■ Annual Congress of European Society of Gene & Cell Therapy 2022
**Correcting causal mutations in Fanconi Anemia group
A patient-derived cells by prime editing**
Peterková L. (Praha) a spol.

11:55 – 12:15

E05 ■ Imunitní cytopenie ve světle novinek z ASH 2022
Konířová E. (Praha)

12:15 – 12:30

004 ■ EHA 2022
**Emergency granulopoiesis induces a lymphoid to myeloid bias
switch in a subset of hematopoietic stem cells**
Vaničková K. (Praha) a spol. – OCENĚNÉ SDĚLENÍ MLADÝCH HEMATOLOGŮ

12:30 – 12:50

E06 ■ Vybrané krvácivé stavy – Post ASH 2022
Blatný J. (Brno)



čtvrtek 19. 1. 2023

12:50 – 13:10

E07 ■ Trombóza – ASH 2022

Gumulec J. (Ostrava)

13:10 – 14:15 **Oběd (hotelová restaurace Veduta, 2. patro)**

14:45 – 16:35

Odborný program – Blok III

Předsedající: Hrušák O. (Praha), Trněný M. (Praha), Žák P. (Hradec Králové)

14:45 – 14:50

Představení posterů

14:50 – 15:20

E08 ■ New WHO and ICC lymphoproliferations classifications

Campo E. (Barcelona; Spain)

15:20 – 15:50

E09 ■ New WHO myeloproliferation classification

Kvasnicka H. (Wuppertal; Germany)

15:50 – 16:20

E10 ■ Lymphomas ASH 22

Westin J. (Houston; USA)

16:20 – 16:35

Round table discussion

16:35 – 16:50 **Přestávka na kávu**

16:50 – 18:20

Odborný program – Blok IV

Předsedající: Mráz M. (Brno), Papajík T. (Olomouc), Špaček M. (Praha)

16:50 – 16:55

Představení posterů

16:55 – 17:10

O05 ■ ASH 2022

FLIPI24: An Improved International Prognostic Model Developed on Early Events in Follicular Lymphoma

Procházka V. (Olomouc) a spol.

17:10 – 17:30

E11 ■ Myelomy – ASH 2022

Pour L. (Brno)

17:30 – 17:45

O06 ■ EHA 2022

Comprehensive NGS testing allows integrated assessment of individual patient prognosis in multiple myeloma

Kotašková J. (Brno) a spol.

17:45 – 18:05

E12 ■ CLL ASH 2022

Doubek M. (Brno)

18:05 – 18:20

O07 ■ ASH 2022

Rozdíly v klinickém průběhu a léčbě infekce SARS-CoV2 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií v jednotlivých fázích pandemie: Studie ERIC18

Špaček M. (Praha) a spol.

18:30 – 20:00 **Posterová sekce s večeří (sál Meridian)**



čtvrtek 19. 1. 2023

Moderovaná diskuse:

čtvrtek 19.1. 2023 od 18:30 do 20:00 hodin, sál Meridian

LYMFOMY (POSTERY P01 – P29)

Diskusi řídí: **Lymfomy 1** (postery P01 - P14): Janíková A. (Brno),

Klener P. (Praha), Obr A. (Olomouc)

Lymfomy 2 (postery P15 - P29): Sýkorová A. (Hradec Králové), Kozák T. (Praha)

P01

Finding a Needle in Haystack: Digital-PCR for Minimal Residual Disease Detection in the Circulating-Tumor DNA Samples in Hodgkin Lymphoma

ASH 2022

Procházka V. (Olomouc) a spol.

P02

Superior graft-versus-leukemia effect in matched unrelated donor versus HLA-identical sibling pediatric recipients transplanted for acute lymphoblastic leukemia within the FORUM Study **ASH 2022**

Sedláček P. (Praha) a spol.

P03

How relevant are the control cohorts of clinical trials in patients with newly diagnosed DLBCL in a daily practice? **ASH 2022**

Vodička P. (Praha) a spol.

P04

A Retrospective Analysis of Fertility in Female Patients with Advanced Stages of Hodgkin Lymphoma Treated with BEACOPP Escalated Chemotherapy (25 Year Experience of a Single Centre)

ISHL 2022

Marková J. (Praha) a spol.

P05

DYNAMICS OF GENOMIC ABERRATIONS IN RELATION TO DISEASE ACTIVITY IN UNTREATED PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA **EHA 2022**

Navrkalová V. (Brno) a spol.

P06

Advanced quality control of cultured NK cells for future cellular immunotherapy of haemato-oncologic disorders

Mašíňová E. (Praha) a spol.

P07

Restored biosynthetic pathways induced by MSCs serve as rescue mechanism in leukemia cells after L-asparaginase therapy

Alquezar-Artieda N. (Praha) a spol. **ASH 2022**

P08

Cyclin-dependent Kinase 4/6 Inhibitor Palbociclib Synergizes with BH3-mimetics in Experimental Models of Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma **ASH 2022**

Maláriková D. (Praha) a spol.

P09

Invariant NKT cells as regulators of post-transplant complications

Holubová M. (Plzeň) a spol.



čtvrtek 19. 1. 2023

P10

METABOLIC CHANGES OF IN VITRO EXPANDED NK CELLS

Jedlička M. (Praha) a spol.

P11

Initial Results From a Phase 1/2 Trial of Subcutaneous Epcoritamab in Combination with Rituximab + Lenalidomide (R2) for First-Line Treatment of Follicular Lymphoma **ASH 2022**

Belada D. (Hradec Králové) a spol.

P12

BCL-XL blockage with A1155463 significantly increases efficacy of venetoclax in mantle cell lymphoma in vitro and in vivo

ASH 2022

Dolníková A. (Praha) a spol.

P13

Intermittent lorlatinib dosing in relapsed/refractory ALCL provides rapid and durable responses. Frequent MRD measurement suggests drug-driven dependency deprivation mechanism

Seventh International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin Lymphoma 2022

Štěrbá J. (Brno) a spol.

P14

PET2-adapted approach after 2 cycles of ABVD is comparable to 2 cycles of BEACOPP escalated and 2 cycles of ABVD and irradiation in early unfavorable Hodgkin lymphoma **ISHL 2022**

Mocíková H. (Praha) a spol.

P15

Detection of recurrent somatic variants in cell-free DNA as a tool for disease monitoring in Hodgkin lymphoma

ISHL 2022

Grohmann J. (Olomouc) a spol.

P16

TSEI (total skin electron irradiation) u pacientů s mycosis fungoides (MF): jak a kdy.

Dolečková M. (České Budějovice) a spol.

P17

First-MIND: Final Analysis from a Phase Ib, Open-Label, Randomized Study to Assess Safety of Tafasitamab or Tafasitamab + Lenalidomide in Addition to R-CHOP in Patients with Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma **ASH 2022**

Belada D. (Hradec Králové) a spol.

P18

MINIMAL-LOSS-CYTOMETRY FOR EVALUATION OF CEREBROSPINAL FLUID IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. SINGLE CENTER STUDY **EHA 2022**

Nováková M. (Praha) a spol.

P19

NGS-BASED VERIFICATION OF LOW MRD POSITIVITY IS HIGHLY SPECIFIC IN PREDICTION OF RELAPSE IN POST-TRANSPLANT ALL PATIENTS

EBMT 2022

Šeferna K. (Praha) a spol.



čtvrtek 19. 1. 2023

P20

Predictive role of the Hodgkin lymphoma-associated cytokines: a prospective study of the Czech Hodgkin Study Group

ISHL 2022

Kredátusová A. (Olomouc) a spol.

P21

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍ EXPRESE DLOUHÝCH NEKÓDUJÍCÍCH RNA Z PLASMY PACIENTŮ S DIFÚZNÍM VELKOBUNĚČNÝM B-LYMFOMEM (DLBCL)

Klieber R. (Plzeň) a spol.

P22

New promising targets of PI3K/AKT signaling in lymphoma

Heřman V. (Praha) a spol.

P23

Challenging Amyloidosis, Concurrent Amyloid Producing Diseases

EHA 2022

Flodr P. (Olomouc) a spol.

P24

Combinatorial PI3K/AKT Pathway Inhibition as a Model for Novel Therapeutic Approach in Diffuse Large B-cell Lymphoma.

ASH 2022

Havránek O. (Praha) a spol.

P25

SUBCLONAL ARCHITECTURE OF CHROMOSOMES REVEALED BY SINGLE-CELL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN A PATIENT WITH CLONAL EVOLUTION OF RELAPSING/REFRACTORY CLL

EHA 2022

Kotašková J. (Brno) a spol.

P26

CD38: a functioning target in relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. Limitations in treatment and diagnostics

EHA 2022

Vakrmanová B. (Praha) a spol.

P27

Scaffold- and gel-based culture systems for in vitro studies of leukemic B cells **New frontiers in CLL research, ERIC-CLL**

Svozilová H. (Brno) a spol.

P28

Quantitative Expression Profiling of Surface Antigens on Peripheral Blood Leukocyte subsets and Childhood T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) Cells using a Standardized Flow Cytometry Workflow: A HCDM CDMaps Initiative **EHA 2022**

Kužílková D. (Praha) a spol.

P29

Sequencing-based Analysis of Clonal Evolution of 25 Mantle Cell Lymphoma Patients at Diagnosis and after Failure of Standard Immunochemotherapy **ASH 2022**

Karolová J. (Praha) a spol.

MDS / AML (POSTERY P30 – P46)

Diskusi řídí: Bělohávková P. (Hradec Králové), Čermák J. (Praha)

P30

Changes of Transcriptomic Landscape in Blasts of Responding and Refractory AML Patients After Chemotherapy **ASH 2022**

Cerovská E. (Praha) a spol.



čtvrtek 19. 1. 2023

P31

Aging-Related Gene Expression Signatures Define Likelihood of Disease Progression in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes

ASH 2022

Kaisrlíková M. (Praha) a spol.

P32

Deregulation of noncoding RNAs derived from KDM genes is associated with azacitidine response in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia **EHA 2022**

Dostálová Merkerová M. (Praha) a spol.

P33

Upregulation of ZEB1-derived circular RNAs is associated with SF3B1-mutated myelodysplastic syndromes **ASH 2022**

Trsová I. (Praha) a spol.

P34

Risk Assessment in Patients with Myelodysplastic Neoplasms Using the Molecular International Prognostic Scoring System: A Single-Center Study from the Czech Republic **ASH 2022**

Veselá J. (Praha) a spol.

P35

Komplexní cytogenomická a molekulárně biologická analýza nádorového genomu pacientů s myeloidními malignitami se zaměřením na cílenou analýzu genu MECOM.

55. výroční cytogenetická konference 2022

Bryjová L. (Brno) a spol.

P36

Komplexní in vitro modely leukemického mikroprostředí pro testování cytotoxické aktivity nových produktů buněčné imunoterapie

Janstová L. (Praha) a spol.

P37

TRANSPOSABLE ELEMENTS EXPRESSION IN CD34+ CELLS IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES **EHA 2022**

Krejčík Z. (Praha) a spol.

P38

First Single-center Experience with Luspatercept Therapy in Low-risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) Patients with Transfusion Dependence Refractory to Erythropoietin Therapy **ASH 2022**

Jonášová A. (Praha) a spol.

P39

Effectiveness of Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) after Two or More Prior Tyrosine Kinase Inhibitors **ASH 2022**

Žáčková D. (Brno) a spol.

P40

p16INK4a in the Gut Mucosa Associates with NFKB1 Gene Polymorphisms and Decreased Serum Levels of Inflammation-Associated Proteins in Patients with Gastrointestinal Acute Graft Versus Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation **ASH 2022**

Kuba A. (Olomouc) a spol.



čtvrtek 19. 1. 2023

P41

BUŇKY BLASTICKÉHO ZVRATU CML S RŮZNÝM SPEKTRUM MUTACÍ V BCR::ABL1 A JINÝCH GENECH MAJÍ ROZDÍLNOU CITLIVOST K BH3-MIMETIKŮM **EHA 2022**

Láznička A. (Praha) a spol.

P42

Zkušenosti 1. interní kliniky VFN s kombinační terapií venetoklaxem u pacientů s HR-MDS a AML.

Minařík L. (Praha) a spol.

P43

Role of isoforms of NRAS and KRAS oncogenes during chemotherapy treatment in acute myeloid leukemia models

Macečková D. (Plzeň) a spol.

P44

Identification of novel therapeutic options for venetoclax-resistant AML cells through drug repurposing **EHA 2022**

Ladungová A. (Brno) a spol.

P45

Acute Myeloid Leukemia Suppression by Palbociclib and Ponatinib in Patient-Derived Xenograft **EHA 2022**

Buša D. (Brno) a spol.

P46

ABC1 AS A POTENTIAL BENEFICIAL TARGET OF MIDOSTAURIN IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA **EHA 2022**

Suchá S. (Hradec Králové) a spol.

NENÁDOROVÁ HEMATOLOGIE (P47 – P52)

Diskusi řídí: Penka M. (Brno), Pospíšilová D. (Olomouc), Vokurka M. (Praha)

P47

Single Amino Acid Mutation of Rps19 Leading to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Defects in the Mouse Model of Diamond-Blackfan Anemia **ASH 2022**

Stopka T. (Praha) a spol.

P48

Naše zkušenosti s léčbou fostamatinibem

Červínek L. (Brno) a spol.

P49

Frequency of Antithrombin Deficiency in Venous thromboembolism. Are We Still Aware of It?

Dulíček P. (Hradec Králové) a spol.

P50

Analýza variant genu ANKRD26 v 5' nepřekládané oblasti u kohorty pacientů s podezřením na dědičné hematologické onemocnění

EHA 2022

Staňo Kozubík K. (Brno) a spol.

P51

Funkční efekt nově identifikované varianty v genu CYCS u rodiny s trombocytopenií typu 4

Štika J. (Brno) a spol.



pátek 20. 1. 2023

P52

Familial erythrocytoses in the Czech Republic – genetic characterization and hepcidin regulation **EHA 2022**

Sochorcová L. (Olomouc) a spol.

Legenda:

- ASH 2022** – 64th AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY ANNUAL MEETING & EXPOSITION
- EHA 2022** – CONGRESS OF THE EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION
- ISHL 2022** – 12th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HODGKIN LYMPHOMA
- EBMT 2022** – 48th EBMT ANNUAL MEETING

PÁTEK 20. 1. 2023

10:00 – 11:00

→ **SÁL ZENIT**

Meet the expert workshop 3:

Jak změřit imunitu (aneb cytometrická analýza nemaligních buněk - virus-specifické lymfocyty, funkční testy and beyond)

Holubová M. (Plzeň)

Kužílková D. (Praha)

Říhová L. (Brno)

10:00 – 11:00

→ **SÁLY TYCHO + KEPLER**

Meet the expert workshop 4:

Paliativní péče - časné fáze nemoci

Hrdličková L. (Praha)

Klejnová M. (Praha)

Kouba M. (Praha)

Kopecký O. (Praha)

Urbanová R. (Olomouc)

11:00 – 11:15 **Přestávka**



pátek 20. 1. 2023

→ **SÁL ZENIT**

11:15 – 13:15

Odborný program – blok V

Předsedající: Cetkovský P. (Praha), Hájek R. (Ostrava), Jindra P. (Plzeň)

11:15 – 11:20

Představení posterů

11:20 – 11:40

E13 ■ Imunoterapie protilátkami v hemato-onkologii (ASH 2022)

Lysák D. (Plzeň)

11:40 – 11:55

O08 ■ ASH 2022

Updated Results From a Phase 1/2 Trial Evaluating Subcutaneous Epcoritamab with Rituximab + Lenalidomide (R2) in Patients with Relapsed or Refractory Follicular Lymphoma

Belada D. (Hradec Králové) a spol.

11:55 – 12:10

O09 ■ ASH 2022

Efficacy and Safety of Ibrutinib Combined with Standard First-Line Treatment or As Substitute for Autologous Stem Cell Transplantation in Younger Patients with Mantle Cell Lymphoma: Results from the Randomized Triangle Trial By the European MCL Network

Klener P. (Praha)

12:10 – 12:25

O10 ■ ASH 2022

Survival of patients with primary mediastinal B-cell lymphoma treated by immunochemotherapy with or without radiotherapy

Polgárová K. (Praha) a spol.

12:25 – 12:45

E14 ■ Buněčná imunoterapie v hematologii - ASH 2022

Otáhal P., Frič J. (Praha)

12:45 – 13:00

O11 ■ Targeting of SFK and CAMK Contributes to Anti-Leukemic Activity of Novel FLT3 Trisubstituted Purine Inhibitors: Effective Therapeutic Approach for AML with FLT3 Mutations

Kořalková P. (Olomouc) a spol.

13:00 – 13:15

O12 ■ ASH 2022

Re-sensitization of Azacytidine-resistant MDS/AML cells via modulation of KEAP1-NRF2 Redox Pathway

Pimková K. (Praha) a spol.

13:15

ZAKONČENÍ KONFERENCE, OBĚD

SAVE THE DATE!

Srdečně Vás zveme na

24. pražské hematologické dny - HEMATOLOGIE 2024-Post-ASH

termín: 17. - 19. 1. 2024



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023 18.–20. 1. 2023
POST-ASH

OŠETŘOVATELSKÝ PROGRAM



čtvrtek 19. 1. 2023

ČTVRTEK 19. 1. 2023

11:15 - 12:45

→ **SÁLY TYCHO + KEPLER**

Ošetrovatelský program I. - Komplikace spojené s léčbou

Předsedající: Turková L. (Praha), Wintnerová J. (Praha)

11:15 – 11:30

S01 ■ **Tumor lysis syndrom a syndrom z uvolnění cytokinů**

Vodička P. (Praha)

11:30 – 11:45

S02 ■ **Komplikace provázející léčbu dětí s promyelocytární leukémií
léčených konvenční chemoterapií v.s. arsentrioxidem**

Vodárková Y., Winterová J. (Praha)

11:45 – 12:00

S03 ■ **Zásady ATB terapie u hematoonkologických pacientů**

Vodička P. (Praha)

12:00 – 12:15

S04 ■ **Problematika žilních vstupů v ambulantní praxi FN Plzeň**

Chovancová J. (Plzeň)

12:15 – 12:30

S05 ■ **Bezpečné podávání léčiv nejen u hematoonkologických pacientů**

Vedrová J. (Praha), Rozsívalová P. (Hradec Králové)

12:30 – 12:45

Diskuse

12:45 – 14:15 Oběd (restaurace Veduta, 2. patro)

14:45 – 16:15

Ošetrovatelský program II. - Právní aspekty v ošetrovatelství

Předsedající: Hrabánková D. (Praha), Vylitová L. (Praha)

14:45 – 15:30

S06 ■ **Práva zdravotnických pracovníků a možnosti obrany v případě neoprávněných zásahů**

Halouzka R. (Brno)

15:30 – 16:15

S07 ■ **Míra právní zodpovědnosti za postupy a rozhodnutí - podávání léků, dekubity, pády**

Dvořáčková I. (Hradec Králové)



pátek 20. 1. 2023

PÁTEK 20. 1. 2023

11:15 – 12:45

→ **SÁLY TYCHO + KEPLER**

**Ošetrovatelský program III. – Paliativní péče
– workshop**

Předsedající: Rusinová K. (Praha)

11:15 – 12:00

S08 ■ Seběpěče zdravotníků

Čepelíková Z. (Praha)

12:00 – 12:45

S09 ■ Reflexe pandemie

Rusinová K. (Praha)

od 12:45 Oběd (restaurace Veduta, 2. patro)

Ošetrovatelský program - postery

**PS01 ■ Rehabilitace pacientů s roztroušenou
sklerózou na hematologii**

Hašová K., Koňářík M., Horáková K. (Ostrava)

PS02 ■ Protektivní péče při léčbě cytostatiky

Watzlawiková M., Kolková L., Koňářík M. (Ostrava)

SAVE THE DATE!

Srdečně Vás zveme na

24. pražské hematologické dny - HEMATOLOGIE 2024-Post-ASH

termín: 17. - 19. 1. 2024



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023 18.–20. 1. 2023
POST-ASH

SATELITNÍ SYMPOZIA



STŘEDA 18. 1. 2023



13:00-13:45 SÁL ZENIT

**MYLOTARG V INTEZIVNÍ LÉČBĚ AKUTNÍ MYELOIDNÍ
LEUKÉMIE A BISPECIFICKÉ PROTILÁTKY
V LÉČBĚ MNOHOČETNÉHO MYELOMU**

**ZKUŠENOSTI S GEMTUZUMAB OZOGAMICINEM
Z ČESKÝCH HEMATO-ONKOLOGICKÝCH CENTER**

Prim. MUDr. Petr Soukup, MHA

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

MUDr. Jan Válka, Ph.D.

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

**VOD V INTEZIVNÍ LÉČBĚ AML – PROJEVY
A MANAGEMENT LÉČBY**

Prim. MUDr. Petr Soukup, MHA

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

MUDr. Jan Válka, Ph.D.

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

**SOUČASNOST A BUDOUCNOST BISPECIFICKÝCH
PROTILÁTEK V LÉČBĚ MNOHOČETNÉHO MYELOMU**

MUDr. Tomáš Jelínek, Ph.D.

(Fakultní nemocnice Ostrava)



STŘEDA 18. 1. 2023

Celgene |  Bristol Myers Squibb
Company

14:00-14:45 SÁL ZENIT

PŘÍNOS BMS V HEMATOLOGII V ROCE 2023

ONUREG - NOVINKA V LÉČBĚ AML

Prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

REBLOZYL V LÉČBĚ NÍZCERIZIKOVÉHO MDS

Doc. MUDr. Anna Jonášová, Ph.D.

INREBIC V LÉČBĚ MYELOFIBROZY – KAZUISTIKA

MUDr. Natália Podstavková

STŘEDA 18. 1. 2023

AstraZeneca 

14:00-14:45 SÁLY TYCHO / KEPLER

MŮŽEME JEŠTĚ ZLEPŠIT PROGNÓZU PACIENTŮ S CLL?

Předsedající:

Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

(1.LF UK a VFN Praha)

JAKÉHO PACIENTA INDIKOVAT K TERAPII NOVÝMI LÉKY?

Prof. MUDr. Michael Doubek, Ph.D.

(FN Brno)

AKALABRUTINIB VS. IBRUTINIB: STUDIE ELEVATE-RR

Prim. MUDr. Martin Špaček, Ph.D.

(1.LF UK a VFN Praha)

**MANAGEMENT COVID-19
U HEMATOONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ**

Doc. MUDr. David Belada, Ph.D.

(FN Hradec Králové)

Pro účastníky symposia bude připraveno občerstvení



ČTVRTEK 19. 1. 2023



9:00-9:45 SÁL ZENIT

JANSSEN - PŘÍBĚH POKRAČUJE...

JE MOŽNÉ MĚNIT PŘÍBĚHY PACIENTŮ?

Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

(I. interní hematologická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice Praha)

DÉLE NA CESTĚ Ž(I+V)OTEM

MUDr. Martin Špaček, Ph.D.

(I. interní hematologická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice Praha)

PRAKTICKÉ ASPEKTY LÉČBY BTKi U PACIENTŮ S CLL

MUDr. Anna Panovská, Ph.D.

(Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno)

REVOLUCE V LÉČBĚ MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Prof. MUDr. Ivan Špička, Ph.D.

(I. interní hematologická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice Praha)

ČTVRTEK 19. 1. 2023



9:00-9:45 SÁLY TYCHO / KEPLER

**ROLE INHIBITORŮ C5 SLOŽKY KOMPLEMENTU
V LÉČBĚ PAROXYSMÁLNÍ NOČNÍ HEMOGLOBINURIE**

Chairman:

Prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

(FN Hradec Králové)

**POSTAVENÍ INHIBITORŮ C5 SLOŽKY
KOMPLEMENTU V LÉČBĚ PNH**

Prof. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc.

(ÚHKT Praha)

ZKUŠENOSTI S INHIBITORY C5 U PACIENTŮ S PNH

MUDr. Libor Červinek, Ph.D.

(FN Brno)



ČTVRTEK 19. 1. 2023



13:45-14:30 SÁL ZENIT

**SATELITNÍ SYMPOZIUM SPOLEČNOSTI NOVARTIS
- PROUD OF OUR BLOODLINE**

Předsedající:

Prof. MUDr. Petr Cetkovský, Ph.D., MBA

**ASCIMINIB – NOVINKA V LÉČBE CML
S POTENCIÁLEM ZMĚNIT STANDARD PÉČE**

Doc. MUDr. Daniela Žáčková, Ph.D.

(Fakultní nemocnice Brno)

**CO NOVÉHO PŘINESL ASH V LÉČBĚ
POLYCYTHAEMIA VERA RUXOLITINIBEM?**

MUDr. Petra Bělohávková, Ph.D.

(Fakultní nemocnice Hradec Králové)

**NAŠE PRVNÍ ZKUŠENOSTI S CAR-T
U FOLIKULÁRNÍHO LYMFOMU**

MUDr. Jan Kořen

(Všeobecná fakultní nemocnice v Praze)

ČTVRTEK 19. 1. 2023



13:30-14:15 SÁLY TYCHO / KEPLER

**“BUDE SE MĚNIT LÉČEBNÝ ALGORITMUS
U PACIENTŮ S DLBCL?”**

Odborným programem provádí:

Prof. MUDr. Marek Trněný, CSc.

**LÉČEBNÁ DOPORUČENÍ PRO DLBCL
NA POČÁTKU ROKU 2023**

Doc. MUDr. David Belada, Ph.D.

**MANAGEMENT TERAPIE PACIENTŮ
LÉČENÝCH KOMBINACÍ POLIVY-BR**

Doc. MUDr. Andrea Janíková, Ph.D.

NAŠE ZKUŠENOSTI S POLIVY V 1. LINII LÉČBY DLBCL

MUDr. Michal Kaščák

Závěrečná moderovaná diskuse

Součástí symposia bude oběd



PÁTEK 20. 1. 2023

abbvie

8:00-8:45 SÁL ZENIT

FIXNÍ LÉČBA V CLL – REALITA NEBO FIKCE?

Předsedající:

Prof. MUDr. Michael Doubek, Ph.D.

**REŽIM VENETOKLAX + OBINUTUZUMAB
V TEORII A PRAXI**

Prof. MUDr. Lukáš Smolej, Ph.D.

(IV. interní hematologická klinika, FN Hradec Králové)

**PŘEHLED AKTUÁLNÍCH DOPORUČENÍ
A HLAVNÍCH SMĚRŮ V TERAPII CLL**

Prim. MUDr. Martin Špaček, Ph.D.

(Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN Praha)



PÁTEK 20. 1. 2023



9:00-9:45 SÁL ZENIT

**JSME JIŽ PŘIPRAVENI OPUSTIT PRAXI
PROTRAHOVANÉ LÉČBY KORTIKOSTEROIDY
U NOVĚ DIAGNOSTIKOVANÉ ITP?**

Předsedající:

Prof. MUDr. Tomáš Kozák Ph.D., MBA

KORTIKOSTEROIDY - DOBRÝ SLUHA, ZLÝ PÁN

MUDr. Jaromír Gumulec

Diskuzi moderuje prof. Kozák

PŘÍNOS ROMIPLOSTIMU V ČASNÉ FÁZI ITP

MUDr. Eva Konířová

Diskuzi moderuje MUDr. Červínek

panel odborníků:

Prof. MUDr. Tomáš Kozák Ph.D., MBA

MUDr. Libor Červínek, Ph.D.

MUDr. Eva Konířová

MUDr. Jaromír Gumulec

PÁTEK 20. 1. 2023



9:00-9:45 SÁLY TYCHO / KEPLER

**NOVÉ INDIKACE CAR-T SPOLEČNOSTI
KITE/GILEAD SCIENCES S.R.O.**

2.LINIE DLBCL -

SOUČASNÉ LÉČEBNÉ MOŽNOSTI, STUDIE ZUMA-7

Doc. MUDr. David Belada, Ph.D.

R/R B-ALL U DOSPĚLÝCH PACIENTŮ -

SOUČASNÉ LÉČEBNÉ MOŽNOSTI, STUDIE ZUMA-3

MUDr. František Folber, Ph.D.

Diskuze



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023 18.–20. 1. 2023
POST-ASH



SBORNÍK ABSTRAKTŮ



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023 18.–20. 1. 2023
POST-ASH

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

30

EDUKAČNÍ PROGRAM **(ABSTRAKTY E01 – E14)**

**E01****MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOC U BCR::ABL1-POZITIVNÍ AKUTNÍ LYMFBLASTICKÉ LEUKÉMIE: ODLIŠNÝ VÝZNAM U TYPICKÉ ALL A U CML-LIKE ONEMOCNĚNÍ**

Jan Zuna^{1,2,3}, Lenka Hovorkova^{1,2}, Justina Krotka^{1,2,3}, Amelie Koehrmann⁴, Michela Bardini⁵, Lucie Winkowska^{1,2}, Eva Fronkova^{1,2,3}, Julia Alten⁴, Rolf Koehler⁶, Cornelia Eckert⁷, Lisa Brizzolara⁵, Marie Trkova⁸, Jan Stuchly^{1,2}, Martin Zimmermann⁹, Paola De Lorenzo¹⁰, Maria Grazia Valsecchi¹⁰, Valentino Conter¹¹, Jan Stary^{2,3}, Martin Schrappe⁴, Andrea Biondi¹¹, Jan Trka^{1,2,3}, Marketa Zaliwova^{1,2,3}, Giovanni Cazzaniga^{5,12} and Gunnar Cario⁴

¹CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague), Prague, Czech Republic;

²Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; ³University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; ⁴Pediatrics, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany; ⁵Tettamanti Research Center, Pediatrics, University of Milano-Bicocca/Fondazione Tettamanti, Monza, Italy; ⁶Department of Human Genetics, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁷Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany; ⁸Centre for Medical Genetics and Reproductive Medicine GENNET, Prague, Czech Republic; ⁹Department of Pediatric Hematology and Oncology, Medical School Hannover, Hannover, Germany; ¹⁰EsPhALL Trial Data Center, School of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy; ¹¹Pediatric Hemato-Oncology, Fondazione MBBM/ASST-Monza, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy; ¹²Medical Genetics, School of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy.

Úvod:

Fúzní gen BCR::ABL1 je charakteristickým znakem chronické myeloidní leukémie (CML), ale vyskytuje se také u akutní lymfoblastické leukémie (ALL). V dětském věku jsou CML a BCR::ABL1-pozitivní ALL relativně vzácné a mají podobnou incidenci (přibližně 1 : 1 000 000), přičemž jejich výskyt se zvyšuje s věkem (zejména u CML) (1, 2). Na základě běžných diagnostických kritérií nemusí být BCR::ABL1 pozitivní ALL odlišitelná od CML v lymfoidní blastické krizi (LBC).

Přístup ke sledování minimální reziduální nemoci (MRN) se liší podle diagnózy, věku a místní zavedené praxe. U CML je téměř výhradně exprimován fúzní transkript Major-BCR::ABL1 (kódující protein p210) a jeho hladiny se hodnotí pomocí kvantitativní reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR); používá se absolutní kvantifikace kopií transkriptu a mezinárodní škála „international scale“, která umožňuje porovnávat hladiny MRN mezi různými laboratořemi (3). U ALL se za zlatý standard obvykle považuje kvantifikace klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny (IG) a T-buněčné receptory (TR) na úrovni DNA nebo sledování leukemického imunofenotypu pomocí průtokové cytometrie, zejména u dětí (4, 5); v některých protokolech pro ALL dospělých se však používá qRT-PCR zaměřená buď na fúzní transkript Major- nebo minor-BCR::ABL1 (druhý jmenovaný, kódující protein p190, je u ALL častější) (6). U ALL se úroveň MRN obvykle hodnotí vůči diagnóze, ve které považujeme hladinu MRN za 100 %. Ačkoli je rychlost poklesu MRN v časných fázích léčby považována za jeden z nejdůležitějších prognostických znaků u ALL obecně (7), její prognostický dopad u BCR::ABL1-pozitivní ALL je méně jasný, zejména v éře léčby využívající tyrozin-kinázové inhibitory (TKI) (4).

V našich předchozích studiích (8-10) jsme využili genomické fúze BCR::ABL1 a pacient-specifické přestavby IG/TR pro qPCR monitorování MRN (obojí na úrovni DNA, abychom eliminovali nevýhody spojené s vysokou variabilitou exprese BCR::ABL1 m-RNA jak při diagnóze, tak během léčby TKI) a prokázali jsme, že u 20-30 % dětí s diagnózou BCR::ABL1-pozitivní ALL je fúze BCR::ABL1 přítomna v širším klonu, zahrnujícím myeloidní buňky, non-ALL B-buňky a T-buňky (viz obrázek 1). To vede k rozdílným hladinám MRN hodnoceným pomocí kvantifikace dvou výše zmíněných dostupných cílů MRN – přestaveb IG/TR a fúze BCR::ABL1. Vzhledem k tomu, že případy s více-liniovým postižením BCR::ABL1 připomínají LBC-CML, nazvali jsme tyto leukémie „CML-like“, lišící se od „typické (BCR::ABL1-pozitivní) ALL“.

Metody:

Pro odhalení biologických a klinických rozdílů mezi oběma podtypy jsme retrospektivně analyzovali prognostický význam MRN a dalších znaků u 147 dětí



s BCR::ABL1-pozitivní ALL léčených podle EsPhALL (n = 133) nebo jiných (n = 14) protokolů. MRN byla hodnocena ve 364 vzorcích kostní dřeně ze tří časných časových bodů léčby (D15, n = 86; TP1 - konec indukce IA, n = 136; TP2 - konec konsolidace IB, n = 142) pomocí sledování genomických zlomů BCR::ABL1 a klonálních přestaveb IG/TR na úrovni DNA.

Kvantifikace pacient-specifických přestaveb IG/TR byla provedena a interpretována podle standardů mezinárodní skupiny EuroMRD (5). Genomické zlomy BCR::ABL1 byly detekovány buď pomocí multiplexní long-distance PCR (8), nebo pomocí „target-enrichment“ sekvenování s použitím vlastního designu sond (10). Pro vlastní sledování MRN byly navrženy primery amplifikující fúzní sekvenci a sonda pokrývající sekvenci zlomu. Výsledky MRN byly hodnoceny jako shodné, pokud byla odchylka mezi hladinami IG/TR a BCR::ABL1 ≤ 1 řád.

Výsledky:

Přestože celková prognóza CML-like (n = 48) a typické BCR::ABL1 pozitivní ALL (n = 99) byla podobná (5-letý EFS 60 % a 49 %; 5-leté celkové přežití 75 % a 73 %), typická ALL vykazovala více relapsů (12/48 vs. 42/99; p = 0,046), zatímco CML-like pacienti častěji umírali v první remisi (6/48 vs. 3/99; p = 0,059 pro počet úmrtí v 1. CR celkově a p = 0,01 pro počet úmrtí v 1. CR z celkového počtu úmrtí).

Analýza hladin MRN u obou podtypů ukázala, že zatímco u pacientů s CML-like podle očekávání pomaleji ustupovaly BCR::ABL1-pozitivní buňky, při kvantifikaci IG/TR vykazovali CML-like pacienti významně rychlejší redukci MRN než pacienti s typickou BCR::ABL1 pozitivní ALL (p < 0,001). MRN měřená ve standardních časových bodech léčby (TP1, TP2) měla u typické BCR::ABL1-pozitivní ALL vysokou prognostickou hodnotu. Naproti tomu u pacientů s CML-like nebyl prognostický vliv MRN významný v žádném časovém bodě léčby a hladina MRN se tedy pro rizikovou stratifikaci léčby ukázala jako nepoužitelná (viz obrázek 2).

Ačkoli diagnostický počet bílých krvinek byl v obou podskupinách podobný, vliv hyperleukocytózy $\geq 50 \times 10^9/l$ na přežití byl opět vysoce významný u typické ALL (a zůstal významný i v multivariantských analýzách, byl tedy patrný i u pacientů s rychlým poklesem MRN), ale u pacientů CML-like nebyl zjištěn žádný prognostický vliv. Žádný prognostický význam neměl ani typ transkriptu BCR::ABL1 (minor/p190 vs. major/p210), delece genu IKZF1, pohlaví či věk v době diagnózy (< 10 vs. ≥ 10 let).

Časnější zahájení kontinuální léčby TKI (15. den vs. 33. den) bylo spojeno s nižšími hladinami MRN u typické BCR::ABL1-pozitivní ALL, ale ne u pacientů s CML-like - mělo však tendenci (byť statisticky nesignifikantní) vést k lepšímu pětiletému přežití u obou podtypů (78 % vs. 67 %; p = 0,082 a 83 % vs. 60 %; p = 0,066 pro typickou ALL respektive CML-like).

Závěry:

Naše výsledky ukazují, že na rozdíl od typické BCR::ABL1-pozitivní ALL, u CML-like leukémií v současné době neexistuje žádný relevantní silný prognostický marker, který by mohl být použit pro predikci úspěšnosti léčby a/nebo úpravu terapie. Také otázka časně transplantace v 1. remisi zůstává otevřená - na jedné straně může být za vhodný považován přístup, podle kterého by pacienti s CML-like leukémií měli být léčeni chemoterapií plus TKI a ti, kteří zrelabují, by měli být transplantováni - s reálnou šancí na vyléčení ve 2. remisi. Na druhou stranu byla úmrtnost související s léčbou u CML-like pacientů při vysoce intenzivní chemoterapii velmi vysoká. V budoucích klinických studiích by mělo být zvaženo a posouzeno, zda by snížení toxicity (např. nahrazením části chemoterapie v první linii imunoterapií zaměřenou na plně leukemický klon B-buněk) případně následované časnou transplantací (brzy po dosažení IG/TR negativity) mohlo zabránit významné části úmrtí souvisejících s intenzivní chemoterapií.

Dokud neshromáždíme podrobné biologické údaje, můžeme atraktivní otázku, zda je CML-like onemocnění ve skutečnosti běžnou CML v lymfoidní blastické krizi, nebo zda existuje širší spektrum BCR::ABL1 pozitivních leukémií



lišících se např. buňkou původu a biologickými charakteristikami, považovat spíše za akademickou. Pokud bychom však chtěli dát mezi CML-like a CML rovnítko, musíme CML do jisté míry předefinovat jako onemocnění, které se - přinejmenším v dětství - velmi často prezentuje v LBC a s fúzní variantou minor-BCR::ABL1/p190.

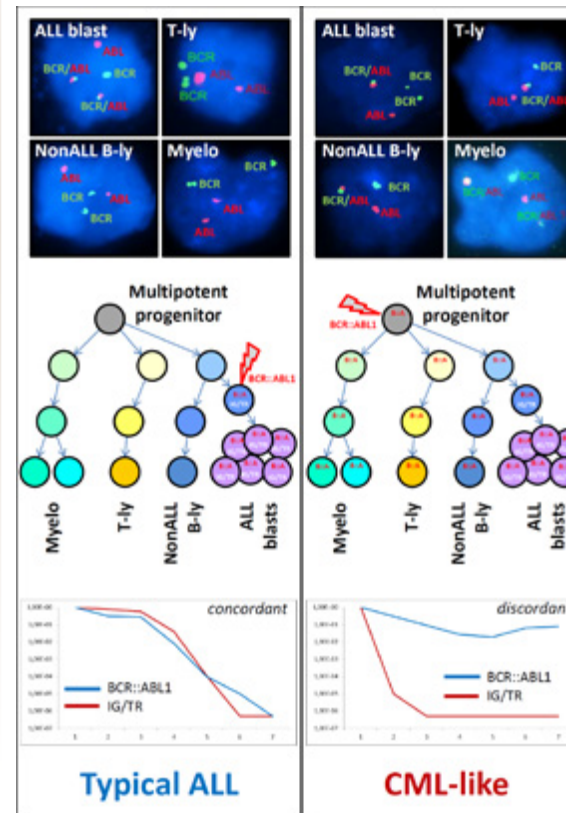
Závěrem lze naše data shrnout tak, že ačkoli se klinicky při diagnóze projevují identicky, ve skutečnosti existují dva biologicky odlišné podtypy BCR::ABL1-pozitivní ALL - typická BCR::ABL1-pozitivní ALL a CML-like leukémie. Rozdílná biologie se odráží v odpovědi na léčbu, a přestože celková míra přežití obou podtypů je na současném protokolu podobná, klíčové důvody selhání léčby jsou odlišné - relapsy u typické ALL a toxicita intenzivní léčby u pacientů s CML-like onemocněním. Včasné rozlišení obou podtypů je tedy zásadní pro umožnění optimálního léčebného přístupu a stratifikaci terapie v nadcházejících studiích. U typické BCR::ABL1-pozitivní ALL mohou být doporučeny TKI současně s chemoterapií s intenzitou léčby přizpůsobenou riziku; u CML-like onemocnění, které představuje čtvrtinu až třetinu dětských pacientů s diagnózou BCR::ABL1-pozitivní ALL, nebyl dosud nalezen žádný relevantní rizikový faktor použitelný pro přizpůsobení terapie.

Reference:

1. Suttorp M, et al. 2021. *Cancers (Basel)* 13: 798.
2. Hunger SP, et al. 2011. *Pediatr Blood Cancer* 56: 984-93.
3. Cross NC, et al. 2015. *Leukemia* 29: 999-1003.
4. Cazzaniga G, et al. 2018. *Haematologica* 103: 107-15.
5. van der Velden VH, et al. 2007. *Leukemia* 21: 604-11.
6. Ravandi F, et al. 2013. *Blood* 122: 1214-21.
7. Conter V, et al. 2010. *Blood* 115: 3206-14.
8. Hovorkova L, et al. 2017. *Blood* 129: 2771-81.
9. Zaliova M, et al. 2009. *Leukemia* 23: 944-51.
10. Zuna J, et al. 2022. *Leukemia* 36: 2793-801.

Obrázek 1 - Schematické znázornění hlavních rozdílů mezi „typickou (BCR::ABL pozitivní) ALL“ a „CML-like“ nemocí. (podle Zuna et al., *Leukemia* 2022):

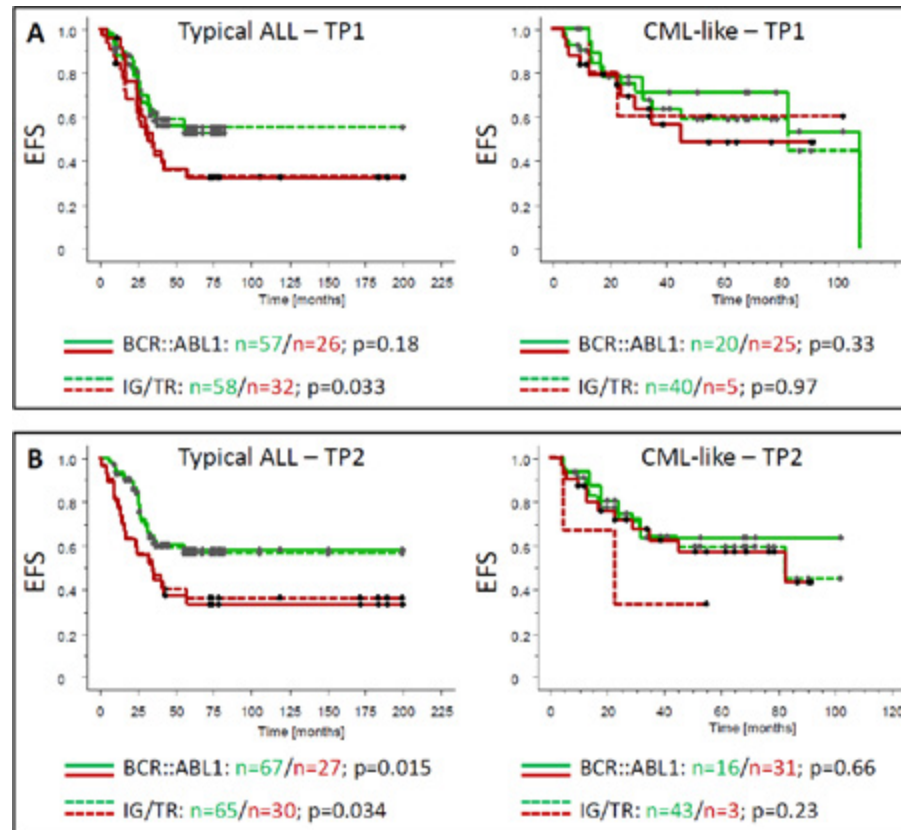
Ilustrativní schéma znázorňující zásadní rozdíly mezi typickou BCR::ABL1-pozitivní ALL a CML-like onemocněním v oblasti FISH, liniového/klonálního postižení a průběhu MRN měřeného pomocí IG/TR a přístupu založeného na BCR::ABL1 DNA. Myelo = myeloidní linie; T-ly = T-lymfoidní linie; NonALL B-ly = B-lymfoidní linie mimo klon ALL; B::A = BCR::ABL1; IG/TR = klonální přestavba leukemicky specifického imunoreceptorového genu.





Obrázek 2 - Výsledky podle úrovně MRN v TP1 a TP2. (podle Zuna et al., *Leukemia* 2022):

Křivky přežití všech pacientů podle podtypu a MRN měřené pomocí BCR::ABL1 (plné čáry) a IG/TR (čárkované čáry). A: EFS podle TP1 MRN $< 10^{-2}$ (zeleně) vs. $\geq 10^{-2}$ (červeně); B: EFS podle TP2 MRN $< 10^{-3}$ (zeleně) vs. $\geq 10^{-3}$ (červeně).



E02

Ph- NEGATIVNÍ MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ NA ASH 2022

Petra Bělohávková

IV. Interní hematologická klinika, FN a LF Hradec Králové

Na 64. výročním sjezdu ASH v New Orleans bylo prezentováno v pěti ústních a šesti posterových sekcích velké množství sdělení zaměřených na problematiku Ph-negativních myeloproliferativních neoplazií (MPN). V diagnostice či určování prognostických faktorů nebyly prezentovány žádné zásadní novinky, v několika sděleních byla zdůrazněna důležitost vyšetřování molekulárního stavu pacienta a jejího vlivu na prognózu. Trendem je vyšetřování vývoje kvantity nálože JAK2 mutace během léčby polycytemia vera (PV) interferonem nebo ruxolitinem (RUXO). Tato problematika ve vztahu k přežití byla diskutována ve dvou sděleních. Shodně v obou pracích byl prokázán vliv snížení alelické nálože JAK2 mutace na progresi do sekundární myelofibrózy, nebyl však prokázán vliv na celkové přežití (Abu-Zeinah et al., abstrakt č. 741; Guglielmelli et al., abstrakt č. 3034). Podle ELN doporučení pro léčbu PV z roku 2021 je u části pacientů nízkého rizika indikováno zahájení cytoredukční léčby. K tomuto názoru také přispěly výsledky italské studie fáze II hodnotící léčbu ropeginterferonem (ROPEG) u low-PV. Ve studii 63 nemocných mělo venepunkce + ASA a 64 nemocných bylo léčeno ROPEG + ASA. Nemocní na léčbě ROPEG měli statisticky významně lépe kontrolovaný hematokrit s redukcí počtu venepunkcí, dále dosáhli regrese velikosti sleziny a snížení symptomů choroby. Léčba byla dobře tolerována a pouze 7 (8%) nemocných ukončilo léčbu z důvodu nežádoucích účinků (Barbui et al., abstrakt č. 744). Ve studii MAJIC byl hodnocen efekt léčby RUXO u nemocných s PV, kteří byli rezistentní či intolerantní k léčbě hydroxyureou. Zařazeno bylo 180 pacientů s následnou randomizací 1:1 (95 RUXO; 95 BAT). Kompletní remisi (CR) ve 12 měsících (M) dosáhlo 43% pacientů na RUXO vs. 26% pacientů s BAT. Na léčbě RUXO byla u nemocných zjištěna významná redukce trombotických událostí a lepší přežití bez události (velké trombózy, krvácení, transformace a úmrtí). Během léčby RUXO také dochází k prohlubování molekulární odpovědi a při posledním hodnocení byla



VAF redukce >50% u 56% pacientů vs. 25% léčených ve větví BAT. Nové nežádoucí účinky nebyly při léčbě RUXO zaznamenány, opět se objevil vyšší výskyt virových infekcí a kožních nádorů oproti rameni s BAT (9% a 14%) (Harrison et al, abstrakt č. 739). Další zkušenosti s RUXO u MPN byly prezentovány v rámci výsledků studie RuxoBEAT, do které byli zařazeni i nemocní s ET. Z těchto 95 nemocných bylo 43 léčeno RUXO a 52 nemocných BAT. Byly zde prezentovány první výsledky po 6M léčbě. Bylo zjištěno, že léčba RUXO významně redukuje počet trombocytů a leukocytů, hemoglobin a velikost sleziny. Ze symptomů má léčba RUXO pozitivní vliv na svědění kůže, koncentraci, ne však na bolest hlavy a závratě. Výskyt nežádoucích účinků všech stupňů v obou ramenech byl srovnatelný. První analýzy tedy ukázaly, že dosažení CR na léčbě RUXO je srovnatelné s BAT, avšak studie nadále probíhá a budou zajímavé výsledky s delší dobou sledování (Koschmieder et al, abstrakt č. 742). Další významnou kapitolu nových léčebných možností přinesla sdělení věnovaná léčbě primární myelofibrózy (PMF). U části pacientů s PMF představuje hlavní léčebný problém anémie. Z tohoto důvodu jsou zajímavé výsledky studie fáze III MOMENTUM, do které byli zařazováni nemocní dříve léčení JAK inhibitory se symptomatickou anémií. Do studie bylo zařazeno 195 pacientů, kdy 130 pacientů užívalo momelotinib (MMB) 200 mg/die a 65 pacientů danazol (DAN) 600mg/die. Po 24M zůstává na léčbě z ramene MMB 72% pacientů vs. 58,8% pacientů v rameni s DAN. Transfuzní nezávislost (TI) byla dosažena u 31% pacientů s MMB vs. 20% DAN, snížení celkových projevů choroby (TSS) bylo přítomno u 25% pacientů s MMB vs. 9% s DAN. U nemocných s MMB, kteří dosáhli TI ve 24M, bylo prokázáno lepší celkové přežití. K ovlivnění anémie dochází prostřednictvím inhibice receptoru AVCR1 a snížení hepcidinu (Gerds et al, abstrakt č. 627). Dalším preparátem, který je potentním ACVR1 inhibítoem a cílí tedy na stejnou skupinu anemických PMF pacientů, je pacritinib (PACR). Na ASH byly prezentovány závěry ze studie PERSIST-2, která hodnotila efekt léčby 200mg PACR (42 pacientů) či BAT (44 pacientů). Podle Gale kriterií je TI hodnocena jako absence transfuze po dobu 12 týdnů a bylo jí dosaženo u 37% pacientů v rameni s PACR vs. pouze 7% pacientů s BAT. Kromě této TI celkově 49% pacientů s PACR dosáhlo >50% redukce potřeby transfuzí. Ve studii byl rovněž hodnocen efekt preparátu na inhibici ACVR1, kdy se prokázalo, že inhibice pacritinibem je až

4 x silnější oproti inhibici momelotinibem (T Oh et al, abstrakt č. 628). Dalším trendem léčby PMF je kombinovaná léčba, nejčastěji se jedná o kombinaci ruxolitinu s novými preparáty modifikujícími PMF na jiném cílovém místě. Ve studii REFINE byl v léčbě 32 naivních PMF pacientů k RUXO přidán navitoclax v úvodní dávce 200mg/die, který je potentním inhibítoem Bcl-2 rodiny. Efekt na velikost sleziny SVR35 po 24 týdnech léčby byl přítomen u 59% pacientů s primární PMF a 67% se sekundární PMF. Lepšího efektu dále dosáhli nemocní mladší 65 let vs. starší (89% vs. 53%) a také nemocní s DIPSS středním-1 nebo středním-2 rizikem oproti vysokým rizikem (67%; 63% vs. 33%). Zlepšení stupně fibrózy ≥ 1 stupeň bylo dosaženo u 35% hodnotitelných pacientů. Redukce nálože JAK2 >50% byla dosažena u 36% nemocných (Passamonti et al, abstrakt č. 237). Studie fáze II MANIFEST-2 prezentuje výsledky 84 naivních PMF pacientů, u kterých je RUXO kombinován s pelabresibem (BET inhibitor regulující NF- κ B geny; PELA). Medián dávky RUXO je 10mg/2x denně a 125mg PELA. Zmenšení velikosti sleziny o $\geq 35\%$ ve 24. týdnu bylo dosaženo u 68% pacientů, ale celkově dosáhlo této odpovědi 80% pacientů. Redukce symptomů TSS50 byla dosažena u 56% pacientů. Zlepšení stupně fibrózy ≥ 1 stupeň bylo prokázáno u 28% hodnotitelných pacientů. Nejčastější nežádoucí účinek představuje rozvoje trombocytopenie (všechny stupně 52%; stupeň ≥ 3 12%). Byly tedy prokázány velmi nadějně efekty kombinace RUXO a PELA, což vedlo k zahájení studie fáze III (Mascarenhas et al, abstrakt č. 238). Poslední citované sdělení se věnuje výsledkům studie fáze II PATHFINDER, kde byl hodnocen efekt léčby avapritinibem u pokročilé systémové mastocytózy. Do této studie bylo zařazeno 107 nemocných, z nichž 25 nemocných bylo léčeno preparátem v první linii. Celková léčebná odpověď u této podskupiny byla přítomna u 84% pacientů, 32% pacientů dosáhlo CR nebo CRh (CR s hematologickým zlepšením). Ve dřeni bylo dosaženo $\geq 50\%$ redukce nálože chorobou u 84% pacientů a 95% pacientů mělo $\geq 50\%$ pokles hladiny tryptázy. K nejčastějším nežádoucím účinkům patřil rozvoj periorbitálního nebo periferního otoku (52,6% a 36,8%) a rozvoj trombocytopenie (44,7%). Dosažení celkového přežití ve 12M bylo 96% a v 24M 88%. Avratinib představuje vysoce účinný preparát pro léčbu první linie všech typů systémové mastocytózy (Radia et al, abstrakt č. 238).

**E03****TERAPIE AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE STARŠÍCH NEMOCNÝCH NEVHODNÝCH K INTENZIVNÍ TERAPII - NOVINKY A CO PŘINESL ASH 2022**

Anna Jonášová

*I. interní klinika - klinika hematologie**Všeobecná fakultní nemocnice a I. lékařská fakulta UK, Praha*

Terapie akutní myeloidní leukemie (AML) u starších nemocných, kteří nejsou kandidáti intenzivní terapie a allogenní transplantace, tj. jediné léčby vedoucí k vyléčení nemocných je zatím stále výzvou. AML je nejčastější formou akutní leukemie u dospělých s mediánem věku v době diagnózy 68 let, přičemž 1/3 nově diagnostikovaných pacientů je ve věku ≥ 75 let. (1,2). Výskyt AML se zvyšuje s tím, jak populace stárne, a léčba starších pacientů zůstává náročná (3,4). Více než 50 % pacientů s AML je nevhodných pro intenzivní chemoterapeutické režimy z důvodu věku, nedobrého celkového stavu (PS-performance status) a/nebo komorbidit (3). Historické údaje u pacientů považovaných za nevhodné pro intenzivní chemoterapii ukazují, že přežití bylo přibližně 5-6 měsíců (4).

Vedle rozdílů ve faktorech, které charakterizují starší nemocné (věk, komorbidit, špatný PS), mezi mladšími a staršími AML existuje rozdíl v biologii onemocnění (5). U starších pacientů s AML se častěji vyskytuje nepříznivá cytogenetika nebo prognosticky negativní molekulární abnormality a větší podíl pacientů má AML související s terapií (tAML) nebo sekundární AML (sAML) (6,7). Mezi často mutované geny patří mutace v TP53 a chromatin-spliceosomových genech, jako jsou SRSF2 a ASXL1, které jsou nezávisle a aditivně spojeny se špatným výsledkem (7). Naopak frekvence příznivé cytogenetiky a mutací, jako je NPM1, je u starších AML výrazně nižší. Vzhledem ke všem výše uvedeným údajům je stále terapie AML u starších nemocných obtížná a je nutné hledat nové léčebné modalit. V souhrnu udáváme současné možnosti terapie těchto nemocných a novinky, které přinesl 64 meeting Americké hematologické společnosti (ASH 2022).

Současným standardem pro léčbu starších (> 75 let) a k intenzivní terapii nevhodných AML nemocných je kombinace hypometylační terapie (HMA) u nás reprezentované azacitidinem a venetoklaxu. Ta prokázala vynikající aktivitu s příznivou bezpečností, a to i u křehkých pacientů. Účinnost kombinace venetoklaxu s azacitidinem (aza + ven) byla studována ve studii VIALE-A (8). Tato randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrovaná studie fáze III prokázala zlepšení celkového přežívání (OS) u pacientů s AML, kteří nebyli kandidáti intenzivní chemoterapie ve srovnání se samotným azacitidinem. Medián OS se zvýšil z 9,6 na 14,7 měsíce a procento dosažené kompletní remise (CR) bylo významně vyšší u kombinace než u samotného azacitidinu (36,7 % vs. 17,9 %). Na ASH 2022 bylo několik prací věnovaných této kombinaci. Presentovaná byla data dlouhodobého sledování nemocných výše uvedené studie (9). U nemocných s CR a CRi s minimální residuální chorobou byl dosažen medián OS 34, 2 měsíců. Ve stejné analýze byla doložena významná aktivita aza+ven oproti samotnému aza u nemocných s IDH1/2 mutací. Čím více zkušeností s terapií aza + ven máme tím je jasnější, že udržení dávek nastavených ve studii pro vybranou studiovou populaci není vždy pro vysokou toxicitu u starších a křehkých nemocných možné. Zajímavé proto jsou výsledky studie Willekense et al. několika francouzských center používající redukováný cyklus 7+7 dní aza + ven s dosažením mediánu OS 12,8 měsíců, a to i u dosti rizikové populace této studie (10). Dalším nepříznivým aspektem kombinace aza+ven je podávání 7denního injekčního azacitidinu. Zajímavé proto jsou výsledky studie fáze 2 používající perorální preparát ASTX727 (cedazuridine/decitabine) v kombinaci s venetoclaxem (11). Překvapivě v této studii u relabovaných/refrakterních (R/R) nemocných nebyl dosažen medián OS. Tak jako před několika roky byl ve studiích pro kombinace základ azacitidinu tak se zdá, že nyní je snaha hledat novou cestu v trojkombinacích aza+ven a další preparát. Z trojkombinací byla nadějná data studie kombinace aza+ven+magrolimab (anti CD47-„do not eat me“ faktor). Kombinace nejen ukazuje vysokou efektivitu, ale je nadějí i pro nemocné s mutací TP53, což je jinak velmi terapeuticky svízelná skupina nemocných (12). Na povrchové antigeny leukemických blastů je též zaměřen další preparát Pivekimab Sunirine (konjugovaný preparát s anti CD123 protilátkou). Opět v kombinaci s aza+ven



vykazuje příznivou aktivitu i u nemocných R/R (13). Nelze nezmínit velmi nadějnou trojkombinaci s inhibítor tyrozinkinazy 3 (FLT3) Gilteritinibem pro nemocné s mutací *FLT3* s 95% CR u nemocných v primoterapii (14).

Co se inhibice mutací týče zajímavé jsou též výsledky práce sledující efekt v USA již povoleného Enasidenibu (IDH2 inhibitor) v monoterapii či při selhání monoterapie ještě možného dosažení efektu přidáním aza (15). Jde opět o snahu vystavit nemocné co nejdéle jen perorální terapii. Sem patří i zcela perorální trojkombinace s výbornými výsledky byt zatím malého souboru nemocných, a to kombinace venetoclaxu s ASTX727 (cedazuridine/decitabine) s inhibítor IDH1 či 2 (Ivosinedibem či Enasidenibem) (16). Mezi další nadějně preparáty patří také v kombinaci s aza ladademstat opět perorální preparát (17). Na ASH meetingu bylo zmíněno mnoho dalších preparátů v raných fázích klinického testování o jejichž dalším osudu se budeme dozvídat na nadcházejících meetinzích a jejichž popis ale přesahuje možnosti krátkého sdělení.

Přestože výše uvedené možnosti terapie mohou potencionálně ve srovnání s podpůrnou léčbou významně zlepšit přežití, ne všichni starší pacienti jsou schopni nebo chtějí léčbu podstoupit. Na volbu nemocného proto nesmíme zapomínat. Nesmíme ani zapomínat na kvalitní profesionální paliativní péči a psychologickou podporu těchto nemocných. Nicméně na druhé straně důležité je mít na paměti, že aktivní AML může přispívat ke špatnému PS a u některých pacientů může léčba zlepšit výkonnost a zvýšit schopnost pacienta tolerovat následnou léčbu a mít z ní prospěch. Je proto důležité pečlivě rozlišovat chronické komorbidity od přechodných a potenciálně zlepšitelných komplikací souvisejících s AML.

1. Cancer stat facts: leukemia—acute myeloid leukemia (AML) derived via <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aml.html>.
2. Vespa J, Medina L, Armstrong DM. Demographic turning points for the United States: population projections for 2020 to 2060. 2020.
3. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*. 2021;11(2):41.
4. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3481–3485.

5. Wass M, Hitz F, Schaffrath J, Muller-Tidow C, Muller LP. Value of different comorbidity indices for predicting outcome in patients with acute myeloid leukemia. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164587.

6. Rossi G, Pelizzari AM, Bellotti D et al. Cytogenetic analogy between myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia of elderly patients. *Leukemia*. 2000;14(4):636–641.

7. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209–2221.

8. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383(7):617–629.

9. Long-Term Follow-up of the Phase 3 Viale-a Clinical Trial of Venetoclax Plus Azacitidine for Patients with Untreated Acute Myeloid Leukemia Ineligible for Intensive Chemotherapy

Keith W. Pratz, Brian A. Jonas, Courtney D. DiNardo et al. *Blood* (2022) 140 (Supplement 1): 529–531.

10. Reduced Venetoclax Exposition to Seven Days of Azacitidine Is Efficient in Treatment-Naïve Patients with Acute Myeloid Leukemia. Christophe Willekens, Samy Chraïbi, Justine Decroocq et al., *Blood* (2022) 140 (Supplement 1): 537–538

11. Phase 2 Study of ASTX727 (cedazuridine/decitabine) Plus Venetoclax in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) or Previously Untreated, Elderly Patients with AML Unfit for Chemotherapy. Tareq Abuasab, Guillermo Garcia-Manero, Nicholas Short et al. *Blood* (2022) 140 (Supplement 1): 3324–3326.

12. Phase I/II Study of Azacitidine (AZA) with Venetoclax (VEN) and Magrolimab (Magro) in Patients (pts) with Newly Diagnosed (ND) Older/Unfit or High-Risk Acute Myeloid Leukemia (AML) and Relapsed/Refractory (R/R) AML. Naval Daver, Jayastu Senapati, Hagop Kantarjian et al. *Blood* (2022) 140 (Supplement 1): 141–144.

13. Broad Activity for the Pivekimab Sunirine (PVEK, IMG632), Azacitidine, and Venetoclax Triplet in High-Risk Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML)



Naval Daver, Pau Montesinos, Ahmed Aribi et al. *Blood* (2022) 140 (Supplement 1): 145–149.

14. Updated Results from a Phase I/II Study of the Triplet Combination of Azacitidine, Venetoclax and Gilteritinib for Patients with *FLT3*-Mutated Acute Myeloid Leukemia

Nicholas Short, Courtney D. DiNardo, Farhad Ravandi et al. *Blood* (2022) 140 (Supplement 1): 2007–2009.

15. A Risk-Adapted Study to Assess the Efficacy of Enasidenib and Subsequent Response-Driven Addition of Azacitidine for Newly Diagnosed *IDH2*-Mutant AML Patients: 3-Year Follow-up. Eytan Stein, Sheng F Cai, Ying Huang et al. *Blood* (2022) 140 (Supplement 1): 2016–2019

16. Phase Ib/2 Study of Oral Decitabine/Cedazuridine (ASTX727) and Venetoclax in Combination with the Targeted Mutant *IDH1* Inhibitor Ivosidenib or the Targeted Mutant *IDH2* Inhibitor Enasidenib in *IDH* Mutated Acute Myeloid Leukemia. Himachandana Atluri, Abhishek Maiti, Koji Sasaki et al. *Blood* (2022) 140 (Supplement 1) Abstract No 2746.

17. Iadademstat Combination with Azacitidine Is a Safe and Effective Treatment in First Line Acute Myeloid Leukemia. Final Results of the Alice Trial Olga Salamero, Tim C.P Somerville, Antonietta Molero et al. *Blood* (2022) 140 (Supplement 1): 1711–1713.

E04

I ANÉMIE - ASH 2022

Jaroslav Čermák

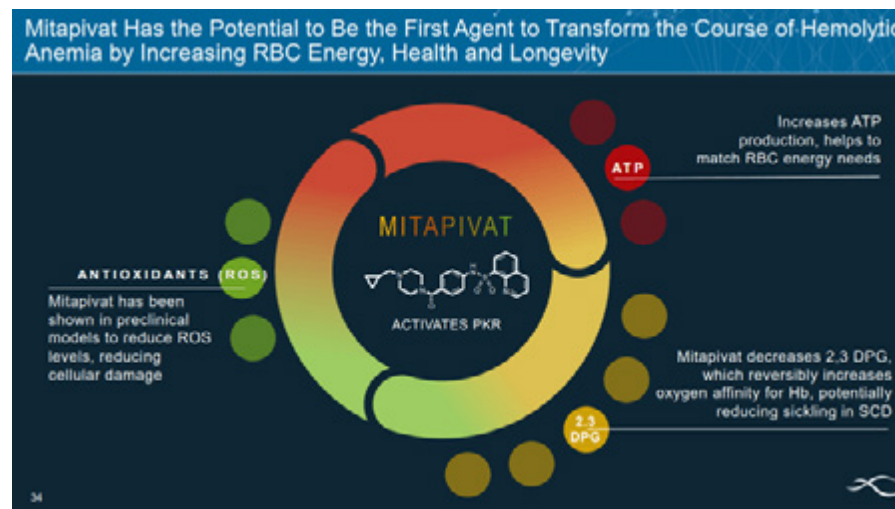
Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

64. výroční kongres Americké hematologické společnosti přinesl řadu příspěvků týkajících se nových přístupů k léčbě anemií. Novinky se týkaly zejména následujících okruhů léčby: stimulace energetického potenciálu červených krvinek u nemocných, kde je přítomen jeho deficit, nových přístupů k ovlivnění imunitní dysregulace hrající roli v patogenezi aplastické anémie, užití inhibitorů iniciálních složek komplementu v léčbě hemolytických stavů

a další rozvoj genové terapie hemoglobinopatií a některých dalších vrozených chorob krvetvorby.

Mitapivat (Pyrukynd®) je látka vážící se na tetramer genů pro isoenzym R pyruvát kinázy, dochází ke zvýšení aktivity enzymu, tvorby ATP a k snížení energetického deficitu buňky.

Obr.1 Účinek mitapivatu na metabolismus erytrocytu.



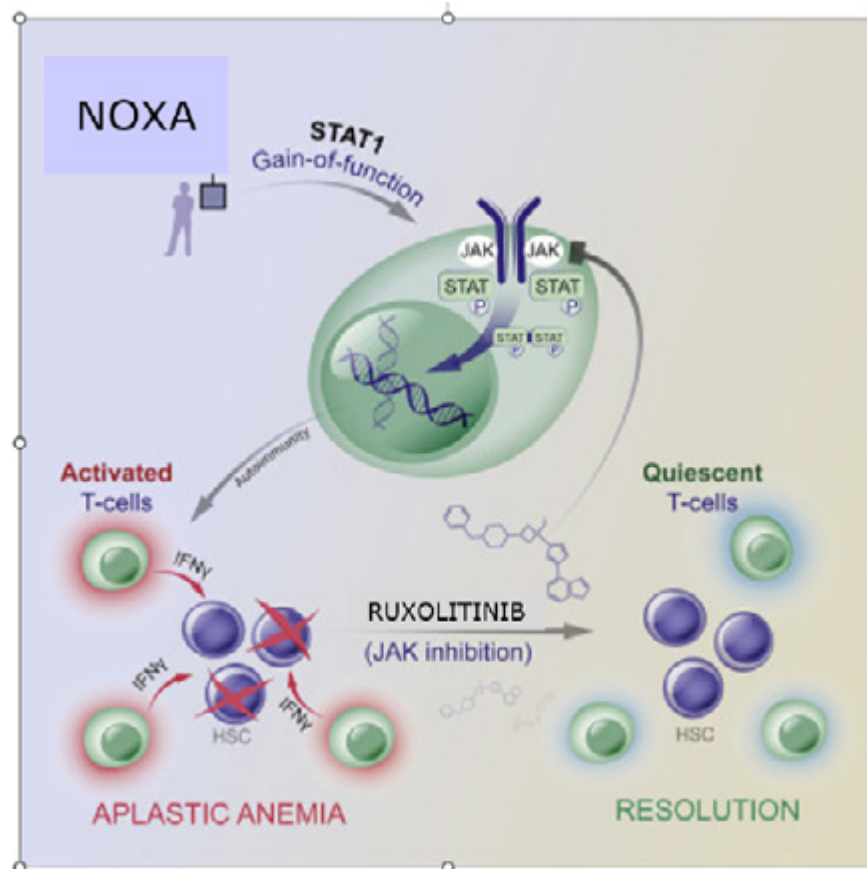
K tomu přispívá i zvýšení hladiny 2,3 DPG a snížení afinity Hb k O₂. Studie podávání léku nemocným s deficitem pyruvát kinázy v prodloužené fázi iniciačních studií ACTIVATE a ACTIVATE-T po dobu 3 let ukázala trvalý vzestup hodnot Hb > 15 g/l u 40% nemocných (**Grace - # 2328**) a ústup obtíží (únava, dušnost, ikterus slabost) (**Kuo - # 506**). Jaterní biopsie současně prokázala pokles zásobního železa spolu se zvýšením hladiny hepcidinu v séru (**Kuo - # 1021**). U nemocných s alfa či beta thalasemií nezávislých na transfuzích vedlo podávání mitapivatu k průměrnému vzestupu hladiny Hb o ≥ 13 g/l. (**Kuo - # 1030**). Studie in vitro u srpkovité anémie ukázaly zvýšení afinity k O₂, zvýšení



deformability a snížení srpkovatění erytrocytů (**Joly - # 8**), (**Lundt - # 1044**). AG 946 je derivátem mitapivatu, u něhož byla krom stimulace energetických zásob prokázán i diferenciacní efekt na buňky erytroidní řady. Byla zahájena studie fáze II. podávání AG 946 nemocným s MDS s nízkým rizikem, Hb < 110 g/l a < 3 TU erytrocytů/16 týdnů (**Al-Samkari - # 1773**).

Řada studií se věnovala výzkumu chronického zánětlivého mikroprostředí a abnormální aktivace některých subpopulací T lymfocytů a jejich úloze v patogenezi selhání kostní dřeně (**Zhang - # 195**), (**Pool - # 196**). Bylo prokázáno, že na destrukci progenitorových buněk se při rozvoji selhání kostní dřeně podílejí některé subpopulace cytotoxických T lymfocytů, jež infiltrují kostní dřeň, proliferují a vyvolávají apoptózu hemopoetických progenitorů. Aktivace JAK/STAT signální dráhy zvyšuje potenciál cytotoxických CD8+T lymfocytů a autoreaktivních Th17 T lymfocytů indukujících tvorbu IFN γ a udržování chronického zánětlivého mikroprostředí. Inhibice JAK/STAT signální dráhy JAK 1/2 inhibitorem Ruxolitinibem vede na myších modelech k ochraně hemopoetických progenitorových buněk, k inhibici prozánětlivých cytokinů, stimulaci T regulačních lymfocytů, prevenci aplasie dřeně a k prodloužení přežití (**Groarke - # 193**) (Obr.2).

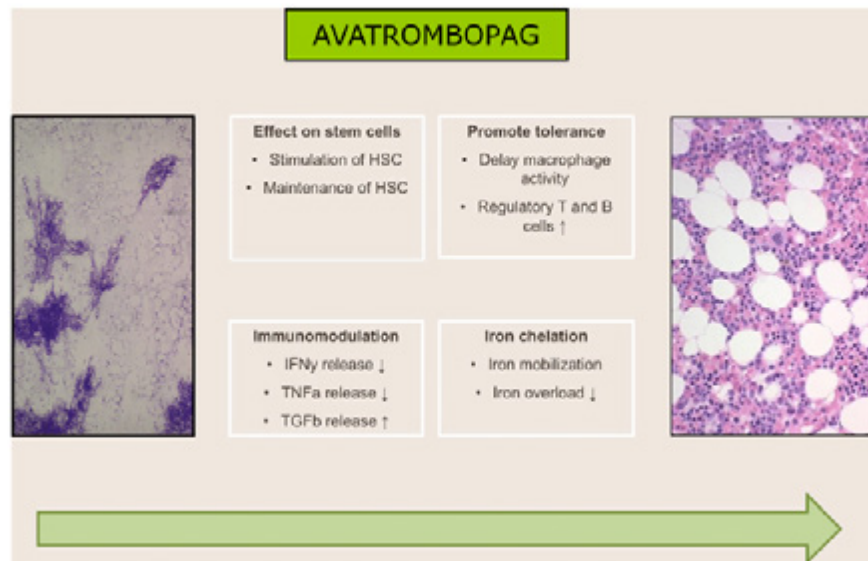
Obr.2 Předpokládaný efekt ruxolitinibu u selhání kostní dřeně





Avatrombopag (Doptelet®) je méně toxický díky nižšímu dávkování při lepší farmakokinetice než eltrombopag.

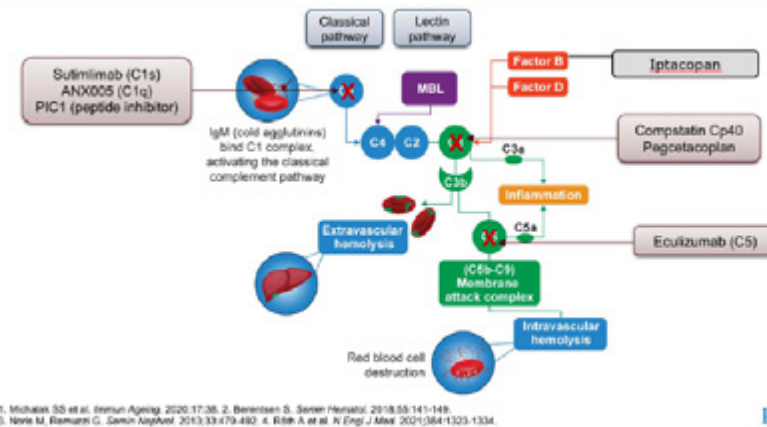
Obr.3 Mechanismus účinku avatrombopagu



Studie podání avatrombopagu v kombinaci s ATG a CS-A (**McQuilten - # 1252**), (**Zhao - # 1256**) v dávce 40-60mg denně po dobu 180 dní nemocným s těžkou aplastickou anémií vedlo k odpovědi u 65,2% nemocných, z toho 30,4% dosáhlo kompletní remise.

Sutimlimab (Enjaymo®) je humanizovaná myšičí monoklonální protilátka proti C1q složce komplementu.

Obr.4 Látky ovlivňující činnost komplementu v léčbě AIHA



Podávání netransfundovaným nemocným s chorobou z chladových aglutininů (CAD) ve stoupající dávce 0.5-7.5g 2x týdně vedlo k průměrnému vzestupu hodnot Hb na 118,6 g/l a k výraznému zlepšení kvality života (**Roth - # 31**) (**Roth - # 1201**), v současnosti probíhá obdobná studie i s pegcetacoplanem (Aspavelli®) (**Jilma - # 2333**). Jako **# LB-2** sdělení (**Pefault Delatour**) byly předneseny výsledky studie fáze III. podávání Iptacopanu (inhibitoru faktoru B) v dávce 200mg per os 2x denně po dobu 24 týdnů oproti eculizumabu či ravulizumabu nemocným s PNH, u 85% nemocných byl přítomen vzestup hodnot Hb o ≥ 20 g/l, kompletní remise bylo dosaženo u 70% nemocných ! Hodnocení prodloužené fáze studií fáze III. podávání pegcetacoplanu (do 96 týdnů léčby) ukázalo setrvávající průměrnou hodnotu Hb 116 g/l a normalizaci LD u 73% nemocných (**Patriquin - # 1248**). Podávání Vemircopanu (inhibitor faktoru D) vedlo k vzestupu Hb o 3,9 g/l a k průměrné hodnotě Hb 118 g/l (**Browett - # 294**).

Na sjezdu byla prezentována řada sdělení týkajících se preklinického výzkumu genové terapie a dále sdělení týkající se použití nových modifikací vektorů a editovaných genů na malém počtu nemocných Reprezentativní studie



hodnotící data 63 nemocných s beta thalasemií léčených genovou terapií v USA (**Walters - # 2348**) ukázala i po 7 letech po transdukcii HBB genu stabilitu vektoru a trvající transfuzní nezávislost u 89,5% nemocných.

Další literatura (abstrakta z ASH jsou uvedena pod číslem v textu):

Grace RF, Rose C, Layton DM et al.:
Safety and Efficacy of Mitapivat in Pyruvate Kinase Deficiency.
New Engl J Med 381;2019; 933-944.

Bhavisha A, Groarke EM, Lotter J et al.:
Long-term outcomes in patients with severe aplastic anemia treated with immunosuppression and eltrombopag – a phase 2 study.
Blood 139; 2022; 34-43.

Risitano AM,, de Latour P :
How we (,II) treat paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diving into the future.
Br J Haematol 196; 2022; 288-303.

Payne E :
Efficacy and Safety of Gene Therapy for β -Thalassemia.
New Engl J Med 386; 2022; 488-490.

E05

I IMUNITNÍ CYTOPENIE VE SVĚTLE NOVINEK Z ASH 2022

Eva Koniřová

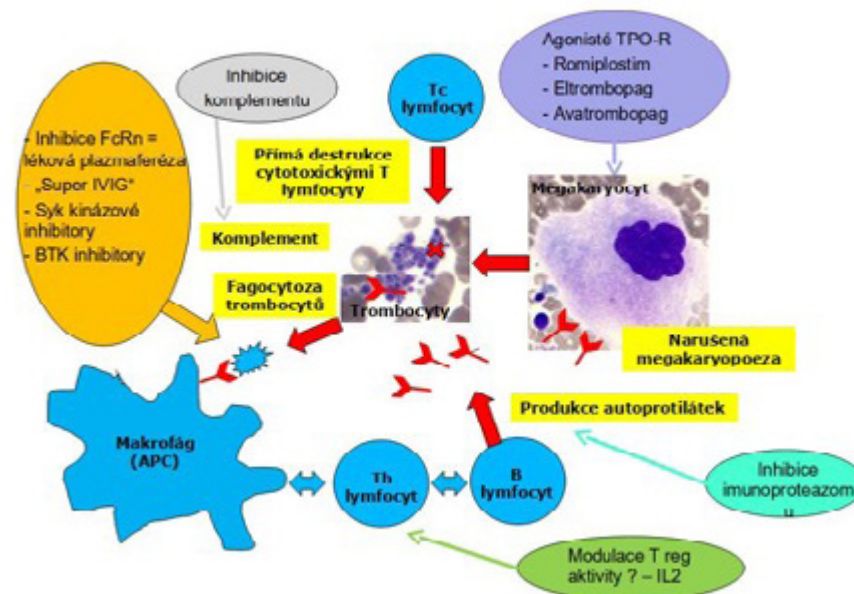
I. interní klinika – klinika hematologie 1. LF UK a VFN

V oblasti imunitních cytopenií lze v poslední době sledovat dvě zásadní témata. Se stále přibývajícím poznatky ohledně patofyziologie se objevují stále nové terapeutické modalitativ a incidence a léčba byla v posledních třech letech zásadně ovlivněna pandemií COVID19. Není tedy překvapivé, že nejzajímavější

sdělení na letošní konferenci Americké hematologické společnosti (ASH), byla prezentována právě v těchto dvou oblastech.

Aktuální doporučení a novinky v léčbě imunitní trombocytopenie (ITP)

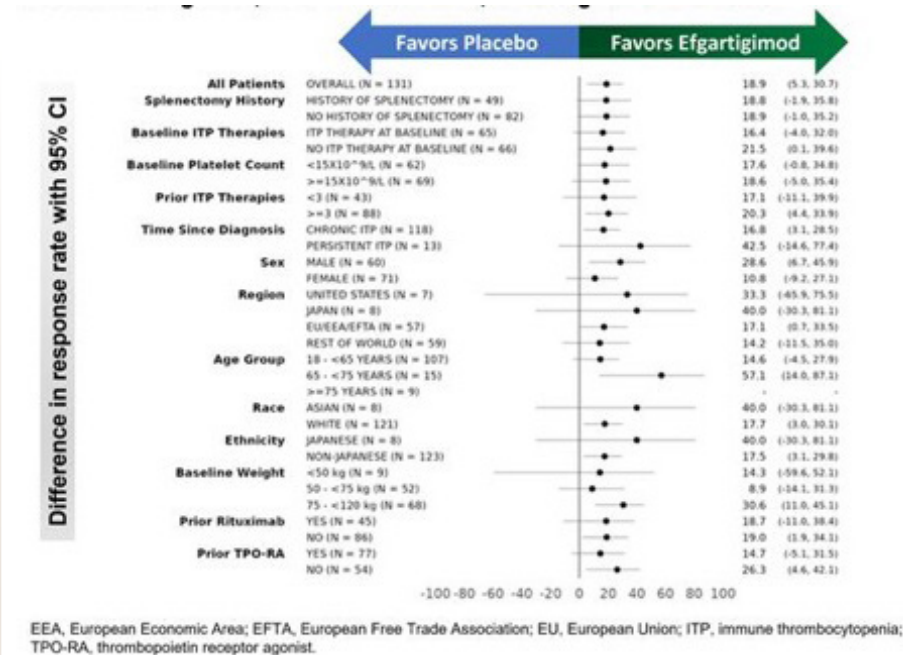
Terapie ITP je významně ovlivněna současným náhledem na patofyziologii, kdy se jedná o onemocnění spojené se zvýšenou destrukcí, ale také suboptimální produkcí trombocytů (obrázek 1).



Dle **aktuálních doporučení** jsou iniciální modalitou nadále kortikosteroidy, ale po co nejkratší dobu. V dalších liniích jsou pak preferovány agonisté trombopoetického receptoru (TPO-R) proti rituximabu, a to zejména tam, kde pacient upřednostňuje šanci na dlouhodobou odpověď. Naopak jednoznačný



je odklon od splenektomie.^{1,2} V případě refrakterního pacienta včetně agonisty TPO receptoru, je na prvním místě switch na jiný lék z této skupiny.³ Další možností je pak inhibitor splenické tyrosinkinázy (Syk) fostamatinib, který blokuje signální cestu vedoucí k fagocytóze trombocytů makrofágy. V randomizované studii bylo dosaženo response rate 43 %, stabilní odpovědi pouze 18 %, ale jednalo se o významně předléčenou populaci pacientů včetně agonistů TPO receptoru.⁴ **Pro multirefrakterní pacienty** je pak nutné zvažovat nové léky, zejména v rámci klinických studií. Řada nových léků funguje na úrovni zabránění zvýšené destrukci trombocytů, a to ovlivněním vazby protilátky na Fc receptor makrofágu nebo ovlivněním signální cesty vedoucí k fagocytóze trombocytů makrofágy. Do první skupiny patří také inhibitory neonatálního Fc receptoru (FcRn). Neonatální Fc receptor zabraňuje lysozomální degradaci IgG. Jeho inhibicí blokuje recyklaci a zvyšujeme clearance IgG, čímž navozujeme lékovou plazmaferézu. Na aktuálním kongresu ASH zaznělo sdělení prezentující **výsledky studie fáze 3 s inhibitorem FcRn Efgartigimodem (ADVANCE)**. Do této multicentrické, randomizované, placebo kontrolované studie bylo zařazeno celkem 113 dospělých pacientů s perzistentní (13) nebo chronickou (118) ITP s trombocyty pod $30 \times 10^9/L$. Pacienti byli randomizováni 2:1 (efgartigimod = 86, placebo = 45 pacientů). Jednalo se o pacienty s dlouhotrvající a významně předléčenou ITP, kdy medián doby od diagnózy byl 4,57 let a 67,2 % pacientů mělo minimálně tři předchozí linie léčby. Pacienti s efgartigimodem dosáhli ve srovnání s placebem časnější odpovědi, vyšší podíl trvající odpovědi (21,8 % vs 5 %) a více týdnů s trombocyty nad $50 \times 10^9/L$. Kritéria odpovědi IWG dosáhlo 51,2 % pacientů s efgartigimodem vs 20 % s placebem. Odpověď na terapii efgartigimodem byla bez ohledu na věk, pohlaví, závažnost ITP, čas od diagnózy či předchozí terapii (obrázek 2).



Efgartigimod byl dobře tolerován, bez identifikace nových nežádoucích účinků.⁵

Mezi léky ovlivňující signální cesty patří inhibitory Brutonovy tyrosinkinázy (BTK). BTK inhibitory novější generace nemají vliv na agregaci trombocytů, což umožňuje jejich použití u ITP. Další ze zajímavých sdělení na letošní konferenci ASH byla **analýza ze studie fáze 1/2 s rilzabrutinibem sledující klinické prediktory odpovědi**. Ze 45 pacientů na minimální identifikované účinné dávce rilzabrutinibu 400 mg 2x denně dosáhlo odpovědi 18 (40 %) pacientů. U významně předléčené populace pacientů byly jako signifikantní prediktory odpovědi identifikovány kratší trvání ITP a absence předchozí léčby rituximabem, ukazující větší šanci na odpověď u méně předléčené populace pacientů.⁶

**Aktuální doporučení a novinky v léčbě autoimunitní hemolytické anémie (AIHA)**

Současné možnosti terapie AIHA zahrnují kortikosteroidy, rituximab a imunosupresiva. Podobně jako u ITP je odklon od splenektomie, respektive je zařazována až po selhání dostupných medikamentózních modalit a je často také odmítána pacienty. U části pacientů není nemoc uspokojivě kontrolována a vyžadují dlouhodobou kortikoterapii spojenou s významnými nežádoucími účinky. Řada pacientů tak může profitovat z nových terapeutických možností dostupných v rámci klinických studií, výsledky některých z nich byly prezentovány na letošní ASH konferenci.

Fostamatinib je schválenou terapeutickou modalitou pro ITP a probíhají studie u AIHA s tepelnými protilátkami (wAIHA). Byly prezentovány výsledky randomizované studie fáze 3 FORWARD. Do studie byli zařazeni pacienti s wAIHA, u kterých selhala alespoň jedna předchozí linie terapie. Do studie bylo zařazeno 90 pacientů randomizovaných do ramene fostamatinib (n = 45) nebo placebo (n = 45). Medián věku byl 58 a 64 let a medián trvání wAIHA 1,7 a 2,6 roků. Primární endpoint trvající odpovědi hemoglobinu nebyl dosažen v celkové populaci, ale byl signifikantní v západních zemích (US, Kanadě, Austrálii a západoevropských zemích). Důvodem vysoké míry odpovědi na placebo v části populace byla vysoká míra použití záchranné medikace ve screeningovém období. Při reanalýze pouze západních zemí byla odpověď na fostamatinib vs placebo signifikantní (8/25 [32.0%] vs. 0/28, p=0.0021).⁷

Sutimlimab je inhibitor C1 klasické cesty komplementu a v současné době probíhají klinické studie u ITP i AIHA. Prezentovány byly výsledky pokračující fáze studie CADENZA. U pacientů s nemocí z chladových hemaglutininů IgM (CAD) vedla pokračující inhibice klasické cesty komplementu sutimlimabem nejen ke zlepšení hematologických parametrů, ale také snížení únavy a zlepšení kvality života, a to trvající po 26 týdnech i roce od zahájení terapie.⁸

Pandemie COVID19

Dle prezentovaných dat je SARS-CoV-2 rizikovým faktorem pro vznik ITP, kdy až 30 % nových diagnóz souvisí s infekcí či očkováním. Také více než 50 % relapsů souviselo se SARS-CoV-2 a to zejména s vakcinací. Přesto je vakcinace proti SARS-CoV-2 u pacientů s ITP doporučena a představuje neúčinnější ochranu proti infekci. Po všech dávkách by měli být pacienti hematologicky monitorováni.⁹ V diferenciální diagnostice postvaccinační trombocytopenie je nutné zvažovat vakcínou indukovanou trombotickou trombocytopenii (VITT) spojenou s vysokým rizikem tromboembolických komplikací.¹⁰

V době pandemie COVID-19 je snaha vyhnout se u nově diagnostikovaných či relabovaných pacientů imunosupresivní terapii a rituximabu v obavě ze zvýšeného rizika infekce a jejího závažnějšího průběhu. Díky tomu se u ITP ještě více urychlil posun agonistů TPO receptoru do časnějších fází onemocnění, resp. časnějších linií terapie. U pacientů s nově diagnostikovanou či relabovanou ITP jsou u COVID-19 negativních preferovanou modalitou agonisté TPO receptoru nebo kortikosteroidy, u COVID-19 pozitivních pak kortikosteroidy v nižší úvodní dávce s případnou eskalací.¹¹ Obecně jsou v 1. linii nebo časně doporučení agonisté TPO receptoru a v urgentních situacích IVIG.^{11,12}

Reference:

1. Provan D, et al. Blood Adv. 2019 Nov 26;3(22):3780-3817.
2. Neunert C, et al. Blood Adv. 2019 Dec 10;3(23):3829-3866.
3. Al-Samkari H, et al. BJH. 2022 May;197(3):359-366.
4. Bussel JB, et al. Am J Hematol. 2018;93(7):921-930.
5. Broome M, et al. ASH 2022. Abstr. 3.
6. Kuter DJ, et al. ASH 2022. Abstr. 2450.
7. Kuter DJ, et al. ASH 2022. Abstr. 1011.
8. Roeth A, et al. ASH 2022. Abstr. 31.
9. Auteri G, et al. ASH 2022. Abstr. 3761.
10. Hunt BJ. ASH 2022. Presidential Symposium.
11. Pavord S, et al. Br J Haematol. 2020 Jun;189(6):1038-1043.
12. COVID-19 and ITP: Frequently asked questions. Version 3.0 updated 18 May 2020.

**E06****I VYBRANÉ KRVÁČIVÉ STAVY – POST ASH 2022**

Jan Blatný

FN Brno a LF MU Brno

Když se řekne hematologie, velká část laiků i odborné veřejnosti si vybaví hematologii onkologickou. Ta je jistě velmi důležitou částí tohoto vědního a klinického oboru, ale neméně důležitá je i hematologie neonkologická, kam patří mimo jiné i poruchy krevního srážení. At už získané, nebo vrozené. Mnozí z nás si mlhavě vybaví obrázek koagulační kaskády z dob svých studií na medicíně. Ne všichni si však uvědomíme, že i v této oblasti v poslední době dochází k řadám změn, někdy v pravdě revolučních a že možnosti diagnostiky a léčby se posouvají za limity, které jsme si nedávno ani neuměli představit.

Genová léčba (GT) hemofilie

Genová léčba hemofilie spočívá nejčastěji v transfekci daného genu pomocí virového vektoru, většinou AAV (adeno-associated virus). Někdy je použit běžný gen pro daný faktor (FVIII u hemofilie A), někdy gen exprimující faktor se zvýšenou aktivitou (gain-of-function), např. tzv. „Padua“ varianta genu pro FIX (Hemofilie B). V současné době je registrován přípravek Roctavian pro genovou léčbu hemofilie A (EMA¹) a ve schalování je přípravek Hemgenix pro hemofilii B (CHMP doporučila podmíněně schválení²). Efekt léčby je však zejména u hemofilie A s velkým interindividuálním rozdílem a dochází k jeho progresivnímu snížení v čase³. U hemofilie B jsou obě tyto variability signifikantně nižší⁴.

V současné době je řešen zejména systém úhrady takové léčby⁵ ale také její indikace. V průběhu jednoho ze symposií věnovaných genové léčbě⁶ vyplynulo, že 35% dotázaných by GT použilo u osob s hemofilií a častým krvácením, 52% zatím čeká na více dat – zejména stran bezpečnosti GT, a 14% dotázaných by zatím GT svým pacientům nedoporučilo vůbec. Pokud se týká jednotlivých léčiv, pak preparát Hemgenix (etranacogene dezaparovec, Hem B) vede ke stabilním hladinám FIX v rozmezí 20-40% a významnému poklesu

ABR i po 24 měsících léčby. Přítomnost NABs sice vede k poklesu hodnot FIX, ale nikoli k horšímu klinickému efektu⁷. U preparátu Roctavian (valoctocogene roxaparovec, Hem A) se potvrdil významný pokles hladin FVIII v čase (týden 104 po podání) ale stále trvá významná redukce ABR u většiny pacientů⁸. Bezpečnost léčby je uspokojivá, kromě faktu, že 83% léčených potřebuje steroidní léčbu a může mít z toho plynoucí nežádoucí účinky. Tromboembolické komplikace nebyly zaznamenány. U léku SPK-8011⁸ je po 5 letech patrné, že je menší interindividuální rozdíl v expresi a ta je méně měnlivá i v čase, nicméně hladiny FVIII, které jsou touto léčbou dosahovány jsou nižší než u konkurenční GT. Lze tedy shrnout, že bude třeba získat větší zkušenosti s genovou léčbou a rovněž je třeba konstatovat, že GT je jiná než klasická léčba. Jednou podaná GT ovlivní léčenou osobu na celý život.

Nefaktorová léčba (NFT) hemofilie

Nejčastěji používanou NFT a zatím jediným registrovaným lékem v této indikaci je emicizumab (Hemlibra). Studie Haven 7 prokázala, že lék je účinný i u malých dětí vč PUPs a že je schopen i prevence závažných krvácení (vč ICH) v této věkové kategorii⁹. Emicizumab je rovněž efektivní v prevenci krvácení u osob se střední a lehkou hemofilií (Haven 6) a uvažuje se o jeho indikaci u těch pacientů, kteří mají závažný krvácivý fenotyp i když nemají těžkou hemofilii¹⁰. Jakkoli se zdá, že bezpečnostní profil emicizumabu není špatný, někteří upozorňují na o něco vyšší riziko TEN ve srovnání s EHL a volají po více datech v oblasti bezpečnosti léčby emicizumabem¹¹. V tomto by mohly pomoci klinické registry a RWE. Jedním z běžících registrů je kanadský, který zatím potvrzuje uspokojivý bezpečnostní profil emicizumabu¹².

Pokračuje i získávání dat o léčbě concizumabem¹³ u hemofilie A i B. Po změně dávkovacího schématu (snížení dávky) se neobjevily další TEN komplikace. Byla rovněž prezentována první data studie fáze I/II týkající se inhibitoru PC jako nefaktorové léčby hemofilie. Došlo k poklesu ABR z 34,1 na 6,2, resp. 2,2¹⁴ aniž by to s sebou neslo zvýšení rizika TEN. Studie pokračuje.



Výsledky studie fáze I/II s protilátkou Mim8¹⁵ – tedy lékem na podobné bázi, jako emicizumab, který má však vyšší afinitu k faktorům IXa a X, které přemostňuje, jsou povzbudivé. Zatím byla prezentována zejména bezpečnostní data.

Koagulační faktory s prodlouženým účinkem (EHL)

V oblasti hemofilie je v poslední době diskutováno, jaké mají být minimální hladiny cirkulujícího faktoru. Z původní koncepce profylaxe ze 70. let minulého století¹⁶, kdy cílem bylo udržet hladiny nad 1%, recentní evropské doporučení hovoří o 3-5%¹⁷ ale stále častěji se uvažuje o tom, že udržení hladin kolem 15% by mělo zabránit téměř všem krvácením. V tomto smyslu vychází i studie s lékem N9-GP (Refixia)¹⁸ u hemofilie B, použití emicizumabu¹⁰ nebo BIVV001¹⁹ (nová generace substituční léčby) u hemofilie A.

ITP

V rámci léčby dětské i dospělé ITP se stále více prosazují trombopoetivová mimetika. Dá se říci, že jsou v podstatě standardní léčbou 2. linie pro ty, kteří nereagují dobře na steroidy a/nebo IVIG. Z RWD je např. pro romiplostim patrné, že čím dříve je léčba zahájena, tím lepší je její efekt²⁰. RISA studie pak prokázala, že u těch, kteří dobře reagují na eltrombopag je trvání odpovědi dlouhodobé, ale je významné procento pacientů, u nichž byla léčba ukončena pro nedostatečný efekt²¹. Na druhou stranu je patrné, že nedostatečná reakce na jedno mimetikum neznamená nutně nedostatečný efekt jiného léku stejné kategorie. Např. pacienti s nedostatečným efektem eltrombopagu po převedení na hetrombopag měli vysokou míru dobré a dlouhodobé odpovědi²², podobné výsledky byly prezentovány pro avatrombopag po selhání eltrombopagu a hetrombopagu²³.

Jako jedna z možných budoucích léčebných modalit třetí linie se jeví efgartigimod²⁴. Jedná se o IgG1 Fc fragment, který vazbou na neonatální Fc receptor blokuje jeho schopnost prodloužovat poločas IgG a bránit tak jeho lysozomální degradaci. Tím, že funguje jako kompetitor IgG, je, mimo jiné, schopen zvyšovat i eliminaci patologických IgG, včetně těch, způsobujících ITP, aniž by

modifikoval hladiny jiných tříd imunoglobulinů (ITP není jeho jedinou možnou budoucí indikací). Studie ADVANCE IV ukazuje tuto molekulu jako slibnou v léčbě chronické persistentní ITP. Byla prezentována i data o použití tyrosinkinázových inhibitorů při léčbě ITP. Fostamatinib – inhibitor SYK (Spleen Tyrosine Kinase) snižující imunitní destrukci destiček ve slezině se jeví jako lepší ve srovnání s podáním v poslední době stále více kontroverzního rituximabu u osob s chronickou ITP²⁵. Tato léčba je považována za bezpečnou, ale ani ona zřejmě nezajistí dostatečně dlouhý efekt. Po 3 resp 6 měsících byl patrný efekt u 37% resp. 29% pacientů²⁶. Je třeba ale zmínit, že se jednalo o komplikované a významně předléčené osoby. Rilzabrutinib – inhibitor BTK (Brutonovy tyrosin kinasy) zvyšující počet destiček u ITP blokováním Fc gama receptorů makrofágů a ovlivněním tvorby patologických autoprotilátek se zdá být rovněž slibnou léčbou. I v jeho případě se ale ukazuje, že čím dříve je lék podán, tím lepší je jeho efekt. Jinými slovy, u významně předléčených osob bude i jeho efekt nižší²⁷. To mimo jiné znamená, že na pozici léků druhé linie se bude i nadále zvyšovat „konkurence“ a bude třeba nalézt správný rozhodovací mechanismus pro koho jaký lék druhé linie použít. Svou roli stále hraje i splenektomie, ale i u ní je patrné, že efekt je nejhorší u dříve významně předléčených osob. Navíc ti, kteří nereagují na léčbu IVIG případně nereagovali na léčbu rituximabem, budou mít nižší pravděpodobnost úspěchu i po splenectomii²⁸.

Univerzální prokoagulans?

V medicíně, stejně jako v životě, se opakovaně objevuje snaha o to najít jeden lék, na všechny nemoci. Nejinak je tomu i v oblasti hemostázy. Jistě by bylo ideální mít k dispozici medikaci, která bude schopna obnovit krevní srážení u (ideálně) jakéhokoli deficitu faktoru krevního srážení. Preklinické charakteristiky molekuly VGA039 – protilátky proti Proteinu S²⁹ podle ukazují, že tato molekula takový potenciál může mít. Je schopna in vitro obnovit generaci trombinu u kongenitálního deficitu VWF, FVII, FVIII, FIX a FXIII. Tyto studie nicméně zatím vůbec neřeší bezpečnost takové léčby, což bude jistě třeba, protože její podání mimo jiné vede k elevaci D dimerů, což lze interpretovat



jako marker aktivace koagulace, je ale otázka, zda žádoucí. Na další údaje si budeme muset počkat.

V rámci kongresu ASH 2022 byla prezentována pochopitelně i řada dalších zajímavých informací z oblasti hemostázy, ale je mimo možnosti tohoto sdělení je obsáhnout. Výše uvedené je tedy výběrem na základě volby autora sdělení.

Reference

1. [Roctavian | European Medicines Agency \(europa.eu\)](#)
2. [Hemgenix: Pending EC decision | European Medicines Agency \(europa.eu\)](#)
3. Ozelo MC, et al. *N Engl J Med.* 2022;386:1013-25.
4. Miesbach W, et al. ASH 2022. Abstract 2142, poster presentation.
5. Pipe S at session: A light at the end of the treatment tunnel – Exploring the potential role of gene therapy in hemophilia B. Satellite Symposium. ASH 2022, 9 Dec 2022.
6. Young G at session: Navigating a changing landscape together: gene therapy for haemophilia. Satellite Symposium. ASH 2022, 9 Dec 2022.
7. Pipe S, et al. ASH 2022. Abstract 2139, poster presentation.
8. Croteau SE, et al. ASH 2022. Abstract 783, oral presentation.
9. Pipe S, et al. ASH 2022. Abstract 197, oral presentation.
10. Hermans C et al. ISTH 2022. Abstract OC 30.5, oral presentation.
11. Peyvandi F, et al. ASH 2022. Abstract 189, oral presentation.
12. Iorio A et al. ASH 2022. Abstract 3796, poster presentation.
13. Frei-Jones M, et al. ASH 2022. Abstract 191, oral presentation.
14. Baglin T, et al. ASH 2022. Abstract 188, oral presentation.
15. Lentz SR, et al. ASH 2022. Abstract 1158, oral presentation.
16. Nilsson IM, Hedner U, Ahlberg A. Haemophilia prophylaxis in Sweden. *Acta Paediatr Scand.* 1976;65(2):129-35.
17. Peyvandi F, Berger K, Seitz R, et al. Kreuth V initiative: European consensus proposals for treatment of hemophilia using standard

products, extended half-life coagulation factor concentrates and non-replacement therapies. *Haematologica.* 2020;105(8):2038-2043.

18. Seremetis SV at session: Are higher factor levels a rising consideration when selecting a haemophilia treatment? Novo Nordisk Product Theatre. ASH 2022, 10 Dec 2022.
19. Von Drygalski A, et al. ISTH 2022. Abstract LB 01.4, oral presentation.
20. McDonald V, et al. ASH 2022. Abstract 1128, poster presentation.
21. Meyer O, et al. ASH 2022. Abstract 1130, poster presentation.
22. Hu Y, et al. ASH 2022. Abstract 2443, poster presentation.
23. Wang S, et al. ASH 2022. Abstract 3770, poster presentation.
24. Broome CM, et al. ASH 2022. Abstract 3, oral presentation.
25. Laws A, et al. ASH 2022. Abstract 1132, poster presentation.
26. Moezi MM, et al. ASH 2022. Abstract 2250, poster presentation.
27. Kuter DJ, et al. ASH 2022. Abstract 2450, poster presentation.
28. Ogube O, et al. ASH 2022. Abstract 507, oral presentation.
29. Leong L, et al. ASH 2022. Abstract 691, oral presentation.

E07

TROMBÓZA – ASH 2022

Jaromír Gumulec

*Klinika hematookologie Fakultní nemocnice Ostrava
a Lékařské fakulty Ostravské univerzity*

Problematika trombózy a hemostázy je významným tématem na kongresu Americké hematologické společnosti. V prezentaci se věnuji praktickým otázkám trombofilie, mikroangiopatií a antikoagulační léčbě.

Neexistuje shoda v načasování vyšetření dědičné trombofilie. Při výskytu trombózy je zásadní hodnocení rizikových faktorů. V retrospektivní observační studii u 119 pacientů byly trombofilie testovány u 57 % pacientů po arteriální trombóze a u 24 % pacientů po žilní tromboembolické příhodě (VTE), přestože



většina pacientů měla v době příhody nejméně jeden provokační moment. Až na jednu výjimku žádný výsledek neovlivnil strategii léčby.¹

Antifosfolipidový syndrom je systémové autoimunitní onemocnění definované trombotickými nebo porodními příhodami u pacientů s přetrvávajícími antifosfolipidovými protilátkami (aPL). Revidovaná diagnostická kritéria byla přijata jako doporučení péče.² Testování asymptomatických jedinců se nedoporučuje pro významnou falešnou pozitivitu, až 10 % zdravých jedinců může mít aPL přechodně nebo slabě zvýšené. Výsledky studie ukázaly nedostatečné dodržování doporučení při výběru pacienta i interpretaci výsledků.³ Dědičná trombofilie a nádory nezávisle zvyšují riziko VTE. Úloha dědičné trombofilie na riziko VTE u pacientů s nádorem je nejasná a stanovení trombofilie není součástí klinické praxe. V souboru 438 léčených ambulantních onkologických pacientů je riziko VTE vyšší u pacientů s faktor V Leiden a u pacientů s krevní skupinou A, B nebo AB.⁴

Používání periferně zavedených centrálních katétrů (PICC) u pacientů s nádorem zjednodušilo léčbu, ale zvyšuje riziko trombózy horních končetin. Riziko VTE u PICC určuje místo nádoru, počet destiček před léčbou a supradiafragmatická radioterapie.⁵ VTE lze léčit nízkomolekulárním heparinem⁶, rivoraxabanem s rizikem závažného krvácení u 8,6 % a fatální plicní embolie 0,7 %⁷ i apixabanem s nízkým rizikem rekurence (1,4 %) i závažného (2,9 %) a klinicky významného krvácení (5,7 %).⁸

Mezi pilíře léčby aTTP patří terapeutická výměna plazmy (TPE) a imunosuprese. Odpověď na TPE je variabilní. Rituximab a glukokortikoidy v první linii léčby dostávají častěji pacienti s pozdní odpovědí, kteří mívají delší celkové přežití. Pacienti s časnou odpovědí dostávají méně intenzivní imunosupresi. Doba do odpovědi na TPE není spolehlivý ukazatel rizika relapsu. Imunosuprese je základ léčby aTTP a použití rituximabu v první linii významně snižuje počet relapsů a zlepšuje přežití.⁹ Jiná studie hodnotila výsledky kaplacizumabu ve srovnání s historickými kontrolami. Kaplacizumab je bezpečný a účinný

i u pacientů refrakterních na výměnu plazmy, po opětovném podání a u pacientů, kteří nepodstoupili léčbu výměnou plazmy.¹⁰

U pacientů s nádory je zvýšené riziko VTE vyžadující antikoagulaci i riziko rozvoje trombocytopenie. Optimální léčba pacientů s VTE a trombocytopenií je nejasná, protože chybí data z randomizovaných studií.¹¹ Přínos a riziko přímých antikoagulancií u onkologických pacientů s VTE a trombocytopenií není zcela jasný. Podle *post hoc* analýzy studie HOKUSAI VTE Cancer byla trombocytopenie pod $100 \times 10^9/L$ spojena s dvojnásobným rizikem závažného krvácení bez vlivu na rekurenci trombózy.¹²

Trombóza a hemostáza je významná část klinické praxe hematologických pracovišť, které je nezbytné věnovat náležitou pozornost.

Literatura

1. Chahin M, Fordjour I, Leurinda C, Gunsolus B, Raval GG. Inpatient Thrombophilia Testing: Is It Worth It? *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 2813-2814. doi: 10.1182/blood-2022-157814
2. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; **4**(2): 295-306. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x
3. Al-Banaa K, Herrman E, Antonios B, Ahaneku H, Shrotriya S, Wang C *et al.* Assessing the Rate of Compliance with the Revised Sapporo/Sydney Criteria in Diagnosing Antiphospholipid Syndrome: A Multicenter Retrospective Analysis. *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 2795-2796. doi: 10.1182/blood-2022-157217
4. Roy DC, Wang T-F, Mallick R, Wells PS, Carrier M, Hawken S. Thrombophilia Gene Mutations for the Prediction of Venous Thromboembolism in Ambulatory Cancer Patients Receiving Chemotherapy. *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 2792-2793. doi: 10.1182/blood-2022-160158



5. Huguet M, Morgades M, Fernández M, Ferraro MP, Chekhun S, Cano R *et al.* A Risk Score for Single-Lumen Peripherally Inserted Central Catheter (PICC)-Related Venous Thrombosis in Cancer Patients Undergoing Ambulatory Chemotherapy. *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 8542-8543. doi: 10.1182/blood-2022-165328
6. Kovacs MJ, Kahn SR, Rodger M, Anderson DR, Andreou R, Mangel JE *et al.* A pilot study of central venous catheter survival in cancer patients using low-molecular-weight heparin (dalteparin) and warfarin without catheter removal for the treatment of upper extremity deep vein thrombosis (The Catheter Study). *J Thromb Haemost* 2007; **5**(8): 1650-1653. e-pub ahead of print 20070507; doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02613.x
7. Davies GA, Lazo-Langner A, Gandara E, Rodger M, Tagalakis V, Louzada M *et al.* A prospective study of Rivaroxaban for central venous catheter associated upper extremity deep vein thrombosis in cancer patients (Catheter 2). *Thromb Res* 2018; **162**: 88-92. e-pub ahead of print 20170406; doi: 10.1016/j.thromres.2017.04.003
8. Kovacs MJ, Wells PS, Rodger MA, Carrier M, Yeo E, Kovacs JA *et al.* A Prospective Study of Apixaban for Central Venous Catheter Associated Upper Extremity Deep Vein Thrombosis in Cancer Patients: Catheter 3. *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 1245-1246. doi: 10.1182/blood-2022-159135
9. Sridhar A, Yohannan B, Jayan A, Kaur H, Idowu M. A Real-World Analysis of Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Comparing Clinical Outcomes of Early Versus Late Responders to Plasma Exchange. *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 8499-8500. doi: 10.1182/blood-2022-164441
10. Gavriilaki E, Koravou E, Dimou-Mpesikli S, Nikolousis E, Banti A, Pontikoglou C *et al.* Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Real-World Multicenter Data on Re-Administration and Plasma Exchange Free Treatment. *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 8503-8504. doi: 10.1182/blood-2022-158549
11. Wang T-F, Delluc A, Carrier M, Kimpton M. Management of Anticoagulation and Related Outcomes in Patients with Cancer-Associated Thrombosis and Thrombocytopenia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 8538-8539. doi: 10.1182/blood-2022-164725
12. Patell R, Shi M, Grosso MA, Duggal A, Büller H, Raskob GE *et al.* Impact of Thrombocytopenia on Bleeding and Recurrent Thrombosis in Cancer Associated Thrombosis: A Post Hoc Analysis of Hokusai VTE Cancer Study. *Blood* 2022; **140**(Supplement 1): 5675-5676. doi: 10.1182/blood-2022-163507

E08

NEW WHO AND ICC LYMPHOPROLIFERATIONS CLASSIFICATIONS

Elias Campo

Hematopathology Unit, Center for Biomedical Diagnosis, Hospital Clinic, University of Barcelona

1. WHO klasifikace lymfoidních nádorů: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01620-2>
2. ICC klasifikace lymfoidních nádorů: <https://ashpublications.org/blood/article/140/11/1229/485458/The-International-Consensus-Classification-of>

E09

NEW WHO MYELOPROLIFERATION CLASSIFICATION

Hans Kvasnicka

Institute of Pathology and Molecular Pathology, Helios University Clinic Wupperta, University of Witten / Herdecke

1. WHO klasifikace myeloidních nádorů: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01613-1>



2. ICC klasifikace myeloidních nádorů:

<https://ashpublications.org/blood/article/140/11/1200/485730/>

[International-Consensus-Classification-of-Myeloid](#)

E11

MYELOMY – ASH 2022

Luděk Pour

FN Brno

Na letošní výroční konferenci ASH bylo presentováno celkem 840 abstrakt souvisejících s problematikou mnohočetného myelomu. Celkem 200 z nich bylo presentováno ve formě ústního sdělení. Pro úplnost uvádím, že podíl českých autorů byl na 31 z těchto abstrakt. Pokud se budeme soustředit na klíčové sdělení pro klinickou praxi, musíme jednoznačně upřednostnit abstrakta hodnotící výsledky randomizovaných klinických studií, kterých bylo presentováno celkem 54. Jak je obvyklé nejdůležitější sdělení jsou presentována ve formě sdělení ústního a těch bylo celkem 16. Pokusím se zmínit ty nejdůležitější pro klinickou praxi. Dosud nepublikované léčebné výsledky randomizovaných studií byly součástí pouze čtyřech sdělení

Práce Tan a kolektivu s názvem *Carfilzomib, Lenalidomide and Dexamethasone (KRd) Vs Bortezomib, Lenalidomide, and Dexamethasone (VRd) As Induction Therapy in Newly Diagnosed High-Risk Multiple Myeloma* porovnávala účinnost indukce carfilzomibu nebo bortezomibu v kombinaci s lenalidomidem a dexamethasonem u vysoce rizikových pacientů s myelomem. Bylo prokázáno, že na celém souboru pacientů došlo ke zlepšení PFS v rameni s carfilzomibem. Ale překvapivě u pacientů, kde byla použita autologní transplantace tato výhoda nebyla přítomna.

Práce francouzských autorů *A Dexamethasone Sparing-Regimen with Daratumumab and Lenalidomide in Frail Patients with Newly-Diagnosed Multiple Myeloma: Efficacy and Safety Analysis of the Phase 3 IFM2017-03*

Trial se zaměřila na podskupinu pacientů křehkých, starších 65ti let se stavem výkonnosti ECOG horším než 2. Autoři porovnali efektivitu režimu Revlimid dexamethason (RD) oproti režimu daratumumab revlimid (DR). Tedy režimu bez kortikoidů, kdy víme, že právě u křehkých nemocných právě vyšší dávky dexamethasonu mají celou řadu nežádoucích účinků. Režim DR prokázal vyšší efektivitu ve všech podskupinách nemocných. Režim měl rychlý nástup účinků a dobrý bezpečnostní profil .

Studie německých autorů *Long-Term Outcome of a Prospective Randomized Trial Comparing Continuous Lenalidomide/Dexamethasone with Lenalidomide/Dexamethasone Induction, MEL140 with Autologous Blood Stem Cell Transplantation and Single Agent Lenalidomide Maintenance in Patients of Age 60-75 Years with Newly Diagnosed Multiple Myeloma* neprokázala lepší účinnost použití redukované dávky melfalanu s podporou štěpu s následnou udržovací léčbou lenalidomidem oproti kontinuálnímu podávání lenalidomidu a dexamethasonu. U této skupiny starších nemocných je tak v éře nových léků na zvážení podávání autologní transplantace s redukovanou dávkou melfalanu .

Práce italských autorů *Bortezomib-Melphalan-Prednisone (VMP) Vs. Lenalidomide-Dexamethasone (Rd) in Transplant-Ineligible Real-Life Multiple Myeloma Patients: Updated Results of the Randomized Phase IV Real MM* porovnávala účinnost režimu VMP oproti režimu RD u starších nemocných s poměrně velkou kohortou křehkých nemocných. Výsledky byly v obou skupinách podobné. Nicméně pro skupinu vysoce rizikových myelomů byly výsledky lepší ve skupině pacientů v rameni VMP než při použití kombinace RD.

Jak již bylo zmíněno čtyři tyto zmíněné práce podávají původní výsledky randomizovaných studií. Nicméně se jedná o sdělení důležitá pro naši každodenní klinickou praxi, protože hodnotí v ČR dostupné kombinace léčby. V reálné klinické praxi je v primoléčbě bohužel možno použít stále jen režimy s bortezomibem a lenalidomidem. Jiné nové léky není možné použít. Z výše



Uvedených abstraktů tedy jednoznačně vyplývá, že u vysoce rizikových pacientů kombinace je nasnadě použití autologní transplantace, tam kde to není možné není vhodnou kombinací lenalidomidu s dexamethasonem. A zároveň u starších nemocných je na zvážení použití autologní transplantace s nižší dávkou melfalanu a naději je i možnost použití režimu bez dexamethasonu.

Dalším velice zajímavým abstraktem bylo sdělení anglických autorů *Extended Intensified Post-ASCT Consolidation with Daratumumab, Bortezomib, Lenalidomide and Dexamethasone (Dara-VRd) for Ultra-High Risk (UHiR) Newly Diagnosed Myeloma (NDMM) and Primary Plasma Cell Leukemia (pPCL): The UK Optimum/Muknine Trial* klinicky relevantní abstrakt hodnotící léčbu tzv. ultrahigh risk pacientů definovaných přítomností alespoň dvou rizikových cytogenetických abnormalit nebo jako plasmocelulární leukemie. Při intenzivní indukční léčbě s následnou autologní transplantací, konsolidací a udržovací léčbě založené na daratumubu lenalidomidu a bortezomibu nebylo při sledování 40 měsíců dosaženo mediánu PFS. Což je pro takto rizikovou skupinu nemocných skutečně významný pokrok.

V oblasti léčby mnohočetného myelomu jsou v současnosti největší naděje vkládány do oblasti imunoterapie. Hlavními dvěma směry je pak použití CAR T buněk a použití bispecifických případně trispecifických protilátek.

V problematice CAR T buněk bylo předneseno ve formě ústního sdělení 15 abstraktů, avšak pouze jedno bylo hodnocení alespoň fáze 2 klinických studií jednalo se o práci *KarMMa-2 Cohort 2a: Efficacy and Safety of Idecabtagene Vicleucel in Clinical High-Risk Multiple Myeloma Patients with Early Relapse after Frontline Autologous Stem Cell Transplantation* hodnotící léčbu CAR T v případě časného relapsu po autologní transplantaci, u této velmi rizikové skupiny nemocných bylo dosaženo kompletní remise u 45% pacientů.

Léčbou bispecifickými se zabývalo celkem 19 ústně presentovaných abstraktů. Také pouze jedna práce hodnotila fázi II klinické studie a to konkrétně *Efficacy and Safety of Elranatamab in Patients with Relapsed/Refractory Multiple*

Myeloma Naïve to B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-Directed Therapies: Results from Cohort a of the Magnetism-3 Study hodnotící podání elranatamabu u předléčených refrakterních pacientů. Léčebná odpověď byla pozorována u 60% nemocných.

Jak je zřejmé, na letošní výroční konferenci ASH nebylo publikováno žádné zásadní sdělení, které by v budoucích letech od základu změnilo léčebnou strategii v terapii mnohočetného myelomu. Jak jsem se snažil nastínit publikovány byly zejména dlouhodobé výsledky randomizovaných studií v primoléčbě při použití dnes již standardních léků, které používáme v rutinní praxi i v České republice. Tyto výsledky mohou vést k další optimalizaci léčby pacientů s myelomem v reálném medicínském životě. Důraz je kladen zejména na skupiny rizikových a křehkých pacientů, kde jsme stále často nedostatečně efektivní.

Vývoj v léčbě mnohočetného myelomu se ubírá směrem imunoterapie. Publikovaná sdělení v této oblasti nejsou zatím velkými soubory nemocných ve fázi 3 klinických studií, ale jedná se o celou řadu prvních prací, které vedou k přípravě těchto hodnocení a doufejme k dalšímu pokroku v péči o nemocné.

E12 CLL ASH 2022

Michael Doubek

Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno, Česko

Poslední roky přinášejí stále více poznatků o molekulárních změnách, které hrají zásadní roli v patogenezi chronické lymfocytární leukemie (CLL). Stále lepší poznání podstaty onemocnění se pak odráží v pokrocích v určování prognózy i léčbě nemoci.

Pokud jde o diagnostiku nemoci, ta se se nemění. Vyšetření zobrazovacími metodami není stále u CLL při diagnostice nezbytné.



Na prognózu nemoci i v éře nových léčiv má stále největší vliv gen *TP53* a jeho defekty. Velice přesným parametrem je mezinárodní prognostický index CLL-IPI, který ale dle našich i zahraničních zkušeností není plně začleněn do běžné hematologické praxe.

Největší změny tak nastávají v oblasti terapie CLL. Indikace k léčbě se sice stále nemění, i nyní platí, že léčba není u asymptomatických forem CLL indikována, ale významně se rozšiřuje spektrum léčebných možností. Začíná být patrný ústup chemoimuniterapie ve prospěch nové cílené léčby CLL.

Kromě terapie CLL se mění i přístup k hodnocení léčebné odpovědi, kde se stále více uplatňuje měření minimální zbytkové nemoci (MRD) jak pomocí průtokové cytometrie tak pomocí molekulárně genetických metod.

Z nových léčiv, která se dostávají do terapie CLL, hrají a blízké budoucnosti budou hrát klíčovou roli nové monoklonální protilátky (obinutuzumab), inhibitory B buněčného receptoru (ibrutinib, akalabrutinib, zanubrutinib, pirtobrutinib) a Bcl-2 inhibitory (venetoklax). Lze rovněž předpokládat, že se budou užívat kombinace těchto léčiv.

Inhibitory B-buněčného receptoru

Aktivace B buněčného receptoru (BCR) hraje klíčovou roli v patogenezi CLL. Inhibice Brutonovy tyrosinkinázy, zapojené do BCR signalizace, se ukázala jako velice potentní léčebná metoda u pacientů s CLL ať už v první linii, tak i u relabované a refrakterí CLL (R/R CLL).

Inhibitory PI3 kinázy

PI3K- δ je nezbytná pro aktivaci, proliferaci a přežití B buněk a je zvýšeně exprimována u mnohých B-buněčných malignit včetně CLL. Idelalisib je selektivní a reverzibilní inhibitor PI3K- δ . V současnosti je ale idelalisib v léčbě

CLL nahrazován jinými cílenými léky především z důvodu nežádoucích účinků terapie.

Inhibice Bcl-2

CLL buňky produkují velké množství antiapoptotických proteinů, mezi něž se řadí Bcl-2. Z inhibitorů Bcl-2 do léčby CLL jako první zasahuje venetoklax.

Kombinační terapie nových léčiv s monoklonálními protilátkami a jejich kombinace navzájem

Pro léčbu CLL v blízké budoucnosti bude zásadní omezení podávání chemoterapie a narůstající používání kombinací nových léčiv s monoklonálními protilátkami, případně používání kombinací nových léčiv navzájem. Důležitý je také trend k omezení podávání kombinované terapie na 1-2 roky, tedy nikoliv podávání trvalé, s měřením léčebné odpovědi podle hladiny MRD.

Závěr

Léčba CLL už ani zdaleka není založena na chemoimuniterapii. Ta je vytlačována novými léčivy a jejich kombinacemi, které se podávají často po omezenou dobu, tedy nikoliv trvale. Léčba je indikována podle klinických, ale i molekulárně biologických nálezů a stále více je zohledňováno vyšetření MRD.

**E13****IMUNOTERAPIE PROTILÁTKAMI V HEMATO-
ONKOLOGII (ASH 2022)**

Daniel Lysák

*Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice Plzeň***Úvod**

Celá řada hematologických malignit se v současné době léčí pomocí monoklonálních protilátek (mAb) ať již v monoterapii či v kombinaci s dalšími léky (cytostatiky, inhibitory). Obecně jsou tyto protilátky zaměřeny na povrchové antigeny různých typů buněk, tj. lymfoidní, myeloidní, nebo jsou cílené na různé adhezivní molekuly, solubilní substance (složky komplementu), anebo mohou působit proti různým cytokinům.

Monoklonální protilátky uplatňují svůj účinek přímo prostřednictvím různých mechanismů nebo fungují nepřímo prostřednictvím imunitního nebo jiného efektního systému pacienta anebo mohou být konjugovány s různými cytotoxickými sloučeninami nebo radionuklidy, které zvyšují jejich cytotoxický účinek na cílové buňky. Samotné protilátky zabíjejí nádorové buňky kombinací mechanismů, jako jsou komplementem zprostředkovaná cytotoxicita (CDC), na protilátce závislá buněčná cytotoxicita nebo fagocytóza (ADCC, ADCP) či indukce apoptózy (ADA). Monoklonální protilátky mohou zasahovat do funkce inhibitorů kontrolních bodů imunitní reakce (checkpoint inhibitory, např. PD1) a aktivovat imunitní protinádorovou odpověď pacienta. Podobně bispecifické protilátky jsou zase cestou jak přivést do kontaktu nádorovou a efektorovou buňku a zprostředkovat např. cytotoxické působení T-lymfocyty proti nádorovému B-lymfocyty. V současné době se na trhu nachází více než 100 mAb produktů a další stovky jsou v různých fázích klinického hodnocení.

Akutní myeloidní leukémie

V léčbě akutní myeloidní leukémie (AML) se rutinně využívá **gemtuzumab ozogamicin** (GO; Mylotarg), tedy anti-CD33 monoklonální protilátka konjugovaná s cytotoxickou látkou kalicheamicinem. Přidání GO k intenzivní chemoterapii u NPM1^{mut} AML zlepšuje EFS, a to zejména ve věkové skupině

18-60 let (HR 0,72), ale nemá signifikantní efekt na celkové přežití, jak dokládá studie **AMLSG 09-09** (1). Přidání GO v indukci 7+3 zvyšuje šanci na dosažení CR/CRi (82 vs. 55 %), která je dobrým východiskem pro případnou alogenní transplantaci. Špatnou odpověď mají pacienti s nepříznivými genetickými změnami jako jsou ASXL1, DNMT3A, TET2 nebo TP53 mutace (2). **Magrolimab** je mAb specifická proti antigenu CD47, který se nachází na povrchu nádorových buněk a svojí interakcí s ligandem SIRP α na makrofázích blokuje fagocytózu („dont eat me“ signál). Magrolimab byl testován v kombinaci s azacytidinem a venetoklaxem u „unfit“ pacientů s nově diagnostikovanou (ND) a relabující/refrakterní AML (s 90 % zastoupením „adverse“ risk ELN). V ND kohortě bylo dosaženo vysokého procenta odpovědi (ORR 80 %) s přežitím v jednom roce 83 % (TP53^{wt}) resp. 53 % (TP53^{mut}). R/R pacienti nepředléčení venetoklaxem dosáhli taktéž uspokojivé odpovědi (75 % ORR, medián OS 7,4 měs), pacienti předléčení venetoklaxem měli naopak nedostatečnou odpověď (ORR 12 %, med OS 3,1 měs). Studie ukázala vysokou efektivitu této trojkombinace zejména u ND AML s nepříznivými genetickými vlastnostmi včetně TP53^{mut} a kombinace bude dále ověřována v rámci studie **ENHANCE-3** (3).

Akutní lymfoblastická leukémie

Blinatumomab (Blinicyto) je představitelem bispecifických protilátek zapojujících T-lymfocyty (BiTe). Na B-lymfocytech detekuje univerzální antigen CD19, na T-lymfocytech CD3 antigen, čímž se T-buňky přibližují k maligním B-buňkám a uplatňuje se jejich cytotoxický účinek. Indikace protilátky se posunuje od pacientů s R/R B-ALL do první linie léčby. Randomizovaná studie **ECOG-ACRIN E1910** přidávala blinatumomab ke konsolidační chemoterapii, což vedlo k významnému zlepšení OS u pacientů s nově diagnostikovanou B-ALL, kteří byli po intenzifikační chemoterapii MRD negativní (med OS nedosažen vs. 71.4 měs), a to bez zaznamenaných nových bezpečnostních signálů. Blinatumomab v konsolidační chemoterapii má potenciál se stát novým standardem péče o pacienty s Ph^{neg} B-ALL (4). Snížení rizika relapsu (HR 0,48) při konsolidaci blinatumomabem prokázala také subanalýza studie **GRAALL-2014/B** (5). Blinatumomab se může uplatnit i v terapii Ph^{poz}



B-ALL, kdy v kombinaci s ponatinibem nabízí tento nechemoterapeutický režim u nově diagnostikovaných pacientů vysoké procento remisí (kompletní molekulární remise 87 %) a dvouleté EFS a OS 95 % bez potřeby alogenní transplantace (6).

Inotuzumab ozogamicin (IO; Besponsa) je mAb namířená proti CD22 antigenu na B-lymfocytech, je kombinována s kalicheamicinem (ozogamicin) a aktuálně určená pro léčbu R/R B-ALL. Léčba B-ALL je náročná zejména u starších pacientů, kde tradiční intenzivní indukce většinou nevede k dlouhodobým remisím a vyléčení. Výsledky studie **GMALL-Initial1** ukázaly, že začlenění protilátky do první linie terapie je slibnou strategií u pacientů s Ph negativní B-ALL ve věku > 55 let (medián 64 let). Odpovědi (CR/CRi) dosáhli všichni hodnotitelní pacienti, 74 % bylo MRD negativních. OS ve dvou letech bylo 81 %, EFS 73 % (7). Persistence minimální reziduální nemoci (MRD) u B-ALL je nepříznivým faktorem, který zkracuje jak přežití bez relapsu tak celkové přežití. Inotuzumab umožňuje eradikovat MRD u velké části pacientů MRD+ po standardní terapii (60-70 % MRD negativizace) (8).

Non-Hodgkinovské lymfomy

Léčebné možnosti u NHL se rozrůstají o celou řadu nových protilátek, které jsou zaměřeny vedle klasických B-lymfocytárních antigenů (CD19, CD20) na některé nové molekuly (CD24, LAG-3), a které jsou různým způsobem modifikované, konjugované nebo bi-specifické. Proti antigenu CD20 jsou cílené bispecifické protilátky mosunetuzumab, odronextamab, glofitamab nebo epcoritamab a tyto protilátky jsou testovány v monoterapii či v kombinacích, u R/R pacientů i v první linii léčby. **Glofitamab** podávaný v monoterapii pacientům s R/R MCL je schopen navodit CR až u 80 % nemocných s mediánem trvání 10 měs a to i u pacientů předléčených BTKi (9). **Mosunetuzumab** (Lunsumio) v monoterapii vykazuje výbornou aktivitu u pacientů s R/R FCL refrakterních na anti-CD20 terapii s CR 77,8 %, trvající min. 24 měs u cca 80 % pacientů (10). Probíhá několik klinických studií EPCORE věnovaných využití **epcoritamabu** zejména u R/R DLBCL a FCL. Ve vývoji jsou také trispecifické protilátky (např. JNJ-80948543), které posilují vazbu nádoru kombinací

dvou antigenů (CD20 a CD79b) a mají potenciál efektivnější eradikace tumoru a omezení rezistence dané downregulací cílového antigenu (11).

Tafasitamab (Monjuvi) je anti-CD19 Fc modifikovaná protilátka s posílenou cytotoxickou aktivitou využívaná v kombinaci s lenalidomidem v terapii R/R DLBCL. Dlouhodobý follow-up studie **L-MIND** (≥ 5 let) ukázal u pacientů léčených více než 2 roky dlouhodobé trvání odpovědi a přežití (92,6 % ve 4-letech) (12).

Proti antigenu ROR1 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1) je zacílená protilátka **zilovertamab vedotin** (ZV) konjugovaná s monomethyl auristatinem E. ROR1 je exprimován u pacientů s NHL, CLL a jeho absence na ostatních tkáních z něj dělá vhodný terapeutický cíl. Studie **Waveline-001** ověřovala bezpečnost a efektivitu u R/R NHL. ORR a doba trvání odpovědi se pohybovaly mezi 33%/4,6 měs (DLBCL) až 53 %/10 měs (MCL), hlavními nežádoucími účinky byla hematologická toxicita a periferní neuropatie. Protilátka se tedy ukázala jako efektivní u výrazně předléčených NHL pacientů včetně nemocných relabujících po CART terapii (13).

Mnohočetný myelom

Monoklonální protilátky specifické pro antigen CD38 (daratumumab, isatuximab) nebo antigen SLAMF7 (alotuzumab) jsou řadu let standardní součástí terapie R/R mnohočetného myelomu. Přes nespornou efektivitu těchto protilátek pacienti nakonec relabují a vyžadují další intervenci, která byla dosud u triple refrakterních nemocných exponovaných anti-CD38 protilátce obtížná. Příkladem nových sofistikovaných přístupů je protilátka **belantamab mafodotin** (Blenrep) konjugovaná s monomethyl auristatinem F, která cílí na antigen BCMA (B Cell Membrane Antigen), a která prokázala slibnou aktivitu v monoterapii ve studii **DREAMM-2** s ORR 31 % a mediánem OS 13,7 měs (více než 30 měs při \geq VGPR odpovědi) u vysoce předléčených nemocných (medián 7 linií) s RRMM (14). Probíhají další klinická hodnocení ověřující efektivitu protilátky v kombinaci s dalšími léky (pembrolizumab, bortezomib atd.). Bezpečnosti a efektivitě belantamabu u RRMM v reálné praxi se věnovala studie **ALFA**, která potvrdila výsledky studie **DREAMM-2**, kdy ORR byl 35 %



a mOS 9,5 měs pro celou populaci, lepší přežití měli pacienti s odpovědí – 17,5 měs pro PR a nedosažen pro \geq VGPR (15).

BCMA se jako cílový antigen uplatňuje také u bispecifických protilátek jako jsou elranatamab nebo teclistamab. Monoterapie **elranatamabem** vedla ve studii **MagnetisMM-3** k dosažení odpovědi u 61 % RRMM pacientů, která v 6 měsících přetrvávala u 90 % z nich, pacienti s CR byli schopni dosáhnout dokonce MRD negativity (16). Analýza imunologického profilu pacientů s RRMM léčených **teclistamabem** v rámci studie **MajesTEC-1** ukázala u non-responderů dysfunkční a vyčerpaný T- buněčný fenotyp se zvýšenou expresí markerů jako PD-1, TIM-3 a zastoupením (CD38+) T regulačních buněk. Tato skutečnost podporuje případné léčebné kombinace např. s checkpoint inhibitory nebo daratumumabem (17). Protilátka **talquetamab** využívá jako cíle antigen GPRC5D (G protein-coupled receptor family C group 5 member D), který je silně exprimován na nádorových plazmocycitech. Studie fáze 1/2 **MonumentAL-1** přinesla výsledky léčby u RRMM po více než třech liniích terapie včetně anti-CD38. ORR byl 73 % s mediánem PFS 7,5 měs (18). Talquetamab se dále testuje v kombinaci s dalšími léky včetně např. i teclistamabu. Efektivitu a bezpečnost konjugované protilátky (belantamab) a bispecifické protilátky (talquetamab) v monoterapii bude porovnávat probíhající studie **MonumentAL-5**.

Myeloproliferativní neoplazie

Moderní léčba myeloproliferativních onemocnění je spojena zejména s cílenými inhibitory nicméně i do této oblasti začínají pronikat mAb. Monoklonální protilátka **INCA033989** se selektivně váže na mutovanou formu calreticulinu (CALR^{mut}) a antagonizuje jeho signalizaci a onkogenní funkci, zároveň neovlivňuje proliferaci/diferenciaci nemutovaných buněk. In vitro byl prokázán její synergistický účinek s ruxolitibem, na myším modelu byla ověřena redukce CALR^{mut} buněk v kostní dřeni a trombocytózy v periferní krvi (19).

Chronická lymfocytární leukémie

Monoklonální protilátky, jako rituximab a zejména obinutuzumab, jsou součástí moderních léčebných schémat CLL kombinujících cílené

inhibitory s mAb. Novou bispecifickou protilátkou, která hledá své místo v terapii CLL, je **NVG-111**, která rozpoznává nádorový antigen ROR1 a CD3 antigen T-lymfocytů. Protilátka prokázala v eskalační studii fáze I na pacientech s R/R CLL a MCL schopnost aktivovat T-lymfocyty u všech nemocných. Objektivní klinické odpovědi bylo dosaženo u 66 % pacientů, toxicita byla očekávaná a řešitelná. (20).

Alogenní transplantace

V rámci přípravy k alogenní transplantaci nebo řešení jejích komplikací se mAb uplatňují jen v omezené míře a v běžné praxi se omezují na podání anti-CD20 protilátky ve druhé linii léčby GVHD. Nově se objevují experimentální přístupy založené na mAb, které přestože jsou ve fázi preklinického výzkumu, přinášejí kvalitativně nové mechanismy. **Anti-CD137** konjugovaná protilátka se váže na kostimulační receptor 4-1BB upregulovaný na dárcovských lymfocycitech po haploidentické transplantaci a způsobuje jejich selektivní depleci a prevenci rozvoje akutní GVHD. Ve zvířecím experimentu nebyla přítomná systémová toxicita, projevy GVHD se omezily na mírnou kožní GVHD, nebyla ovlivněna imunitní rekonstituce po transplantaci (21). Klasická příprava před transplantací znamená podání intenzivní chemo/radioterapie s její orgánovou toxicitou. **Anti-CD45** protilátka konjugovaná s cytotoxickou látkou pyrrololobenzodiazepinem je schopná v myším modelu zprostředkovat kompletní myeloablaci a dárcovský chimerismus po transplantaci. Předpokládá se minimalizace orgánové toxicity bez ztráty kurativního efektu. Její testování s ohledem na farmakokinetiku a toxicitu probíhá (22). Obě protilátky se mohou v budoucnu uplatnit v rámci přípravy k alogenní transplantaci a profylaxe GVHD.

Závěr

Monoklonální protilátky jsou standardní součástí hemato-onkologické praxe. Terapeutické možnosti se rozšiřují příchodem nových molekul, jejich kombinací, širší indikačního spektra. Jejich racionální využití vyžaduje znalosti jejich účinků, terapeutických i vedlejších, a pochopení toho, jak moderní biotechnologie mění tuto oblast imunoterapie.



Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPI, 00669806).

1. Döhner H et al. Gemtuzumab Ozogamicin Plus Intensive Chemotherapy for Patients with NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia; ASH 2022, a. 832.
2. Awanda H et al. Gemtuzumab Ozogamicin Plus Standard Induction Chemotherapy Improves Outcomes in Intermediate Risk Cytogenetic Acute Myeloid Leukemia; ASH 2022, a. 58.
3. Daver N et al. Phase I/II Study of Azacitidine with Venetoclax and Magrolimab in Patients with Newly Diagnosed Older/Unfit or High-Risk Acute Myeloid Leukemia and R/R AML; ASH 2022, a. 61.
4. Litzow M et al. LBA-1 Consolidation Therapy with Blinatumomab Improves Overall Survival in Newly Diagnosed Adult Patients with B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia in Measurable Residual Disease Negative Remission: Results from the ECOG-ACRIN E1910 Randomized Phase III National Cooperative Clinical Trials Network Trial; ASH 2022, a. LBA-1.
5. Boissel N et al. Blinatumomab during Consolidation in High-Risk Philadelphia Chromosome (Ph)-Negative B-Cell Precursor (BCP) Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Adult Patients: A Two-Cohort Comparison within the Graall-2014/B Study; ASH 2022, a. 211.
6. Short N et al. Ponatinib and Blinatumomab for Patients with Newly Diagnosed Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Subgroup Analysis from a Phase II Study; ASH 2022, a. 213.
7. Stelljes M et al. Inotuzumab Ozogamicin Induction Followed By Standard Chemotherapy Yields High Remission Rates and Promising Survival in Older (>55 Years) Patients with De Novo B-Lymphoblastic Leukemia (GMALL-Initial1 Trial); ASH 2022, a. 212.
8. Senapati J et al. A Phase II Study of Inotuzumab Ozogamicin for the Treatment of Measurable Residual Disease-Positive B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia; ASH 2022, a. 1411.
9. Phillips TJ et al. Glofitamab Monotherapy Induces High Complete Response Rates in Patients with Heavily Pretreated Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma; ASH 2022, a. 74.
10. Bartlett N et al. Mosunetuzumab Monotherapy Demonstrates Durable Efficacy with a Manageable Safety Profile in Patients with Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma Who Received ≥ 2 Prior Therapies: Updated Results from a Pivotal Phase II Study; ASH 2022, a. 610.
11. Kuchnio A et al. Characterization of JNJ-80948543, a Novel CD79b \times CD20 \times CD3 Trispecific T-Cell Redirecting Antibody for the Treatment of B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma; ASH 2022, a. 1342.
12. Duell J et al. L-Mind: A Safety and Efficacy Analysis of Tafasitamab in Patients with Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma (R/R DLBCL) Receiving Treatment for at Least 2 Years; ASH 2022, a. 2937.
13. Spurgeon SE et al. Waveline-001: Updated Results from a Phase 1 Dose Escalation and Cohort Expansion Study of Zilovetamab Vedotin (MK-2140) in Non-Hodgkin Lymphoma; ASH 2022, a. 2956.
14. Lonial S, Lee HC, Badros A, et al. Longer term outcomes with single-agent belantamab mafodotin in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: 13-month follow-up from the pivotal DREAMM-2 study. *Cancer*. 2021;127(22):4198-4212. doi:10.1002/cncr.33809.
15. Roussel M et al. Effectiveness and Safety of Belantamab Mafodotin in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma in Real-Life Setting: The ALFA Study; ASH 2022, a. 1856.
16. Bahlis NJ et al. Efficacy and Safety of Elranatamab in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma Naïve to B-Cell Maturation Antigen (BCMA)-Directed Therapies: Results from Cohort a of the Magnetism-3 Study; ASH 2022, a. 159.
17. Cortes-Selva D et al. Teclistamab, a B-Cell Maturation Antigen (BCMA) \times CD3 Bispecific Antibody, in Patients with R/R Multiple Myeloma (RRMM): Correlative Analyses from MajesTEC-1; ASH 2022, a. 97.
18. Chari A et al. Talquetamab, a G Protein-Coupled Receptor Family C Group 5 Member D \times CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM): Phase 1/2 Results from MonumentAL-1; ASH 2022, a. 157.



19. Reis E et al. Discovery of INCA033989, a Monoclonal Antibody That Selectively Antagonizes Mutant Calreticulin Oncogenic Function in Myeloproliferative Neoplasms (MPNs); ASH 2022, a. 6.
20. Townsend W et al. First-in-Human Phase I Trial of a ROR1 Targeting Bispecific T Cell Engager (NVG-111) in Combination with Ibrutinib or As Monotherapy in Subjects with Relapsed Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) and Mantle Cell Lymphoma (MCL); ASH 2022, a. 1810.
21. Gerdemann U et al. Targeted Deletion of Activated T Cells with a Single Dose of Anti-CD137-Antibody Drug Conjugate Protects Against Acute Gvhd (AGVHD) and Promotes Tolerogenic T Cell Reconstitution after Haplo-Identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT); ASH 2022, a. 649.
22. Persaud S et al. Fully Myeloablative Antibody-Drug Conjugates Condition for Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Provide Durable Antileukemia Benefit; ASH 2022, a. 650.

E14**I BUNĚČNÁ IMUNOTERAPIE V HEMATOLOGII - ASH 2022**

Pavel Otáhal

*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha***Historie léčby pomocí CAR-T**

První chimérické receptory složené z extracelulární antigen-specifické domény a intracelulární signalizační domény obsahující část T-buněčného receptoru (TCR) byly popsány v roce 1987 Yoshihisou Kuwanou v Japonsku (Kuwana et al., 1987) a nezávisle v roce 1989 Zeligem Eshharem v Izraeli. (Gross et al., 1989).

Schválené CAR-T přípravky v současnosti

V současnosti jsou všechny schválené přípravky pouze pro léčbu hematologických malignit. Klinicky se ale testuje mnoho dalších typů CAR-T zejména na solidní nádory – tyto přípravky však postrádají podobnou účinnost jako

CD19-specifické CAR-T a jejich vývoj je stále ve fázi klinického vývoje. Léčba komerčními přípravky CAR-T byla v ČR zahájena v r. 2020. První typ CAR-T aplikovaný v ČR byl přípravek Kymriah, což jsou CD19-specifické CAR-T. Zpočátku byla indikační kritéria pro přípravek Kymriah omezena na B-ALL pod 25 let věku a DLBCL, postupně se však tato indikační kritéria rozšiřují a současně přibývají další schválené přípravky (Tab. 1) i na další antigeny jako je BCMA u mnohočetného myelomu.

Tab 1 Schválené CAR-T přípravky

Generický název	Komerční název	Výrobce	Datum schválení FDA	Antigen	Intracelulární signalizační doména
tisagenlecleucel	Kymriah	Novartis	8//2017	CD19	41BB - CD3 ζ
axicabtagene ciloleucel	Yescarta	Kite Pharma / Gilead	10/2017	CD19	CD28 - CD3 ζ
brexucabtagene autoleucel	Tecartus	Kite Pharma / Gilead	7/2020	CD19	CD28 - CD3 ζ
lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	Juno Therapeutics / BMS	2/2021	CD19	41BB - CD3 ζ
idecabtagene vicleucel	Abecma	Bluebird Bio / BMS	3/2021	BCMA	41BB - CD3 ζ
ciltacabtagene autoleucel	Carvykti	Janssen / J&J	2/2022	BCMA	41BB - CD3 ζ

Terapie AML pomocí CAR-T

Terapie AML pomocí CAR-T je mnohem obtížnější než terapie B-ALL/B-NHL kvůli nedostatku podobně účinného cíle jako je CD19. Zatím všechny klinicky testované antigeny jako jsou například CD33, CD123, CLEC12A, jsou také exprimovány zdravými hematopoetickými progenitorovými buňkami



a terapie cílící na tyto antigeny proto také může poškodit normální hematopoezu (Tettamanti et al., 2014). K překonání této off-target cytotoxicity byly vyvinuty různé přístupy. Např. lze použít CAR-T buňky co-exprimující antigeny CD20 a EGFR což umožňují jejich selektivní eliminaci in vivo pomocí terapeutických protilátek rituximab nebo cetuximab (Zhang et al., 2017). V případě rozvoje závažné cytopenie je možné pacienty indikovat k transplantaci hematopoezy, tj. musí mít vybraného dárce před zahájením terapie. Terapie CAR-T může být použita jako překlenovací terapie před alogenní transplantací hematopoetických kmenových buněk (aloSCT) již v době indikace pro léčbu pomocí CAR-T což také zajistí eliminaci podávaných CAR-T.

Terapie T-buněčných malignit pomocí CAR-T

Základním problémem terapie malignit T lymfocytů pomocí CAR-T je nedostatek efektivního cílového antigenu, jako je antigen CD19. Většina antigenů experimentálně cílených CAR-T buňkami je také přítomna na zdravých T-lymfocytech, vhodnými antigeny se zdají CD4, CD5, CD7, CD30 a TCR-alfa/beta řetězec. Cílení těchto antigenů však může vést k vzájemnému zabíjení CAR-T (tzv. bratrovražda) a významně tak omezí účinnost jejich výroby. Tento problém lze vyřešit cíleným odstraněním tohoto antigenu na CAR-T buňkách pomocí DNA nukleáz CRISPS-Cas9 nebo TALEN (Georgiadis et al., 2021). Současně lze provést eliminaci endogenního T-buněčného receptoru což umožní použití alogenních CAR-T buněk od zdravých nepříbuzných dárců.

Next-generation CAR-T

Současné zkušenosti s CD19-specifickými CAR-T přípravky jsou jak pozitivní, tak ale i negativní. Léčba těmito přípravky nejlépe funguje u B-ALL, zatímco u agresivních lymfomů typu DLBCL je podstatně nižší. Pravděpodobně dobře účinná bude léčba BCMA-specifickými CAR-T u mnohočetného myelomu, bohužel ale solidní nádory jsou výrazně rezistentnější na léčbu CAR-T než hematologické malignity. V posledních cca 10-ti letech bylo popsáno mnoho nových experimentálních postupů umožňujících vybavit T lymfocyty řadou nových funkcí. Tyto postupy odpovídají na několik zásadních otázek: 1) jak zvýšit bezpečnost CARů omezením rizika CRS a off-target cytotoxicity, 2) jak

lépe cílit nádorové buňky pomocí kombinace několika antigenů současně, 3) jak umožnit cílenou eliminaci CARů in vivo, 4) jak zvýšit jejich perzistenci in vivo, 5) jak eliminovat supresorické působení nádorového mikroprostředí, 6) jak navodit silnější protinádorové účinky.

Reference

Gross, G., Gorochoy, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplantation Proceedings*, 21.

Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F., & Kurosawa, Y. (1987). Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 149(3).

Zhang, W., Stevens, B. M., Budde, E. E., Forman, S. J., Jordan, C. T., & Purev, E. (2017). Anti-CD123 CAR T-Cell Therapy for the Treatment of Myelodysplastic Syndrome. *Blood*, 130 (Supplement 1).

Tettamanti, S., Biondi, A., Biagi, E., & Bonnet, D. (2014). CD123 AML targeting by chimeric antigen receptors: A novel magic bullet for AML therapeutics? *Oncotarget*, 3(5), 5–7.

Georgiadis, C., Rasaiyaah, J., Gkazi, S. A., Preece, R., Etuk, A., Christi, A., & Qasim, W. (2021). Base-edited CAR T cells for combinational therapy against T cell malignancies. *Leukemia*, 35(12).



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023 18.–20. 1. 2023
POST-ASH

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

58

PŘEDNÁŠKOVÁ SDĚLENÍ **(ABSTRAKTY 001 – 012)**



001

ASH 2022

SINGLE CYCLE OF BLINATUMOMAB FOLLOWED BY HIGH-DOSE CHEMOTHERAPY IN THE INDUCTION THERAPY FOR PH-NEGATIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN ADULTS. PRIMARY ENDPOINT ANALYSIS OF THE BLINA-CELL TRIAL

Cyril Šálek^{1, 2)}, František Folber³⁾, Štěpán Hrabovský³⁾, Zdeněk Kořístek⁴⁾, Jan M. Horáček^{5, 6)}, Eva Froňková⁷⁾, Petr Soukup¹⁾, Kateřina Benková⁴⁾, Petr Cetkovský^{1, 2)}, Jan Trka⁷⁾, Michael Doubek³⁾

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

²⁾Ústav klinické a experimentální hematologie, Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Praha, Česko

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

⁴⁾Klinika hematooonkologie, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava, Česko

⁵⁾IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, Česko

⁶⁾Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové, Česko

⁷⁾Klinika dětské hematologie a onkologie, CLIP - Childhood Leukemia Investigation Prague, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Praha, Česko

Background: Blinatumomab induces a high proportion of complete molecular responses in relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) and ALL with persistent or recurrent measurable residual disease (MRD) after initial therapy. However, responses are generally short if they are not followed by allogeneic stem cell transplantation (HSCT). We infer that blinatumomab needs to be incorporated sequentially into the early phase of treatment to enhance rates of MRD negativity, lower the need of HSCT and improve survival.

Methods: Induction therapy in the Blina-CELL Phase 2 trial (NCT04554485) consisted of run-in phase (dexamethasone 10 mg/m² days 1–7, cyclophosphamide 200 mg/m² days 3–5, vincristine 2 mg day 6, and daunorubicin 45 mg/m² days 6–7), first induction phase (blinatumomab 9 µg/day days

12–19 and 28 µg/day days 20–40), and second induction phase (dexamethasone 10 mg/m² days 50–54, vindesine 3 mg/m² day 50, methotrexate 1.5 g/m² day 50, etoposide 250 mg/m² days 53–54, and cytarabine 2x 2 g/m² day 54). Consolidation chemotherapy was identical to the GMALL 07/2003 protocol. Intensive intrathecal prophylaxis was given in both induction and consolidation phases. The primary endpoint was MRD evaluated by quantification of IG/TR rearrangements at week 11 (at the end of induction II). The minimum sensitivity and quantitative range of all assays was 10e-4.

Results: Twenty-nine patients started this treatment between May 2019 and March 2022. One patient terminated the study after 3 days of blinatumomab infusion due to elevated liver function tests, one was considered a screening failure due to the missing MRD target. Twenty-seven patients were evaluable. Median age was 41 years (range, 19–65). Median white blood cell count (WBC) at diagnosis was 6.2 x 10⁹/L (range, 0.6–67.7). Twenty-five patients (93%) achieved complete remission (CR) at the end of induction I, 2 (7%) were refractory (both had *BCR::ABL1*-like phenotype). No patient died during the induction phase.

Of the 25 patients in CR, 13 (52%) had complete molecular response (CMR) at day 40 (upon termination of blinatumomab infusion), 11 (44%) had positive non-quantifiable MRD and one (4%) patient had quantifiable MRD >10e-4. Primary endpoint assessment at week 11 showed 20 (80%) patients in CMR, 3 (12%) with positive non-quantifiable MRD and 2 (8%) with MRD ≥10e-4.

Four (16%) patients underwent HSCT due to MRD failure or reappearance, all were pre-treated with a further 1–2 cycles of blinatumomab. Three of them (75%) entered HSCT in CMR. One patient was transplanted in CMR for high-risk features (proB, *KMT2A* rearrangement).

The follow-up period is still ongoing. With 18 months of median follow, the overall and relapse-free survival in the study is 18.2 and 15.9 months, respectively.



The most frequent grade 3–4 adverse events of blinatumomab therapy were: febrile neutropenia (15%), elevated ALT/AST (11%), soft tissue infection (7%) and low fibrinogen (7%). Only one case of grade 3 cytokine release syndrome was documented. No neurotoxicity events were observed during the induction phase of treatment.

Conclusion: Remission induction strategy combining one cycle of blinatumomab with one cycle of high-dose chemotherapy provides a high molecular response rate (CMR or non-quantifiable MRD) of 92%. This approach translates into a low transplant rate due to a high MRD response and has a favourable safety profile. Longer follow-up is needed to evaluate survival benefit.

Table 1. Patient characteristics and response to the induction treatment.

Characteristics	N (%), median (range)
Total evaluable	27
Age (years)	41 (19–65)
Male / Female	19 (70) / 8 (30)
WBC ($\times 10^9/L$)	6.2 (0.6–67.7)
Immunophenotype	
proB	7 (26)
commonB	15 (56)
preB	5 (18)
Karyotype	
Normal	12 (44)
Low hypodiploidy/near triploidy	3 (11)
Low hyperdiploidy	2 (7.5)
High hyperdiploidy	1 (4)
t(X;11)	2 (7.5)
Complex	3 (11)
Other	1 (4)
Unsuccessful cultivation	3 (11)
BM blasts on day 11* (%)	10 (0–97)
Response	
CR after Induction 1	25/27 (93)
Molecular response on day 40**	
CMR	13 (52)
Positive non-quantifiable	11 (44)
Positive quantifiable $>10^{-4}$	1 (4)
Molecular response at week 11 (primary endpoint)	
CMR	20 (80)
Positive non quantifiable	3 (12)
Positive quantifiable $>10^{-4}$	2 (8)

* Before the start of blinatumomab infusion.

** After the end of blinatumomab infusion.



002

ZLEPŠENÍ DIAGNOSTIKY CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE IMPLEMENTOVÁNÍM NOVÝCH MOLEKULÁRNÍCH METOD A TECHNOLOGIÍ**EHA 2022**

Kateřina Machová Poláková

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko

Vyzvaná přednáška na EHA 2022 – SWG CML představila klíčové výstupy z mezinárodního projektu konsorcia EUTOS 2018-2021.

V roce 2021 byl finalizován program evropské harmonizace vyšetřování hladiny *BCR::ABL1* transkriptů typu major v mezinárodním měřítku (IS). V současnosti je komerčně dostupný referenční panel AcroMetrix™ umožňující validaci přepočtového koeficientu, kterou si mohou laboratoře využívající kontrolní gen *ABL1* provádět samostatně. Pro laboratoře využívající kontrolní gen *GUSB* je doporučováno pokračovat ve výměně vzorků s referenční laboratoří nebo využít uchované vzorky se známou hladinou *BCR::ABL1* v IS (White et al. *Leukemia* 2021). Pro kvantifikaci atypických transkriptů *BCR::ABL1* je doporučeno poměr *BCR::ABL1/kontrolní gen* vztahovat ke vzorku před zahájením léčby inhibitory tyrozinových kináz (TKI) a vyjadřovat výsledky jako individuální molekulární odpověď (IMR) (Ernst et al. *JCRCO* 2021).

Technickými experimenty a validací na souboru pacientů byl zjištěn rozdíl v efektivitě amplifikování major transkriptů e13a2 a e14a2 *BCR::ABL1* s použitím standardizované metody RT-qPCR, což se odráželo v hodnocení optimálního času dosažení velké molekulární odpovědi. Rozdíly v kvantifikaci nebyly zjištěny při aplikování kapkové digitální ddPCR (Salmon et al. *Leukemia* 2021). DdPCR je velmi přesná metoda pro kvantifikaci cílových genů a vhodná pro měření MRN (měřitelné reziduální nemoci). S využitím pacient-specifických assayí detekujících genomické zlomy *BCR::ABL1* a m ddPCR bylo možné vyhodnotit hlubokou molekulární odpověď měřenou před vysazením/přerušením léčby a vytvořit prediktivní model stratifikující pacienty dle pravděpodobnosti dosažení remise bez léčby (Machova Polakova et al. *Leukemia*

2021). Stratifikační model je v současnosti validován v rámci národní klinické studie HALF.

Sekvenování nové generace představuje metodu volby pro detekci mutací v kinázové doméně (KD) *BCR::ABL1*. Prostřednictvím NGS jsme zjistili, že časným ukazatelem pro detekci mutací v KD *BCR::ABL1* je nestabilní velká molekulární odpověď (Benesova et al. submitted 2022). Mimo gen *BCR::ABL1* byly sekvenovány další geny související s nádorovými onemocněními (panelové sekvenování) a zjištěny frekvence mutovaných genů u pacientů v chronické fázi a progredovaných fázích CML (Schönfeld et al. *Leukemia* 2022). Význam a klinický dopad somatických mutací v dalších nádorových genech je intenzivně studován v rámci mezinárodní spolupráce genomické aliance iCMLf a projektu HarmonyPlus.

Implementování nových molekulárních technologií a metod představuje účinný nástroj v precizní medicíně CML zahrnující bezpečné vysazování léčby TKI u pacientů v trvalých hlubokých molekulárních odpovědích a odhalení rizika progresu onemocnění související se somatickými mutacemi v *BCR::ABL1* a jiných nádorových genech, které odkrývají výraznou heterogenitu progredovaných fází CML.

**Annual Congress of European Society
of Gene & Cell Therapy 2022**

003

**CORRECTING CAUSAL MUTATIONS IN FANCONI ANEMIA
GROUP A PATIENT-DERIVED CELLS BY PRIME EDITING**Lucie Peterková¹, Markéta Racková¹, Michael Svatoň¹, Petr Sedláček²,
Lucie Šrámková², Karolína Škvárová Kramaržová¹¹*Klinika dětské hematologie a onkologie, lab. centrum CLIP,
Universita Karlova, 2. lékařská fakulta, Praha Motol, Česko*²*Klinika dětské hematologie a onkologie, Fakultní
nemocnice Motol, Praha Motol, Česko*

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disorder caused by mutations in genes involved in DNA repair. Most FA patients undergo bone marrow failure (BMF) early in childhood. The current treatment for BMF in FA is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, which can be associated with severe side effects. Genome-editing technologies hold great potential to change the treatment paradigm for FA, whereby the underlying genetic cause is corrected *ex vivo* in the patient's hematopoietic stem cells which are then returned to the patient body upon BMF. Prime editing (PE) is an advanced genome-editing technology that, unlike the traditional CRISPR/Cas9 system, does not require the activity of homology-directed repair pathway (HDR). We designed pegRNAs for the correction of two compound heterozygous *FANCA* mutations identified in a patient with FA (c.1A>G and c.4010+1-c.4010+18del) and tested their efficiency using different forms of pegRNA and prime editor molecules (plasmid/RNA delivery, engineered molecules) in the patient-derived fibroblasts.

For the c.1A>G, we obtained up to 15% of precisely edited DNA (imprecise editing \approx 0.5%) and detected full-length *FANCA* protein in edited cells. The level of corrected DNA increased over time in culture (up to fourfold over two weeks) in accordance with the hypothesized restoration of FA pathway. The PE tools designed for correction of the c.4010+1-c.4010+18del generated up to 1% of precisely corrected DNA (imprecise editing \approx 0.4%). Our results

show that prime editing can be successfully used for the correction of *FANCA* mutations in FA patient-derived cells.

Supported by KOG-202108-00904, Next Generation EU, LX22NPO5102, and IPE 6980395.

004

EHA 2022**EMERGENCY GRANULOPOIESIS INDUCES
A LYMPHOID TO MYELOID BIAS SWITCH IN
A SUBSET OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS**Karolína Vaníčková^{1, 2}, Petr Daněk¹, Mirko Milosevic³,
Miroslava K. Adamcová^{1, 4}, Nooralam Rai⁵, Francesca Matteini⁶,
M. Carolina Florian^{6, 7, 8}, Jeanine D'Armiento⁹, Jakub Rohlena³,
Kateřina Rohlenová³, Meritxell Alberich-Jorda¹¹*Oddělení hematooonkologie, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha, Česko*²*Faculty of Science, Charles University, Praha, Česko*³*Institute of Biotechnology of the Czech Academy of Sciences, Praha, Česko*⁴*Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric
Haematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles
University in Prague, University Hospital Motol, Praha, Česko*⁵*Department of Pediatrics, Columbia University,, New York, Spojené státy*⁶*Stem Cell Aging Group, The Bellvitge Institute for Biomedical
Research (IDIBELL), Barcelona, Španělsko*⁷*P-CMR[C], Barcelona, Španělsko*⁸*CIBER-BBN, Madrid, Španělsko*⁹*Department of Anesthesiology, Columbia University, New York, Spojené státy*

adapted to specific demands. While daily production of granulocytes is sustained by steady-state granulopoiesis, upon infection this program switches to emergency granulopoiesis (EG), to ensure enhanced and accelerated granulocytic production. Recently, it was shown that unperturbed hematopoiesis is sustained by multipotent progenitors, however,



during stress conditions, hematopoietic stem cells (HSCs) become active and responsible for coping with stress situations. Yet, whether and how HSCs play a role during EG is unknown.

Aims: The aim is to understand the role of HSCs at early stages of acute infection, and to determine the mechanisms that drive emergency granulopoiesis at the stem cell level.

Methods: The methods used in the project include single cell RNA sequencing, qRT-PCR, ELISA, whole-mount bone marrow microscopy, flow cytometry sorting and analysis, stem cell in vitro cultures, Wnt10b knockout mouse model and murine LPS administration.

Results: To understand the contribution of HSCs to the EG response, we performed single cell RNA sequencing analysis of sorted murine HSCs (Lin-c-Kit+Sca-1+CD48-CD150+) 4 hours after lipopolysaccharide (LPS) stimulation, which mimics a bacterial infection and activates EG in vivo. Strikingly, we observed radical changes in the HSC cluster composition between PBS control and LPS treated mice. Interestingly, these changing population dynamics were marked by alterations in HSC lineage bias, demonstrating that under EG there is an expansion of the myeloid-bias HSCs at expenses of the lymphoid-bias HSCs. Remarkably, we identified Procr (CD201) as a specific cell surface marker for this lymphoid to myeloid transition, allowing us to distinguish, sort and track the switch from CD201+ lymphoid-bias HSCs (present in PBS control) towards CD201- myeloid-bias HSCs (present upon LPS stimulation). Further, the abundant CD201- myeloid-bias HSC clusters were characterized by an inflammatory gene signature. Particularly interesting, was the elevated expression of Wnt10b. We verified that Wnt10b is upregulated in murine primary bone marrow cells upon LPS stimulation in vitro using qRT-PCR. Further, we demonstrated that Wnt10b is released in the bone marrow following LPS treatment in vivo using ELISA and whole-mount microscopy. We showed that Wnt10b activates the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway and promotes myeloid differentiation of Lin-c-Kit+Sca-1+ cells in vitro. In addition, our preliminary data suggests that the EG response is impaired in Wnt10b KO mice following LPS stimulation in vivo.

Summary/Conclusion: In conclusion, we observed that HSCs actively take part in early stages of EG by activating an inflammatory signature associated with the switch from lymphoid to myeloid bias, therefore ensuring sufficient production of myeloid cells to fight the infection. *Acknowledgements:* This work was partially supported by a GACR grant 22-18300S and institutional funding from the IMG CAS (RVO 68378050).

005

ASH 2022

FLIPI24: AN IMPROVED INTERNATIONAL PROGNOSTIC MODEL DEVELOPED ON EARLY EVENTS IN FOLLICULAR LYMPHOMA

Vít Procházka¹, Matthew Maurer², Christopher R. Flowers³, Lasse Jakobsen⁴, Diego Villa⁵, Caroline Weibull⁶, Elliot Cahn², Alexandra Smith², Herve Ghesquieres⁷, Robert Kriedel⁸, Maher Gandhi⁹, Chan Cheah¹⁰, Eliza Hawkes¹¹, John Seymour¹², Ciara Freeman¹³, Michael Clausen¹⁴, Björn Wahlin¹⁵, Jonathan Friedberg¹⁶, Carla Casulo¹⁶, Thomas Habermann¹⁷, Yucai Wang^{18, 17}, Loretta Nastoupil¹⁸, Peter De Nully Brown¹⁹, David Belada²⁰, Andrea Janíková²¹, Heidi Mociková²², Tomáš Füst²³, Richard Burack²⁴, Peter Martin²⁵, Jonathon Cohen²⁶, Izidore Lossos²⁷, Brad Kahl²⁸, Brian Link²⁹, Karin Smedby⁶, Laurie Sehn³⁰, Marek Trněný³¹, Tarec Galaly³², James Cerhan²

¹Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, Česko

²Department of Quantitative Health Sciences Research, Mayo Clinic, Rochester, MN, Spojené státy

³Department of Lymphoma and Myeloma, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, Spojené státy

⁴Department of Clinical Medicine, Aalborg University, Aalborg, Aalborg, Dánsko

⁵Centre for Lymphoid Cancer, BC Cancer, Vancouver, BC, Kanada

⁶Division of Clinical Epidemiology, Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Stockholm, Švédsko

⁷Department of Hematology, Lyon Sud University Hospital/Hospices Civils de Lyon, Lyon, Francie



⁸⁾University Health Network, Princess Margaret Cancer Center, Toronto, ON, Kanada

⁹⁾Department of Haematology, Princess Alexandra Hospital, Mater Research University of Queensland, Brisbane, Brisbane, QLD, Austrálie

¹⁰⁾Linear Clinical Research and Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, WEA, Austrálie

¹¹⁾Department of Clinical Haematology, Austin Health, Heidelberg, VIC, Austrálie

¹²⁾Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, VIC, Austrálie

¹³⁾Department of Blood and Marrow Transplant and Cellular Immunotherapy, H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, FL, Spojené státy

¹⁴⁾Department of Haematology, Vejle Hospital, Vejle, Dánsko

¹⁵⁾Karolinska Institute, Stockholm, Švédsko

¹⁶⁾James P. Wilmut Cancer Center, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, Spojené státy

¹⁷⁾Division of Hematology, Department of Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, Spojené státy

¹⁸⁾The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, Spojené státy

¹⁹⁾Department of Hematology, Copenhagen University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Dánsko

²⁰⁾IV Dept of internal medicine - hematology, University Hospital, Hradec Králové, Česko

²¹⁾Department of Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital, Brno, Česko

²²⁾Department of Internal Medicine, Third Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady, Praha, Česko

²³⁾Department of Mathematical Analysis and Applications of Mathematics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Česko

²⁴⁾Department of Pathology and Laboratory Medicine/Hematopathology, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, Spojené státy

²⁵⁾Meyer Cancer Center, Weill Cornell Medical College-New York Presbyterian Hospital, New York, NY, Spojené státy

²⁶⁾Department of Hematology and Medical Oncology, Emory University, Atlanta, GA, Spojené státy

²⁷⁾Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami School of Medicine, Miami, FL, Spojené státy

²⁸⁾Division of Oncology, Washington University School of Medicine in St. Louis, Saint Louis, MO, Spojené státy

²⁹⁾Division of Hematology, Oncology, and Blood & Marrow Transplantation, University of Iowa, Iowa City, IA, Spojené státy

³⁰⁾Centre for Lymphoid Cancer, Department of Medical Oncology, BC Cancer and The University of British Columbia, Vancouver, BC, Kanada

³¹⁾1st Department of Internal Medicine - Hematology, General Hospital, Charles University, Praha, Česko

³²⁾Department of Hematology and Aalborg Hospital Science and Innovation Center (AHSIC), Aalborg University Hospital, Aalborg, Dánsko

Background: Early events are associated with inferior outcomes in follicular lymphoma (FL) and increased risk of death due to refractory FL. Risk prediction of early events prior to the start of therapy may enhance clinical management and research strategies. We report the FL International Prognostic Index model developed specifically to predict the risk of event within 24 months (EFS24) of starting first-line immunochemotherapy (IC) (FLIPI24).

Methods: Modeling was performed using individual patient data from 10 observational cohorts from Europe, North America, and Australia. Eligible patients were diagnosed with grades 1-3A FL and initiated frontline R-CHOP, R-CVP, R-bendamustine (B-R), or like therapies. Event-free survival (EFS) was defined as time from start of IC to progression, retreatment, transformation, or death due to any cause. Model development utilized a truncated Cox model stratified on IC type and cohort with a time-dependent adjustment for maintenance therapy. Multiple imputation was implemented to address missing data. Functional forms of variables were assessed using splines. Model selection was based on model performance, clinical relevance, and parsimony. Gradient boosting machines were evaluated as a complementary approach and used to inform model selection. Model building was performed on an 80% split sample with 20% held for internal testing. External validation



occurred in an independent cohort. FLIPI24 risk scores assumed B-R or R-CHOP based chemotherapy and 50% likelihood of maintenance.

Results: 4485 patients initiating frontline IC between 2002 and 2018 were utilized in the analysis; 3577 patients were utilized for model building and 908 for internal model testing. Median age at diagnosis in the model build dataset was 61 years (IQR 53-69) and 51% were male. FLIPI was 21%, 32%, and 48% for low, intermediate, and high risk, respectively. IC type was 1874 R-CHOP or like (52%), 730 B-R or like (20%), and 973 R-CVP (27%); 2164 received CD20 antibody maintenance (61%). At median follow-up of 77 months (IQR 48-115), EFS24 estimate was 81% (95% CI: 79-82) and 835 patients (23%) died. 5-year survival after an early (non-death) event was 46% (95% CI: 42-50).

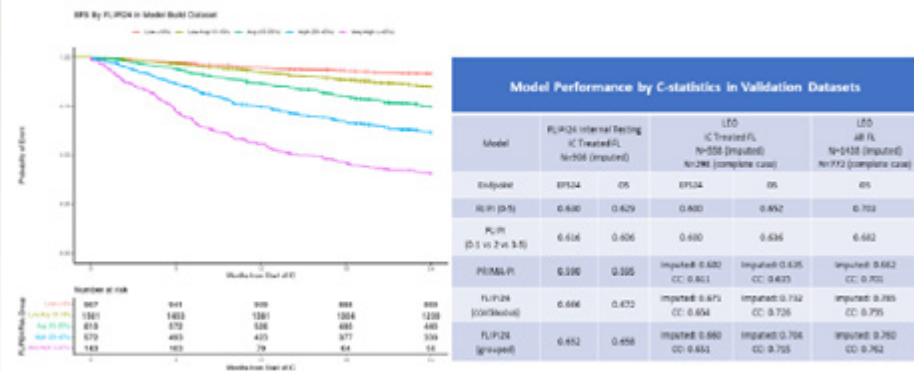
The FLIPI24 model utilizes 5 continuous variables: age (linear 60-90 years with inflection at age 75), hemoglobin (linear 8-17 g/dL), white blood cell count (linear 4-11 10⁹/L), normalized lactate dehydrogenase (linear 0.5-5), and beta-2-microglobulin (linear 1-10 mg/L). Linear variables and valid ranges were utilized based on close examination of functional forms across potential models. Continuous FLIPI24 risk scores were grouped for visualization in K-M curves as follows: very low risk (0-0.10), low risk (0.10-0.15), average risk (0.15-0.20), high risk (0.20-0.40), very high risk (>0.40), Figure 1.

Internal validation was performed on the 20% holdout set (N=908). The FLIPI24 had superior concordance (c-stat) for EFS24 (c-stat=0.666) compared to FLIPI (c-stat=0.630) and PRIMA-PI (c-stat=0.590) models, Table 1. Importantly, FLIPI24 also improved prognostic ability for 10-year OS following IC (c-stat = 0.672) vs FLIPI (c-stat=0.629) or PRIMA-PI (c-stat=0.595).

External validation was performed in a prospective cohort of 1438 newly diagnosed patients with FL (558 treated with IC) enrolled in the multicenter US LEO Cohort between 2015 and 2020. The FLIPI24 had superior c-stats compared to the FLIPI and PRIMA-PI for EFS24 (0.671 vs 0.600 vs 0.602)

and OS (0.732 vs. 0.652 vs 0.635) in IC treated patients and for OS (0.785 vs 0.703 vs 0.662) when assessed in all patients.

Conclusion: The FLIPI24 model provides an individual risk score at diagnosis for the likelihood of experiencing an event within 24 months from starting IC. The FLIPI24 was rigorously developed, tested, and externally validated using large harmonized and pooled international observational cohorts from the IC era. The FLIPI24 utilizes objective variables easily and reliably measured at diagnosis. A novel feature of the model is the significance of established blood-based measurements in the model, which appears to capture underlying tumor and host biology. Model performance for FLIPI24 was superior to standard clinical models for prediction of both EFS24 and OS in internal and external validation sets. Elevated FLIPI24 risk represents a patient population for further biologic studies and who should be considered for novel frontline therapies.





006

COMPREHENSIVE NGS TESTING ALLOWS INTEGRATED ASSESSMENT OF INDIVIDUAL PATIENT PROGNOSIS IN MULTIPLE MYELOMA

Jana Kotašková^{1, 2, 3}, Andrea Marečková¹, Daniela Pokrivčáková¹, Eva Ondroušková¹, Viera Hrabčáková¹, Veronika Navrkalová^{1, 2}, Jakub Porc², Karla Plevová^{1, 2, 3}, Marie Jarošová^{1, 3}, Šárka Pospíšilová^{1, 2, 3}, Martin Štork⁴, Luděk Pour⁴

¹CMBG IHOK, Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česko

²CEITEC (Central European Institute of Technology), Masarykova Univerzita, Brno, Česko

³Ústav lékařské genetiky a genomiky, Masarykova Univerzita, Brno, Česko

⁴IHOK, Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česko

Background

Multiple myeloma (MM) represents a lymphoproliferative disorder with a vast number of alterations on both chromosomal and gene levels. FISH panel detecting structural changes of chromosome 1, monosomy 13/del(13q), del(17p) and disruptions of the IGH gene remain the gold standard in MM prognostication. Low tumor cell fraction in the bone marrow (BM) biopsies dramatically limits the routine FISH analysis. Plasma cells are either labelled via cytoplasmic immunoglobulin light chains (c-IG) or separated. Unfortunately, up to 20–60 % of MM samples referred to the laboratory (all disease stages) cannot be tested due to a lack of cancer cells needed for FISH analysis. This obstacle can be overcome with alternative methods using DNA isolated from low amounts of separated cells such as aCGH or NGS. Moreover, it was reported that mutations in genes like *TP53*, *KRAS*, and *NRAS* negatively influence the disease outcome and should be tested routinely.

Aims

Our study focused on bone marrow samples with plasma cell infiltration below 50 %. We employed a custom NGS panel to detect simultaneously mutations in 67 genes, genome-wide copy number alterations (CNAs), IGH/

EHA 2022

IGK/IGL rearrangements, and common IGH translocations in one analysis. Such comprehensive NGS testing allows integrated assessment of individual patient prognosis.

Methods

Plasma cells were immunomagnetically separated from BM biopsies of 35 patients with MM (under informed consent). The proportion of malignant plasma cells in each sample was assessed by flow cytometry with a median of 18 % (range 0,8 – 42 %). The median purity of the separated cells reached 92 % (range 72 – 99 %). DNA was analyzed by the custom NGS panel LYNX (Navrkalova et. al). We compared detected CNAs and translocations with FISH results where possible.

Results

An integrated NGS analysis of separated plasma cells confirmed disease heterogeneity. Besides routinely FISH tested aberrations, we detected additional CNAs in every sample. All 35 cases carried complex changes (≥ 3 aberrations). The most often affected chromosomes were chr1, chr5, chr9, chr15, and chr19. We also detected somatic mutations in at least one of the tested genes in the majority of the samples (30/35). In part of the samples, detected mutations were subclonal. The most often affected genes were *KRAS* (12/35) and *NRAS* (11/35). We have detected mutation in the *TP53* gene in three cases and confirmed clonal biallelic inactivation of this gene in two of them. Prognostically relevant translocations were detected as follows: 2x t(4;14), 1x t(11;14), 1x t(14;20). In addition, we detected rare translocations t(8;14) and t(12;14). We were able to identify clonal IG rearrangements in most of the cases. Detected clonal rearrangements of IG kappa or lambda correlated with results of flowcytometric analysis of IG light chains.

Summary – Conclusion

Our NGS panel represents a unique tool for analyzing genomic biomarkers relevant to the prognostication of multiple myeloma. We evaluated all aberrations that are included in the guidelines. In addition, we screened



genome-wide CNAs to uncover the disease heterogeneity and detected mutations of key genes involved in MM pathogenesis. Taken together, our results demonstrate that a comprehensive NGS analysis allows personalized tumor genotyping even in samples with a low cancer cell fraction.

Supported by AZV NV19-03-00091, MZ-CR RVO 65269705.

References

Navrkalova et al, *J Mol Diagn.* 2021; 23(8):959-974.

007**ASH 2022**

ROZDÍLY V KLINICKÉM PRŮBĚHU A LÉČBĚ INFEKCE SARS-COV2 U PACIENTŮ S CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIÍ V JEDNOTLIVÝCH FÁZÍCH PANDEMIE: STUDIE ERIC

Martin Špaček¹⁾, Andrea Visentin²⁾, Lydia Scarfò³⁾,
Thomas Chatzikonstantinou⁴⁾, Martin Šimkovič⁵⁾, Michael Doubek⁶⁾

¹⁾I. interní klinika - hematologie, 1. lékařská fakulta
UK a VFN v Praze, Praha 2, Česko

²⁾Hematology and Clinical Immunology Unit, Department
of Medicine, University of Padova, Padova, Itálie

³⁾Università Vita-salute San Raffaele and IRCC Ospedale San Raffaele, Milan, Itálie

⁴⁾Hematology Department and HCT Unit, George
Papanicolaou Hospital, Thessaloniki, Řecko

⁵⁾IV. interní hematologická klinika, FN Hradec Králové a Lékařská
fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, Česko

⁶⁾Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno
a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Česko

Pacienti s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) mají vysoké riziko závažného průběhu onemocnění covid-19. Od počátku roku 2020 se postupně vyvíjely

jak varianty SARS-CoV2, tak různé terapeutické strategie, včetně očkování apod. Cílem této studie ERIC (European Research Initiative on CLL) bylo analyzovat v jednotlivých fázích průběhu pandemie dopad covid-19 na pacienty s CLL/SLL a monoklonální B-lymfocytózou (MBL) v retrospektivní mezinárodní multicentrické studii sledující období od 1/2020 do 5/2022. Během pandemie byly identifikovány 4 fáze, zařazeno bylo 1540 pacientů (93,8% CLL, 4,1% SLL a 2,1% MBL), 65% mužů, medián věku v době covid-19 byl 69 let, medián CIRS byl 4 (IQR 2-7). 49,6% pacientů bylo léčeno v posledních 12 měsících před covid-19, 38,8% bylo v době diagnózy na léčbě (BTKi 51,1%, BCL2i 20,7%, chemo/chemoimunoterapie 21,5%, ostatní 6,7%). Celkem 34,4% pacientů bylo v domácí péči, 49,9% potřebovalo hospitalizaci a 15,7% bylo přijato na jednotku intenzivní péče (JIP). Po mediánu sledování 2,7 měsíce byla infekce vyléčena v 1124/1540 (73%) případech, zatímco 23% pacientů zemřelo a 3,6% bylo stále v lékařské péči. Mezi jednotlivými fázemi byly signifikantní rozdíly komorbiditách (arytmie, onemocnění ledvin, další malignity), v předlěčenosti a proočkovánosti. Změny byly rovněž v symptomech či terapeutických přístupech. V pozdějších fázích bylo hospitalizováno méně pacientů (84,5% vs 67,3% vs 60,3% vs 45,8%, $p < 0,001$), bylo méně přijetí na JIP (20,6% vs 17,2% vs 13,3% vs 8,1%, $p < 0,001$) a méně pacientů zemřelo (29,8% vs 25,5% vs 21,8% vs 15,8%, $p = 0,002$).

Závěr: V rámci studie ERIC byla analyzována velká série pacientů s CLL infikovaných SARS-CoV2 v průběhu více než 2 let pandemie. Pacienti v pozdějších fázích byli méně často hospitalizováni, jen výjimečně potřebovali hospitalizaci na JIP a méně často zemřeli v důsledku infekce SARS-CoV2. Důležitou roli v tom mohlo hrát zlepšení léčby covid-19, vysoká míra očkování i změny variant SARS-CoV2 v průběhu času.



008

ASH 2022

**UPDATED RESULTS FROM A PHASE 1/2 TRIAL
EVALUATING SUBCUTANEOUS EPCORITAMAB WITH
RITUXIMAB + LENALIDOMIDE (R2) IN PATIENTS WITH
RELAPSED OR REFRACTORY FOLLICULAR LYMPHOMA**

Lorenzo Falchi¹⁾, Pau Abrisqueta²⁾, Marcel Nijland³⁾,
Sirpa Leppä⁴⁾, Martin Hutchings⁵⁾, Harald Holte⁶⁾, Reid W. Merryman⁷⁾,
Pieternella Lugtenburg⁸⁾, Sven de Vos⁹⁾, Chan Y. Cheah¹⁰⁾, Jacob Haaber
Christensen¹¹⁾, Luca Arcaini¹²⁾, Kristina Drott¹³⁾, Mats Hellström¹⁴⁾, Lori A.
Leslie¹⁵⁾, Umberto Vitolo¹⁶⁾, Ali Rana¹⁷⁾, Aqeel Abbas¹⁷⁾, Liwei Wang¹⁷⁾,
Minh Dinh¹⁸⁾, **David Belada**¹⁹⁾

¹⁾Lymphoma Service, Memorial Sloan Kettering Cancer
Center, New York, NY, Spojené státy

²⁾Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Španělsko

³⁾University Medical Center Groningen and University
of Groningen, Groningen, Nizozemsko

⁴⁾Helsinki University Hospital Comprehensive Cancer
Center and University of Helsinki, Helsinki, Finsko

⁵⁾Rigshospitalet, Copenhagen University Hospital, Copenhagen, Dánsko

⁶⁾Oslo University Hospital and KG Jebsen Center
for B-cell Malignancies, Oslo, Norsko

⁷⁾Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, Spojené státy

⁸⁾Department of Hematology, On behalf of the Lunenburg Lymphoma
Phase I/II Consortium-HOVON/LLPC, Erasmus MC Cancer
Institute, University Medical Center, Rotterdam, Nizozemsko

⁹⁾Ronald Reagan University of California Los Angeles
Medical Center, Los Angeles, CA, Spojené státy

¹⁰⁾Sir Charles Gairdner Hospital, Nedlands, Austrálie

¹¹⁾Odense University Hospital, Odense, Dánsko

¹²⁾Department of Molecular Medicine, University of Pavia and Division of
Hematology, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Itálie

¹³⁾Skåne University Hospital, Scania, Švédsko

¹⁴⁾Uppsala University Hospital, Uppsala, Švédsko

¹⁵⁾Hackensack University Medical Center, Hackensack, NJ, Spojené státy

¹⁶⁾Candiolo Cancer Institute, FPO-IRCCS, Candiolo (Turin), Itálie

¹⁷⁾Genmab, Princeton, NJ, Spojené státy

¹⁸⁾AbbVie, North Chicago, IL, Spojené státy

¹⁹⁾4th Department of Internal Medicine – Hematology, University
Hospital and Faculty of Medicine, Hradec Králové, Česko

Background: An unmet need remains for patients with relapsed or refractory (R/R) follicular lymphoma (FL). Subcutaneous epcoritamab is a bispecific antibody that simultaneously binds to CD3 on T cells and CD20 on B cells to kill malignant B cells. High response rates were observed in arm 2b of the phase 1/2 EPCORE NHL-2 trial, which evaluated epcoritamab with R² in patients with R/R FL (Falchi, ASCO 2022). Here we present updated results.

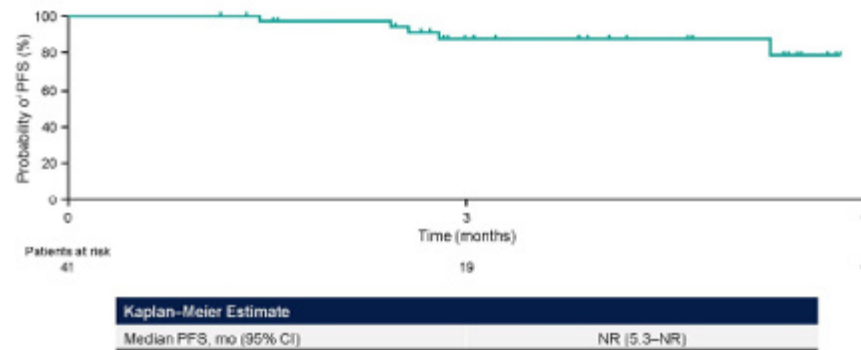
Methods: Patients ≥18 years of age with R/R FL received epcoritamab 48 mg + R² for 12C of 28 days each. Epcoritamab was administered QW at C1–2, and Q4W at C≥3 for up to 2 years. To mitigate cytokine release syndrome (CRS), step-up dosing and corticosteroid prophylaxis were required in C1.

Results: As of June 10, 2022, 62 patients were treated. Median age was 65 years (range, 30–79), 58% had stage IV disease, 52% had FLIPI 3–5, 31% had primary refractory disease, and 50% had received 1 prior line of therapy (range, 1–9). At a median follow-up of 4.0 months, 56 patients (90%) remained on treatment. The most common treatment-emergent adverse events were CRS (37%; 27% grade 1, 10% grade 2), neutropenia, fatigue, and injection-site reactions. Most CRS events occurred after the first full dose of epcoritamab; all events resolved in a median of 2 days. There was one case of grade 1 ICANS that resolved. In efficacy-evaluable patients (n=41), the overall response rate was 95%, and 73% achieved a complete metabolic response (CMR). Most CMRs (27/30) were achieved by the first assessment (6 weeks). The longest duration of response was 4.5+ months. Median progression-free survival was not reached (Figure).



Conclusions: Subcutaneous epcoritamab + R² demonstrated a manageable safety profile in patients with R/R FL. CRS events were low grade and resolved. The high CMR rate observed is encouraging and supports ongoing investigation of epcoritamab + R² in patients with R/R FL.

Figure. PFS with epcoritamab + R² in EPCORE NHL-2 arm 2b.



NR, not reached; PFS, progression-free survival; R², rituximab + lenalidomide.

009

ASH 2022

EFFICACY AND SAFETY OF IBRUTINIB COMBINED WITH STANDARD FIRST-LINE TREATMENT OR AS SUBSTITUTE FOR AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION IN YOUNGER PATIENTS WITH MANTLE CELL LYMPHOMA: RESULTS FROM THE RANDOMIZED TRIANGLE TRIAL BY THE EUROPEAN MCL NETWORK

Pavel Klener

I. interní klinika- hematologie, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze, Praha 2, Česko

Introduction: High-dose cytarabine-containing immunochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation (ASCT) and rituximab maintenance represents the current standard of care for younger mantle cell

lymphoma (MCL) patients. The BTK-inhibitor ibrutinib has shown promising efficacy in relapsed (Dreyling et al, Hemasphere 2022) and previously untreated older MCL patients (Wang et al., NEJM 2022). In 2016, the European MCL Network initiated the randomized, open-label, 3-arm TRIANGLE trial to evaluate the addition of ibrutinib to standard treatment (arm A+I) in comparison to the previous standard treatment (arm A) and an ibrutinib containing treatment without ASCT (arm I).

Patients and methods: Patients with previously untreated, advanced stage II-IV MCL, up to 65 years and suitable for high-dose cytarabine and ASCT were randomized 1:1:1 to the 3 trial arms A, A+I, and I in 13 European countries and Israel. Study treatment consisted of 3 cycles R-CHOP/R-DHAP without (arm A) or with ibrutinib added to R-CHOP cycles and 2 years maintenance (arms A+I, I). ASCT was planned for responding patients of arms A and A+I. Rituximab maintenance could be applied according to national guidelines in all responding patients irrespective of the trial arm. For the primary outcome, failure-free survival (FFS), stable disease at the end of induction, any progression, or death were counted as events. Three pairwise log-rank tests for FFS were monitored with regular pre-planned interim analyses maintaining each a one-sided 0.0167 significance level. A pre-defined decision criterion based on the statistical significance of the treatment comparisons was established to determine the future treatment recommendation. Secondary outcomes were overall response (OR), complete remission (CR), overall survival (OS), and grade 3-5 AEs.

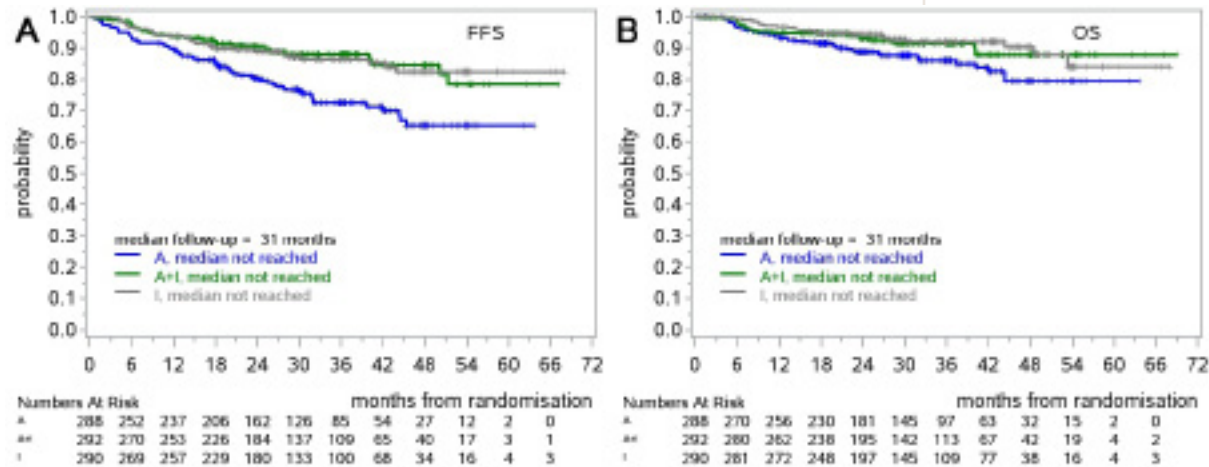
Results: Between July 2016 and December 2020, 870 patients were randomized to A (n=288), A+I (n=292), and I (n=290). Median age was 57 years (range 27-68), 76% of the patients were male, 87% had stage IV, and 58%/27%/15% had low/intermediate/high risk MIPI. OR and CR rates were 94% and 36% of 272 evaluable patients in arm A (R-CHOP/R-DHAP) as compared to 98% and 45% of 559 evaluable patients in the combined A+I/I arms (ibrutinib-R-CHOP/R-DHAP). After a median follow-up of 31 months, A failed to show superiority over I in terms of FFS with 3-year FFS 72% (A) vs. 86%



(I; $p=0.9979$, hazard ratio: 1.77, Figure 1A). A+I was superior to A in terms of FFS with 3-year FFS 88% (A+I) vs. 72% (A; $p=0.0008$, hazard ratio: 0.52). Subgroup analyses by the intention to apply rituximab maintenance did not change the main results on the lack of superiority of A vs. I and the superiority of A+I vs. A. Statistical monitoring for the FFS comparison of A+I vs. I is still ongoing. Three-year OS was 86% in A, 91% in A+I, and 92% in I (Figure 1B). There were no substantial differences in the occurrence of grade 3-5 AEs during induction with R-CHOP/R-DHAP vs ibrutinib-R-CHOP/R-DHAP (neutropenia: 47%/49% of patients, leukopenia: 15%/15%, febrile neutropenia: 9%/12%, infections and infestations: 9%/12%, cardiac disorders: 2%/3%). The two ASCT-containing arms did not substantially differ in grade 3-5 AEs (A/A+I: neutropenia: 36%/33%, febrile neutropenia: 20%/22%, leukopenia: 17%/17%, infections and infestations: 17%/20%). In contrast,

during maintenance, there were substantially more grade 3-5 AEs in A+I as compared to A and I (A+I/A/I: neutropenia: 44%/17%/23%, leukopenia: 4%/2%/2%, febrile neutropenia: 6%/3%/3%, infections and infestations: 25%/13%/19%, cardiac disorders: 3%/1%/4%).

Conclusions: The addition of ibrutinib during induction and as maintenance with or without ASCT showed strong efficacy with acceptable toxicity. It has been clearly demonstrated that the current standard high-dose regimen is not superior to the new ibrutinib-containing regimen without ASCT. More follow-up is needed to clarify the role of ASCT in the context of ibrutinib-containing treatment. However, the current results already support the use of ibrutinib in the first-line treatment of younger MCL patients.





010

ASH 2022

**SURVIVAL OF PATIENTS WITH
PRIMARY MEDIASTINAL B-CELL LYMPHOMA
TREATED BY IMMUNOCHEMOTHERAPY
WITH OR WITHOUT RADIOTHERAPY**

Kamila Polgárová¹⁾, Andrea Janíková²⁾, David Belada³⁾, Vít Procházka⁴⁾,
Juraj Ďuraš⁵⁾, Heidi Móciková⁶⁾, Kateřina Steinerová⁷⁾, Vít Campr⁸⁾,
Petra Blahovcová⁹⁾, David Zogala¹⁰⁾, Václav Ptáčník¹⁰⁾, Marek Trněný¹⁾

¹⁾1. Interní klinika, VFN, Praha, Česko

²⁾Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno, Brno, Česko

³⁾IV. interní hematologická klinika, FN Hradec Králové, Hradec Králové, Česko

⁴⁾Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc, Olomouc, Česko

⁵⁾Klinika hematoonkologie, FN Ostrava, Ostrava, Česko

⁶⁾Hematologická klinika, FNKV, Praha, Česko

⁷⁾Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň, Plzeň, Česko

⁸⁾Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha, Česko

⁹⁾Datacentrum, 1. IK VFN, Praha, Česko

¹⁰⁾Ústav nukleární medicíny, VFN, Praha, Česko

Introduction:

Primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL) is B-non-Hodgkin lymphoma subtype with unique clinical and biological characteristics mostly affecting younger patients. The current treatment standard is based on combination of rituximab and anthracycline based chemotherapy (R-CHT), either standard (R-CHOP) or intensified (DA-EPOCH-R). Radiotherapy (RT) consolidation has been standard of care for a long time, but its role is currently unclear, especially in the context of PET/CT guided therapy and long term toxicity prevention considering young patient population (Hayden et al. 2020, Giulino-Roth 2018). In this analysis we evaluate the survival benefit of RT consolidation in patients with PMBL achieving PET negative (PET-neg) response after R-CHT.

Methods:

Patients with confirmed diagnosis of PMBL observed in NiHiL project (Gov Trial No: NCT03199066) were analysed. All patients were treated by R-CHT; PET/CT was performed at the end of the immunochemotherapy. The treatment response was evaluated according to Cheson 2007 criteria. Only patients achieving PET negativity were included in primary analysis.

Results:

The study included 230 patients out of whom 133 (57.8%) were women. Median age was 37 years (range 19–79); localised stage (I–II) was observed in 165 pts (71.7%) and low or low-intermed IPI in 189 patients (82.2%). The diagnosis was confirmed by central pathologist in all cases. Patients were treated by R-CHT, mostly R-CHOP (52.2%) and R-CHOEP-like (25.2%; i.e. R-CHOEP or DA-EPOCH-R); other intensive regimens, incl. platinum were used in 19.6% of patients; 48 patients (20.8%) received ASCT as part of first line induction. PET/CT was performed at the end of R-CHT (including ASCT); 174 patients (75.7%) achieved PET-neg remission at the end of the immunochemotherapy, 56 (24.3%) were PET positive (PET-pos). After reaching PET negativity, radiotherapy was performed in 68 patients (39.1%) with median dose of 36Gy (range 20–42Gy); 106 patients were not consolidated by RT and observed (OBS). There was higher incidence of bulky disease and B-symptoms in RT group (57% vs 47% and 57% vs 48% resp.) without reaching statistical significance.

Median follow up was 5.9 years. OS and PFS probability at 6y was 90.5% and 83.6% resp. for the whole cohort. RT consolidation in PET-negative subgroup led to a significant improvement ($p=0.039$) in PFS at 6y with 95% ($n=68$) vs 85.3% in OBS group ($n=106$). This was, however, not transformed into the OS difference (94.5% vs 92.1% probability at 6y for RT vs OBS; HR 1.64, CI95% 0.52–5.8), fig. 1. In subgroup of patients treated by R-CHOP, there was an insignificant trend for better PFS probability in RT group (HR 2.41, 95%CI 0.71–6.92, $p=0.17$). This was not reflected in any OS difference. The outcome



of patients who reached PET negativity by R-CHOEP was the same regardless of the radiotherapy use.

Conclusion:

Our analysis of retrospectively recorded patients shows that skipping RT in PET-neg PMBL patients at the end of immunochemotherapy does not hamper overall survival. There was borderline improvement of PFS. The patient cohorts with different chemotherapy regimens were not big enough to analyse the significance. However, data observed in patient subpopulation treated by CHOEP-like regimen confirm already published observations (Dunleavy et al. 2013) concluding possible RT oblivion after intensified immunochemotherapy. Therefore, the choice between radiotherapy consolidation vs observation in PET negative patients should be discussed with the patient especially when less intensive regimen (R-CHOP) is used.

O11**ASH 2022****TARGETING OF SFK AND CAMK CONTRIBUTES TO ANTI-LEUKEMIC ACTIVITY OF NOVEL FLT3 TRISUBSTITUTED PURINE INHIBITORS: EFFECTIVE THERAPEUTIC APPROACH FOR AML WITH FLT3 MUTATIONS**

Pavla Kořalková¹⁾, Nikola Niederlová¹⁾, Iveta Hradilová¹⁾, Jan Gurský¹⁾, Pavla Chaloupková¹⁾, Barbora Čudová²⁾, Helena Urbánková²⁾, Eva Řezníčková³⁾, Tomáš Gucký³⁾, Denisa Myslivcová⁴⁾, Monika Beličková⁴⁾, Vladimír Kryštof³⁾, Vladimír Divoký¹⁾

¹⁾Ústav biologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

²⁾Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, Česko

³⁾Katedra experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

⁴⁾Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko

We have recently developed compound LGR3922, a potent inhibitor of FLT3 receptor tyrosine kinase (RTK), which displays selectivity and potency in *in vitro* and *in vivo* AML models (compound 7d, Gucky T et al, J Med Chem. 2018;61(9):3855). In addition, LGR3922 showed strong inhibitory activity against Src family kinases (SFK) in the *in vitro* settings (Fig. 1A; ASH meeting abstract, Radosova Muchova et al, Blood. 2016;128(22):1569). Here, we present additional characterization of the lead compound LGR3922 and demonstrate its potent antileukemic activity in MLL/FLT3-ITD cell lines, murine xenografts and *ex vivo* primary AML samples.

LGR3922 exhibited strong anti-proliferative effect against MV4-11 and MOLM-13 cells. Contrary to quizartinib (quiz), LGR3922 simultaneously reduced phosphorylation levels of FLT3-SFK and their downstream molecules STAT5 and ERK in both AML cell lines. Interestingly, the inhibitory effect of LGR3922 on SFK, STAT5 and ERK increased over time, especially in the MOLM-13 cells. Similar results were only seen for the combination treatment with quiz and dasatinib (das). Dual-targeting of FLT3-SFK by LGR3922 was



further confirmed on MV4-11 xenografts. In the long-term *in vivo* experiment with repeated doses of the tested inhibitors, LGR3922 showed similar trends in initial treatment response as the combination treatment with quiz and das; quiz exhibited less efficient inhibitory effects at this stage. The tumor reduction was most significant ($p \leq 0.0001$) in LGR3922 group; 3 out of 6 tumors were completely eradicated during the treatment period (Fig. 1B). Complete tumor eradication (in 1 out of 5 animals) over the treatment period was then seen only in combination quiz and das (Fig. 1B). No adverse effects on blood count parameters or body weight were associated with LGR3922 compared to combination treatment with quiz and das, where temporary body weight loss and only limited weight gain were observed.

Next, we focused on additional targets of the unique kinome profile of LGR3922. Besides the RTK class III and SFK, members of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases (CAMK) belong to other druggable nodes of AML-associated networks (Fig. 1A). Among them, the drug was highly active against MNK2 and CaMK2 γ in kinase selectivity profiling study (Fig. 1A). Indeed, we observed that LGR3922 inhibited p-eIF4E as a direct target of MNK2 and also CaMK2 γ activity, already in 10 nM after 24-hour treatment of MV4-11 (with a dose response over the concentration range), in contrast to quiz and das. We hypothesize that this activity modulating leukemia cell proliferative abilities, cooperating with FLT3/SFK inhibition, may elicit more effective eradication of AML cells than quiz and das or quiz/das combination.

We then evaluated toxicity of LGR3922 on normal hematopoiesis using colony forming unit (CFU) assays with progenitor cells from several healthy donor controls. LGR3922 inhibited colony formation in a dose-dependent manner; maximal tolerated concentration (MTC) for all healthy samples was 100 nM, in some samples the reduced granulocyte-macrophage (CFU-GM) and burst forming unit-erythroid (BFU-E) colony forming ability was not observed up to a concentration of 200 nM. Quiz and das exposure showed MTCs at

20 nM and 5 nM, respectively; in quiz/das combination at 10 nM/0.5 nM; 10 nM/5 nM was already toxic.

Then, we performed CFU assays on 4 primary human AML samples with FLT3-ITD mutations ($n=3$) or FLT3-TKD+KMT2A::MLLT3 ($n=1$). Cultures with LGR3922 at 100 nM reduced the number of colonies by ~70% in all FLT3-ITD patient samples. The inhibitory effects were comparable to or a little more potent than MTCs of quiz or quiz/das combination. Das culture had significantly lower effect on colony formation for the tested concentrations. In the FLT3-TKD+KMT2A::MLLT3 positive sample, fusion transcript was quantified in harvested colonies. While LGR3922 significantly reduced KMT2A::MLLT3 fusion transcript, no effects were observed for MTCs of single agent cultures with quiz or das. Only a combination of quiz/das exceeding MTC (10 nM/5 nM) resulted in a slight decrease of KMT2A::MLLT3 fusion transcript levels.

Taken together, these data suggest effectiveness of our new LGR3922 compound and provide a rationale for further development and testing of this molecule for MLL/FLT3-ITD AMLs, and, potentially, other types of AMLs.

Grant support: Program EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102; GA19-09086S; MH CZ-DRO (UHKT, 00023736).

*These authors contributed equally to this work.

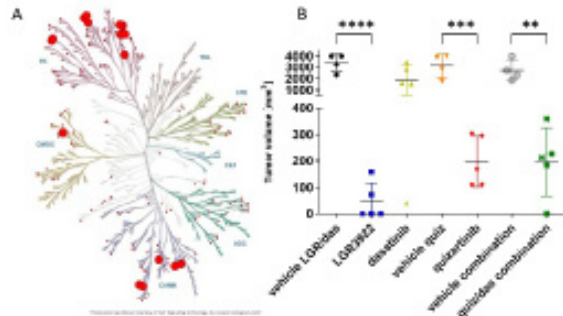


Figure 1. A) Kinase dendrogram for LGR3922. Large red circles indicate kinases inhibited by over 90% at 10 nM of LGR3922 (PDGFR β , FLT3, CLK1, TRKC, TRKA, QIK, TRKB, CaMK2 δ , SIK, PDGFR α , YES, FMS, CaMK2 γ , KIT, MNK2, ACK, SRC). Small circles depict all tested kinases.

B) MV4-11 xenografts. Tumor volume regression after 12 doses of indicated compounds.

012

RE-SENSITIZATION OF AZACYTIDINE-RESISTANT MDS/AML CELLS VIA MODULATION OF KEAP1-NRF2 REDOX PATHWAY

Kristýna Pimková, Lubomír Minařík, Juraj Kokavec, Tomáš Stopka
BIOCEV, 1. LF BIOCEV, Vestec, Česko

Introduction: The hypomethylation therapy by the cytidine analogue pro-drug 5-azacytidine (AZA) significantly extends the life expectancy of patients with myeloid malignancies, as shown in randomized trials in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). Although AZA induces more durable hematologic responses, the rate and duration of remissions are insufficient, and most patients eventually progress on therapy, highlighting the need to better understand the mechanisms of drug resistance. Our and others' previous data suggest that resistance is the result of the interplay between multiple molecular mechanisms [1]. Recent evidence highlights the important

role of oxidative/reductive (redox) homeostasis in the development of resistance [2, 3, 4]. Redox homeostasis is controlled by redox sensor Kelch like associated protein 1 (KEAP1), whose oxidation of cysteine under elevated oxidative stress stabilizes the transcription factor Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), leading to cytoprotection against oxidative stress. In this work we aimed to investigate the role of the KEAP1-NRF2 pathway in the AZA efficacy.

Methods: We derived AZA-resistant clones (AZA-R) by multiple round of AZA > IC₅₀ treatment of the human OCI-M2 MDS/acute myeloid leukemia (AML) cell line. The IC₅₀ of AZA-R estimated by WST assay ranged from 4-16 μ M. We applied CM₂-H₂DCFDA and ThiolTracker fluorescent probes to determine the oxidative state and glutathione levels (GSH) of AZA-sensitive (AZA-S) and AZA-R cells. To evaluate functional impact of altered redox homeostasis in AZA-R, we applied a quantitative mass spectrometry-based proteomic approach to identify protein targets of oxidative modifications in AZA-S and AZA-R after AZA treatment. The consequence of altered redox homeostasis was determined by RNA sequencing of AZA-S and AZA-R cells after 24h treatment with 1 μ M AZA. The findings were validated by functional analyses.

Results: We showed that the redox state of AZA-S was rapidly increased by AZA treatment; while the basal oxidative levels of AZA-R cells were almost 2-fold higher than those of AZA-S cells and were not further altered by AZA. Similarly, AZA induced GSH levels in AZA-S but not in AZA-R cells. Treatment of AZA-S with N-acetylcysteine (NAC) ameliorated oxidative stress and alleviated AZA toxicity, suggesting that AZA-induced oxidative stress is a key factor in its cytotoxic effect. Conversely, a reduction in GSH levels in these cells led to an increase in oxidative state, which was accompanied by enhanced sensitivity to AZA. Proteomic analysis showed that AZA treatment of AZA-S cells resulted in altered cysteine oxidation of 20% of cysteine proteins (578 out of 2853). Resistance to AZA was associated with changes in oxidation state of 14% of cysteine proteins, among which the key redox sensor KEAP1 was significantly differently oxidized between AZA-R and AZA-S. Transcriptomic

ASH 2022



profiling revealed that 75 out of 478 NRF2 protein coding target genes were differentially expressed between AZA-S and AZA-R [2]. NRF2 protein levels detected by Western blotting were significantly lower in the nucleus of AZA-R MDS/AML myeloblasts. These data indicate a loss of the dynamic response of AZA-R cells to oxidative stress by the KEAP1-NRF2 system.

Therefore, we aimed to activate NRF2 in AZA-R by treatment with KEAP1 inhibitors (iKEAP1). We found that NRF2 activation in these cells modifies the redox balance and restores the sensitivity of AZA-R cells to AZA, presumably by restoring the antioxidant properties of the cells. Finally, we transplanted AZA-S and AZA-R cells into immunodeficient mice in order to translate the data obtained into *in vivo*. Generated Cell line-Derived Xenograft (CDX) AZA-R models were treated with iKEAP and indeed iKEAP1 markedly prolonged event-free survival and overall survival of MDS/AML mice upon AZA treatment.

Conclusions: In conclusion, we demonstrate that the mechanism of AZA resistance involves the cellular adaptation to oxidative stress and that modulation of the KEAP1-NRF2 cellular antioxidant response pathway can re-sensitize AZA-resistant cells *in vitro*. We also demonstrated our findings of enhanced AZA efficacy by KEAP1 inhibition *in vivo* in an experimental CDX mouse model. Moreover, preliminary evidence supports the initiation of a randomized clinical trial to block KEAP1-NRF2 pathway in patients with high-risk-MDS progressing on AZA therapy.

References:

1. Minařík L. et al. Analysis of 5-Azacytidine Resistance Models Reveals a Set of Targetable Pathways. *Cells*. 2022 Jan 11;11(2):223.
2. Pollyea, D.A., Stevens, B.M., Jones, C.L. et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med* 24, 1859–1866 (2018).
3. Jones CL. et al. Cysteine depletion targets leukemia stem cells through inhibition of electron transport complex II. *Blood*. 2019 Jul 25;134(4):389-394.

4. Gu, X. et al. Decitabine- and 5-azacytidine resistance emerges from adaptive responses of the pyrimidine metabolism network. *Leukemia* 35, 1023–1036 (2021).



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023 18.–20. 1. 2023
POST-ASH

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

76

POSTEROVÁ SEKCE **(POSTERY P01 – P52)**



P01

ASH 2022**FINDING A NEEDLE IN HAYSTACK: DIGITAL-PCR FOR MINIMAL RESIDUAL DISEASE DETECTION IN THE CIRCULATING-TUMOR DNA SAMPLES IN HODGKIN LYMPHOMA**

Vít Procházka¹⁾, Veronika Hanáčková¹⁾, Jan Grohmann¹⁾,
Alexandra Kredátusová¹⁾, Jana Navrátilová¹⁾, Helena Urbánková¹⁾,
Tomáš Papajík¹⁾, Veronika Bachanová²⁾

¹⁾Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc, Olomouc, Česko

²⁾Division of Hematology, Oncology and Transplantation,
University of Minnesota, Minneapolis, Spojené státy

Introduction: Hodgkin lymphoma (HL) is the most frequent malignancy in young adults. The high probability of the cure is redeemed by both acute and long-term treatment sequelae. Balancing toxicity and efficacy requires highly reliable decision-making tools. Current treatment tailoring is based on the positron-emission tomography (PET/CT) assessment. The way how to improve the sensitivity of imaging methods could be a detection of minimal residual disease (MRD) in the circulating-tumor DNA (ctDNA) samples. The standard of the detection method is a next-generation sequencing (NGS), which covers a large spectrum of mutations, but is time-consuming, costly, and requires a significant concentration of ctDNA. The new digital PCR (dPCR) is a faster, cheaper method, which needs a lower amount of ctDNA.

Aim: To validate the reliability of the dPCR for target-mutations of STAT6 and XPO1 genes detection in the peripheral blood ctDNA of patients with Hodgkin lymphoma

Methods: CtDNA samples were obtained at the time of diagnosis/relapse, at the time of PET/CT assessment (interim, final), and during follow-up – every 3-6 months.

CfDNA was extracted from peripheral blood plasma using the QiaAmp Circulating nucleic acid kit (Qiagen). Specific NGS panel covering coding sequences (including UTRs) of 13 selected genes (B2M, CD36, CIITA, GNA13, HIST1H1E, ITPKB, NFKBIE, PTPN1, SOCS1, SPEN, STAT6, TNFAIP3, and XPO1) was designed. For library preparation, we used SureSelect XT HS2 technology (Agilent Technologies) based on „target enrichment“ with molecular barcodes. Sequencing was performed on a NovaSeq6000 (Illumina). Data were analyzed with the SureCall software (Agilent Technologies) with the sensitivity of 1.0% VAF. The detected variants were annotated using COSMIC, dbSNP, Ensembl, and ClinVar. Selected variants STAT6 p.N417Y and XPO1 p.E571K were further monitored by dPCR (QIAcuity Digital PCR System; Qiagen) with the sensitivity of 0.1% VAF. For dPCR experiments, we used a QIAcuity™ probe PCR kit (Qiagen) and nanoplate QIAcuity Nanoplate 26K 24-well (Qiagen). Primers and probes were taken and modified according to Camus et al., 2016 (EXPO1 p.E571K) and Spina et al., 2018 (STAT6 p.N417Y). All pts were analyzed with the same Siemens Biograph mCT scanner and results were independently reviewed by two physicians blinded for clinical outcome.

Results: We have analyzed ctDNA using an NGS panel in 48 pts with CHL (44 at diagnosis, 4 in relapse). Mutations were detected in 22/48 (46%) pts. The most frequently mutated genes were STAT6 (12/48 pts), TNFAIP3 (10/48 pts), XPO1 (7/48 pts), and SOCS1 (7/26 pts). Frameshift deletions prevailed in TNFAIP3 and SOCS1 genes. Hotspot mutations in the STAT6 (p.N417Y, in five pts) and XPO1 (p.E571K, in six pts) genes we used as target mutations for dPCR cohort. The first date of ctDNA analysis was the first CHL diagnosis in ten and 1st relapse in one case. This dPCR-cohort (n=11) consists of 9 females and 2 males with a median age at the time of diagnosis of 40 yrs, with disease subtypes of nodular sclerosis (8), mixed-cellularity (1), lymphocyte-rich (1), and CHL unclassified (1). Mean VAF at diagnosis was 9.14% (0.76-25.0), mean cell-free DNA concentration 1.47 ng/mL (0.76-2.88). Three of the pts were considered to have intermediate and eight advanced cHL stages according to the GHSG system. Pts have received ABVD



(n=5) or BEACOPPesc (n=5) or platinum-based+BEAM200 (n=1) protocols. Interim PET-2 was positive in 1 pt (stable disease), and final PET was positive in 2 (both PD). dPCR captured mutation in all three PETpos (0.12, 0.86, and 2.22%) cases, whereas was negative (<0.1% VAF) in all PETneg cases. During follow-up, two patients relapsed (both with detectable mutation, illustrative case is a Figure 1), in one case (pt during the BV post-ASCT maintenance) we observed transient dPCR positivity without evidence of relapse.

Conclusion: A combination of the NGS (large-scale mutation screening) at the diagnosis with rapid and sensitive mutation monitoring using dPCR at the time of the treatment-tailoring or follow-up could improve decision-making accuracy in the routine care of Hodgkin lymphoma patients. Further analyses are needed to directly compare the sensitivity of the NGS and dPCR methods.

Acknowledgement: Supported by MZCR-RVO (FNOL, 00098892) and AZV NU22-03-0018 grants.

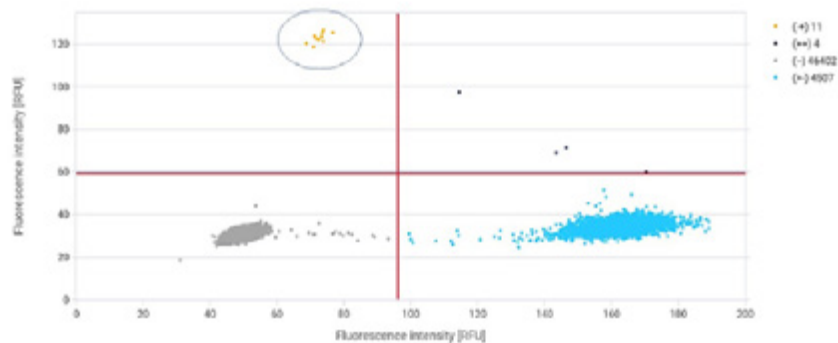


Figure 1. Showing positive dPCR signals (circle) for STAT6^{N417Y} mutation at lymphoma relapse.

P02

ASH 2022

SUPERIOR GRAFT-VERSUS-LEUKEMIA EFFECT IN MATCHED UNRELATED DONOR VERSUS HLA-IDENTICAL SIBLING PEDIATRIC RECIPIENTS TRANSPLANTED FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITHIN THE FORUM STUDY

Jean-Hugues Dalle¹, Petr Bader², Franco Locatelli³, Christina Peters⁴, Petr Sedláček⁵

¹Pediatric Hematology/Oncology, University Hospital, Paris, France

²Pediatric Hematology/Oncology, University Hospital, Frankfurt, Německo

³Pediatric Hematology/Oncology, Hospital Bambini Gesù, Řím, Itálie

⁴Pediatric Hematology/Oncology, St. Anna Kinderspital, Vídeň, Rakousko

⁵Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol, Prague

Introduction:

Allogeneic stem cell transplantation (HSCT) from either matched siblings (MSD) or matched unrelated donors (MUD) remains a standard option for children with high risk acute lymphoblastic leukemia (ALL), either in first complete remission (CR) or after relapse. The superiority of total body irradiation (TBI)/VP16 conditioning, compared to a chemotherapy based conditioning (fludarabine and thiotepa plus either busulfan or treosulfan) was demonstrated in the prospective, international, randomized non inferiority phase III study which enrolled 417 patients beyond the age of 4 years (y) transplanted for ALL in CR from either MSD or MD (Peter set al, JCO 2021; FORUM study). Besides the 201 patients randomized and actually receiving TBI from 2013 and 2018 in the randomizing countries, the FORUM trial included 411 additional children conditioned with TBI/VP16, enrolled either in countries where the randomization could not take place (for either legal or technical reasons) or in randomizing countries where TBI was chosen because the randomization was either skipped by physicians or families or had been discontinued.

**Methods:**

Here we report the 3-year consolidated results of these 612 patients ³⁴y and <21y treated in >100 pediatric centers in 26 countries following HSCT from either MSD (n=186, 30%) or MUD (defined as 9 or 10/10 4-digit molecular HLA-compatibility, n=426, 70%) after 12Gy TBI-VP16 for ALL in CR³1. Transplant details and statistical methods were previously reported in detail (Peters et al, JCO 2021). Of note, the main difference between the two groups was the GvHD prophylaxis consisting of cyclosporine A (CSA) +/- methotrexate (MTX) in MSD and serotherapy + CSA + MTX (Day 1, 3, 6, 11 post-HSCT) in MUD.

Results:

Patient's characteristics are reported in Table. Median age was 10y (4.0-20.8). The MSD and MUD groups were comparable, with the only exception of a larger use of peripheral blood and cord blood as stem cell source in the MUD population. In total, 299 pts were transplanted in CR1 (MSD, n=84; MUD, n=215) and 312 (MSD, n=102; MUD, n=210) in > CR1. In univariate analysis (figure), the Kaplan-Meier estimate of 3-year overall survival (OS) was significantly better in the MUD compared to the MSD group (83±2% vs 73±5%, respectively, P=0.041). Both the 3-year cumulative incidence (CI) of treatment-related mortality (TRM) and the 3-year probability of Event Free Survival (EFS) were comparable in the 2 groups analyzed (7±3% vs 7±1%, P=0.87 and 69±5% vs 83±2%, P=0.25, in MSD and MUD, respectively). The 3-year cumulative incidence of relapse (CIR) was higher in MSD (24±4% and 16±2%, respectively), although not statistically significant (p=0.08). The CI of acute GvHD was comparable in both groups, whereas the 3-year CI of cGvHD was higher in MSD than in MUD (19±3 vs 11±2%, P=0.07). The GvHD-relapse-secondary malignancy-free survival (GRFS) is significantly better in MUD than MSD (62±3 vs ±51±5%, P=0.04).

In multivariate analysis, factors associated with superior OS include being transplanted from unrelated donor MUD, in CR1 and below the age of

14 years. Disease status at time of HSCT (i.e. CR1) was the only factor associated with better EFS and lower risk of post-transplant relapse.

Conclusion: Our data indicate that the use of MUD is no longer a risk factor in HSCT for childhood ALL. The greater immune-genetic disparity in the matched unrelated donor/recipient pairs protects from the risk of disease recurrence, while the use of serotherapy prevents the occurrence of chronic GvHD, with both factors contributing to the observed improved GRFS in patients transplanted from an unrelated donor.

P03

ASH 2022

HOW RELEVANT ARE THE CONTROL COHORTS OF CLINICAL TRIALS IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED DLBCL IN A DAILY PRACTICE?

Prokop Vodička¹, Kateřina Benešová¹, Andrea Janíková², David Belada³, Heidi Móciková⁴, Jan Pirnos⁵, Vít Procházka⁶, Juraj Ďuraš⁷, Kateřina Kopečková⁸, Kateřina Steinerová⁹, Petra Blahovcová¹⁰, Vít Camp¹¹, Pavel Klener¹, Alice Sýkorová³, Marek Trněný¹

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

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

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

⁴Interní hematologická klinika, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha, Česko

⁵Onkologické oddělení, Nemocnice České Budějovice, České Budějovice, Česko

⁶Hemato-onkologická klinika, LF UPOL a FN Olomouc, Olomouc, Česko

⁷Klinika hematoonkologie, LF OU a FN Ostrava, Ostrava, Česko

⁸Onkologická klinika, 2. LF UK a FN Motol, Praha, Česko

⁹Hematologicko-onkologické oddělení, LF UK a FN Plzeň, Plzeň, Česko

¹⁰Datacentrum, Kooperativní Lymfomová Skupina, Praha, Česko

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

**Background.**

The development of novel therapeutical strategies is essential for improvement of survival of patients with newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Almost all attempts to improve the outcome over R-CHOP have failed. The study cohort selection and its representativeness is one of the important questions which is repeatedly discussed. We have decided to compare the outcome of real-world data of R-CHOP-treated patients with control arms of two studies. First study is a negative one – GOYA trial (Vitolo, 2017) testing replacement of rituximab by obinutuzumab; and the second study is a positive one – POLARIX trial (Tilly, 2022) testing the substitution of vincristine by an antibody-drug conjugate polatuzumab vedotin. The aim of this analysis is to understand the relevance of the results of clinical trials for daily practice.

Methods.

Characteristics and outcomes of patients in the control cohorts of the GOYA trial ($n = 710$) and POLARIX trial ($n = 439$) were compared retrospectively with cohorts of patients identified in the Czech national non-Hodgkin lymphoma registry NiHiL (NCT03199066) who fulfilled the main inclusion/exclusion criteria (IC/EC) of the respective studies and were treated in the recruitment period of each study.

Results.

Altogether 4602 patients with *de novo* DLBCL, their characteristics and information on treatment and outcomes were identified in the NiHiL registry between 2008–2020. Of them, 1572 patients were diagnosed between years 2011–2014 and 1182 between 2017–2019.

From the cohort of 1572 patients diagnosed between 2011–2014, 1028 (65%) patients received R-CHOP, and 778 (50% of all and 76% of R-CHOP cohort) patients met all main IC/EC of the GOYA study. The patients (median age 64 years vs. 62 years in the control cohort of the GOYA trial) were diagnosed with advanced clinical stage (aCS) in 60% (vs. 76%), PS ECOG

2 in 21% (vs. 14%), elevated LDH 66% (vs. 57%), and IPI 3–5 in 49% (vs. 43%). The median time from diagnosis to treatment initiation was 25 days for both our patients and the GOYA control arm. A total of 82% of patients completed the planned ≥ 6 cycles of R-CHOP (vs. 85%). Our patients presented with similar ORR of 75% vs. 78% in the GOYA study (CR rate 69% vs. 59%), prolonged survival in terms of PFS (73% vs. 67% at 3 years, 67% vs. 63% at 5 years; Fig. A), and similar OS (80% vs. 81% at 3 years, 74% vs. 78% at 5 years), with median follow-up of 99.6 months (range 0.4–135.6).

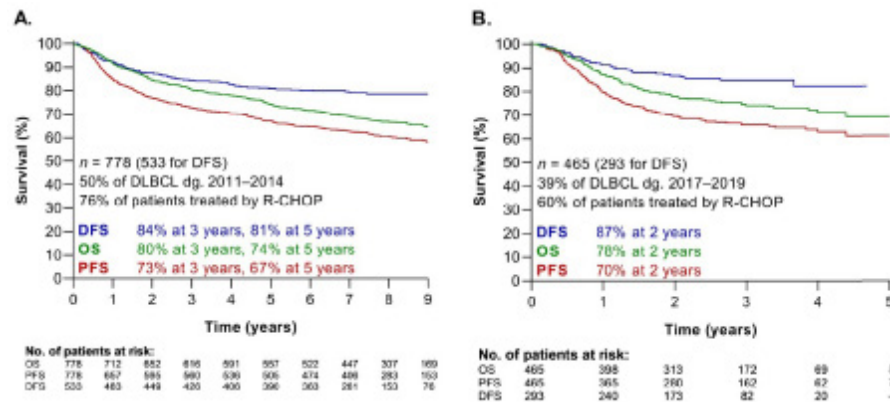
Among the 1182 patients diagnosed between 2017–2019, a total of 773 (65%) patients were treated by R-CHOP, from which 465 patients (39% of all DLBCL and 60% of R-CHOP patients) met the IC/EC of the POLARIX study. Median age was 67 years (vs. 66 years in the control cohort of the POLARIX trial) aCS was observed in 76% (vs. 88%), PS ECOG 2 in 28% (vs. 17%), elevated LDH in 79% (vs. 65%), and IPI 3–5 in 64% (vs. 62%). The median time from diagnosis to treatment initiation was 29 days (vs. 27 days). Majority of patients (80%) received all the planned ≥ 6 cycles of R-CHOP (vs. 86%). Our patients had slightly decreased ORR in comparison to the POLARIX control cohort (76% vs. 84%; CR rate 63% vs. 74%). The PFS of both cohorts of patients was 70% at 2 years (Fig. B). But, the 2-year OS was inferior in the NiHiL control cohort (78% vs. 89%), with median follow-up time of 35.6 months (range 1.0–62.9).

Conclusions.

The patients with newly diagnosed DLBCL in the real-life setting defined by the IC/EC of the study cohorts (GOYA, POLARIX) have similar primary endpoints outcomes as the control R-CHOP arms of those study cohorts. Thus, the study results are relevant for the daily practice. It has to be however taken into account that IC/EC defined cohorts represent only 76% (GOYA), and 60% (POLARIX) of all R-CHOP-treated patients in the real life.



Figure. Survival curves of patients from the NiHIL registry who fulfilled the main inclusion/exclusion criteria of the GOYA (A; $n = 778$) and POLARIX (B; $n = 465$) trial.



P04

ISHL 2022

A RETROSPECTIVE ANALYSIS OF FERTILITY IN FEMALE PATIENTS WITH ADVANCED STAGES OF HODGKIN LYMPHOMA TREATED WITH BEACOPP ESCALATED CHEMOTHERAPY (25 YEAR EXPERIENCE OF A SINGLE CENTRE)

Jana Marková¹, Heidi Mociková¹, Lubica Gaherová¹, Kateřina Klásková¹, Maria Maco¹, Kateřina Dědečková², Tomáš Kozák¹

¹Hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské

Vinohrady a 3. LF UK, Praha 10, Česko

²Proton Therapy Center, 2. LF UK, Praha, Česko

Background. BEACOPP escalated (eBEA) includes alkylating agents and its gonadal toxicity has been reported in prospective and retrospective studies. This retrospective study analyzed fertility of **119 young female** patients (pts) with initial diagnosis of Hodgkin lymphoma (HL) in advanced stages treated

with eBEA. **Patients and Methods.** Overall 128 women aged 18-34 years (median age at diagnosis was 27 years) were treated with eBEA between 1997 and 2020. Median follow-up since the beginning of the treatment was 12.4 years. Overall 57 pts (48%) received 8 cycles of eBEA, 46 pts (39%) were treated with 6 cycles and 16 pts (13%) received 4 cycles of eBEA. Additional radiotherapy was indicated in 36 pts (30%). Gonadotropin-releasing hormone-analogue (GnRH) Gosereline acetate received 68 pts (57%) and 51 (43%) pts used oral contraceptives (OC) during chemotherapy to prevent gonadal toxicity. Median follow-up after the end of treatment was 12 years.

Results: Out of 119 women 45 (38%) delivered 61 babies including 18 (40%) women with 2 deliveries after treatment with eBEA. Number of all delivered healthy babies was 59 (one baby was born with small cleft lip, other with mild renal malformation). Two pregnancies were terminated prematurely (week 20 and 22) due to congenital malformations: monozomy 45, XO Turner syndrome and serious cleft lip). All pregnancies were spontaneous except of 6 women that underwent in vitro fertilisation (IVF) Median time from the end of therapy until the delivery of the first baby was 66 months (range 18-169m). 40 children (65%) were born in the group of pts aged 18 - 24 years, 16 (26%) in the group of 25 - 29 years and only 5 (9%) in the group of 30 - 34 years. **Conclusion.** Our data indicate that even after eBEA 38% of young fertile women in advanced stages of HL are able to deliver babies and protection of fertility should be offered to them. Implementation of new strategies with reduction of chemotherapy cycles based on PET may further contribute to fertility preservation.



P05

EHA 2022**DYNAMICS OF GENOMIC ABERRATIONS IN RELATION TO DISEASE ACTIVITY IN UNTREATED PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA**Veronika Navrkalová^{1,2}, Jana Kotašková^{1,2}, Karla Plevová^{1,2}, Tomáš Reigl², Jakub Porc², Lenka Radová², Anna Panovská¹, Šárka Pospíšilová^{1,2}¹Department of Internal Medicine - Hematology and Oncology, University Hospital Brno and Medical faculty, Masaryk University Brno, Brno, Česko²Medical Genomics, Central European Institute of Technology, Masaryk University Brno, Brno, Česko

Background: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) manifests remarkable clinical variability linked with extensive heterogeneity of genomic defects. Despite the progress with novel therapeutic agents, some patients still face relapse and disease persistence due to subclonal populations, which harbor various somatic defects, growth dynamics, and therapy sensitivity. Clonal evolution of genomic defects was observed mainly in treated CLL patients, whereas progression and therapy need occur at some point during the disease course suggesting clonal dynamics even in untreated patients.

Aims: To describe impact of clonal dynamics in gene mutations and chromosomal defects on clinical course of the disease in paired samples of untreated CLL patients.

Methods: 200 samples from 100 CLL patients were analyzed by well-established comprehensive NGS panel LYNX (PMID 34082072) in two time points; at the diagnosis and before first therapy. Variants in 70 genes associated with B-cell malignancies, copy-number alterations (CNAs) and copy-neutral loss of heterozygosity (CN-LOH) across the whole genome were evaluated by a dedicated in-house bioinformatic pipeline. Clinical data were correlated with obtained results.

Results: The surveillance period median between two sampling points was 36 months (range 7-174). One third of patients was still untreated during the follow-up (median 86 months, range 21-271), and the time to first treatment among 68 patients was 38 months (range 11-141). At the baseline, the most frequent defects were mutations in *NOTCH1* (15 %), *SF3B1* (15 %), *ATM* (12 %) genes, and 13q- (56 %), 11q- (19 %) and tri12 (15 %). We observed common clonal and subclonal co-occurrence of genomic defects in the pretreatment period. In sequential samples, we detected a change in the composition of genomic aberrations. Most alterations were stable (59 % mutations, 70 % chromosomal defects), but we observed dynamic changes in the rest with the predominance of growing allelic frequency and occurrence of new defects. Unsupervised clustering according to the presence of individual genomic defects with the emphasis on their dynamic changes and CLL driver attribute enabled to distinguish three clusters. The correlation with clinical data showed significant differences among clusters in IGHV status, CLL activity (categorized according to therapy need), and an increase of absolute lymphocyte count (ALC) per month. Obviously, the most adverse was cluster 1 with unmutated IGHV, rapid increase in ALC, and dynamics in CLL activity. Cluster 2 seemed to be intermediate and cluster 3 indolent. Groups also significantly differed in the presence and evolution of 11q-, 13q-, *ATM* mutations, tri12, chr13 LOH, 3p-, 2p+, chr9 LOH. Importantly, stable defects of chr13 were the most abundant in cluster 3, stable tri12 and expansions of 13q- in cluster 2, dynamics defects including 11q-, *ATM* mutations, 3p-, 2p+ and LOH 9 in cluster 1.

Conclusion: In untreated CLL patients, clonal stable genomic defects prevail. However, common subclonal alterations and dynamic changes were observed in a considerable proportion of patients. After unsupervised clustering, a group of patients showing the most adverse clinical disease course harbored *ATM* defects, 3p-, 2p+, and chr9 LOH, possibly standing behind fast progression and therapy need. Hence, detailed monitoring of clonal evolution can help understand the heterogeneity in the CLL activity in the pretreatment period.

Supported by AZV NV19-03-00091, MZ-CR RVO 65269705, MUNI/A/1330/2021.



P06

ADVANCED QUALITY CONTROL OF CULTURED NK CELLS FOR FUTURE CELLULAR IMMUNOTHERAPY OF HAEMATO-ONCOLOGIC DISORDERS

Eva Mašíňová^{1, 2}, Tereza Feglarová¹, Jana Szabová¹, Lucie Janstová^{1, 2}, Marek Jedlička^{1, 2}, Veronika Švubová^{1, 2}, Markéta Nádeníková^{1, 2}, Jan Frič^{1, 3}

¹*Oddělení Moderní Imunoterapie, Ústav Hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko*

²*Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Praha, Česko*

³*Cellular and Molecular Immunoregulation Group, International Clinical Research Center of St. Anne's University Hospital Brno, Brno, Česko*

Adoptive immunotherapy using natural killer cells (NK) represents one of the approaches to treat leukemia patients, that do not respond to conventional therapy and are not eligible for haematopoietic stem cells transplantation. Numerous clinical studies have been performed, however, the effectivity of NK cells treatment is low and their implementation into the clinical practice remains limited.

Currently the quality control of immunotherapeutic NK cells is focused on the control of input materials, manufacturing procedures, and purity of the final products. Potency tests relevant to NK cell functionality including assessment of cytotoxicity or ability to degranulate are not required within Phase I/II trials. Furthermore, the cytotoxicity tests, if performed, use in most cases K562 cell line as a target, lacking biological relevance due to null expression of MHC I molecules. This results in a bias towards missing-ligand effects, which may not fully represent the situation *in vivo*.

Absent or limited knowledge about functional properties of NK cells in the final product may be one of the reasons of unfavourable outcomes of NK adoptive immunotherapy clinical studies. We have tested new set of assays including cytotoxicity towards more biologically relevant targets, CD107a

degranulation assay complemented by ELISA or beads array to analyse NK effector molecules (IFN , TNF , Fas, granzyme, perforin), and also testing for reactivation of endogenous viruses (CMV, EBV) in PBMC used as feeder cells.

Our results show significant differences in NK cells cytotoxicity and degranulation among K562 and other target cells. Furthermore, we show differences in potency and fitness of NK cells cultivated in a different setup, indicating, that cultivation conditions may also influence the properties of the final product, especially when supportive feeder cells are used. These data aim to help the development and QC of NK immunotherapy protocols and increase their chance to deliver the desired clinical effects.



P07

ASH 2022

RESTORED BIOSYNTHETIC PATHWAYS INDUCED BY MSCS SERVE AS RESCUE MECHANISM IN LEUKEMIA CELLS AFTER L-ASPARAGINASE THERAPY

Natividad Alquezar-Artieda^{1, 2}, Daniela Kuzilkova^{1, 2, 3}, Jennie Roberts⁴, Katerina Hlozkova^{1, 2}, Alena Pecinova⁵, Petr Pecina⁵, Martina Zwyrtkova^{1, 2}, Eliska Potuckova^{1, 2}, Daniel Kavan⁶, Ivana Hermanova^{1, 2}, Marketa Zaliova^{1, 2, 3}, Petr Novak⁶, Tomas Mracek⁵, Daniel A. Tennant⁴, Jan Trka^{1, 2, 3}, Julia Starkova^{1, 2, 3}

¹CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague, Prague, Česko

²Dept. of Pediatric Hematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko

³University Hospital Motol, Prague, Česko

⁴Institute of Metabolism and Systems Research, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, Spojené království

⁵Department of Bioenergetics, Institute of Physiology of the Czech Academy of Science, Prague, Česko

⁶Laboratory of Structural Biology and Cell Signalling, Institute of Microbiology, Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Česko

The cause of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) is often associated with resistance to the standard chemotherapy treatment. The primary goal of this project was to elucidate the resistance mechanism of L-asparaginase (ASNase), one of the crucial drugs used in ALL therapy. The cytotoxic effect of ASNase relies on the depletion of extracellular asparagine (Asn) and glutamine, which is disastrous for leukemic cells since they have minimal activity of *de novo* synthesis of these amino acids that paradoxically have essential roles in leukemic cells' metabolism.

We previously showed that ASNase caused metabolic reprogramming by which leukemic cells escaped the cytostatic effect of the treatment. In the present study, we investigated the role of the main aspects of the *in vivo* environment on the resistance mechanism of leukemic cells (BCP-ALL

cell lines: NALM-6, REH, RS4-11 and SUP-B15 and primary ALL cells). By co-culturing them with mesenchymal stem cells (MSCs) and treating them with ASNase-pretreated culture media, we mimicked the bone marrow matrix and the *in vivo* half-life of the drug (1.28 ± 0.35 days). The ASNase concentrations used in the ASNase-pretreated culture media were 0.04, 0.4 and 4 IU/mL.

In concordance with previous results, we showed that leukemic cell survival was increased in the co-culture model compared to the "classical" *in vitro* treatment after five days using flow cytometry (NALM-6 - 0.04IU/mL: $17.37 \pm 2.8\%$ $p < 0.0001$, 0.4IU/mL: $18 \pm 2.8\%$ $p < 0.0001$, 4IU/mL: $25.87 \pm 2.3\%$ $p < 0.0001$; REH - 0.04IU/mL: $27.51 \pm 3.3\%$ $p < 0.0001$, 0.4IU/mL: $22.06 \pm 3.3\%$ $p < 0.0001$, 4IU/mL: $23.96 \pm 3.3\%$ $p < 0.0001$; RS4:11 - 0.04IU/mL: $50.07 \pm 2.9\%$ $p < 0.0001$, 0.4IU/mL: $60.14 \pm 2.9\%$ $p < 0.0001$, 4IU/mL: $34.50 \pm 3\%$ $p < 0.0001$; SUP-B15 - 0.04IU/mL: $13.90 \pm 2\%$ $p < 0.0001$, 0.4IU/mL: $19.55 \pm 2.3\%$ $p < 0.0001$, 4IU/mL: $5.72 \pm 2\%$ $p < 0.05$). While ASNase-mediated metabolic rewiring of leukemic cells persisted in both mono and co-culture: reduced glycolysis and increased fatty acid oxidation, the activity of mTOR-regulated biosynthetic pathways differed. The latter pathway was assessed by western blot quantification of the downstream targets of mTOR, S6 and CAD, which are protein and nucleotide synthesis mediators, respectively. In both cultures, the phosphorylated forms of S6 and CAD were inhibited after ASNase treatment (4IU/mL). However, the effect was significantly less profound in the co-culture model (REH: p-S6 (-1.826 log (2) fold change, $p = 0.0043$); p-CAD (-2.385 log (2) fold change, $p = 0.0152$), NALM-6: p-S6 (-1.380 log (2) fold change, $p = 0.0106$); p-CAD (-0.78 log (2) fold change, $p = n.s$). Similar changes in phospho-S6 were observed in primary BCP-ALL cells isolated from pediatric patients treated with ASNase. As shown by stable isotope tracing, asparagine synthesized *de novo* and released from MSCs compensated for asparagine depletion (after ASNase administration) and induced resistance of leukemic cells. Asparagine was sufficient to restore protein and nucleotide synthesis and partially rescued the viability of leukemic cells.



In conclusion, the presence of MSCs sustains biosynthetic pathways, making leukemic cells more accessible to bioenergetic rewiring, which may counteract ASNase cytotoxicity. These findings present a potential therapeutic target for resistant patients. (Supported by GAČR GA20-27132S and GAUK 1262120)

P08

ASH 2022

Cyclin-dependent Kinase 4/6 Inhibitor Palbociclib Synergizes with BH3-mimetics in Experimental Models of Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma

Diana Maláriková^{1, 2)}, Radek Jorda³⁾, Alexandra Dolníková¹⁾, Ondřej Havránek^{4, 2)}, Eva Pokorná¹⁾, Dmitry Kazanstev¹⁾, Dana Sovilj⁵⁾, Karel Helman⁶⁾, Magdaléna Klánová^{2, 1)}, Ladislav Andera^{4, 5)}, Miroslav Strnad⁷⁾, David Chiron⁸⁾, Marek Trněný²⁾, Pavel Klener^{2, 1)}

¹⁾Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2, Česko

²⁾I. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Praha 2, Česko

³⁾Katedra experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc, Česko

⁴⁾BIOCEV, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česko

⁵⁾Biotechnologický ústav, AV ČR, Praha, Česko

⁶⁾Fakulta informatiky a statistiky, Ekonomická univerzita, Praha, Česko

⁷⁾Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc, Česko

⁸⁾CRC12NA, Integrated Research Center in Immunology and Oncology, Nantes University, Nantes, Francie

Introduction: Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive subtype of B-cell non-Hodkin lymphomas characterized by cyclin D1 upregulation. The complex of upregulated cyclin D1 and cyclin-dependent kinases (CDK) 4 and 6 deregulates G1/S cell cycle transition of malignant lymphocytes, which represents a rationale druggable target. Palbociclib, a CDK 4/6 inhibitor approved for

the therapy of patients with breast cancer, demonstrated single-agent clinical activity in relapsed/refractory (R/R) MCL. BH3-mimetics bind to an anti-apoptotic BCL-2 proteins (Bcl-2, Bcl-xL or Mcl-1) and thereby block their anti-apoptotic function. Specific Bcl-2 inhibitor venetoclax, the only FDA approved member of BH3-mimetics, is currently being tested in numerous clinical trials in hematological malignancies. Interestingly, the combination of palbociclib and venetoclax showed promising results in patients with breast cancer but has never been tested in patients with MCL.

Methods: Experimental therapy aimed at inhibition of CDK4/6 by palbociclib and anti-apoptotic BCL-2 proteins using venetoclax, S63845 and A1155463 was performed on nine MCL cell lines and four patient-derived xenograft (PDX) models from patients with R/R MCL. Mitochondrial priming to apoptosis was assessed by BH3 profiling. Expression of selected cell cycle regulators, pro-, and anti-apoptotic proteins was evaluated before and after exposure to palbociclib by western blotting both *in vitro* and *in vivo*. Spectrum of BCL-2-bound BH3-only proteins were detected by immunoprecipitation of MCL tumors *ex vivo* 24 and 48 hours after start of palbociclib therapy (compared to tumors obtained from untreated controls). Mitochondrial priming to apoptosis was assessed by BH3 profiling. Impact of palbociclib on energy-metabolic pathways in MCL cells was measured by SeaHorse assay. MCL clones with knockdown or overexpression of *CDKN2A*, *MYC*, *CDK4* and *RB1* were used to evaluate impact of these aberrations on the sensitivity to palbociclib (and venetoclax).

Results: Synergistic effect of palbociclib was observed in combination with all BH3-mimetics (venetoclax, S63845 and A1155463) *in vitro*, and confirmed *in vivo* on PDX R/R MCL models using venetoclax, as the only FDA approved member. Exposure of MCL-bearing mice to palbociclib induced downregulation of D-type cyclins, cyclin A, Rb1 and Mcl-1 proteins. Even though single-agent palbociclib had limited cytotoxic (proapoptotic) effect, it increased pro-apoptotic mitochondrial priming. Curiously, palbociclib significantly increased level of basal and maximal oxidative phosphorylation after



cultivation with MCL cells for 72 hours (but not 24 hours). Pre-treatment of MCL cells with palbociclib showed even greater synergy than simultaneous palbociclib and BH3-mimetic application. MCL cell clones with *RB1* knock-down became resistant to palbociclib. Susceptibility of MCL clones with knockout of *CDKN2A*, overexpression of *MYC*, and overexpression of *CDK4* to palbociclib and venetoclax was not significantly changed.

Conclusion: Our data strongly support investigation of palbociclib in combination with venetoclax as an innovative treatment strategy for chemoresistant MCL patients without *RB1* deletion. Although we demonstrated that palbociclib increases pro-apoptotic mitochondrial priming and induces metabolic stress, the detailed contribution of these changes to the observed synergy are under investigation.

P09

Invariant NKT cells as regulators of post-transplant complications

Monika Holubová^{1, 2)}, Tereza Dekojová¹⁾, Hana Gmucová¹⁾, Robin Klieber^{1, 2)}, Daniel Lysák¹⁾, Pavel Jindra¹⁾

¹⁾Department of Hematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Česko

²⁾Laboratory of Tumor Biology and Immunotherapy, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Česko

Introduction: Invariant NKT cells are (iNKTs) a rare T cell subset interacting with the cells of innate and adaptive immunity able to support both pro-inflammatory and anti-inflammatory responses. The decrease of the iNKTs level was seen to be associated with cancer, GvHD or infections. The application of ex vivo expanded iNKTs seems to be promising to regulate all most severe transplant complications in one shot.

Methods: We cultured healthy donors iNKTs with the presence of C1R-CD1d, KRN700 and IL-15, and defined the basic characteristics: proportion of CD4 and CD8 cells, expression of CD62L, NKG2D (function markers) or checkpoint molecules (PD1, BTLA, LAG-3, TIM-3). Moreover, we compared the culture with IL15 or IL2+IL15. Then, we tested the cytotoxic potential against cell lines (AML, lymphoma, myeloma) stained with CFSE and immunomodulatory capacity after addition to phytohemagglutinin stimulated T-cells by determination of CD25 expression (MFI=median fluorescence intensity).

Results: NKG2D was expressed almost exclusively on CD8+ cells (median=94%) and limited on CD4+ (median=8%). Expression of CD62L was slightly higher on CD4+ cells (median=12%) compared to CD8+ (median=3%). TIM3 showed the highest expression from checkpoint molecules (median=18%) and with slightly increased expression in IL2+IL15 culture (median=23%). The addition of IL2 also increased PD1 level (median=13%) compared to culture with IL15 only (median=5%). The levels of BTLA4 and LAG-3 was very low in both cultures. Cells cultured with IL15 alone multiplied two time less than with IL2+IL15. The level of CD25 significantly decreased on activated T-cells 1.75 times ($p \leq 0.05$) after iNKTs addition. The cytotoxic activity was low ($\leq 15\%$) except lymphoma cell line C1R-CD1d cultured with KRN7000 (proportion of dead cells was 77%).

Conclusion: The cells prepared by our protocol showed functional iNKTs preserving all necessary surface characteristics.

Funding: The project was funded by FNPI, 00669806 and by grant from Czech Bone Marrow Foundation.



P10

METABOLIC CHANGES OF IN VITRO EXPANDED NK CELLS

Marek Jedlička^{1, 2, a)}, Tereza Feglarová¹⁾, Eva Mašínová^{1, 2)},
Lucie Janstová^{1, 2)}, Jana Szabová¹⁾, Veronika Švubová^{1, 2)},
Tereza Kořánová^{3, 2)}, Kateřina Kuželová³⁾, Jan Frič^{1, 4, b)}

¹⁾Department of modern immunotherapy, Institute of
hematology and blood transfusion, Praha 2, Česko

²⁾Faculty of Science, Charles University in Prague, Praha, Česko

³⁾Department of proteomics, Institute of hematology
and blood transfusion, Praha, Česko

⁴⁾Cellular and Molecular Immunoregulation Group, International Clinical
Research Center of St. Anne's University Hospital Brno, Brno, Česko

NK cells are key immune cells responsible for malignant or virus infected cells surveillance and removal. Their high cytotoxic potential and low risk of GvHD makes NK cells a promising tool for adoptive transfer immunotherapy of haemato-oncological disorders. During transition from steady state to highly proliferating and activated state, NK cells switch their metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis. This metabolic change supports high energetic and proteosynthetic demands linked with cytotoxic and effector functions. Major aim of the project is to understand the metabolic demands during the immunotherapeutic NK based product preparation and later changes after the adoptive transfer to patients. In order to clarify molecular mechanism linking metabolism and NK cell cytotoxicity we have expanded primary NK cells with selected metabolic modulators and performed cytotoxicity, gene expression and metabolic analysis. Our results showed that the *in vitro* expanded NK cells have higher killing ability compared to freshly isolated cells and are metabolically more active (a). Furthermore, the perturbation of metabolic pathways has profound short-term as well as long-term effects on NK cell phenotypes. Significant changes in granzyme B and IFN- expression has been observed upon 25-hydroxycholesterol and etomoxir treatment. The result also showed impaired cytotoxicity in a glutaminase inhibitor (BPTES) and c-Myc inhibitor (25-hydroxycholesterol) treated cells, suggesting

crosstalk of immunometabolism and cytotoxic function. Furthermore, observed long-term persistence of metabolic switch during whole expansion process suggests that this ability to change metabolism in long term opens window for metabolic intervention during expansion. These results confirmed that metabolic priming of NK cells does have long term effect on their gene expression as well as killing activity. The modulation of metabolism regulates cytotoxic functions of NK cells and as such shall be considered in expansion protocols for immunotherapy.



P11

ASH 2022

Initial Results From a Phase 1/2 Trial of Subcutaneous Epcoritamab in Combination with Rituximab + Lenalidomide (R2) for First-Line Treatment of Follicular Lymphoma

Lorenzo Falchi¹⁾, Lori A. Leslie²⁾, David Belada³⁾, Katerina Kopeckova⁴⁾, Fritz Offner⁵⁾, Joshua Brody⁶⁾, Miguel Ángel Canales Albendea⁷⁾, Alejandro Martín García-Sancho⁸⁾, Marcel Nijland⁹⁾, Per-Ola Andersson¹⁰⁾, Farrukh Awan¹¹⁾, Jacob Haaber Christensen¹²⁾, Kristina Drott¹³⁾, Mats Hellström¹⁴⁾, Catharina Lewerin¹⁵⁾, Mayur Narkhede¹⁶⁾, Sylvia Snauwaert¹⁷⁾, Björn E. Wahlin¹⁸⁾, Ali Rana¹⁹⁾, Aqeel Abbas¹⁹⁾, Liwei Wang¹⁹⁾, Minh Dinh²⁰⁾, Joost S.P. Vermaat²¹⁾, Pau Abrisqueta²²⁾

¹⁾Lymphoma Service, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, Spojené státy

²⁾Hackensack University Medical Center, Hackensack, NJ, Spojené státy

³⁾4th Department of Internal Medicine – Hematology, University Hospital and Faculty of Medicine, Hradec Králové, Česko

⁴⁾Motol University Hospital, Prague, Česko

⁵⁾Universitair Ziekenhuis Gent, Ghent, Belgie

⁶⁾Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, Spojené státy

⁷⁾Hospital Universitario La Paz, Madrid, Španělsko

⁸⁾Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Salamanca, Španělsko

⁹⁾University Medical Center Groningen and University of Groningen, Groningen, Nizozemsko

¹⁰⁾South Älvsborg Hospital, Borås, Švédsko

¹¹⁾The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, Spojené státy

¹²⁾Odense University Hospital, Odense, Dánsko

¹³⁾Skåne University Hospital, Scania, Švédsko

¹⁴⁾Uppsala University Hospital, Uppsala, Švédsko

¹⁵⁾Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Švédsko

¹⁶⁾O'Neal Comprehensive Cancer Center at the University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, Spojené státy

¹⁷⁾Department of Hematology, AZ Sint-Jan Hospital, Bruges, Belgie

¹⁸⁾Karolinska Institutet, Stockholm, Švédsko

¹⁹⁾Genmab, Princeton, NJ, Spojené státy

²⁰⁾AbbVie, North Chicago, IL, Spojené státy

²¹⁾Leiden University Medical Center, Leiden, Nizozemsko

²²⁾Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Španělsko

Background: Follicular lymphoma (FL) remains an incurable disease and better treatment options are needed. Epcoritamab is a subcutaneously administered bispecific antibody that binds to CD3 on T cells and CD20 on B cells to kill malignant B cells. Epcoritamab + R² showed promising activity in patients with R/R FL in EPCORE NHL-2 (Falchi, ASCO 2022). Here we present arm 6 of EPCORE NHL-2, which is investigating epcoritamab + R² in first-line FL.

Methods: Patients ≥18 years of age with previously untreated FL grade 1–3A who met GELF criteria received epcoritamab 48 mg + R² for 12C of 28 days. Epcoritamab was administered QW in C1–2, and Q4W+, for up to 2 years. Step-up dosing and corticosteroid prophylaxis were required during C1 to mitigate cytokine release syndrome (CRS).

Results: As of June 10, 2022, 41 patients had received treatment. Median age was 57 years (range, 39–78), and median time from initial diagnosis to first dose was 12 weeks (range, 2–352); most patients (85%) had grade 2/3A FL, 90% had stage III/IV disease, and 34% had FLIPI 3–5. At a median follow-up of 4.4 months (range, 0.7–7.5), 88% of patients remained on treatment. The most common treatment-emergent adverse events (TEAEs) were CRS (51%; 34% grade 1, 17% grade 2), neutropenia, pyrexia, injection-site reactions, fatigue, headache, constipation, and rash. Most CRS events occurred after the first full dose and all resolved in a median of 4 days. No cases of ICANS or clinical tumor lysis syndrome were observed. There was one fatal TEAE: COVID-19 pneumonia (not related to epcoritamab). In efficacy-evaluable patients (n=29), the overall response rate and complete metabolic response rate were 90% and 69%. All responses were ongoing at data cutoff.



Conclusions: Epcoritamab + R² demonstrated a manageable safety profile, similar to that of patients with R/R disease. CRS events were low grade and occurred around the time of first full dose. These encouraging efficacy results support further clinical evaluation.

P12

ASH 2022

BCL-XL blockage with A1155463 significantly increases efficacy of venetoclax in mantle cell lymphoma in vitro and in vivo

Alexandra Dolníková¹, Dmitry Kazantsev¹, Diana Maláriková^{1, 2},
Eva Pokorná¹, Dana Sovilj³, Cristina Daniela Kelemen³,
Ladislav Anděra^{3, 4}, Marek Trněný², Pavel Klener^{1, 2}

¹*Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko*

²*First Department of Medicine – Department of Hematology, Charles University General Hospital, Prague, Česko*

³*Institute of Biotechnology CAS/BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, Vestec, Česko*

⁴*Institute of Molecular Genetics, CAS, Prague, Česko*

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare chronically relapsing subtype of aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma characterized by the canonical chromosomal translocation t(11;14) and other recurrent molecular cytogenetic aberrations including overexpression of BCL2 antiapoptotic protein. Venetoclax (VEN), a BCL2 inhibitor, has demonstrated activity in MCL both as a monotherapy and in combination with other targeted agents, e.g., ibrutinib. Treatment with single agent venetoclax is, however, hampered by frequent development of drug resistance caused in large part by adaptive upregulation of other anti-apoptotic BCL2 family members, namely BCL-XL and MCL1. Specific inhibitors of BCL-XL and MCL1 are currently being tested in clinical trials.

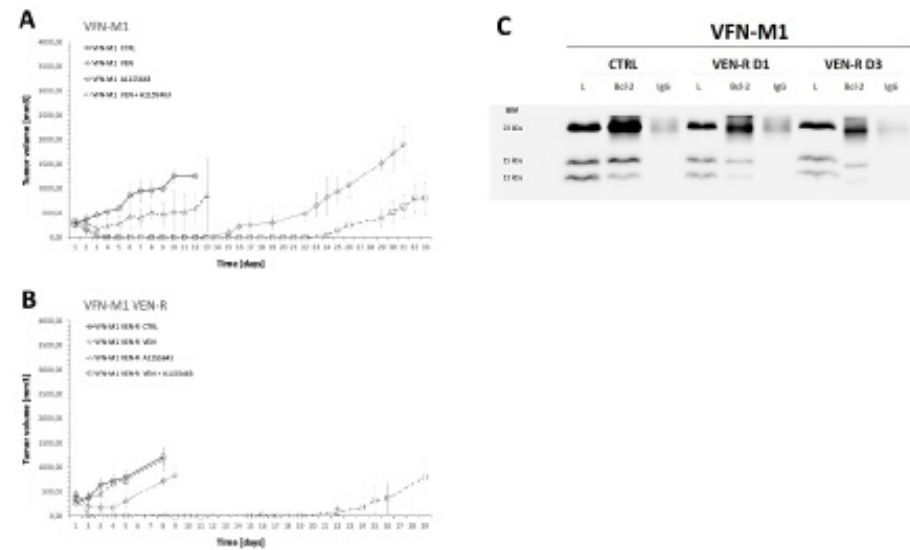
Immunodeficient NOD-SCID-gamma mice were xenografted subcutaneously with MCL cell lines and PDX cells established from patients with relapsed and refractory MCL. The therapy was given for two weeks (4 days on, 3 days off). VEN was administered by oral gavage (100 mg / kg once daily), A1155463 was administered intraperitoneally (10 mg / kg once daily). Western blotting was implemented to evaluate expression levels of BCL2 proteins, immunoprecipitation was used to analyze the levels of BIM bound to BCL2 and BCL-XL before and after exposure to VEN. CRISPR-Cas9 was employed to derive clones with BCL-XL knock-out. Blood cell counts in mice on A1155463 +/- VEN therapy were analyzed using the Mindray BC-5300 Auto Hematology Analyzer.

In this study, we analyzed molecular mechanisms of *in vivo* acquired resistance to VEN using a panel of several murine cell line-based xenografts (CDX, n= 4) and patient-derived xenografts (PDX, n= 4) of MCL. First, the mice xenotransplanted with VEN-sensitive MCL cells were subject to monotherapy with VEN until development of VEN-R tumors. The VEN-R tumors, when retransplanted to secondary mice, remained resistant to single-agent VEN. Western blot analysis of VEN resistant tumors revealed marked upregulation of BCL-XL in majority of VEN-R tumors compared to untreated controls. Other changes included upregulation of MCL1 and downregulation of BIM proteins in several models. Immunoprecipitation experiments confirmed that BCL-XL indeed serves as a buffer for BIM released from BCL2 after exposure to VEN thereby blocking VEN-triggered apoptosis. Importantly, we demonstrated that the upregulation of BCL-XL caused not only VEN resistance, but also led to BCL-XL-specific pro-apoptotic priming of VEN-R lymphoma cells. *In vitro*, the combination of VEN and A1155463, a specific BCL-XL inhibitor, induced strong cytotoxic synergy on a panel of MCL cell lines and primary cells. CRISPR-Cas9-mediated BCL-XL knock-out resulted in marked sensitization to VEN-induced apoptosis in MCL cell lines further confirming critical role of BCL-XL in mediating susceptibility to VEN. *In vivo*, pharmacological blockage of BCL-XL strongly increased sensitivity to VEN. Despite that A1155463 exerted limited anti-lymphoma activity as monotherapy on virtually all tested



CDX and PDX models, its combination with VEN was synthetically lethal and exerted significantly enhanced anti-lymphoma activity. Of note, the efficacy of the VEN and A1155463 combination was highly effective even in mice bearing VEN-R tumors (i.e., tumors with acquired VEN resistance, Figure 1). It has been demonstrated by other groups that molecular mechanisms responsible for BCL-XL upregulation include activation of NFκB signaling via CD40 and hypoxia. Upregulation of BCL-XL induced by these microenvironmental factors in turn caused VEN resistance *in vivo*. Indeed, we confirmed that upregulation of BCL-XL was observed already after engraftment of VEN-sensitive MCL cells in immunodeficient mice. MCL cells isolated *ex vivo* from the established CDX tumors were significantly more sensitive to BCL-XL inhibition compared to the corresponding *in vitro* growing MCL cell lines. Our results thus confirmed increased BCL-XL dependence of MCL cells *in vivo* compared to *in vitro*. We suggest that these microenvironmental factors were also critical for the selection of VEN-resistant clones during the therapy with VEN eventually leading to overgrowth of BCL-XL overexpressing VEN resistant MCL tumors. Historically, experimental therapy of patients with chronic lymphocytic leukemia with navitoclax, a combined inhibitor of BCL2 and BCL-XL, was rather disappointing. The plausible reasons included both low efficacy of navitoclax due to insufficient BCL2 inhibition, and a dose-limiting thrombocytopenia caused by BCL-XL blockage. We demonstrated that the thrombocytopenia associated with continued therapy with A1155463 could be successfully managed by 4 days on / 3 days off treatment strategy, which cannot be applied in case of fixed dual BCL2/BCL-XL inhibitors like navitoclax, or AZD4320.

In summary, the combined inhibition of BCL2 and BCL-XL with VEN and A1155463 is a highly effective experimental treatment strategy for R/R MCL with a potential translation to the clinical grounds.



Effect of A-1155463 in combination with venetoclax (VEN) in xenograft models. **A**, A-1155463 plus VEN in the VFN-M1 (PDX) model, mice ($n = 6$ per group) were randomly assigned to treatment groups. A1155463 (Δ) was administered i.p. at 10 mg/kg/d, VEN (\circ) was given p.o. at 100 mg/kg/d, both in 4-on/3-off regime. The combination therapy (\square) led to a significantly reduced tumor growth and enhanced tumor growth delay compared with A1155463 and VEN in monotherapy. **B**, A-1155463 plus VEN in the VFN-M1 VEN-R (PDX) model, in identical conditions as the treatment in MAVER-1 model. **C**, Western blot of proteins after co-immunoprecipitation assays. Co-immunoprecipitation of Bcl-2 with proapoptotic protein Bim. Decrease of Bim levels associated with proapoptotic protein Bcl-2 was detected after venetoclax therapy in tumor (PDX) sample (VEN-R D1) compared to control sample (CTRL). The effect of VEN remained 3 days after the last dose of VEN (VEN-R D3). Positive control of Bim (L – control lysate, non-immunoprecipitated), negative control (IgG), Bcl-2 immunoprecipitated samples (Bcl-2).



P13

**Seventh International Symposium on Childhood,
Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin Lymphoma 2022****Intermittent lorlatinib dosing in relapsed/
refractory ALCL provides rapid and durable
responses. Frequent MRD measurement suggests
drug-driven dependency deprivation mechanism.
Jaroslav Sterba, University Hospital Brno, Masaryk
University, School of Medicine, Czech Republic**

Jaroslav Štěřba

Klinika dětské onkologie, University Hospital Brno, Brno, Česko

BACKGROUND: About 100 new children pediatric patients present with anaplastic large-cell lymphoma (ALCL) in the US and Europe each year. Approximately 90% harbor ALK gene rearrangements, with NPM1-ALK being the most prevalent. Despite the use of intensive chemotherapy approaches, about 1/3 of patients will experience a relapse of the disease. In relapsed patients, multiple therapeutic strategies can be considered. The frequency of ALK gene rearrangements in ALCL and the success of ALK inhibitors in other cancer types led to early use of TKIs in patients with ALK gene rearrangement positive ALCL (ALK+ ALCL).

OBJECTIVES: Inhibition of ALK gene rearrangements represents a promising therapeutic option for ALK+ ALCL. Intermittent dosing of TKI as means to prevent drug resistance has been previously explored in the past, however different mechanisms of resistance to different TKIs in various malignancies need to be considered.

DESIGN/METHODS: For ALK+ ALCL, upregulated ALK signaling may lead to a resistance to continuous TKI administration. After TKI withdrawal, increased ALK signaling may results in cell death, which should allow for prolonged disease control, compared to continuous dosing. In relapsed/refractory ALCL where the best treatment is not yet defined, we commenced intermittent lorlatinib treatment with frequent MRD monitoring to assess the efficacy of this approach. We present 2 children who relapsed one during and the second

shortly after intensive chemo-immunotherapy as per protocol ANHL12P1 with anti CD30 antibody and were successfully treated using lorlatinib, intermittent dosing.

RESULTS: One child had only non-quantifiable positive minimal residual disease (MRD) level at the time of clinical relapse, but frequent MRD monitoring was available for the other patient and revealed that the most significant drop of MRD was repeatedly caused by interruptions of lorlatinib treatment as documented in figure bellow. Intermittent dosing seems to be a very effective approach in ALK fusion-positive ALCL.

CONCLUSION: Using this strategy, we were able to achieve 2nd EFS several times longer, then the 1st EFS achieved by intensive chemo-immunotherapy as per protocol ANHL12P1 on anti CD30 arm.

JCO, Precision oncology, June 14, 2022: DOI <https://doi.org/10.1200/PO.21.00525>

Seventh International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin Lymphoma 20-23 October 2022 • The Intercontinental New York Times Square, New York City, NY, USA • Publication of this abstract supplement is supported by the Pediatric Cancer Research Foundation. Research reported in this publication was supported by the National Cancer Institute of the National Institutes of Health under Award Number R13CA275201.

Volume 121, Supplement



P14

ISHL 2022

PET2-adapted approach after 2 cycles of ABVD is comparable to 2 cycles of BEACOPP escalated and 2 cycles of ABVD and irradiation in early unfavorable Hodgkin lymphomaHeidi Mociková¹⁾, Jana Marková¹⁾, Ľubica Gahérová¹⁾, Mária Maco¹⁾, Alice Sýkorová²⁾, David Belada²⁾, Marie Lukášová³⁾, Vít Procházka³⁾, Juraj Ďuraš⁴⁾¹⁾Hematologická klinika, FN Královské Vinohrady

a 3. Lékařská fakulta UK, Praha, Česko

²⁾4. Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice

a Lékařská fakulta, Hradec Králové, Česko

³⁾Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice

a Palackého Univerzita, Olomouc, Česko

⁴⁾Klinika hematoonkologie, Fakultní nemocnice, Ostrava, Česko

Background. PET2-adapted approach after 2 cycles of ABVD reduced treatment intensity in the majority of patients with early stages of classical Hodgkin lymphoma (cHL) according to EORTC H10 trial. GHSG HD17 enabled omission of radiotherapy in PET4-negative early unfavorable HL treated with 2 cycles of BEACOPP escalated and 2 cycles of ABVD (2+2 chemotherapy). We compared PET2-adapted approach with 2+2 chemotherapy followed by 30 Gy of involved-node radiotherapy (INRT) regardless of interim PET in patients with early unfavorable cHL assessed according to the GHSG risk factors.

Methods. Overall, 224 patients with early unfavorable cHL (aged 18-60 years) prospectively observed in the Czech Hodgkin Lymphoma Study Group Registry between 2003-2021 were analyzed. Patients in clinical stage IIB with massive mediastinal tumor and/or with extranodal disease were excluded. Overall, 194 patients received 2+2+INRT chemotherapy and 30 patients were treated with PET2-adapted approach: 29 PET2-negative patients received 4 cycles of ABVD and 30 Gy of INRT and one PET2-positive patient was treated with 2 cycles of ABVD plus 2 cycles of BEACOPP escalated and 30 Gy INRT.

Results. Median age at the time of cHL diagnosis was 32 (range 18-59) years. Median follow-up was longer in the 2+2+INRT group (98.9, range 6.2-211.7) months compared to the PET2-adapted approach (30.8, range 9.8-90.4) months. The 2-year progression-free survival and 2-year overall survival did not differ between two groups (99.5% [95% CI 98.5%-100%]) and 100% [95% CI 100%-100%]), respectively. The rate of patients with neutropenia grade ³3 and anemia grade ³3 did not differ significantly between both groups (p=0.09 and p=0.60, respectively). Thrombocytopenia was more frequent in the 2+2+INRT group (p<0.001). Other non-hematological toxicities grade 3/4 included: 2+2+INRT group (2 infections and 1 deep vein thrombosis) and 1 cutaneous allergic reaction in PET2 adapted approach.

Conclusion. This retrospective analysis indicates that there is no superiority in progression-free survival and overall survival when comparing 2+2 chemotherapy and INRT to PET2-adapted approach. The toxicity is higher in the 2+2+INRT group.

This work was supported by the following grants: AZV NU22-03-00182 from the Ministry of Health of the Czech Republic and Cooperatio Program awarded by the Charles University in Prague in the Czech Republic.

P15

ISHL 2022

Detection of recurrent somatic variants in cell-free DNA as a tool for disease monitoring in Hodgkin lymphomaJan Grohmann, Alexandra Kredátusová, Jana Navrátilová, Veronika Hanáčková, Helena Urbánková, Vít Procházka, Tomáš Papajík
Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

A major challenge in the health care management of HL is finding optimal balance between treatment efficacy and risk of toxicity. Nowadays there is no reliable and precise tool for evaluation of treatment response and MRD



monitoring due to scarce presence and difficult availability of neoplastic cells. The cell-free DNA (cfDNA) in HL reflects its mutational profile and could be source for genotyping assays. We developed a specific NGS panel for analysis of 13 genes involved in pathogenesis of HL. Selected variants detected by NGS were subsequently used for MRD monitoring by droplet PCR (dPCR). Our cohort consisted of 48 pts: 20 females/28 males; median age of dg 39.5 years.

Our cohort consisted of 48 pts: 20 females/28 males; median age of dg 39.5 years. Histological subtypes: 28 pts (58%) NSCHL; 14 pts (29%) MCCHL; 1 pt (2%) NLPHL; 1 pt (2%) LRCHL (4 pts not determined). Forty-four samples were obtained at dg/ 4 in relapse. CfDNA was extracted from peripheral blood plasma using QiaAmp Circulating nucleic acid kit (Qiagen). Specific NGS panel covering coding sequences (including UTRs) of 13 selected genes was designed. For library preparation we used SureSelect XT HS2 technology (Agilent Technologies) based on „target enrichment“ with molecular barcodes. Sequencing was performed on a NovaSeq6000 (Illumina). Data were analysed with the SureCall software (Agilent Technologies) with sensitivity of 1,0 % VAF. The detected variants were annotated using COSMIC, dbSNP, Ensembl and ClinVar. Selected variants were further monitored by dPCR (QIAcuity Digital PCR System; Qiagen) with sensitivity of 0,1 % VAF.

Mutations were detected in 22/48 (46%) pts. The most frequently mutated genes were *STAT6* (12/48 pts), *TNFAIP3* (10/48 pts), *XPO1* (7/48 pts), *SOCS1* (7/26 pts). Frameshift deletions prevailed in *TNFAIP3* and *SOCS1* genes. Most mutations in the *STAT6* (p.N417Y/D) and *XPO1* (p.E571K) genes were hotspots. We monitored levels of these variants by dPCR during the course of disease and correlate results with clinical and PET-CT data.

Fast, sensitive and non-invasive detection of mutations means an important improvement in diagnostics, prognostics, and monitoring of HL. NGS/dPCR approach would refine the evaluation of treatment response fundamentally. Correlation of mutational load with continuous PET examination would reduce

the amount of false-positive results and enable us to use more precise and safe therapy de-escalation. DPCR proved to be sensitive, fast and affordable technology for MRD testing.

All authors declare no conflict of interests. Supported by grants MH CZ – DRO (FNOI, 00098892) and IGA_LF_2022_001

P16

TSEI (total skin electron irradiation) u pacientů s mycosis fungoides (MF): jak a kdy.

Miluše Dolečková, Dana Králová, Alena Chourová, Pavel Stolbenko, Petr Berkovský, Petr Schandl

Onkologické oddělení, Nemocnice České Budějovice a.s., České Budějovice, Česko

Úvod. TSEI je speciální ozařovací technika k ozáření kůže celého těla u pacientů s MF. Je to nejefektivnější samostatná léčebná metoda, dosahuje až 100% odpovědí. Výhodou této techniky je 100% dávky na povrchu, rychlý pokles dávky do hloubky, takže nedochází k ozáření vnitřních orgánů a kostní dřeně.

Metoda. Na Onkologickém oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. jsme v r. 1993 modifikovali TSEI techniku vyvinutou v McGill Universitě v Montrealu pro naše podmínky. Pacient při rotační TSEI technice stojí na točném v postavení baletky, jednou rukou se drží madla umístěného ve vrcholu bezpečnostní stěny kolem točny a rotuje rychlostí 4 otáčky/ min., 4+ 4 minuty je celkový čas rotace. Plánujeme standardní dávku 30-36 Gy. Od r. 2014 provádíme tzv „timing“ tj. 1 týden záříme a 2. týden má pacient pauzu. Podporou k tomu nám byla radiobiologie maligních lymfocytů a zdravých tkání. Od r. 2016 provádíme retreatmenty TSEI. Za velmi důležité považujeme u pacientů trvale pečovat o kůži. Kůže pacientů je často kolonizována bakterií Staphylococcus



aureus, produkující enterotoxin, který zvyšuje proliferaci maligních T buněk a vytváří maligní inflamaci.

Výsledky. Na našem pracovišti jsme od r. 1993 ozářili touto technikou 103 pacientů. Charakteristika souboru: muži 70%, průměrný věk 62let, MF 94%, TNMB st.IIb - 57,7 %. Po TSEI s dávkou ≥ 30 Gy dosáhlo 100% pacientů odpověď na léčbu (kompletní nebo parciální). Overall survival v 5 a 10 letech bylo 53,5 % a 26,8 %, „Week timing“, prodloužení celkového času TSEI, přináší významné snížení časných nežádoucích účinků TSEI (o 70-80 %).

Závěr. TSEI je účinná a dobře tolerovaná léčba pacientů s MF. Všichni naši pacienti měli z TSEI prospěch, někteří dosáhli dlouhodobé remise, někteří dobrého paliativního efektu.



P17

ASH 2022

First-MIND: Final Analysis from a Phase Ib, Open-Label, Randomized Study to Assess Safety of Tafasitamab or Tafasitamab + Lenalidomide in Addition to R-CHOP in Patients with Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma

David Belada¹⁾, Johannes Duell^{1, 2)}, Katerina Kopeckova³⁾, Marek Trněný⁴⁾, Christiane Pott^{1, 2, 5, 3, 4, 6, 7)}, Mouhamad Khouja⁶⁾, John M. Burke⁷⁾, Maeve Waldron-Lynch⁸⁾, Steve Wagner⁹⁾, Grzegorz S. Nowakowski⁵⁾

¹⁾4. interní hematologická klinika, FN Hradec Králové, Hradec Králové 5, Česko

²⁾Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinik Würzburg, Würzburg, Germany, Würzburg, Německo

³⁾Department of Oncology of the 2nd Faculty of Medicine of Charles University and University Hospital in Motol, Prague, Czech Republic, Prague, Česko

⁴⁾Charles University General Hospital, Prague, Czech Republic, Prague, Česko

⁵⁾Division of Hematology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA, Rochester, Spojené státy

⁶⁾Clinic for Internal Medicine II - Haematology, Oncology, University Clinic Schleswig-Holstein, Kiel, Germany, Kiel, Německo

⁷⁾Hematology, US Oncology Research and Rocky Mountain Cancer Centers, Aurora, CO, USA, Aurora, Spojené státy

⁸⁾MorphoSys US, Inc., Boston, MA, USA, Boston, Spojené státy

⁹⁾MorphoSys AG, Planegg, Germany, Planegg, Německo

Both CD20 and CD19 are selectively and strongly expressed on the surface of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) cells. For newly diagnosed and untreated DLBCL, the anti-CD20-targeted R-CHOP regimen is the standard of care. Tafasitamab, a humanized, Fc-modified, anti-CD19 monoclonal antibody, in combination with lenalidomide (LEN), has received regulatory approvals for the treatment of adult patients with R/R DLBCL not otherwise specified, including DLBCL arising from low-grade lymphoma, and who are ineligible for ASCT. A treatment strategy targeting both of these B cell surface molecules,



and supplemented by LEN to enhance the cytotoxicity activity of tafasitamab and rituximab, may limit target evasion and reduce resistance to R-CHOP.

First-MIND (NCT04134936) is a Phase Ib randomized study to assess the safety and tolerability of R-CHOP + tafasitamab ± LEN in patients with previously untreated and newly diagnosed DLBCL, and an International Prognostic Index (IPI) score of 2–5. The primary analysis demonstrated the feasibility of adding tafasitamab + LEN to R-CHOP without impairing its dosing and scheduling, with toxicities similar to those expected with R-CHOP alone (ASH 2021; #3556). The combination of R-CHOP and tafasitamab + LEN as first-line therapy is being investigated further in the global, randomized, Phase III frontMIND study (NCT04824092) in untreated patients with DLBCL and an IPI score of 3–5.

Here, we report the 18-month follow-up analysis from the First-MIND study in all patients and in patients with an IPI score 3–5.

Methods

Eligible patients were randomized 1:1 to six 21-day (D) cycles of either R-CHOP (R-CHOP, D1–5) + tafasitamab (12 mg/kg IV, D1, 8, 15) (Arm T) or R-CHOP + tafasitamab + LEN (25 mg orally, D1–10) (Arm T/L). The primary endpoint was incidence of treatment-emergent adverse events (TEAEs). Secondary endpoints included overall response rate (ORR) and PET-negative complete response (CR) rate at end of treatment (EoT). Safety was assessed using the NCI CTCAE V5.0, and tumor measurements by PET/CT or PET/MRI at EoT were performed according to Lugano 2014 criteria. Minimal residual disease (MRD) was assessed using immunoglobulin gene next-generation sequencing in cell-free DNA.

Results

At the data cut-off (May 5, 2022), of the 66 patients randomized (Arm T, n=33; Arm T/L, n=33), a total of 27 patients (40.9%) were still on study (Arm T, n=13; Arm T/L, n=14) with a median follow-up of 17.6 months for

progression-free survival (PFS). Baseline characteristics were well balanced: 60.6% of patients in Arm T and 66.7% in Arm T/L had an IPI score of 3–5; 94.0% and 87.9% had an ECOG PS of 0–1, respectively; and 93.9% of patients in both Arms were Ann Arbor stage III/IV.

ORR at EoT visit and best response across all visits were higher in Arm T/L, as were 18-month DoR, PFS, and OS rates (Table 1). In patients treated in Arm T/L and with an IPI score of 3–5 (n=22), ORR and 18-month DoR, PFS, and OS rates were comparable with the overall Arm T/L cohort (Table 1). The 12-month PFS rate by MRD status at EoT in Arm T/L was 100% in MRD-negative patients (n=12) (Figure 1) and 67% in MRD-positive patients (n=3). MRD-negativity at Cycle 2 Day 1 appeared to be predictive for durable PFS responses.

The frequency of Grade ≥3 TEAEs was 72.7% in Arm T and 90.9% in Arm T/L; the most common TEAEs were neutropenia, anemia, leukopenia, and thrombocytopenia in both arms. Serious TEAEs occurred in 42.4% in Arm T and 51.5% in Arm T/L, with no difference between treatment arms in the incidence of febrile neutropenia (15.2%), and an incidence of infections and infestations of 9.1% in Arm T and 6.1% in Arm T/L.

Conclusions: Adding tafasitamab in combination with LEN to R-CHOP shows numerically higher clinical efficacy than adding tafasitamab alone, and is consistent with the synergy between tafasitamab and LEN, leading to durable responses in treatment-naïve patients with DLBCL. The long-term safety profile of tafasitamab ± LEN when added to R-CHOP showed no new safety signals to those reported previously. Although the sample size is limited, patients with an IPI score of 3–5 treated with tafasitamab + LEN + R-CHOP showed efficacy comparable to that of the overall treatment arm cohort, including MRD-negative patients who remained disease-free for ≥18 months. frontMIND will further evaluate tafasitamab + LEN + R-CHOP in previously untreated patients with high-intermediate and high-risk (IPI score 3–5) DLBCL.

Funding: MorphoSys AG.

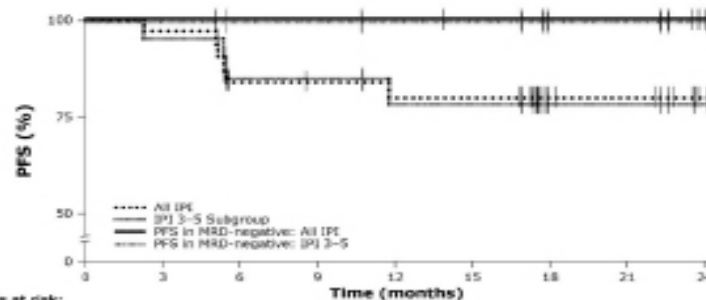


Table 1. First-MIND efficacy after 18 months' follow-up.

Event	Arm T N=22	Arm T/L N=23	T/L IPI 3-5 N=22
ORR, n (%) [95% CI]			
CR or PR (at EoT)	25 (75.8) [57.7, 88.9]	27 (81.8) [64.5, 93.0]	18 (81.8) [59.7, 94.8]
CR or PR (best response across all visits)	30 (90.9) [75.7, 98.1]	31 (93.9) [79.8, 98.3]	20 (90.9) [76.8, 98.9]
18-month DoR rate, % [95% CI]	65.8 [40.4, 82.4]	82.1 [61.9, 92.2]	81.4 [52.6, 92.8]
18-month PFS rate, % [95% CI]	66.0 [41.5, 82.2]	79.9 [60.5, 90.5]	78.4 [51.6, 91.4]
18-month OS rate, % [95% CI]	90.3 [72.8, 98.8]	93.8 [77.3, 98.6]	85.2 [70.7, 99.3]

CI, confidence interval; CR, complete response; DoR, duration of response; EoT, end of treatment; IPI, International Prognostic Index; ORR, objective response rate; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; PR, partial response; 3-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; T, tafasitamab + 3-CHOP; T/L, tafasitamab + lenalidomide + 3-CHOP.

Figure 1. PFS in all IPI and IPI 3-5 patients in Arm T/L, and PFS in all IPI and IPI 3-5 MRD-negative patients at EoT in Arm T/L.



Tick marks denote censored patients; EoT, end of treatment; IPI, International Prognostic Index; MRD, minimum residual disease; PFS, progression-free survival; 3-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; T/L, tafasitamab + lenalidomide + 3-CHOP.

P18

EHA 2022

MINIMAL-LOSS-CYTOMETRY FOR EVALUATION OF CEREBROSPINAL FLUID IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. SINGLE CENTER STUDY

Michaela Nováková^{1, 2, a)}, Iveta Janotová²⁾, Elena Vodičková³⁾, Alena Houdková²⁾, Jitka Hanzalová⁴⁾, Martina Vášková^{1, 2)}, Daniela Kužilková^{1, 2)}, Ester Mejstříková^{1, 2)}, Lucie Šrámková²⁾, Jan Starý²⁾, Ondřej Hrušák^{1, 2)}

¹⁾CLIP-Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko

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

³⁾Department of Clinical Hematology, University Hospital Motol, Prague, Česko

⁴⁾Department of Immunology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Česko

Background: Central nervous system (CNS) involvement at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL) represents a risk factor for CNS relapse. Currently, examination of the cerebrospinal fluid (CSF) is performed and evaluated quantitatively using a counting chamber and qualitatively using cytomorphological analysis of cytopspin. Recently, flow cytometry (FC) evaluation of CSF was shown to provide more reliable results and to predict relapse risk (de Haas et al., 2021, Thastrup et al., 2020).

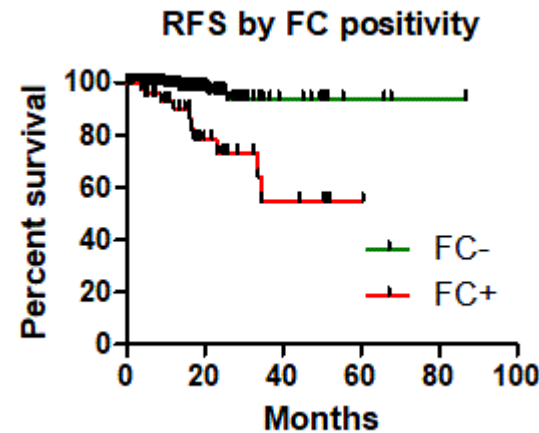
Aims: Independently of these studies, we applied a lyse-no wash technique aiming at minimizing cell loss during preparation and at improved cell concentration estimate. We compared our findings with morphological criteria and correlated them with clinical outcome in pediatric patients with ALL.

Methods: We included pediatric patients with newly diagnosed ALL (04/2014 – 01/2022), whose CSF examination was performed in CLIP laboratory (n=208). Patients were classified as B cell precursor ALL (BCP ALL; 86%) and T ALL (15%) and treated according to following protocols: AIEOP-BFM



2009 (n=118), AIEOP-BFM 2017 (n=71), EsPhALL(n=8), Interfant06 (n=5), off-protocol (n=6). During follow up, 14 patients relapsed (5 CNS incl. combined, 9 non-CNS). CSF (drawn into tube with no fixative agent and processed within 2 hours) was concentrated by centrifugation and incubated with combination of antibodies (CD20/CD10/CD45/CD34/CD19/CD3/Syto41 in BCP ALL and CD4/CD99/CD5/CD3/CD7/CD16+56/CD8/Syto41 in T ALL). Residual erythrocytes were lysed with NH₄Cl solution, followed by immediate acquisition on BD FACS Lyric or BD LSRII cytometers. Blasts were quantified to initial CSF volume. Cluster of 20 events was required to assign samples as FC positive (FC+). In parallel, CNS status was concluded according to morphological criteria, being classified as CNS1 (no blasts), CNS2a/b (≤ 5 WBC/ μ L with blasts), CNS2c/CNS3 (≥ 5 WBC/ μ L with blasts) according to treatment protocol guidelines. Continuous variables were compared with the Mann-Whitney test, survival data were analyzed using Mantel-Cox test. P values < 0.05 were considered as significant.

Results: Using FC, we identified atypical blasts in 50 out of the 208 analyzed samples (24%). Median of analyzed CSF volume was 367 μ L (range 143-1033 μ L), which enabled median sensitivity 0.054 (0.02-0.14 ev/ μ L). Mean blast concentration was 0.47 ev/ μ L (range 0-25 ev/ μ L) in all samples and 2 ev/ μ L (range 0.01-25 ev/ μ L, median 0.53/ μ L) in FC+ samples. We observed significantly higher blast concentration in patients with T ALL[MN1], in patients with CNS2 and CNS3 and those who subsequently relapsed. Patients with FC+ had significantly lower relapse-free survival than FC- patients (55% vs 94%), which provided better separation than CNS status (68% vs. 85% for CNS2/3 vs. CNS1, respectively).





P19

EBMT 2022**NGS-BASED VERIFICATION OF LOW MRD POSITIVITY IS HIGHLY SPECIFIC IN PREDICTION OF RELAPSE IN POST-TRANSPLANT ALL PATIENTS**

Michael Svaton^{1, 2)}, Krystof Seferna^{1, 2, a)}, Andrea Rennerova^{1, 2)}, Aneta Skotnicova^{1, 2)}, Leona Reznickova^{1, 2)}, Petr Sedlacek^{2, 1)}, Petr Riha^{2, 1)}, Renata Formankova^{2, 1)}, Petra Keslova^{2, 1)}, Veronika Valkova^{3, 4)}, Lucie Sramkova^{2, 1)}, Jan Stary^{2, 1)}, Julia Horakova^{5, 6)}, Alexandra Kolenova^{5, 6)}, Cyril Salek^{3, 4)}, Jan Trka^{1, 2)}, Eva Fronkova^{1, 2)}

¹⁾CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Česko

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

³⁾Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague, Česko

⁴⁾Institute of Clinical and Experimental Haematology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko

⁵⁾Department of Pediatric Hematology and Oncology, Comenius University Medical School, Bratislava, Slovensko

⁶⁾University Children's Hospital, Bratislava, Slovensko

Background:

In patients transplanted for acute lymphoblastic leukemia (ALL), decisions about early therapy intensification are based on minimal residual disease (MRD) levels. MRD testing via quantitative PCR (qPCR) using clone-specific immunoglobulin (Ig) and T-cell (TR) receptor gene rearrangements is a standard for MRD detection in ALL and is the most widespread method for post-transplant MRD monitoring. We have previously shown that MRD detection using Ig/TR monitoring via next-generation sequencing (NGS) is more specific than qPCR (Kotrova, BMT 2017). Since then, NGS-MRD detection has been standardized within the EuroClonality-NGS consortium. In the current study, we investigated the clinical outcome of prospectively verifying positive non-quantifiable (PnQ) qPCR results via NGS-MRD.

Methods:

Sequential post-transplant MRD monitoring in pediatric and young adult ALL patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) was performed in our facility for patients from 4 transplant centers in the Czech Republic and Slovakia. For qPCR-MRD monitoring, we used the standardized EuroMRD approach. For NGS-MRD we used the EuroClonality-NGS protocols for library preparation (Brüggemann, Kotrova, Leukemia 2019). The qPCR products with PnQ result were first retested for length using Agilent-on-a-chip analysis (Fronkova, BMT 2008) and if the length did not match the diagnostic sample, the qPCR results were concluded as negative. In cases with irresolvable or unavailable PCR products size comparison, the results were reported as positive according to the EuroMRD criteria and further retesting via NGS was performed.

Results:

In total, we reevaluated MRD via NGS in 26 patients. In 8 patients, the results were confirmed as positive using NGS and reported to clinicians. Out of these 8 patients, 5 relapsed despite therapeutic efforts to avert relapse (median time to relapse: 2 months). All 3 patients positive by NGS who did not progress to relapse had immunosuppressive treatment (IST) reduced and one received 5 doses of donor lymphocyte infusions (DLI) in reaction to the qPCR/NGS-detected positivity. One patient died of GvHD reactivation after IST withdrawal. Among the 17 patients identified as negative by NGS, only one relapse occurred (5 months after testing). In 5 NGS-negative patients, therapy was intensified (IST reduction) on the basis of the qPCR result (including the patient who progressed to relapse, who also received 2 doses of DLI). In one patient (who did not relapse), NGS testing was evaluated as inconclusive due to low sensitivity.

Conclusions:

Ig/TR monitoring via qPCR still represents the most cost-effective and time-efficient method for post-transplant MRD monitoring. Although the NGS method has comparable cost-efficiency to qPCR, its main challenge remains



the longer turnaround time, depending on the laboratory throughput. In our study, we confirmed that the NGS method is more specific for discerning low positive MRD from the background of physiological lymphocytes and thus more reliable for clinical decisions. The combination of qPCR measurements and subsequent verification of low positive results via NGS appears to be the safest method for post-transplant MRD-guided clinical decision-making. Supported by NU20-03-00284 and GA UK 318321.

P20

ISHL 2022

Predictive role of the Hodgkin lymphoma-associated cytokines: a prospective study of the Czech Hodgkin Study Group

Alexandra Kredátusová¹, Vít Procházka¹, Heidi Móciková², Alice Sýkorová³, Jana Marková², Marie Lukášová¹, Ľubica Gaherová², Eva Kriegová⁴, Mária Maco², Tomáš Kozák², David Belada³, Tomáš Papajík¹

¹Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

²Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha, Česko

³IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, Česko

⁴Ústav imunologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

Background: Prognostic stratification and thus the selection of the frontline treatment in Hodgkin lymphoma (HL) is based on historical systems which only indirectly reflect lymphoma burden or cytokine activity. Analysis of the lymphoma-related soluble biomarkers offers a non-invasive tool for more precise risk stratification.

Aim: To define a prognostic significance of the pretreatment soluble cytokines levels in the newly diagnosed pts with HL treated within GHSG policy

Methods: We have conducted prospective serum sampling (2017–2021) of the unselected pts treated in three university hospitals in the Czech Republic. All samples were analysed centrally using ELISA for lymphoma cells (TARC pg/ml; sCD30, ng/ml), macrophages (sCD163, ng/ml) and inflammation-related cytokines (sIL-6, pg/ml). Clinical and laboratory data were retrieved from the national Hodgkin lymphoma registry.

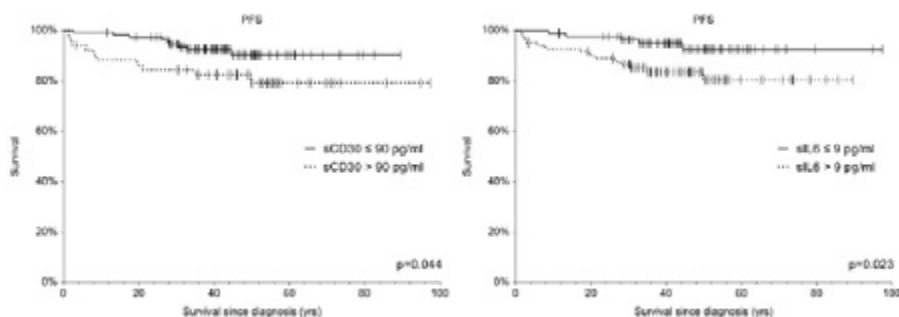
Results: In total we have analysed 169 (100%) consecutive pts. Median age was 42 (19–83) yrs, with slight female predominance (52%). All but 7 pts (96%) have been diagnosed as classical HL (nodular sclerosis in 83, mixed cellularity in 58, lymphocyte-rich in 8 and lymphocyte depletion in 1, 12 not classified). Ann Arbor stages were as follows: (12%), II (37%), III (22%), IV (29%) with B-symptoms present in (56%) and extranodal disease in (32.5%) of the pts, leading to allocating of the pts into limited (18%), intermediate (24%) and advanced (58%) GHSG stages. Treatment was based on ABVD (48%), BEACOPPesc (42%), COPP/ABV (8%), or other (2%) regimen. Treatment response was assessed in 161 pts (95%), with CR in 90% of the pts. After a median FU of 43 months the 5-y OS reached 90.4% (95% CI 0.83–0.98) and 5-y PFS 86.6% (95% CI 0.81–0.93). Lower mean pretreatment levels of 3 cytokines correlated with achieving of CR: sCD30 (70 vs 130; p=0.04), sCD163 (783 vs 1171; 0.007), sIL-6 (26 vs 130; p<0.001), TARC did not show any correlation with CR (mean 33764 vs 23702; p=0.67). Two cytokines were predictive for PFS: sCD30, cut-off 90 ng/ml (5-y PFS 79.1 vs 90.4%; p=0.044) and sIL-6, cut-off 9 pg/ml (5-y PFS 80.3 vs 92.5%; p=0.023). High levels of sCD30 and sIL-6 were associated with inferior 5-y OS of 79.3 vs 97.2% (sCD30, p=0.004) and 82.6% vs 97.4% (sIL-6, p=0.025).

Conclusion: Pretreatment levels of soluble CD30 and IL-6 are associated with the treatment outcome and survival in the patients treated with GHSG risk-adapted policy.



Acknowledgment

MZCR-RVO (FNOL, 00098892), AZV NU22-03-0018



P21

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍ EXPRESE DLOUHÝCH NEKÓDUJÍCÍCH RNA Z PLASMY PACIENTŮ S DIFÚZNÍM VELKOBUNĚČNÝM B-LYMFOMEM (DLBCL)

Robin Klieber¹⁾, Pavel Ostašov²⁾, Monika Holubová^{1, 2)}, Diana Macečková²⁾, Daniel Lysák¹⁾, Pavel Jindra¹⁾

¹⁾Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň, Plzeň, Česko

²⁾Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Plzeň, Česko

Východiska:

DLBCL je u dospělých nejčastějším subtypem ne Hodgkinského lymfomu. Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) představují heterogenní skupinu protein-nekódujících RNA s délkou >200 nukleotidů. Vzhledem ke krátké životnosti RNA v krvi jejich zastoupení odráží pacientův aktuální stav a díky vysoké tkáňové specifičnosti se dají lncRNA z tekuté biopsie využít jako biomarkery pro sledování účinku léčby.

Cíl:

Práce se zabývá identifikací a stanovením diferenciální exprese plasmatických lncRNAs před a po léčbě pacientů s DLBCL. Hlavním cílem je identifikovat potenciální lncRNA biomarkery, které by umožnily rychlý, citlivý a specifický monitoring léčby DLBCL nebo například detekci minimální reziduální nemoci.

Metodika:

Plazma pacientů je získána centrifugací z plné, (K3EDTA) nesrážlivé krve do 1 hodiny po odběru. cfRNA (mimobuněčná=cell-free RNA) je následně izolována a kvantifikována. Poté jsou připraveny 3'polyadenylované sekvenční knihovny, které jsou analyzovány na sekvenátoru nové generace.

Výsledky:

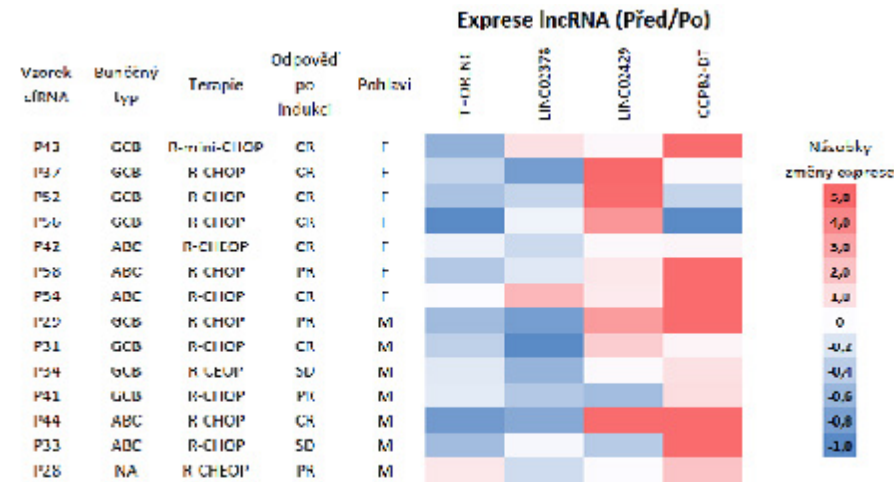
Byly provedeny dvě nezávislé sekvenace cfRNA celkem od 14 pacientů s DLBCL. Analýza napříč všemi vzorky odhalila 1375 lncRNA a nehlédě na pohlaví a buněčný typ DLBCL (GCB, ABC) identifikovala pouze 4 rozdílně exprimované lncRNA při porovnání jejich výskytu v plasmě před a po léčbě. Expres THORLNC a LINC02378 byla bez rozdílu na pohlaví a buněčný typ před léčbou výrazně snížena u většiny pacientů. Lehce zvýšená exprese LINC02378 byla však pozorována u vzorků P43, P54 a nepatrně zvýšená THORLNC u vzorku P28. LINC02429 a COPB2-DT naopak vykazují všeobecně zvýšenou expresi před léčbou. Výjimky tvoří dva mužští pacienti se sníženou expresí LINC02429 (P41 a P33) a dvě ženy rovněž se sníženou expresí COPB2-DT (P52, P56).

Závěr:

lncRNA mohou být použity pro sledování nádorového onemocnění nebo jako biomarkery včasného záchytu. lncRNA získané z tekutých biopsií obecně představují potenciál pro detekci, sledování a diagnostiku nádorů. Naše data je nutno verifikovat pomocí RT-qPCR na větším souboru pacientů.

Financování:

Podpořeno projektem SVV 2020-2022 č. 260 540 a MZČR – FNPI, 00669806.



GCB - germinal center B cell like, ABC - activated B cell like, CR - celková remise, PR - částečná remise, SD - stabilní nemoc, F - žena, M - muž

P22

New promising targets of PI3K/AKT signaling in lymphoma

Václav Heřman^{1, 2)}, Mariana Pacheco-Blanco¹⁾, Kristyna Kupcova^{1, 2, b)}, Jana Senavova^{1, 2, c)}, Tereza Chrbolkova^{1, d)}, Pavel Klener^{2, 3)}, R. Eric Davis⁴⁾, Ondrej Havranek^{1, 2, e)}

¹⁾BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko

²⁾First Department of Medicine - Department of Hematology, General University Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko

³⁾Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko

⁴⁾Department of Lymphoma and Myeloma, MD Anderson Cancer Center, Houston, Spojené státy

Phosphoinositol-3-kinase / protein kinase B (PI3K/AKT) pathway is one of the most frequently deregulated signaling pathways in non-Hodgkin lymphomas (NHL). Certain NHL subtypes depend on its constitutive activity, namely the germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma (GCB-DLBCL). One of the signals activating PI3K/AKT pathway in GCB-DLBCL comes from tonic B-cell receptor (BCR) signaling.

We have shown that other mechanisms are involved in AKT activation as BCR knockout (KO) in GCB-DLBCL cell lines did not completely abolish AKT activity. This was confirmed by initial experiments, showing that, in contrast to BCR KO, the KO of AKT is uniformly toxic to all tested GCB-DLBCL cell lines. Next, we performed a KO screen of multiple candidates of upstream AKT activation and assessed the KO effect on AKT activity (using a genetically encoded AKT activity biosensor). The most promising and universal target for PI3K/AKT pathway inhibition was phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1 (PDPK1) – a mediator of AKT activating phosphorylation. Similarly to AKT KO, PDPK1 KO is highly and uniformly toxic to all tested GCB-DLBCL cell lines. Initial experiments showed that the toxic effect of PDPK1 KO could be partially rescued by overexpression of constitutively active isoforms of AKT



or mTOR (mammalian target of rapamycin), which may, therefore, represent an effector of PDPK1 mediated AKT activation. Pharmacological inhibition of PDPK1 using GSK-2334470 inhibitor showed dose-dependent decrease in AKT activity, confirming its specificity. Initial tests of combinations with commonly used chemotherapeutic agents showed synergy. Moreover, PDPK1 inhibition was effective also *in vivo* in a xenograft mouse model, where it reduced growth of SUDHL-6 DLBCL cell line.

Our initial data suggest PDPK1 as a promising universal therapeutic target in lymphoma and justify further testing.

Supported by: Charles University (PRIMUS/17/MED/9, UNCE/MED/016, SVV260521, Cooperatio) and NICR LX22NPO5102

P23

EHA 2022

Challenging Amyloidosis, Concurrent Amyloid Producing Diseases

Patrik Flodr¹, Martina Navrátilová¹, Tomáš Tomáš², Dušan Holub³, Jiří Minařík², Jaroslav Michálek¹, Petr Džubák³

¹*Department of Clinical and Molecular Pathology, FH and FMD Palacký University Olomouc, CZ, Olomouc, Česko*

²*Department of Hemato-oncology, FH Olomouc, Olomouc, CZ, Olomouc, Česko*

³*Department of Molecular and Translational Medicine, FMD Palacký University Olomouc, CZ, Olomouc, Česko*

Amyloidosis is a heterogeneous acquired or hereditary, systemic or localised disease that results from the abnormal deposition of beta-sheet fibrillar protein aggregates in various tissues with variable distribution in extracellular

space, mainly oligomers and protofibrils produce tissue damage. Current nomenclature classification distinguishes 36 amyloidogenic proteins, 18 proteins in systemic and 22 proteins in localised amyloidosis (ISA 2020). Our file contains 339 positive specimens (in total 749 FFPE and native samples analysed) with amyloid deposits diagnosed between the years 2007-2022 in variable tissues and organs stained with Congo red and/or Saturn red as a diagnostic step with consequent immunohistochemical analysis (IHC) a proteomic analysis (laser captured microdissection-liquid chromatography/tandem mass spectrometry - LMD-LC/MS/MS) as a typing steps. Our results are shown in enclosed tab. Detected hybrid amyloid types are highly important in differential diagnosis of coincidental diseases both producing amyloid deposits (commonly AL amyloidosis + another one) and are also challenging the correct interpretation of amyloid protein deposition process e.g. a/ deposits from different specimens or organs, b/ deposits from the same specimen and organ in diverse microspaces, c/ deposits from the same specimen and organ in the same microspace. These microanatomical variabilities reveal distinct subtypes of amyloid fibrillogenesis. Analysis of amyloid deposits irrespective of origin and localization is appealing for diagnostic and experimental precising including also amyloid signature proteins (SAP, HSPG, SAP, apo-AI, apo-AIV, apo-E and others). Presented algorithm shows highly valid method with crucial impact on novel therapeutic decisions (siRNA, antisense mRNA, anti-human-SAP antibodies, monoclonal antibody binding amyloid protofilaments, accelerators of fibrillization, etc.) which are different in particular amyloidosis and concurrent diseases (e.g. ATTRwt amyloidosis with MGUS/MM without AL amyloidosis, and more combinations exist). Polymorphisms and mutation burden is another horizon in amyloid deposits survey.

Supported by AZV-16-31156A and LF_2021_005 from Palacký University Olomouc.

Amyloid(Σ)	AL (Σ)	AL lambda	AL kappa	hybrid AL/ATTR	hybrid AL/ApoAIV	hybrid AL/AH	ATTR	AA	AH	AApoAI	AIAPP	ASem1	ACal	AFib
339	100	69	31	1	1 (kappa)	1 (kappa/IgG1)	92	13	4	1	1	5	6	2



P24

ASH 2022**Combinatorial PI3K/AKT Pathway Inhibition as a Model for Novel Therapeutic Approach in Diffuse Large B-cell Lymphoma**

Kristýna Kupcová^{1, 2)}, Jana Seňavová^{1, 2)}, Václav Heřman^{1, 2)}, Mariana Pacheco-Blanco¹⁾, Tereza Chrbolková¹⁾, Iva Onděčková^{1, 2)}, Ondřej Havránek^{1, 2)}

¹⁾BIOCEV, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Vestec, Česko

²⁾1. interní klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha, Česko

Background. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most frequent type of non-Hodgkin lymphoma (NHL, ~ 25-30% of NHL cases). Currently, DLBCL treatment is based on non-specific chemotherapy combination (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) with anti-CD20 monoclonal antibody. Although the DLBCL survival dramatically improved during last decades, approximately 40 % of DLBCL patients could not be cured with the currently used therapeutic approaches. Novel approaches are, therefore, needed to improve DLBCL survival and to decrease treatment related toxicity. Since many DLBCL tumors depend on phosphatidylinositol 3-kinase /protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway, it represents one of the possible novel therapeutic targets. Despite promising results in various cancers, PI3K/AKT pathway inhibitors show only partial efficacy, low specificity, and resistance development in lymphomas. Since the PI3K/AKT activity is highly regulated, we hypothesize that the PI3K/AKT pathway (and other lymphoma specific signaling) needs to be inhibited at multiple levels simultaneously to achieve its full and lasting inhibition.

Methods. To provide a proof of principle of multilevel vertical inhibition, we planned to use four inhibitors targeting the PI3K/AKT pathway at four different levels: PI3K δ inhibitor idelalisib, PDPK1 inhibitor GSK2334470, AKT inhibitor ipatasertib, and mTOR inhibitor rapamycin on DLBCL model cell lines. Precise measurement of AKT activity in living cells was done using our

recently published genetically encoded Förster Resonance Energy Transferred (FRET) based AKT activity reporter including novel methodology for flow cytometry-based FRET measurement (PMID: 34128311) allowing medium throughput and measurement in kinetics setting.

Results. First, we confirmed that individual inhibitors showed maximal AKT inhibitory effect at approximately 10 times lower concentrations in comparison to IC50 values calculated from net cell growth assessing the overall inhibitor toxicity. This suggests compensatory mechanisms and/or off target effects of PI3K/AKT inhibitors. Next, we tested dynamics of AKT activity following AKT inhibition. Initial testing showed that cellular contra-regulatory mechanisms compensated for the decrease of AKT activity within 24 hours even in the presence of the inhibitor. Moreover, we detected a massive increase in AKT activity following release of the cells from media with AKT pathway inhibitor. Importantly, pharmacological inhibition of one or two members of PI3K/AKT signaling cascade did not lead to lasting AKT activity inhibition and combination of at least three different PI3K/AKT inhibitors was necessary to achieve lasting AKT activity decrease. Further initial testing identified that similar approach might be applicable to other lymphoma specific pathways as are NF κ B or MAPK/ERK pathways using NF κ B and ERK genetically encoded biosensors.

Conclusions. Concept of inhibiting more members of PI3K/AKT pathway was suggested before using combinations and/or dual inhibitors of AKT and mTOR, however, our data suggest that more than two inhibitors are needed for lasting PI3K/AKT inhibition. We have provided a proof of principle of vertical multilevel signaling inhibition justifying further experimental validation and testing.

This work was supported by the Charles University in Prague (PRIMUS/17/MED/9, UNCE/MED/016, SVV260521, Cooperatio); and the project National Institute for Cancer Research (reg. No. LX22NPO5102) - Funded by the European Union - Next Generation EU, Programme EXCELES.



P25

EHA 2022

Subclonal architecture of chromosomes revealed by single-cell analysis of gene expression in a patient with clonal evolution of relapsing/refractory CLL

Jana Kotašková^{1, 2, 3)}, Terezia Kurucová²⁾, Kamila Réblová^{1, 2, 3)},
Kristýna Závacká^{1, 2)}, Andrea Marečková¹⁾, Michaela Bohúnová¹⁾,
Veronika Navrkalová^{1, 2)}, Marie Jarošová^{1, 3)}, Michael Doubek^{1, 2, 3)},
Karla Plevová^{1, 2, 3)}, Šárka Pospíšilová^{1, 2, 3)}

¹⁾CMBG IHOK, Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česko

²⁾CEITEC (Central European Institute of Technology),
Masarykova Univerzita, Brno, Česko

³⁾Ústav lékařské genetiky a genomiky, Masarykova Univerzita, Brno, Česko

Background: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) manifests by remarkable intracлонаl heterogeneity of genomic defects, especially in patients with relapsed/refractory disease, often connected with complex karyotype. In cancer cells, chromosomal changes are often multiple and complex. Aberrations can be present only in subclones and often underlie disease refractoriness. Using the bulk analysis such as WGS, WES, or genomic array to precisely determine the co-occurrence of aberrations in the individual cell provides limited information.

Aims: To perform an in-depth, single-cell RNA sequencing (scRNAseq) study of subclonal changes associated with relapsed/refractory CLL.

Methods: A bulk analysis of DNA from separated malignant cells using comprehensive NGS panel LYNX (PMID 34082072) was performed on a representative CLL case at three time-points (TPs): at dg (TP1, month 0, Rai II), before first therapy (TP2, month 19) and during relapse (TP3, month 59). Simultaneously, the transcriptome was analyzed using scRNAseq (Chromium system, 10x Genomics) in 2330 cells (TP1), 2397 cells (TP2), and 1902 cells (TP3). A detailed data analysis was carried out with the Seurat R package. In addition, we used the InferCNV tool to detect the chromosomal aberrations in every tested cell. We identified multiple chromosomal changes and compared the findings with the results of bulk

DNA analysis using a genomic array (ThermoFisher Scientific) and FISH. **Results:** We detected a number of aberrations that were already present at TP1, including del13q, del11q, mutations in NOTCH1, RPS15, ZMYM3, and minor mutations in TP53 and ATM. At TP2, additional changes comprised mutations in PIM1, XPO1, and del(3q). Between TP2 and TP3, the patient underwent several treatment lines (FCR, BR, COP) without an apparent therapeutic effect. The cells from TP3 carried complex changes, including additional mutations in BIRC3 and RB1. Unsupervised clustering of scRNAseq gene expression data defined major clones bearing aberrations (losses on chromosomes 1, 9, 13, 17, 18). Moreover, these clones were composed of cells with additional aberrations defining a number of separate subclones. The proportion of subclones was typically under the detection limit of the genomic array and showed extreme intracлонаl heterogeneity of the relapsed/refractory CLL case.

Summary/Conclusion:

We showcase how genomic alterations influence the expression of affected genes. Such fact can be exploited to reconstruct chromosomal disruptions in individual cells using scRNAseq and to uncover the subclonal architecture of the disease.

Grants: MH-CZ_AZV_NU20-08-00314, MH-CZ_AZV_NV19-03-00091, MEYS-CZ_MUNI/A/1224/2022, MH-CZ_RVO_65269705.



P26

EHA 2022**CD38: a functioning target in relapsed/
refractory acute lymphoblastic leukemia.
Limitations in treatment and diagnostics**

Barbora Vákrmanová, Michaela Nováková, Petr Říha, Markéta Žaliová,
Eva Froňková, Ester Mejstříková, Jan Starý, Ondřej Hrušák,
Lucie Šrámková

*Department of Paediatric Haematology and Oncology Second Faculty of
Medicine Charles University and University Hospital Motol, CLIP (Childhood
Leukaemia Investigation Prague) laboratory center, Praha, Česko*

Background

The prognosis of relapsed T-acute lymphoblastic leukemia (ALL) is dismal and there is a need for new treatment options. Daratumumab, a monoclonal kappa chain antibody against CD38 is routinely used in multiple myeloma treatment. CD38 is also expressed in malignant cells of most cases with pediatric ALL. Accordingly, daratumumab can be used experimentally in treatment of relapsed ALL but data about efficacy of such a treatment is limited. The loss of CD38 described in myeloma patients can be one of the reasons of treatment failure.

Aims

Does daratumumab provide a benefit in relapsed ALL?

Can we observe the inability of anti-CD38 mAbs to bind to leukemia cells after daratumumab treatment as described in myeloma patients?

Methods

We treated five patients with relapsed ALL with daratumumab between 10/2019 – 10/2021 (four of them for a first relapse of T-ALL and one for

a second CD19^{neg} relapse of B cell precursor (BCP) ALL). In three patients, daratumumab was used in combination with chemotherapy, in one patient, chemotherapy was early discontinued for toxicity and the remaining patient received it in monotherapy due to clinical condition. Blast positivity of CD38 by a diagnostic monoclonal antibody (mAb) at relapse was confirmed in all patients before treatment started.

Results

Three of five patients responded to daratumumab plus chemotherapy and were in second complete remission (CR2) and underwent stem cell transplantation (SCT). CD38 expression on blasts after daratumumab was not evaluated due to blast elimination in these cases. Two of these patients relapsed with CD38^{pos} ALL 5 and 7 months after SCT, respectively. Third patient is in CR2 one year after SCT. In two of five patients (one with T-ALL and one with a CD19^{neg} BCP ALL) blasts were still detected by flow cytometry after daratumumab. In patient 4 disease progressed under daratumumab treatment. Under the progressing disease patient died 52 days after the relapse. In the other patient, the amount of blasts decreased by one log after the first course of treatment. Nevertheless, the blasts remained on the same log level. Therefore, daratumumab treatment was stopped and replaced by inotuzumab and subsequent SCT, which led to a molecular CR3. We could not detect binding of a diagnostic anti-CD38 (clone T16, HIT2) in neither of the two cases early after the start of daratumumab treatment. We then tested whether the lack of anti-CD38 binding could be caused by steric hindrance with daratumumab molecules as had been described in myeloma patients. We proved our patients had blasts CD38 positive on mRNA level and intracellularly (patient 4). We also detected daratumumab directly on the blasts by detecting its kappa chain on the blasts (patients 4). Moreover, adding daratumumab to blasts of a patient freshly diagnosed with CD38^{pos} BCP ALL blocked anti-CD38 antibody (clone T16) binding. Collectively, the data showed that like in myeloma, daratumumab may block binding of some diagnostic antibodies. By measuring the blast with multiepitope CYT-38F2 pAb, the blasts were clearly positive, albeit with a lower intensity.



Conclusion

In conclusion, daratumumab can lead to CR2 in relapse/refractory ALL, however, the effect is often temporary. Daratumumab administration may result in weeks lasting inability of anti-CD38 mAbs to bind to leukemia cells. Other antibodies, such as the multiepitope pAb CYT-38F2, are needed.

Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grants nr. NU20-03-00284 and NU20J-07-00028.

P27

New frontiers in CLL research, ERIC-CLL 2022

Scaffold- and gel-based culture systems for in vitro studies of leukemic B cells

Hana Svozilová^{1, 2, 3)}, Lucy Vojtová⁴⁾, Daniel Horák⁵⁾, Radana Studená¹⁾, Jana Dorazilová⁴⁾, Jiří Baloun¹⁾, Zdeněk Plichta⁵⁾, Vladimír Proks⁵⁾, Michael Doubek^{1, 2, 3)}, Šárka Pospíšilová^{1, 2, 3)}

¹⁾Centrum molekulární medicíny, Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno, Česko

²⁾Ústav lékařské genetiky a genomiky, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česko

³⁾Centrum molekulární biologie a genetiky, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česko

⁴⁾Pokročilé biomateriály, Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Brno, Česko

⁵⁾Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Brno, Česko

Background

Three-dimensional (3D) in vitro models represent an essential culture method, as they capture physiologically relevant interactions of cells with their micro-environment. So far, numerous techniques, methods, and materials for 3D

culture have already been introduced in cancer research – e.g., patient-derived tumor organoids, multicellular tumor spheroids, bioprinting, etc. In our study, we have utilized gels and porous solid scaffolds for a culture of cells relevant for studies of chronic lymphocytic leukemia (CLL).

Material and methods

Cell lines (M2-10B4, HG-3, MEC-1) or primary CLL cells were cultured in three distinct material types: (1) solid porous poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based hydrogels, (2) 0,5% collagen foams, and (3) 6% or 8% carboxymethylcellulose gels with 5% polyethyleneglycol (CMC-PEG). Cellular viability, metabolic activity, and apoptotic processes were assessed by various complementary methods – confocal microscopy, AlamarBlue, MTT, Caspase-Glo 3/7 assay, or RealTime-Glo annexin V apoptosis assay.

Results

All materials mentioned above exhibited suitability for a weeks-long culture of adherent (M2-10B4) and suspension (MEC-1, HG-3) cell lines. However, significant differences were observed in the lifetime of primary CLL cells cultured in various culture systems. The highest drop of metabolic activity and the highest apoptotic activity was measured in conventionally-cultured cells, i.e., cells growing in medium only – their metabolism irreversibly decreased each day, reaching zero values after 4-6 days of culture. Cells incubated in solid scaffold-based systems (porous hydrogels, collagen foams) showed a similar pattern, which was also seen in the scaffolds improved with the RGDS peptide, bioceramics, or when the CLL cells were co-cultured with bone marrow stromal cells, IL-4 and CD40L. Interestingly, CLL cells growing in the CMC-PEG gels managed to maintain the same metabolic rates even after eight days of culture in a complete medium, with no other supplements or co-cultured cells. These results were supported by the apoptosis assays data and were seen both in 6% and 8% CMC-PEG gels.

**Conclusion**

We have introduced several CLL culture systems suitable for the long-term culture of cell lines. Moreover, the CMC-PEG gel represents a promising platform for in vitro studies of primary CLL cells. Our results suggest that primary CLL cells cultured in vitro favor viscous gelly substances rather than conventional culture or advanced solid 3D architectures.

Acknowledgment

This work was supported by projects MUNI/A/1224/2022 (Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic), RVO (FNBr, 65269705, Ministry of Health, Czech Republic), and National Institute for Cancer Research (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102, funded by the European Union - Next Generation EU).

P28

EHA 2022

Quantitative Expression Profiling of Surface Antigens on Peripheral Blood Leukocyte subsets and Childhood T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) Cells using a Standardized Flow Cytometry Workflow: A HCDM CDMaps Initiative

Daniela Kužílková¹, Joan Puñet-Ortiz², Pei M. Aui³, Javier Fernandez², Karel Fišer¹, Pablo Engel², Menno C. van Zelm³, Tomáš Kalina¹

¹CLIP (Childhood Leukemia Investigation Prague),

KDHO 2. LF UK a FN Motol, Praha, Česko

²Department of Biomedical Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Španělsko

³Department of Immunology and Pathology, Central Clinical School, Monash University, Melbourne, VIC, Austrálie

Background: Human Leukocyte Differentiation Antigen (HLDA) workshops are organized by the Human Cell Differentiation Molecules (HCDM) consortium to test and validate the reactivity of particular antibody clones to specific targets. Thereby the consortium provides the scientific community validated antibody clones reactive to particular cluster of differentiation (CD) markers. Although this approach has been used since the 1980s, quantitative profiling of CD markers at “single-cell” level and benchmarking of reagents are currently lacking. We aimed to develop a flow cytometric procedure allowing CD marker expression profiling in a standardized way in time and place. First, we developed and titrated two antibody panels with a free position in the phycoerythrin (PE) channel. The panels enable identification of 27 innate and adaptive leukocyte cell populations present in peripheral blood. The panels were custom dried in 96-well plates, and the Quantibrite™ PE Beads were used for quantification of the PE signal. Subsequently, we developed a high content framework to evaluate the titration of PE conjugated monoclonal antibodies using fluorescently barcoded cell lines and peripheral blood cells. The selected titer and critical antibody information (such as clone, catalogue number, vendor, gene and CDname etc.) were centrally stored in an inventory



table, which was expanded into an experiment master table (EMT) following inclusion of experimental details (e.g. the position of individual mAbs in 96-well plate, experiment name, operator etc.). The EMT was used to generate an experimental protocol with automated calculation of reagent amounts and volumes. Post acquisition, the fcs files were annotated using all relevant experimental information from the EMT table.

To validate our approach, we quantified protein expression of four selected CD markers (CD11b, CD31, CD38 and CD40) with well-known expression pattern on peripheral blood leukocytes that showed high reproducibility across centers. We also performed benchmarking of four anti-CD3 clones, of which the titration curves revealed variable performance: from high-performance TB3 clone, through intermediate-performance UCHT1 and SK7 clones to low-performance MEM-57 clone. Three out of four anti-CD3 clones showed similar pattern of staining, whereas the MEM-57 clone showed decreased intensity on CD4 and CD8 T cells while retaining comparable intensity to the other clones for TCR $\gamma\delta$ + T cells. Our pilot results on childhood T-ALL patient samples (n=7) revealed potential targets for minimal residual disease monitoring.

In summary, we optimized a procedure for quantitative expression profiling of surface antigens on subsets of blood leukocyte and proved its feasibility with inter-laboratory comparison in three different laboratories. The presented workflow enables (i) to map the expression patterns of HLDA-approved antibody clones to CD markers, (ii) to benchmark new antibody clones to established CD markers, (iii) to define new clusters of differentiation in future HLDA workshops and (iv) mapping of childhood T-ALL cells.

Acknowledgement: The reagents were kindly provided by Exbio and BioLegend. The work was financially supported by project NU20-05-00282 of the Czech Republic Ministry of Health

P29

ASH 2022

SEQUENCING-BASED ANALYSIS OF CLONAL EVOLUTION OF 25 MANTLE CELL LYMPHOMA PATIENTS AT DIAGNOSIS AND AFTER FAILURE OF STANDARD IMMUNOCHEMOTHERAPY

Jana Karolová^{1,2}, Dmitry Kazantsev¹, Michael Svatoň³, Liliana Tušková¹, Kristína Forsterová², Diana Maláriková^{1,2}, Kateřina Benešová², Tomáš Heizer¹, Alexandra Dolníková¹, Magdalena Klánová^{1,2}, Eva Froňková³, Zuzana Zemanová⁴, Marek Trněný², Pavel Klener^{1,2}

¹*Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko*

²*First Department of Medicine- Hematology, University General Hospital Prague and First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko*

³*CLIP- Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Česko*

⁴*Center for Oncocytogenetics, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Charles University and General University Hospital, Prague, Česko*

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare chronically relapsing subtype of aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma characterized by canonical chromosomal translocation t(11;14) and recurrent molecular cytogenetic aberrations. Front-line therapy of MCL is still based on standard immunochemotherapy. While the mutational landscape and genetic background of MCL patients at diagnosis have been repeatedly published, our knowledge on genetic aberrations and clonal development associated with MCL relapse remains limited.

Whole-exome sequencing (WES) of 25 patients with MCL at diagnosis and first relapse after the failure of standard front-line immunochemotherapy was performed and analysis of variants and copy number variants (CNV) was carried out. By the definition, our cohort comprised prognostically adverse patients according to MCL international prognostic index (MIPI).



At diagnosis, 48% of patients had a mutation of *TP53*, and additional five genes were found to be mutated in at least four patients (*ATM*, *KMT2D*, *CCND1*, *LRP1B*, and *SP140*). At relapse, the most frequent variant newly detected was the mutation of *LRP1B*. Five genes were newly mutated in two patients: *KMT2D*, *HOXD9*, *CDC27*, *RYR2*, and *FLNA*. In addition, variant allele frequencies of *TP53* variants at relapse significantly increased.

CNV analysis revealed chromosome arm events detected at diagnosis, which were also observed at relapse. New alterations of chromosome arms 6q, 7p, 8p, and 21p were observed only at relapse (Figure 1A). Both, the frequency, and weight of the majority of detected CNVs significantly increased at relapse (Figure 1B). The most significant deletions and amplifications at relapse filtered out against a predefined CNV gene list comprised especially loss of *CDKN2A/2B* (75 % of cases) and *TP53* genes (58 % of cases) and gains of *PIK3CA* gene (50 % of cases, Figure 1C).

Our results demonstrate drastic clonal evolution in MCL after standard front-line immunochemotherapy at prognostically extremely unfavorable disease, where standard therapeutic strategies lack an effect. The WES data suggest that the resistant clone(s) detected at relapse were already present at diagnosis and were plausibly selected further by the therapy. Markedly higher numbers of variants and CNVs at relapse compared to diagnosis both suggest a significant increase of MCL heterogeneity after the failure of immunochemotherapy leading to genomic instability and increased aggressiveness of the disease.

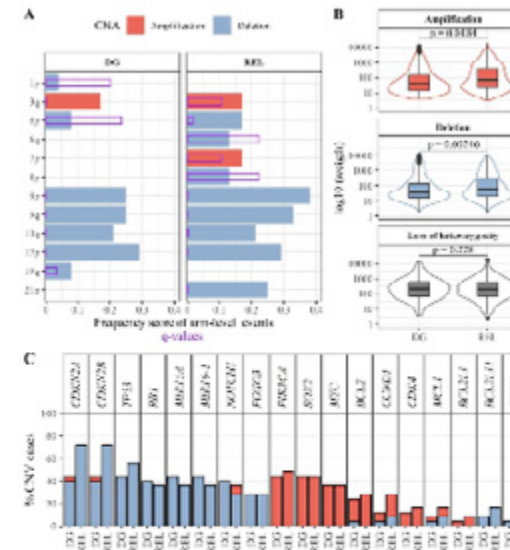


Figure 1 CNV profile and evolution at relapse (REL) compared to diagnosis (DG).
1A – Comparison of chromosome arm-level CNVs at DG and REL, q-values < 0.25 are statistically significant (n = false positive ratio). **1B** – Comparison of CNV weight of the amplified, deleted, and loss of heterozygosity regions between DG and REL samples. **1C** – Comparison of estimated case percentage regarding CNVs at DG and REL per gene filtered out using a predefined gene list.



P30

ASH 2022

CHANGES OF TRANSCRIPTOMIC LANDSCAPE IN BLASTS OF RESPONDING AND REFRACTORY AML PATIENTS AFTER CHEMOTHERAPYEla Cerovská^{1, 2)}, Cyril Šálek^{1, 3)}, David Kundrát¹⁾, Zdeněk Krejčík¹⁾, Monika Beličková¹⁾, Jaroslav Čermák¹⁾, Hana Remešová¹⁾¹⁾Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko²⁾Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha, Česko³⁾Karlova Univerzita v Praze, 1. Lékařská fakulta, Praha, Česko

Background: Despite many ongoing clinical drug trials and advances in acute myeloid leukemia (AML) therapy, the 3+7 induction regimen with anthracyclines and cytarabine (+/- midostaurin) remains the golden standard of AML treatment. Approximately 40 % of AML patients do not achieve a complete hematological remission (CR) after the first cycle of 3+7 chemotherapy and face an adverse prognosis. One of the main causes of treatment failure is chemoresistance of leukemia cells acquired by various mechanisms, all of which have not been identified as yet. We present here a unique study of transcriptome landscape mapping of separated AML blasts from paired samples collected before and after chemotherapy administration, focusing on differences between responding (RES) and refractory (REF) AML.

Aims: The aim of this study was to describe transcriptional changes in leukemic blasts between RES and REF AML patients after chemotherapy administration, and to identify molecular pathways involved in reduced sensitivity to chemotherapy.

Methods: Leukemic blasts were sorted from peripheral blood of AML patients collected at diagnosis (day 0, n=30) and on the third day (day 3, n=16) of 3+7 chemotherapy. CD34⁺ and CD117⁺ antibodies were used for blast separation on autoMACS (Miltenyi Biotec). 100 ng of high quality DNase-treated RNA (RIN>8) was ribodepleted via the RiboCop rRNA Depletion kit (Lexogen) and the library was prepared using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library

Prep Kit (NEB). Transcriptome was sequenced on NovaSeq (Illumina). For data analysis, we divided patients by primary response status into RES and REF groups based on CR achievement after the first cycle of 3+7 therapy. Quantification of gene expression was performed using StringTie2 software (version 1.3.6). Resulting data were subsequently analyzed and visualized in R software 4.0.0 using edgeR and pheatmap packages. The String and GO databases were used to annotate genes into molecular pathways and biological processes.

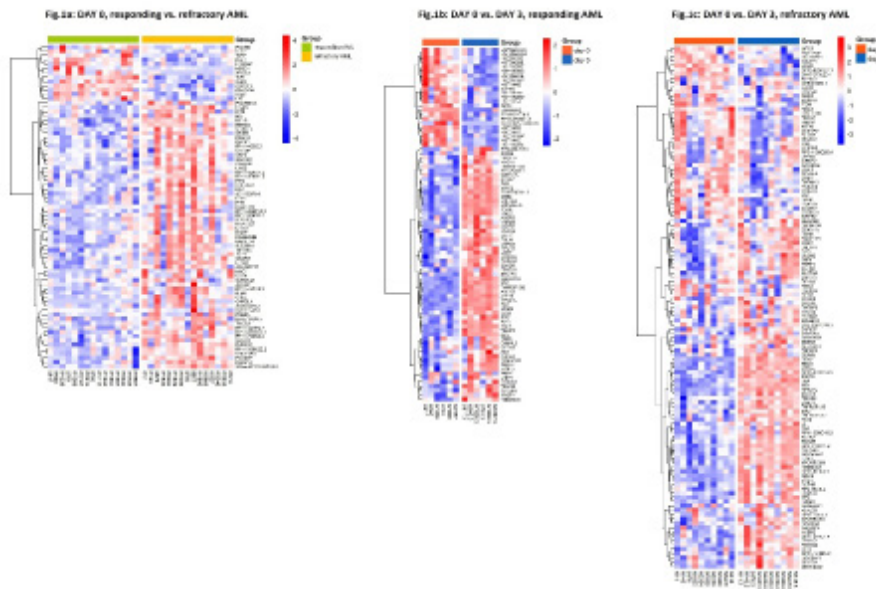
Results: We identified 75 differentially expressed genes (FDR<0.05) at day 0 between RES (n=15) and REF (n=15) AML patients (Fig.1a). Among genes upregulated (n=62) in REF AML, those previously associated with inferior prognosis such as *MN1* (transcriptional regulator), *ABCA6* (membrane transporter) and *SETBP1* (transcriptional regulator) were identified. On the contrary, *PRF1* (involved in killing transformed cells) and *TLE1* (negative regulator of NF-κB) were among genes downregulated (n=13) in REF AML. In general, genes upregulated in REF AML were assigned to Golgi membrane, carbohydrate transport and interferon signalling and genes upregulated in RES AML to immune response and the β-catenin/TCF transcriptional complex. In the pairwise analysis (day 0 vs. day 3), we identified 82 differentially expressed genes in RES (Fig.1b, n=6) and 121 differentially expressed genes in REF AML (Fig.1c, n=10). There were 42 genes identically deregulated in both groups and they were annotated into DNA damage/stress response, DNA repair and apoptotic pathways. Next, we compared genes that were deregulated only in RES or REF AML. In RES AML, there was a big cluster of downregulated histone and chromatin remodelling genes that was missing in REF AML. Upregulated genes in RES AML included those with antiproliferative, proapoptotic and p53 stabilizing functions. In REF AML, the principal deregulated genes were those affecting cytoskeleton remodelling (downregulated), p53 signalling network (upregulated) and genotoxicity pathways (upregulated).

Conclusions: We identified differences in leukemic blast transcriptome between RES and REF AML before and after chemotherapy administration. The



role of some differentially expressed genes has already been elucidated in AML pathogenesis, others deserve a closer look to evaluate their relevance as potential targets for emerging therapies. Instant downregulation of histone genes after chemotherapy administration seems to be a strong sign of RES AML and requires further attention for its use as a biomarker for early stratification into good versus poor responder AML.

This project was supported by Ministry of Health of the Czech Republic (00023736, IHBT) and by GA CR (No. 20-19162S).



P31

ASH 2022

Aging-Related Gene Expression Signatures Define Likelihood of Disease Progression in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes

Monika Kaisrlíková^{1, 2)}, Iva Trsová^{1, 3)}, Zuzana Lenertová^{1, 2)}, Jitka Veselá¹⁾, David Kundrát¹⁾, Hana Votavová¹⁾, Michaela Dostálová Merkerová¹⁾, Zdeněk Krejčík¹⁾, Martin Vostrý¹⁾, Jaroslav Čermák⁴⁾, Monika Beličková¹⁾

¹⁾Department of Genomics, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Česko

²⁾First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Česko

³⁾Faculty of Science, Charles University, Prague, Česko

⁴⁾Laboratory of Anemias, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Česko

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous clonal bone marrow disorders occurring mostly in the elderly. The Revised International Prognostic System (IPSS-R) groups MDS patients according to the risk of transformation into acute myeloid leukemia. For treatment decision-making, patients are usually divided into two groups: lower- and higher-risk with the cutpoint of 3.5 according to the IPSS-R. However, part of lower-risk MDS patients (LR-MDS) progresses rapidly. Recently, we demonstrated that DNA damage response (DDR) activation and the ensuing senescence form an anti-tumor barrier in CD34+ cells of LR-MDS patients, and that this barrier can be breached by *RUNX1* mutations (Kaisrlíková M, et al., *Leukemia*. 2022; 36:1898). As an extension, we analyzed transcriptomes of LR-MDS patients regardless of their driver mutation, with and without rapid progression (within 2 years of diagnosis), to determine molecular mechanisms underlying the progression. Because MDS is associated with aging, and many anti-tumor barrier mechanisms (DDR, checkpoint activation, senescence) lead to a pro-aging phenotype, we questioned whether aging-related gene expression signatures define the likelihood of disease progression in patients with LR-MDS.



We performed RNA-seq on CD34+ cells of 61 LR-MDS diagnostic samples (53 patients without rapid progression (NRP) and 8 patients with rapid progression (RP)) with a median age of 65 years.

The differential expression analysis showed 1,701 up- and 1,569 downregulated genes in NRP (FDR<0.01). According to the GO Biological Processes (GO BP) and REACTOME databases, the most significantly upregulated pathways were related to macromolecular metabolic processes such as DNA repair, replication, protein metabolism, cell cycle, chromosome organization, including regulation of gene expression, and telomere organization (Fig. 1). The pathways of rRNA expression regulation, splicing, and RNA metabolism were deregulated as well as the pathways related to apoptosis, cellular senescence and cellular response to stress, immune response, and mitochondrial metabolism. Furthermore, we found deregulation of crucial signaling pathways mediated by NOTCH, RHO GTPases, NF- κ B, MAPK, b-catenin, and WNT.

Although 1,569 genes were upregulated in RP, only seventeen GO BP terms consisted of regulation of metabolic processes, cytoskeleton organization, phosphorylation, and signal transduction were upregulated.

The NRP results are consistent with the hallmarks of aging (López-Otín C, et al., Cell. 2013; 153:1194). In GSEA, 36/37 and 120/143 gene sets were upregulated in NRP for the datasets consisting of gene sets chosen according to the keyword 'aging' and 'stress', respectively (Fig. 2). Among them, gene sets associated with replication stress, DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response were significant (FDR<0.1, INESI>1.7).

Abnormal splicing is associated with cellular aging. Therefore, we conducted a differential alternative splicing analysis using rMATS. We found significant differences in 1,356 alternative splicing events (FDR<0.05, absolute inclusion level difference>10%) between NRP and RP.

Finally, we performed analysis of healthy controls (n=7) and age-matched NRP (NRP-age) (n=13) samples. We observed 70 up- and 209 downregulated genes in NRP-age (FDR<0.05). Only the splicing pathways were upregulated and the immune pathways downregulated. In GSEA, no gene sets were significant (FDR<0.1) for aging and stress datasets.

To conclude, these results show increased signatures of aging in CD34+ cells from NRP, which correspond to an increased level of the intrinsic ability of CD34+ cells to suppress malignant progression through anti-tumor barrier activation. This is consistent with the current understanding that most aging phenotypes are known to be the products of DDR and tumor suppression. Based on our data, we hypothesize that the progression of LR-MDS patients represents a cell-autonomously and perhaps also non-cell-autonomously-mediated failure of appropriate cellular stress response mechanisms. Our data also show similarity at the transcriptome level between age-matched NRP and healthy controls.

Supported by AZV (NV18-03-00227) and (NU21-03-00565), GA CR (N20-19162S), and MH CZ-DRO (UHKT, 00023736).

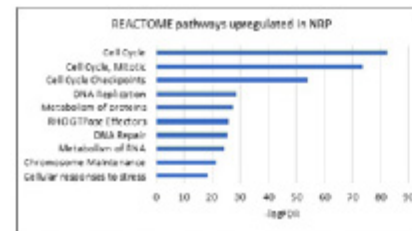


Figure 1. Ten REACTOME pathways highly upregulated in NRP.

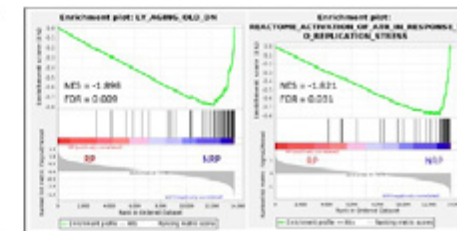


Figure 2. Example of significantly deregulated gene sets from GSEA.



P32

EHA 2022

DEREGULATION OF NONCODING RNAS DERIVED FROM KDM GENES IS ASSOCIATED WITH AZACITIDINE RESPONSE IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROMES AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Michaela Dostálová Merkerová¹, Andrea Hruštinová¹, Iva Trsová¹, Zdeněk Krejčík¹, David Kundrát¹, Jiří Kléma², Jaroslav Čermák¹, Anna Jonášová³, Monika Beličková¹

¹ÚHKT, Praha, Česko

²ČVUT, Praha, Česko

³VFN, Praha, Česko

Background: Prediction of response to azacitidine (AZA) treatment is an important challenge in the management of higher-risk myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). To date, no clinical, cytogenetic, or molecular markers of AZA treatment outcome have been validated to support clinical decisions. Moreover, little is known about how AZA efficiency can be affected by various noncoding RNAs (ncRNAs), such as long ncRNAs (lncRNAs) and ci

Michaela Dostálová Merkerová^{1, a)}, Andrea Hruštinová^{1, b)}, Iva Trsová^{1, c)}, Zdeněk Krejčík^{1, d)}, David Kundrát^{1, e)}, Jiří Kléma^{2, f)}, Jaroslav Čermák^{1, g)}, Anna Jonášová^{3, h)}, Monika Beličková^{1, i)}

¹ÚHKT, Praha, Česko

²ČVUT, Praha, Česko

³VFN, Praha, Česko

rcular RNAs (circRNAs). *KDM* genes encode demethylases of histone lysine residues (e.g., *KDM1* mediates demethylation of H3K4 and H3K9, and *KDM4* acts on H3K9, H3K36, and H1K26). *KDMs* are often differentially expressed in leukemia and they cooperate with transcription factors to activate or repress gene expression.

Aims: Our aims were to provide biological insight into the contribution of ncRNAs to AZA mechanisms of action and to propose novel disease

biomarkers that would be able to predict future response to AZA treatment. Based on our results, we particularly focused on expression and function of *KDM*-related ncRNAs.

Methods: Whole transcriptome RNA sequencing (RNA-seq) was performed in CD34+ bone marrow cells from 26 patients with MDS or AML with myelodysplasia-related changes (AML-MRC) before AZA treatment (11 responders and 16 nonresponders), and 9 healthy controls. Expression of protein coding genes (PCGs), lncRNAs and circRNAs was bioinformatically processed.

Results: Overall, differential expression analysis between AZA responders and nonresponders identified significant deregulation of 202 PCGs, 34 lncRNAs, and 21 circRNAs. Surprisingly, machine learning data showed that predictive potential of ncRNAs was stronger than that of PCGs. Within the data, deregulation of several *KDM*-related ncRNAs was observed, e.g., *CTC-482H14.5* (antisense RNA to *KDM4B* gene, downregulated in AZA responders), *hsa_circ_0003889* (circRNA processed from *KDM1A*, downregulated in AZA responders), and *hsa_circ_0001580* (circRNA processed from *KDM1B*, upregulated in AZA responders). By contrast with these noncoding transcripts, the levels of corresponding PCGs (namely *KDM1A/1B/4B*) were not altered between AZA responders and nonresponders, suggesting that the deregulated ncRNAs play specific roles independent of their host genes. Further, the best predictor genes were defined by machine learning using RNA-seq data and pathway analysis linked these markers to cellular processes related to MDS/AML. Interestingly, *CTC-482H14.5* was identified as one of the strongest predictors of AZA treatment response. Expression of this *KDM*-related ncRNA was coregulated with expression of *DNMT1*, *EZH2*, and multiple *MCM* genes, associating this transcript with epigenetic regulation and recombinational repair pathways.

Conclusion: Several ncRNAs processed from *KDM* genes seem to be closely related to the responsiveness of MDS/AML-MRC patients to AZA treatment.



In this study, novel functions were predicted for these ncRNAs, pointing to possible mechanisms by which their deregulation could affect AZA treatment response.

Acknowledgements: Supported by GA CR (No. 20-19162S) and MH CZ-DRO (UHKT, 00023736).

P33

ASH 2022

Upregulation of ZEB1-derived circular RNAs is associated with SF3B1-mutated myelodysplastic syndromes

Iva Trsová, Andrea Hruštinová, Monika Beličková, Monika Kaisrlíková, Zuzana Lenertová, David Kundrát, Zdeněk Krejčík, Jitka Veselá, Jiří Kléma, Petr Ryšavý, Jaroslav Čermák, Michaela Dostalová Merkerová
Genomika, UHKT, Praha, Česko

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of bone marrow (BM) neoplasms characterized by ineffective hematopoiesis, peripheral cytopenia, and increased tendency to leukemic transformation. Mutations of splicing factor gene *SF3B1* are frequently found in MDS, resulting in aberrant splicing of multiple genes such as those involved in mitochondrial metabolism. Splicing process results not only in a variety of linear mRNAs but it can also produce covalently enclosed RNAs, circular RNAs (circRNAs). CircRNAs regulate biological processes through various molecular mechanisms, e.g. miRNA sponging. CircRNAs are deregulated in many types of cancer, including MDS. Based on our previous data (Dostalova Merkerova M, et al., Cancer Genomics Proteomics. 2022; 19:205-228), we hypothesized that there is an association between MDS and the level of circRNAs derived from *ZEB1* gene. *ZEB1* is an essential hematopoietic transcription factor governing blood lineage commitment. Here, we studied expression and function of these circRNAs in *SF3B1*-mutated MDS.

The study included 85 patients and 13 healthy controls. We examined somatic mutations (Illumina Myeloid Panel) and gene expression (RNA-seq). Further, isogenic CRISPR/Cas9-edited NALM-6 cell line with or without *SF3B1* mutation was used for *in vitro* testing. RT-qPCR method was applied for analysis of expression of individual genes or circRNAs. Cellular bioenergetics was measured using a Seahorse platform.

Initially, we examined *ZEB1* gene expression, its alternative splicing, and *ZEB1*-circRNA expression using RNA-seq data from CD34+ BM cells. Although expression of *ZEB1* gene as a whole remained unchanged, we observed substantial changes on the level of transcripts, including upregulation of *ZEB1* circularization in patients with a *SF3B1* mutation in comparison to controls and non-mutated patients. Within the data, we detected expression of ten *ZEB1*-circRNAs. Of these, increased levels of seven neighboring circRNAs from the central part of *ZEB1* gene were detected and their levels were significantly coregulated. More specifically, four alternatively spliced exons of *ZEB1* were present in the upregulated circRNAs, suggesting that the minimal region essential for this alteration occurs in chr10:31,661,947-31,676,195 (hg19).

Hsa_circ_0000228 showed more than five-fold higher expression than other *ZEB1*-circRNAs. Thus, we particularly focused on this circRNA in subsequent experiments. Initially, we confirmed the sequence of the backsplicing junction site of hsa_circ_0000228 by Sanger sequencing. Treatment of isolated RNA with RNase R exonuclease, which specifically cleaves linear RNAs and leaves circRNAs intact, was used to prove that hsa_circ_0000228 is of circular nature. Further, NALM-6 cell line was treated with actinomycin D, which blocks RNA transcription, showing that hsa_circ_0000228 is more stable than linear *ZEB1*-derived mRNAs.

To better describe the relation between *ZEB1*-circRNAs and MDS pathogenesis, we studied correlation of hsa_circ_0000228 levels with various mutational and clinical variables. Importantly, we observed that the circRNA upregulation



is exclusive to *SF3B1* mutations and not for mutations in other splicing factors (*SRSF2*, *U2AF1*, and *ZRSR2*) or other recurrently mutated genes. Further, the circRNA upregulation was specifically associated with *SF3B1* mutations and not with any other tested clinical variables. Upregulation of *ZEB1*-circRNAs expression in NALM-6 cells with *SF3B1* K700E mutation (compared to wild-type) proved that this mutation directly leads to increased circularization.

To study functions of hsa_circ_0000228 in MDS cells, we performed siRNA-mediated knock-down of this circRNA in NALM-6 cells with *SF3B1* mutation. Subsequent RNA-seq and pathway analysis suggested that hsa_circ_0000228 inhibition positively regulates mitochondrial complex I. Effect of hsa_circ_0000228 on function of complex I was proved by the Seahorse analysis, which showed that the siRNA-transfection led to metabolic switch – induction of oxidative phosphorylation and reduction of glycolysis.

Overall, we demonstrated that *SF3B1* mutation in MDS leads to upregulation of *ZEB1*-circRNAs and this deregulation contributes to changes in mitochondrial metabolism which have been associated with *SF3B1*-mutated MDS.

Supported by GA CR N20-19162S, AZV NU21-03-00565, and MH CZ-DRO UHKT, 00023736.

P34

ASH 2022

RISK ASSESSMENT IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC NEOPLASMS USING THE MOLECULAR INTERNATIONAL PROGNOSTIC SCORING SYSTEM: A SINGLE-CENTER STUDY FROM THE CZECH REPUBLIC

Jitka Veselá¹, Hana Votavová¹, Monika Kaisrlíková^{2,1}, Zuzana Lenertová^{2,1}, David Kundrat¹, Iva Trsová^{3,1}, Šárka Ransdorfová⁴, Dana Mikulenková⁵, Jaroslav Čermák⁶, Monika Beličková¹

¹Genomika, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko

²1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česko

³Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česko

⁴Cytogenetika, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko

⁵Morfologicko - cytochemická laboratoř, Ústav

hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko

⁶Laboratoř anémií, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko

Background

The new Molecular International Prognostic Scoring System (IPSS-M) for myelodysplastic neoplasms (MDS) has been recently developed by Bernard et al. 2022, and considers hematologic, cytogenetic, and somatic gene mutation parameters. This study aimed to use the IPSS-M for risk assessment in Czech patients with MDS and to compare stratification of the IPSS-M with the IPSS-R.

Methods

The data from 363 untreated patients with MDS were re-analyzed using the IPSS-M. Diagnoses were made according to the standard criteria. Patients who underwent hematopoietic cell transplant were censored at the time of transplant. All samples and clinical data were collected with patient consent under an Institutional Scientific Board approved protocol in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. The IPSS-M scores were



calculated as described by Bernard et al. 2022 using algorithm in the R package. Targeted gene sequencing was performed using Illumina TruSight Myeloid Sequencing Panel Kit. GraphPad Prism 7 Software was used to perform a Kaplan-Meier survival analysis.

Results

The median age of the cohort was 64 years, and the median follow-up was 1.8 years. Overall survival (OS) was available for 98.6 % of patients. A total of 64 % of patients had at least one pathogenic mutation. Out of these patients, 61 % carried more than 1 mutation. The number of mutations ranged from 0 to 9 per patient with a median of 1 mutation. The most affected gene was *SF3B1*, mutated in 26 % of mutation-positive patients. Eighty four percent of mutation-positive patients had mutation in the 16 main effect genes. The IPSS-R categories were as follows: 21% of the patients had very low, 44% had low, 23% had intermediate, 7% had high, and 4% had very high risk. Upon re-stratification using the IPSS-M, 18% of patients were scored as very low, 36% were scored as low, 17% were scored as moderate low, 12% were scored as moderate high, 12% were scored as high, and 5% were scored as very high risk. A total of 42% of patients were re-stratified into different risk categories, 71 % were upstaged and 29% were downstaged (Fig. 1). Six percent of patients from the IPSS-R low category shifted to the IPSS-M high/very high category. With a median follow-up of 1.8 years (range, 0.2–16.3 years), the median OS per IPSS-R scoring system was 8.8, 6.9, 5.2, 0.6, and 0.6 years for very low, low, intermediate, high, and very high, respectively ($P < 0.0001$) (Fig. 2A). The median OS per IPSS-M scoring system was 8.8, 9.5, 6.0, 4.2, 3.1, and 0.6 years for very low, low, moderate low, moderate high, high, and very high, respectively ($P < 0.0001$), (Fig. 2B). Notably, the median OS of patients in the IPSS-M high category was significantly longer compared to that in the IPSS-R high category.

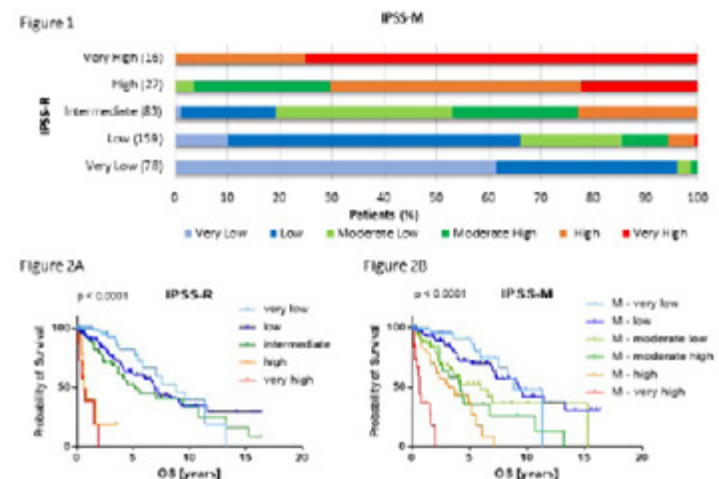
Conclusions

Overall, nearly half of MDS patients were re-stratified (mostly upstaged) in the IPSS-M. Compared to the IPSS-R, the IPSS-M improved prognostic discrimination of MDS patients, especially in patients at high and very high risk. Importantly, the new system identified patients at high/very high risk in the IPSS-R low category who may have a higher likelihood of progression and should be treated appropriately. Our study supports the concept that the incorporation of mutational data into current prognostic scoring system enhances its ability to predict the outcome in MDS patients.

Supported by AZV (NV18-03-00227) and (NU21-03-00565), GA CR (N20-19162S), and MH CZ-DRO (UHKT, 00023736).

Figure 1. Re-stratification of IPSS-R to IPSS-M for 363 MDS patients.

Figure 2. (A) Overall survival by IPSS-R, (B) Overall survival by IPSS-M.





P35

55. výroční cytogenetická konference 2022**KOMPLEXNÍ CYTOGENOMICKÁ A MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÁ ANALÝZA NÁDOROVÉHO GENOMU PACIENTŮ S MYELOIDNÍMI MALIGNITAMI SE ZAMĚŘENÍM NA CÍLENOU ANALÝZU GENU MECOM**

Lenka Bryjová¹, Eva Ondroušková¹, Kateřina Čábelová¹, Jiří Šmejkal¹, Petra Šmuhařová¹, Jana Kotašková^{1, 2}, Andrea Marečková¹, Michaela Bohúnová¹, Ivana Ježíšková¹, Adam Folta¹, Dagmar Smítalová¹, Michael Doubek^{1, 3, 2}, Barbora Weinbergerová³, Libor Červínek³, Anna Panovská³, Daniela Žáčková³, Marie Jarošová^{1, 2}

¹Centrum molekulární biologie a genomiky, FN Brno, Brno, Česko

²Ústav lékařské genetiky a genomiky a Lékařská fakulta, FN Brno a MU Brno, Brno, Česko

³Interní hematologická a onkologická klinika a Lékařská fakulta, FN Brno a MU Brno, Brno, Česko

Podle WHO klasifikace akutních leukémií a souvisejících neoplázií patří změny na chromosomu 3q26.2 mezi rekurentní chromosomové aberace, které jsou pozorovány u 1-2,5 % u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) a s akutní myeloidní leukémií (AML) a až v 25-40 % u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v blastické fázi onemocnění. V oblasti 3q26.2 je lokalizován gen MECOM (EVI1). Chromosomové změny na chromosomu 3, inverze nebo translokace (Inv(3)/t(3;3)), vedou k deregulaci genu MECOM a jeho nadměrné expresi, jejíž důsledkem je nepříznivá prognosa nemocných. Gen MECOM je transkripční faktor, který indukuje leukemickou transformaci regulací svých cílových genů.

Cílem naší analýzy bylo určit typy a frekvenci aberací genu MECOM, jeho genovou expresi a zjistit, zda všechny změny genu MECOM vedou k jeho nadměrné expresi a tedy k nepříznivému prognostickému dopadu.

Provedli jsme genetickou analýzu souboru 25 pacientů (14 žen a 11 mužů, medián věku 65 let) s myeloidními malignitami (15 pacientů s AML, 7

pacientů s MDS, 2 pacienti s CML, 1 pacient s CMML). Genetická analýza zahrnovala klasickou cytogenetiku, FISH, mFISH/mBAND, arrayCGH, cílené NGS a Q-RT-PCR pro určení hladiny exprese genu MECOM.

Cytogenetická a FISH analýza potvrdila přestavbu genu MECOM u 10 pacientů, u dalších 6 pacientů došlo k zisku chromosomové oblasti s genem MECOM (u dvou pacientů jsme potvrdili amplifikaci genu MECOM) a u 9 pacientů byl lokalizován gen MECOM na derivovaném chromosomu. Následná cílená NGS a Q-RT-PCR doplňuje komplexní informace o přestavbě a heterogenitě exprese genu MECOM.

V našem příspěvku budeme prezentovat předběžné výsledky společné cytogenetické, molekulárně biologické a klinické analýzy souboru pacientů s myeloidními malignitami a změnami genu MECOM. Ukážeme detailní analýzy přestaveb genu MECOM a heterogenitu jeho exprese. Na základě výsledků uvedených metod budeme laboratorně i klinicky charakterizovat pacienty se změnami genu MECOM, kteří jsou prognosticky nepříznivou skupinou nemocných a v budoucnu kandidáty na novou cílenou léčbu.

P36

Komplexní in vitro modely leukemického mikroprostředí pro testování cytotoxické aktivity nových produktů buněčné imunoterapie

Lucie Janstová^{1, 2}, Veronika Švubová^{1, 2}, Marek Jedlička^{1, 2}, Eva Mašíňová^{1, 2}, Jana Szabová¹, Tereza Feglarová¹, Jan Frič¹

¹Oddělení Moderní Imunoterapie, ÚHKT, Praha 2, Česko

²Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita, Praha, Česko

Současné preklinické *in vitro* modely pro testování cytotoxických vlastností produktů buněčné imunoterapie představují pouze zjednodušený model hemato-onkologických onemocnění. Buněčná imunoterapie využívající NK buňky expandované *in vitro* je jedním ze slibných přístupů vyvíjených



například k léčbě akutní myeloidní leukemie (AML) a testování těchto buněk na komplexnějších modelech kostní dřeně a 3D nádorových sferoidech poskytuje přesnější data o jejich kvalitě. Cílem projektu je vývoj a optimalizace 3D modelu AML (sferoidy) a modelu komplexního mikroprostředí kostní dřeně (MKD) vhodných například pro výzkum vlivu kryoprezervace léčivého přípravku nebo úlohy imunosupresivních cytokinů na schopnost cytotoxického zabití NK buněk expandovaných *in vitro*.

Sferoidy byly vytvořeny kultivací buněk linie MOLM-13 (AML) v semi-solidním médiu Methocult (STEMCELL Technologies). MKD bylo simulováno ko-kultivací imortalizované linie mesenchymálních buněk (hTERT MSC) a hematopoetických buněk (HSPC) izolovaných z pupečnickové nebo mobilizované krve. NK buňky izolované z PBMC byly expandovány *in vitro* 14 dnů ve směsné kultuře s ozářenými buňkami K562 a cytokiny IL-2 a IL-15 (R&D). Část buněk byla kryoprezervována nebo inhibována TGF- β (R&D) a jejich cytotoxicita porovnávána s NK buňkami přímo z kultury v den 14. Cytotoxicita byla testována na sferoidech a suspenzních buňkách MOLM-13 pomocí kitu LDH-Glo (Promega) a jejich specifická aktivita na linii K562 kultivované v MKD pomocí průtokové cytometrie.

NK buňky po kryoprezervaci a buňky inhibované v kultuře TGF- β vykazovaly signifikantně nižší schopnost cytotoxicky zabít myeloidní buněčné linie. Dále bylo potvrzeno, že cytotoxické zabití sferoidů je nižší oproti suspenzním buňkám. Z testování cytotoxického potenciálu NK buněk v MKD vyplývá, že NK buňky specificky cílí jen na leukemické buňky a schopnost zabití K562 buněk inkubovaných v MKD je výrazně snížena.

Podařilo se nám vyvinout a optimalizovat pokročilé komplexní AML modely pro testování cytotoxické aktivity NK buněk. Z výsledků vyplývá, že kryoprezervace omezuje cytotoxický potenciál NK buněk. TGF- β negativně ovlivňuje cytotoxickou aktivitu NK buněk. Dále jsme prokázali specifickou aktivitu NK buněk proti nádorovým liniím v MKD a budoucnu se plánujeme věnovat výzkumu mechanismu migrace NK buněk do kostní dřeně.

P37

EHA 2022

TRANSPOSABLE ELEMENTS EXPRESSION IN CD34+ CELLS IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Zdeněk Krejčík¹⁾, Andrea Hruštinová¹⁾, Iva Trsová¹⁾, David Kundrát¹⁾, Katarína Szikszai¹⁾, Monika Beličková¹⁾, Jaroslav Čermák¹⁾, Anna Jonášová²⁾, Michaela Dostálová Merkerová¹⁾

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

²⁾First Department of Medicine, General University Hospital, Prague, Česko

Background: Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of malignant hematopoietic stem cell (HSC) disorders characterized by genomic instability resulting in aberrant differentiation of HSCs, peripheral blood cytopenia, and a tendency toward leukemic transformation. Transposable elements (TEs) are common in the human genome and, with regard to their ability to change the position in the genome, may represent one of the sources of this instability. Although TE dysregulation has previously been reported in different hematological malignancies, e.g., in acute myeloid leukemia (AML), information about TEs in MDS is rare. In the past, Colombo et al. demonstrated suppressed TE expression in higher risk MDS in a small cohort of patients. They proposed this suppression as a mechanism for immune escape in MDS/AML because the higher TEs expression can potentially trigger immune-mediated cell clearance of cancer cells via “viral mimicry” pathways.

Aims: Our aims were to identify, quantify and compare TE expression in different stages of MDS on a larger cohort of patients to provide deeper insight into their occurrence and possible roles in MDS.

Methods: We prepared, sequenced, and analyzed rRNA-depleted RNA libraries of CD34⁺ HSCs in a cohort of 75 MDS patients, and 13 healthy controls, using the SalmonTE tool for the TEs detection.

Results: Comparison between healthy controls and MDS patients revealed slightly but significantly upregulated class I LTR (Long Terminal Repeat)



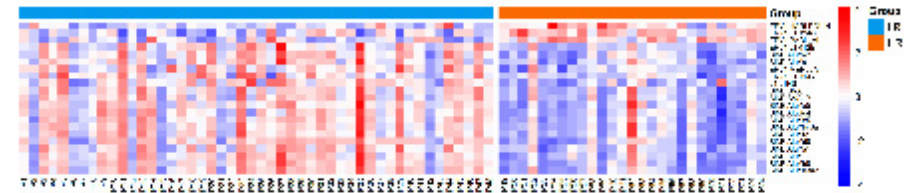
retrotransposons ($p = 0.0006$, $\log_{2}FC = 0.040$), especially then ERV1 (Endogenous Retrovirus) class ($p = 0.0002$, $\log_{2}FC = 0.052$), in MDS patients. Detailed analysis revealed 11 significantly ($FDR < 0.05$) differentially expressed TEs, nine upregulated (ERV1: HERV-Fc1, MER51E, LTR27E, MER65C, HUERS-P1, PABL_A, ERV3: MER54B, CR1: X5A_LINE, SINE (Short Interspersed Element): MIR3) and only two downregulated (ERV1: LTR71A, LTR26E) in the group of MDS patients. After stratification of patients into lower (IPSS-R score ≤ 3.5 , $n = 48$) and higher risk (IPSS-R score ≥ 4 , $n = 27$) categories, we observed significant dysregulation of non-LTR retrotransposons in general, and in particular of SINE ($p = 6.2 \times 10^{-14}$, $\log_{2}FC = -0.21$) and LINE1 (Long Interspersed Element) ($p = 3 \times 10^{-7}$, $\log_{2}FC = 0.06$) clades. Detailed differential expression analysis revealed that 18 out of 21 the most significantly ($FDR < 0.001$) deregulated TEs were suppressed in higher risk MDS (Fig. 1), namely AluY, AluYb8, AluYd8, AluYe2, AluSq4, AluYa1, AluYa5, AluYb3a2, AluYc1, AluYbc3a, AluYe5, AluYf2, SVA_B and SVA_F (all SINE), L1HS (LINE1), LTR12E and LTR1A2 (both ERV1); and only three TEs were upregulated (HARLEQUIN, LTR24C, PABL_AI (all ERV1)).

Conclusion: To our knowledge, this is the first report on TE expression and MDS-risk specific dysregulation in a larger cohort of MDS patients, revealing their importance in the pathogenesis of MDS. Observed significant suppression of TEs in higher risk MDS patients supports the previously formulated potential mechanism of immune escape in these MDS patients.

Acknowledgements: Supported by AZV CR (NU20-03-00412) and MH CZ-DRO (UHKT, 00023736).

Reference: Colombo et al. Suppression of transposable elements in leukemic stem cells. *Sci Rep.* 2017. 1;7(1):7029. doi: 10.1038/s41598-017-07356-9.

Fig. 1: Heatmap of the most significantly ($FDR < 0.001$) deregulated TEs between lower risk (LR) and higher risk (HR) MDS patients.



P38

ASH 2022

First Single-center Experience with Luspatercept Therapy in Low-risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) Patients with Transfusion Dependence Refractory to Erythropoietin Therapy

Anna Jonášová¹⁾, Lubomir Minařík¹⁾, Zuzana Zemanova²⁾,
Tomas Stopka^{1, 3)}

¹⁾klinika hematologie, I. interní klinika VFN a I. LF UK, Praha, Praha 2, Česko

²⁾oddělení nádorové cytogenetiky VFN, VFN a I. LF UK Praha, Praha, Česko

³⁾BIOCEV, I. LF UK, Praha, Česko

Introduction: In the treatment of low-risk MDS patients, anemia is the predominant problem., about 90% of patients are anemic and 60% require transfusions. For years, erythropoiesis-stimulating agents (ESA) have been used in the therapy of anemia. Unfortunately, only 10-20% of transfusion-dependent patients respond to ESA. A recent breakthrough in the therapy of anemia in low-risk MDS patients are drugs involved in TGF β pathway blockade. Luspatercept is a recombinant fusion protein derived from human activin receptor type IIB. It binds TGF β superfamily ligands and inhibits the SMAD2/3 pathway leading to potentiation of red cell line differentiation and proliferation. Luspatercept was approved last year by the FDA and EMEA in the treatment of anemic low-risk MDS patients with ring sideroblasts



(MDS-RS-MLD, MDS-RS-SLD) and/or SF3B1 mutated patients who are not eligible for ESA or for patients who failed on this therapy. Luspatercept showed high clinical activity for the treatment of anemia in the phase 2 trial (PACE-MDS) and subsequently in the phase 3 trial (MEDALIST). It has led to transfusion independence (TI) in about 40 % of patients.

Methods: From January 2021 to July 2022, 27 patients were treated with luspatercept (Reblozyl) at the hematology department of Charles University hospital in Prague, Czech Republic. The median age of the patients was 77 years (range 57-89) with a male to female ratio 17:10. Diagnoses according to WHO 2016 were: MDS-RS-MLD (N = 23) and MDS/MPN-RS-T (N = 4). Median of IPSS-R was 2,5 (range 1-4). Median of IPSS-R cytogenetic score scaled from 0-2 with the median of 1. Luspatercept was administered in subcutaneous injections once every 3 weeks with an initial dose of 1 mg/kg. Dose escalation was done according to the level of response to 1.33 and 1.75 mg/kg. The median number of cycles administered was 7 (2-17). Transfusion dependency before initiation of therapy ranged from 2 transfusion units (TU)/8 weeks to 12 TU/8 weeks, 11 patients had low transfusion burden (LTB), 16 high transfusion burden (HTB). Three patients had Grade II neutropenia and 3 patients had Grade II thrombocytopenia at the time of initiation. Baseline erythropoietin levels was 374 IU/l in average (range 150-770) and ferritin level was 1307 µg/l in average (range 234-3832). 9 patients were treated with chelation therapy. 22 patients were tested for SF3B1 mutation with 21 positive results (95.5%) using Sanger sequencing (N = 3) or NGS approach (N = 18). Isolated mutation of SF3B1 was present in 8 patients (44 %). The most frequent mutation besides SF3B1 were TET2 (N = 8; 44%), ASXL1 (N = 3; 17 %), DNMT3A and RUNX1 (N = 2; 11 %). Average count of mutation per one patient was 1.7 (range 0-5). We did not observe any TP53 mutation.

Results: There were 24 evaluable patients in terms of response, who had at least 2 cycles of luspatercept with median follow-up of 7.8 months (range 1-38). At the time of the last analysis, 11 (45 %) patients have responded by

achieving TI, 5 (20 %) patients have had a reduction in transfusion dependence (HI, according to IWG criteria 2006), 8

patients have not responded. One patient progressed to the higher risk MDS and one transformed to acute myeloid leukemia. Median duration of response was 7.4 months (range: 0.7-31.8). Median number of cycles to achieve response was 4. Eleven patients responded to the basic dose of 1 mg/kg, 2 additional patients on the doses 1.33 mg/kg and 2 more on the dose of 1.75 mg/kg. There were differences in response according to transfusion burden, in LTB group achieved TI 8 patients and HI 1 patient, in HTB group we observed TI in 3 patients and HI in 4 patients. In 9 patients, we added erythropoietin to luspatercept therapy, as they act both at different levels of erythropoiesis, which led to the improvement of response in 5 cases. In general, patients with lower initial baseline erythropoietin levels were better responders. We did not observe decrease in ferritin level during therapy. There was no significant effect of mutation burden on patient's OS, although patients with single mutated SF3B1 achieved better ORR (75%), than patients bearing mutations in multiple genes (ORR = 40%). There were no adverse effects of Grade II or more.

Conclusion: In conclusion, luspatercept (Reblozyl) is certainly the next major step in the treatment of anemia in MDS patients. The advantage of the drug is very good tolerance and easy administration. We observed better responses in patients bearing single mutation in SF3B1 and patients with lower initial baseline erythropoietin levels. The higher response rate in our follow-up may be influenced by the combination with EPO and rapid dose escalation.

This work was supported by the following grants: grant AZV 2021-2024 NU21-08-00312, Grant AZV 2019-2023 NV19-08-00144, UNCE/MED/016

Presentace byla - ve formě online publikace Blood 2022



P39

ASH 2022

Effectiveness of Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) after Two or More Prior Tyrosine Kinase Inhibitors

Daniela Žáčková¹⁾, Torsten Dahlén^{2, 3)}, Camille Kockerols⁴⁾, Germano Ferreira⁵⁾, Peter Westerweel⁴⁾, Jiří Mayer¹⁾, Alex Allepuz⁶⁾, David Wormser⁵⁾, Lillian Yau⁵⁾

¹⁾Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Česko

²⁾Department of Medicine Solna, Clinical Epidemiology Division, Karolinska Institute, Stockholm, Švédsko

³⁾Department of Hematology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Švédsko

⁴⁾Department of Internal Medicine, Albert Schweitzer Hospital, Dordrecht, Nizozemsko

⁵⁾Novartis Pharma AG, Basel, Švýcarsko

⁶⁾Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, Spojené státy

Introduction: Despite the availability of therapies that have broadened treatment choices and improved outcomes for patients with CML-CP, patients who have been treated with ≥ 2 prior tyrosine kinase inhibitors (TKIs) experience high failure rates due to resistance or intolerance, with outcomes worsening across lines of therapy.

Previously presented real-world data on TKI treatment patterns in patients with CML-CP from 3 registries across different countries did not identify a common TKI sequence. Between 12.8% and 35.7% of patients starting treatment with a second line TKI required third line therapy and beyond (3L+) and 32.8% (124/378) of patients in 3L+ discontinued treatment, with treatment intolerance among the most frequent reasons for discontinuation.

There is scarce information on response rates in patients treated with ≥ 2 prior TKIs and no established standard of care exists for these patients. Here we

present data collected from CML registries on the effectiveness of different TKIs in patients with CML-CP initiating therapy after ≥ 2 prior TKI treatments.

Methods: This non-interventional, descriptive, retrospective cohort study is based on secondary use of data from 3 existing CML registries (Czech INFINITY, Dutch PHAROS, and Swedish CML register). The observation period was from January 1, 2008, until the last available date of follow-up for each registry (6–12 years depending on the registry). Patients with CML-CP aged ≥ 18 years and initiating a TKI after being treated with ≥ 2 prior TKIs were included in the analysis. Study index date was defined as the start date of treatment for each TKI used in the 3L+ setting. Effectiveness endpoints (major molecular response [MMR, $BCR::ABL1^{IS} \leq 0.1\%$] rates by 6 and 12 months and overall survival [OS] rates) were analyzed separately for each TKI. Results for each registry are reported separately.

Results: Among patients enrolled in the INFINITY, PHAROS, and Swedish CML registries, 105, 48, and 172 patients, respectively, started 3L+ TKI therapy and were included in this analysis.

Across all 3 registries, the most frequently prescribed TKIs in the 3L+ setting were nilotinib (NIL; 52.4%, 58.3%, and 45.3%, respectively) and dasatinib (DAS; 38.1%, 16.7%, and 32.6%, respectively). NIL and DAS were mostly prescribed to patients who had received 2 prior TKIs at index, whereas bosutinib (BOS) and ponatinib (PON) were mostly prescribed in later treatment lines (BOS: 8/12 [66.7%], no data [ND], and 21/48 [43.7%] patients had received 3 prior TKIs at index, respectively; PON: 9/14 [64.3%], 3/8 [37.5%], and 7/19 [36.8%] patients had received 3 prior TKIs at index, respectively). At the time of TKI index, there were more patients already in MMR in the Swedish CML register compared with the other registries (**Table 1**).

For patients not in MMR at the time of TKI index, the highest MMR rates by 12 months across all registries were observed on DAS (12/32 [37.5%], 3/8 [37.5%] and 14/34 [41.2%], respectively), followed by NIL (14/47 [29.8%],



6/21 [28.6%], and 13/46 [28.3%], respectively). MMR rates by 12 months were in general lower for BOS (2/11 [18.2%], ND, 7/21 [33.3%]) and PON (2/11 [18.2%], 2/8 [25.0%], 5/13 [38.5%]) (**Table 2**). The OS analysis showed that the median survival time was longest for NIL (42.5, ND, and 45.0 months, respectively), followed by DAS (34.5, 68.0, and 40.9 months, respectively).

Conclusion: This is the most comprehensive study to date analyzing TKI response rates based on real-world data from patients with CML-CP treated in the 3L+ setting. The number of patients in each registry was low, which may explain the variability of response and limits comparability across TKIs. However, a common pattern of treatment was observed across the 3 countries, with BOS and PON being used more frequently in patients treated with ≥ 3 prior TKIs; this could explain some of the differences in response rates. In the Swedish CML register, the high number of patients in MMR at the time of TKI switch may suggest that intolerance is a frequent reason for switching TKI; this is consistent with the reasons for discontinuation reported in a previous analysis. This study contributes to the evidence on real-world response rates of TKI treatment in CML-CP.

This study was a research collaboration between Novartis and the 3 registries and was funded by Novartis.

Table 1. Numbers of patients already in MMR at TKI index date.

Registry		Cohort size			Patients already in MMR at TKI index date		
		INFINITY	PHAROS	Swedish CML	INFINITY	PHAROS	Swedish CML
Bosutinib	N (%)	12	0	48	1 (8.33)	0	28 (56.25)
Dasatinib	N (%)	40	8	56	8 (20.0)	0	27 (39.29)
Imatinib	N (%)	1	3	8	1 (100.0)	0	5 (62.5)
Nilotinib	N (%)	55	28	78	8 (14.55)	7 (25.0)	32 (41.03)
Ponatinib	N (%)	14	8	19	3 (21.43)	0	6 (31.58)

Study observation periods: INFINITY, Jan 1, 2008, to Oct 31, 2020; PHAROS, Jan 1, 2008, to Apr 30, 2014; Swedish CML, Jan 1, 2008, to Dec 31, 2018.
CML, chronic myeloid leukemia; MMR, major molecular response; N, number of patients, TKI, tyrosine kinase inhibitor.

Table 2. MMR rates by 6 and 12 months in patients not in MMR at TKI index date.

Registry		Cohort size			Patients not already in MMR at TKI index date			Patients in MMR by 6 months from TKI index date			Patients in MMR by 12 months from TKI index date		
		INFINITY	PHAROS	Swedish CML	INFINITY	PHAROS	Swedish CML	INFINITY	PHAROS	Swedish CML	INFINITY	PHAROS	Swedish CML
Bosutinib	N (%)	11	0	48	11 (100.0)	0	11 (22.92)	1 (9.09)	0	6 (12.50)	2 (18.18)	0	7 (14.58)
	95% CI	-	-	-	-	-	(7.28-53.79)	-	-	(11.28-52.88)	(7.28-52.88)	-	(11.28-52.88)
Dasatinib	N (%)	40	8	56	32 (80.0)	8 (100.0)	34 (60.71)	12 (37.5)	3 (37.5)	12 (35.29)	13 (37.5)	3 (37.5)	14 (25.0)
	95% CI	-	-	-	-	-	(21.18-56.31)	(21.18-56.31)	(10.57-25.57)	(14.25-53.51)	(11.10-53.51)	(10.57-25.51)	(14.25-53.51)
Imatinib	N (%)	1	3	8	0	3 (100.0)	3 (37.5)	0	0	1 (33.33)	0	0	1 (33.33)
	95% CI	-	-	-	-	-	(0.00-73.79)	(0.00-73.79)	(0.00-73.79)	(0.00-73.79)	(0.00-73.79)	(0.00-73.79)	(0.00-73.79)
Nilotinib	N (%)	55	28	78	47 (85.5)	21 (75.0)	46 (58.97)	14 (29.79)	5 (23.81)	13 (23.91)	14 (29.79)	6 (28.57)	15 (19.35)
	95% CI	-	-	-	(17.34-44.82)	(17.34-44.82)	(12.59-44.82)	(17.34-44.82)	(12.59-44.82)	(12.59-44.82)	(12.59-44.82)	(12.59-44.82)	(12.59-44.82)
Ponatinib	N (%)	14	8	19	11 (78.57)	8 (100.0)	11 (58.42)	3 (18.18)	2 (25.0)	4 (33.33)	2 (18.18)	3 (25.0)	5 (38.46)
	95% CI	-	-	-	(7.28-83.79)	(7.28-83.79)	(7.28-83.79)	(7.28-83.79)	(7.28-83.79)	(7.28-83.79)	(7.28-83.79)	(7.28-83.79)	(7.28-83.79)

Study observation periods: INFINITY, Jan 1, 2008, to Oct 31, 2020; PHAROS, Jan 1, 2008, to Apr 30, 2014; Swedish CML, Jan 1, 2008, to Dec 31, 2018.
CI, confidence interval; CML, chronic myeloid leukemia; MMR, major molecular response; N, number of patients; N/A, not applicable; TKI, tyrosine kinase inhibitor.



P40

ASH 2022

p16INK4a in the Gut Mucosa Associates with NFKB1 Gene Polymorphisms and Decreased Serum Levels of Inflammation-Associated Proteins in Patients with Gastrointestinal Acute Graft Versus Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell TransplantationAdam Kuba¹⁾, Luděk Raida¹⁾, Patrik Flodr²⁾, František Mrázek³⁾,
Eva Kriegová³⁾, Tomáš Papajík¹⁾¹⁾Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, Lékařská
fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko²⁾Ústav klinické a molekulární patologie, Lékařská fakulta
Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko³⁾Ústav imunologie, Lékařská fakulta Univerzity
Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

Cellular senescence is characterized by irreversible cell cycle arrest and pro-inflammatory secretion, mostly regulated by NF-κB. Expression of p16INK4a – a cell cycle inhibitor, is considered a hallmark of cellular senescence. Based on overlapping features observed in inflammatory signaling of both GVHD and cellular senescence, we have postulated a hypothesis whether genetic variants of the *NFKB1* gene and expression of p16INK4a in intestinal mucosa of the recipients have impact on transplant-related inflammatory complications.

Here we present 52 consecutive patients with symptoms of lower gastrointestinal GVHD after allogeneic stem cell transplantation. The patients were genotyped for GVHD-prone polymorphisms of the *NFKB1* gene, rs3774937 C/T and rs3774959 A/G. All patients underwent diagnostic proctosigmoidoscopy with gut mucosa biopsy. Immunohistochemical detection of p16INK4a expression was evaluated in normal intestinal crypts and stroma. On day +14 after graft infusion serum levels of inflammation – associated proteins were analyzed.

Increased p16INK4a expression in intestinal crypts was independently associated with late manifestation of lower gastrointestinal symptoms. Patients with and without p16INK4a expression in intestinal crypts developed lower gastrointestinal symptoms in median of 43 days (range, 12-140) and 24 days (range, 13-80), respectively. The effect was observed in the whole study cohort (HR 2.3 [95%CI 0.99-5.47]; p=0.006) as well as in a subgroup of patients who fulfilled the clinical diagnostic criteria of GVHD only (HR 3.1 [95%CI 0.95-10.01]; p=0.002).

Increased risk of histological grade 3-4 aGVHD was observed in patients without stromal p16INK4a expression (HR 3.45 [95%CI 1.26-9.42]; p=0.01). The impact was confirmed by means of multivariate Cox regression (p=0.009).

No clinical variable had effect on p16INK4a expression but *NFKB1* genotype. The GVHD-prone genotypes rs3774937 CC and rs3774959 AA were significantly less frequent in patients with increased p16INK4a expression (p=0.04 and p=0.02, respectively).

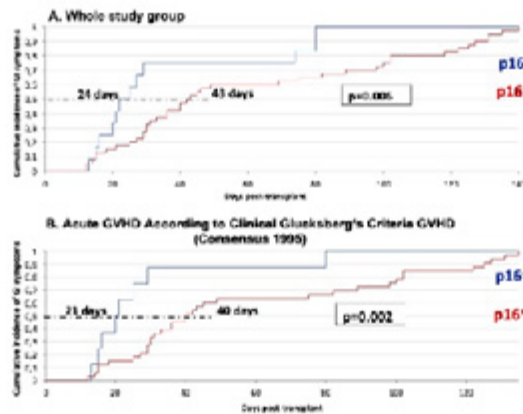
In 13 patients, measurement of serum levels of 92 inflammation-associated proteins from the Proseek Multiplex Inflammation - I kit on day +14 after graft infusion was performed. Patients with increased expression of p16INK4a in intestinal crypts at the time of gut biopsy had significantly lower serum levels of proinflammatory proteins (IL-17A, IL-18, IL-4, CXCL10 and TNFRSF9) on day +14. Using the STRING web engine we performed the enrichment analysis with statistically significant confirmation of interactions among these proteins suggesting various T-cell cytokine production or Type -2 immune response from the gene ontology analysis.

Cellular senescence is considered a program of innate immunity. In GVHD, innate immunity becomes seriously decontrolled. Cellular senescence may thus bring novel approaches towards GVHD diagnostics and therapy.



Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (FNOL, 00098892)

Increased p16^{INK4a} expression in intestinal crypts is independently associated with late manifestation of lower GI symptoms



P41

EHA 2022

BUŇKY BLASTICKÉHO ZVRATU CML S RŮZNÝM SPEKTRUM MUTACÍ V BCR::ABL1 A JINÝCH GENECH MAJÍ ROZDÍLNOU CITLIVOST K BH3-MIMETIKŮM

Adam Lázníčka^{1, 2)}, Nikola Čuřík^{1, 3)}, Václava Polívková¹⁾, Jitka Křížková¹⁾, Pavel Burda^{1, 3)}, Alexandra Dolníková³⁾, Eva Pokorná³⁾, Cyril Šálek¹⁾, Hana Klamová¹⁾, Dana Srbová¹⁾, Pavel Klener jr.^{3, 4)}, Tomáš Kalina⁵⁾, Kateřina Machová Poláková^{1, 3)}

¹⁾Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česko

²⁾2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česko

³⁾Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česko

⁴⁾1. interní klinika - klinika hematologie, Praha, Česko

⁵⁾Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta

Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, Praha, Česko

Úvod. Blastický zvrát chronické myeloidní leukemie (BC-CML) zůstává v době inhibitorů tyrosinových kináz (TKI) terapeutickou výzvou s mediánem přežití pacientů 1 rok. BH3-mimetika, inhibitory antiapoptotických proteinů BCL-2, jsou v současné době indikována u mnoha hematologických malignit. Cílem je testovat citlivost buněk BC-CML ke kombinované léčbě BH3-mimetiky a TKI.

Metody. Klony linie KCL-22 rezistentní k imatinibu (IM-R; n=10), se zkříženou rezistencí k ponatinibu (PONA/IM-R; n=9) a primární buňky pacientů s BC-CML (n=8) byly vystaveny ředící řadě BH3-mimetik (inhibitor BCL-2 venetoclax, MCL-1 S63845 a BCL-XL A1155463) a TKI po dobu 72, resp. 168 hod. *In vivo* byly buňky IM-R klonu B8 (BCR::ABL1-T315I) xenotransplantovány do imunodeficitních myši (n=36), myši byly randomizovány do kontrolní skupiny a skupin léčených ponatinibem, venetoclaxem, S63845 a kombinací.

Výsledky. V prostředí *in vitro* byla většina IM-R klonů (8/10) citlivá k S63845. Snížená citlivost byla pozorována u klonů s mutacemi v BCR::ABL1, GATA2 a BCOR. K venetoclaxu byla citlivá polovina klonů, u všech se sníženou citlivostí byly detekovány mutace v BCR::ABL1 a jiných nádorových genech.



Pouze dva klony byly citlivé k A1155463, avšak rezistentní k venetoclaxu. PONA/IM-R klony vykazovaly podobný profil jako jejich mateřské IM-R, přesto u některých došlo ke zvýšení citlivosti k venetoclaxu a A1155463.

In vivo bylo pozorováno snížení růstu tumoru u myší léčených monoterapií venetoclaxem a S63845, výrazněji při monoterapii ponatinibem a v kombinaci s S63845. Kombinace venetoclaxu a ponatinibu vedla k úplné regresi tumorů u všech myší a významně delšímu celkovému přežití.

Blasty pacientů s BC-CML vykazovaly citlivost k S63845 (6/8), vyšší hodnoty LC50 pro BH3-mimetika byly měřeny zpravidla u pacientů s přídatnými mutacemi a změnami karyotypu.

Závěr. BH3-mimetika se ukazují být účinná na buňky BC-CML v kombinaci s TKI, zejména s ponatinibem. Implementace nových léčiv na základě znalosti genetického podkladu a *in vivo* testování může zlepšit prognózu pacientů s BC-CML.

Podpora. MZCR 00023736, GAUK 492222

P42

Zkušenosti 1. interní kliniky VFN s kombinační terapií venetoklaxem u pacientů s HR-MDS a AML

Lubomir Minarik^{1, 2)}, Tomas Stopka^{1, 2)}, Zuzana Zemanova³⁾, Anna Jonasova¹⁾

¹⁾I. Interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha 2, Česko

²⁾BIOCEV, 1. LF UK, Vestec, Česko

³⁾Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Centrum nádorové cytogenomiky, VFN a 1. LF UK, Praha, Česko

Úvod: Prognóza starších pacientů s vysoce rizikovým myelodysplastickým syndromem (HR-MDS) nebo akutní myeloidní leukemii (AML), neúnosných

intenzivní terapie nebo progredujících na léčbě hypometylačními agens (HMA) je bezúspěšná.

Slibné výsledky klinických studií VIALE-A a VIALE-C s významným prodloužením mediánu celkového přežití (OS) a dosažením časných remisí v léčebných ramenech standardní terapie v kombinaci s venetoklaxem (VTX) u AML a další studie zahrnující 78 pacientů s HR-MDS (Garcia JS et al., 2020), nebo podobná studie se 44 pacienty (Zeidan AM et al., 2020) přinesly novou naději pro pacienty. Tato práce přibližuje zkušenosti našeho centra s podáváním VTX v kombinační terapii u pacientů s HR-MDS nebo AML. Cílem je sledovat toxicitu léčby, komplikace včetně nutnosti přerušování terapie z důvodu cytopenie a identifikovat markery spojené s horším přežíváním.

Metody: Naše kohorta se skládá ze 41 pacientů (muži, N=22; ženy, N=19) s diagnózou HR-MDS včetně MDS/AML (N=28) nebo *de novo* AML (N=13) v době zahájení VTX. Medián věku byl 75 let. Průměrné cytogenetické riziko podle IPSS-R u pacientů s MDS bylo 1,9. Pro screening mutací byl použit panel genů často mutovaných u myeloidních neoplázií.

Výsledky: VTX byl podáván v kombinaci s azacitidinem v režimu 5-2-2 (75 mg/m², interval 28 dnů) nebo LD-AraC (standardní dávkování, interval 28 dnů). Medián celkové dávky VTX byl 1500 mg na jeden cyklus. Průměrná dávka byla 53 mg/den, což je nižší v porovnání s terapeutickou dávkou používanou při léčbě jiných hematologických malignit vzhledem k riziku cytopenie. Ve skupině pacientů s *de novo* AML jsme pozorovali ORR 67 % (CR=33 %, PR=17 %, HI=17 %) s mediánem OS na léčbě 6,5 měsíce. Ve skupině pacientů s HR-MDS jsme pozorovali ORR 57 % (CR=29 %, PR=21 %, hematologické zlepšení (HI)=7 %) s mediánem OS na terapii 5,4 měsíce. Součástí sledování je rovněž 23 pacientů (56 %) po selhání AZA jako první linie léčby, u kterých vedlo přidání VTX k přechodné remisi.

Závěr: VTX v kombinaci s azacitidinem nebo LD-AraC je účinná léčba pro pacienty s *de novo* AML, MDS-AML v první linii terapie, nicméně jsou



pozorovány remise i po přidání VTX k selhávající terapii azacitidinem. Celková dávka podávaného VTX je nižší z důvodu cytopenie. Nutnost redukovat dávky azacitidinu během prvních dvou cyklů bylo spojeno s horším celkovým přežitím ($p=0,0191$). Mutace *TP53* byla spojena s horším celkovým přežitím ($p=0,0184$). Dosažení HI-P během prvních dvou cyklů bylo spojeno s lepším celkovým přežitím ($p=0,0341$). Selhání kombinované léčby zůstává nejasné a vyžaduje další studium.

P43

Role of isoforms of NRAS and KRAS oncogenes during chemotherapy treatment in acute myeloid leukemia models

Diana Macečková^{1, 2)}, Monika Holubová^{1, 3)}, Miroslava Čedíková¹⁾, Robin Klieber¹⁾, Pavel Pitule^{1, 2)}

¹⁾Laboratory of Tumor biology and Immunotherapy, Biomedical center, Pilsen, Česko

²⁾Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Česko

³⁾Department of Hematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Česko

1. Introduction

Majority of Acute myeloid leukemia (AML) could be traced down to single or often also multiple genetic aberrations like translocations or pro-oncogene mutation, however roughly 20% of patients are diagnosed with standard karyotype. This knowledge lead to application of epigenetic evaluation for diagnosis and treatment. Huge impact was found to be related to *RAS* proteins, specifically *NRAS* and *KRAS*. These genes are critical oncogenic drivers in nearly 30% of all human cancers. Current knowledge shows that wild type *RAS* alleles do not contribute significantly to *RAS*-mediated oncogenesis or

tumor maintenance, but minor isoforms are very often appearing in malignant tissue.

2. Method

For in vitro simulation of treatment we used models of acute myeloid leukemia. Individual cell lines were treated with two chemotherapies. Cells were treated with IC90 dose of treatment, which was established in previous titration experiments. After treatment, samples were treated by dead cell removal kit to remove cells that died due to the sensitivity to therapy and remaining approximately 10% of surviving cells were used for analysis of *NRAS* and *KRAS* isoforms by RT-PCR.

3. Results

Using isoform specific primers we analyzed five variants of both *NRAS*, and *KRAS* transcripts. Initial experiments showed interesting results about several-fold increased expression of isoform 5 both of this genes after chemotherapy treatment, where *NRAS* expression changes are two times higher than *KRAS*, and all changes are more significant after non-specific treatment. Our results show that expression of specific isoforms of *KRAS* and *NRAS* is highly affected by the treatment and we will follow these changes to test their potential to be used as targets for specific treatment in AML. The results have to be validated on bigger dataset and primary samples.

4. Funding

The project was supported by projects SVV 2020-2022 no. 260 540 and GAUK no.12618 project.



P44

EHA 2022

Identification of novel therapeutic options for venetoclax-resistant AML cells through drug repurposingAdriana Ladungová^{1, 2)}, Daniel Buša³⁾, Yusuf Lodhi^{1, 4)}, Jan Hýl³⁾, Martin Čulen^{3, 5)}, Michal Šmída^{1, 3, 5)}¹⁾Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Česko²⁾National Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Česko³⁾Department of Internal Medicine - Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Česko⁴⁾Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Česko⁵⁾Department of Internal Medicine - Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Česko

Background. Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant disease derived from the bone marrow precursors of myeloid lineage. Treatment options are rather limited, primarily based on chemotherapy, and often result in disease progression. Recently, venetoclax-based therapies have transformed the frontline regimens of elderly patients and patients unfit for intensive chemotherapy. Despite its promising outcomes in clinical studies, multiple resistant subclones evolved during the treatment acting as a barrier in disease regression. Understanding the venetoclax-resistance mechanisms and detecting the major determinants could reveal previously unrecognized novel perspectives for therapeutic strategies to improve patients' outcomes. Moreover, performing high-throughput screenings with clinically approved drugs could reveal novel treatment options for resistant subclones of AML.

Aims. Our project aims 1) **to identify novel FDA-approved drugs** effective for treating venetoclax-resistant AML cells through a high throughput screening, 2) **to validate the most effective compounds**, prove their specificity, and 3) **to investigate the molecular background** mechanisms underlying the observed sensitivity.

Methods. Two different models mimicking the microenvironment of venetoclax-resistance formation have been established: 1.) Patient-derived mouse xenograft (PDX) model. AML PDX model was generated by using AML patient sample transplanted into an immunocompromised murine host and treated with different regimens of venetoclax; 2.) Venetoclax-resistant cell lines (MOLM-13, OCI-AML3, HL-60). Generation of the venetoclax-resistant AML cell lines was achieved through the chronic administration of the compound, inhibiting the cell viability to 80-90% in multiple rounds with gradually increasing concentrations until the cells become fully resistant. Both models are next used for the high-throughput screening of 859 approved drugs, covering a broad chemical space. The standard concentration (1 µM) of drugs in the library is automatically added to cells on 384-well-plates with a programmed liquid handling system epMotion (Eppendorf). Cell viability is determined after 72 hours by a Cell-titer Glo assay. Compounds with the strongest effect upon resistant AML cell viability are validated through 10-point dose-response curves with 2-fold-dilutions. Moreover, the investigation of molecular mechanisms responsible for the sensitization of resistant AML cells is planned by using various cell biology and molecular biology techniques.

Results. Treating the PDX mouse model with venetoclax for 6 weeks resulted in the generation of resistant cells. Importantly, these cells also acquired additional resistance to topoisomerase inhibitors, DNA-damaging agents and many other compounds. On the contrary, both 6-week as well as 3-week venetoclax treatments generated cells exquisitely sensitive to the iron chelator deferoxamine mesylate and a purine nucleoside analogue clofarabine. In addition, we generated a venetoclax-resistant MOLM-13 cell line with 1500-fold decreased sensitivity and have subjected it to the drug screening to correlate its response with the PDX model.

Conclusion. The outcomes of this research project point out the importance of novel treatment options to overcome venetoclax-resistance in AML cells. Further validations and investigation of the molecular mechanisms are planned for the



top-performing drugs to strengthen the translational potential for AML therapy.

This project was partly supported by grants MUNI/A/1330/2021, MUNI/A/1419/2021, OPRDE (No.CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016943) and project NICR (EU program EXCELES, No. LX22NPO5102).

P45

EHA 2022

Acute Myeloid Leukemia Suppression by Palbociclib and Ponatinib in Patient-Derived Xenograft

Daniel Buša¹, Martin Čulen^{1, 2}, Tomáš Loja³, Ivana Ježíšková^{1, 2}, Adam Folta², Jiří Mayer^{1, 3, 2}

¹Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Česko

²Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Česko

³Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Česko

Background: Palbociclib, a CDK4/6 inhibitor approved for breast cancer treatment, and ponatinib, a BCR/ABL1 inhibitor with a multi-kinase activity approved for chronic myeloid and acute lymphoid leukemia, were previously shown to be effective *in vitro* against different cancer types including acute myeloid leukemia (AML).

Aims: To test palbociclib and ponatinib, along with reference drugs – venetoclax, azacitidine, cytarabine+doxorubicine (chemotherapy) on 2 primary AML samples in a patient-derived xenograft model.

Methods: Two newly diagnosed AMLs (AML #1: myelomonocytic AML, intermediate cytogenetic risk; AML #2: AML with myelodysplasia-related changes, poor cytogenetic risk) were xenotransplanted into NOD SCID gamma mice. Treatment was initiated at detection of approximately 5-20% hCD45+ cells in mouse peripheral blood (PB). Chemotherapy (cytarabine+doxorubicine,

AraC/Dox) was administered as a 5+3 regimen. Azacitidine was administered subcutaneously, five days per week in 3 cycles – 1 week on, 1 week off. Palbociclib, ponatinib, venetoclax, and vehicle were administered orally for 3 weeks, 5 days per week. Gene sequencing was performed using targeted 37 gene Archer Variantplex Core Myeloid Kit panel.

Results: From the reference treatments, significant AML reduction and prolonged overall survival (OS) was achieved with venetoclax in both AMLs, and with chemotherapy in AML #1. No statistically significant effect was observed with azacitidine, but interestingly in AML #2 the azacitidine treatment induced the longest remission in the whole study, almost 10 weeks (<1% hCD45+ cells in PB) in 2/4 mice.

Of the tested drugs, palbociclib showed the same effect as venetoclax, with significantly reduced AML and prolonged OS in both AMLs. Ponatinib led to prolonged OS only in AML #1 (Fig. 1A-D).

Overall, none of the treatments led to complete AML eradication and all PDX groups gradually relapsed.

No phenotype changes were observed in the relapsed cells in palbociclib and ponatinib groups compared to vehicle (SSC_{low}CD45_{dim} blasts, SSC_{dim}CD45_{high} monocytes, CD34+ and CD34+CD38- cells). Azacitidine group showed altered monocyte, CD34+, and CD34+CD38- fractions in AML #1. Azacitidine, chemotherapy, and venetoclax showed altered blast and monocyte fraction in AML #2 and venetoclax also altered CD34+ fraction in AML #2.

Mutational status in AML #1 remained unchanged (*FLT3*-TKD and *NRAS* mutated) in all PDX groups at relapse. In AML #2, *KRAS* mutation from the primary tumor remained conserved, whereas all PDXs lost an *IDH1* mutation and gained a *WT1* mutation. This indicates that mutation selection was induced



by the xenotransplantation rather than treatment. In addition, a second *WT1* mutation was gained only in the palbociclib group.

Treatment toxicity manifested by weight decrease after the end of treatment was only seen with chemotherapy and was accompanied by early mouse mortality in 3/4 mice for AML #2.

Summary: Palbociclib demonstrated *in vivo* AML suppression that was comparable to venetoclax and superior to chemotherapy. Effect of ponatinib was only limited. This encourages further investigation of treatment efficacy in different AML subtypes and in combination with other drugs.

Funding: MUNI/A/1224/2022

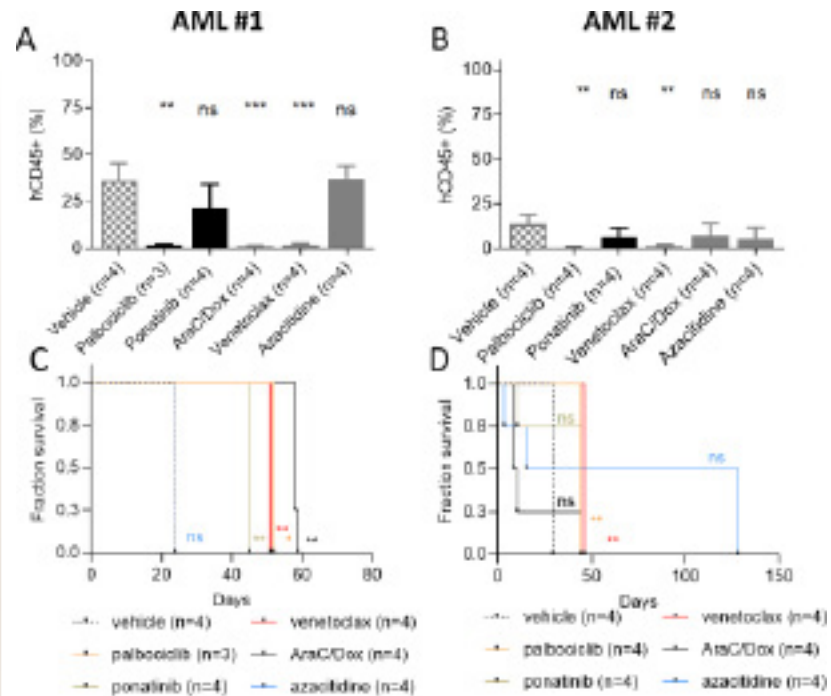


Figure 1. Treatment effects in patient-derived xenograft.

(A,B) Analysis of AML burden in mouse peripheral blood after treatment completion or 2 weeks post AraC/Dox regimen, or at last available sampling in case of earlier exitus. (C,D) Overall survival of mice from treatment initiation; event = spontaneous exitus or sacrifice because of wasting syndromes or high AML burden.



P46

EHA 2022**ABCB1 AS A POTENTIAL BENEFICIAL TARGET OF MIDOSTAURIN IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA**

Simona Sucha, Ales Sorf, Martin Svoren, Dimitrios Vagiannis, Fahda Ahmed, Benjamin Visek, Martina Ceckova
Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University, Akademika Heyrovského 1203, 50005 Hradec Kralove, Czech Republic
4th Department of Internal Medicine – Hematology, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 50005 Hradec Kralove, Czech Republic

Background

In AML, therapeutic outcome of anthracycline-based induction therapy often can be compromised by a resistant phenotype associated with overexpression of ABCB1 transporters. Novel anti-AML agent, midostaurin, was designed to aim at multiple targets including FLT3 mutation. Besides, it was also identified as ABCB1 inhibitor.

Aims

To evaluate ABCB1 efflux activity and expression in primary AML samples in relation to multiple clinical parameters and investigate ABCB1 regulation by microRNA.

Methods

ABCB1 gene expression was absolutely quantified in 28 primary AML samples collected prior to any treatment. Efflux activity was examined using combination of mitoxantrone (*ABCB1* substrate) and midostaurin (*ABCB1*/FLT3 inhibitor). Results were compared in molecular classes defined by CD34 marker, FLT3-ITD and NPM1 mutations, ELN risk classification and (un) achieved complete remission (CR). Enhancement of daunorubicin proapoptotic effect mediated by midostaurin was determined in HL-60 wt and HL-60 overexpressing *ABCB1*. *ABCB1* regulation by microRNAs (miR-9, miR-27a, miR-331) was evaluated by ddPCR and correlated with *ABCB1* efflux activity.

Results

High *ABCB1* expression was associated with unachieved CR, adverse ELN risk and CD34 positivity. *ABCB1* efflux activity was observed in a functional study when mitoxantrone accumulation increased as a direct consequence of midostaurin in CD34+ AML and patients with unachieved CR. *ABCB1* efflux activity and expression were found to be linked to miR-9 downregulation.

Conclusion

We propose therapeutic value of midostaurin for drug-resistant patients beyond the FLT3 inhibition based on *ABCB1* expression and CD34 positivity. We also propose miR-9 as a predictive *ABCB1*-related biomarker that could be helpful in identifying *ABCB1*-resistant AML phenotype.

Supported by Grant Agency of Charles University (GAUK 205019), PRIMUS/20/MED/010 and SVV 260-549.

P47

ASH 2022**SINGLE AMINO ACID MUTATION OF RPS19 LEADING TO HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS DEFECTS IN THE MOUSE MODEL OF DIAMOND-BLACKFAN ANEMIA**

Tomáš Stopka¹, Juraj Kokavec¹, Jan Procházka², Radislav Sedláček²

¹ *BIOCEV, 1. LF BIOCEV, Vestec, Česko*

² *Centre for Phenogenomics (BIOCEV / IMG), Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Prague, Česko*

Introduction: Although many underlying mutations in the ribosomal protein S19 (*RPS19*), a component of the small 40S ribosomal subunit, have been identified, their mechanistic consequences are not well understood. *RPS19* is by far the most mutated gene involved in the pathology of Diamond-Blackfan anemia (DBA) (<25%), a rare bone marrow failure syndrome with reduced erythroid lineage development and early onset with lifelong consequences. DBA is often associated with low birth weight, generalized growth



retardation and short stature, but is also accompanied by a diverse spectrum of cardiovascular, skeletal and urogenital abnormalities. Previously described *Rps19* mutations in mice exhibited a spectrum of phenotypes commonly associated with DBA but lacked craniofacial, skeletal and other developmental abnormalities.

Methods: We have created a novel transgenic mouse model that carries single amino acid deletion of conserved arginine 67 (*Rps19*^{R67Δ}) located in a frequently mutated DBA hot-spot, a post-translational modification site of the protein-arginine methyltransferase (Prmt) family of enzymes, which was removed by transcription activator of effector nuclease (TALEN)-specific mutagenesis. Although a compensatory role for loss-of-function of Trp53 in the DBA phenotype has already been established, the introduction of a homozygous *Trp53* deletion in the *Rps19*^{R67Δ/R67Δ} mouse background provided a basis for studying the genetic interaction and phenotypic compensation between the ribosomal protein Rps19 and the transcription factor Trp53 in a double homozygous mouse model. We performed numerous phenotypic measurements and functional assays in primary hematopoietic organs, including bulk and single-cell transcriptomic profiling of erythroid-oriented hematopoietic cells and progenitors from fetal E14.5 liver and 10-week-old bone marrow.

Results: The homozygous deletion of the conserved arginine 67 in mouse resulted in delayed growth (~25% lower weight gain), shorter lifespan (median survival 20 weeks) and anemia (preceded by reduced proerythroblast and basophilic erythroblast counts in bone marrow and spleen) combined with severe cardiovascular (right atrial and ventricular hypertrophy, dystrophic diaphragm), urogenital (hypoplastic kidneys), skeletal (abnormalities of cervical and thoracic vertebral column), craniofacial (lack of ossification in the frontal bones and absence of closure in some of the cranial sutures), and cerebral (hydrocephalus) abnormalities with variable penetrance. Some of these abnormalities are already present in utero as E14.5-E18.5 *Rps19*^{R67Δ/R67Δ} fetuses are smaller, have smaller fetal livers, heart & kidney hypoplasia, and cerebral malformations.

The decreased erythroid lineage development in fetal liver as well as bone marrow was also characterized by upregulation of Trp53 signaling pathway in erythroid-biased hematopoietic stem cells and progenitors and relative enrichment of bone marrow progenitor populations (c-Kit+, Sca1+). Competitive transplantation assays using *Rps19*-deficient bone marrow cells indicated that HSCs and their descendants were compromised even if transplanted in excess (25% reconstitution vs. 75% controls). This defect, however, may be rescued by concomitant homozygous deletion of tumor suppressor *Trp53* and double homozygous *Rps19*^{R67Δ/R67Δ} *Trp53*^{-/-} hematopoietic cells achieve competitive advantage comparable to *Trp53*^{-/-} mutants. Contrary to *Rps19* mutants, the double mutant mice normally developed without DBA malformations, nevertheless their life-span was reduced due to the underlying *Trp53* deficiency (median lifespan of 25 weeks). Transcriptomic analyses of hematopoietic stem and progenitor cells from bone marrow and E14.5 fetal liver of *Rps19*^{R67Δ/R67Δ} mutants identified a highly selective group of p53 transcriptional targets revalidating the role of augmented p53 signaling in the pathology of DBA.

Conclusion: Overall, our work represents a novel mouse model for DBA research and appears to be a new and very useful tool to further study the molecular pathology of complex multisystem failure in DBA and to design new therapeutic options for DBA. Currently, our analysis shows that some p53 targets may be mediators of the DBA phenotype and their therapeutic interference is the focus of our research.

P48

Naše zkušenosti s léčbou FOSTAMATINIBEM

Libor Červínek

IHOK, IHOK FN Brno, Brno, Česko

Perorální inhibitor splenické SYK tyrozin kinázy představuje novou léčebnou možnost pro pacienty s chronickou ITP. Na protilátkách závislá fagocytóza



je primárním mechanismem, jímž dochází u ITP pacientů k destrukci trombocytů. Slezina je dominantní místo produkce protilátek a i hlavní místo destrukce opsonizovaných trombocytů. Někteří pacienti mohou mít i minoritní místo destrukce trombocytů v játrech. Lidské makrofágy exprimují různé Fc receptory, jež se specificky váží na IgG imunoglobuliny. Funkčně rozpoznáváme inhibiční a aktivační Fc receptory, jež přenášejí signál cestou tyrozin kinázového receptoru. Jako hlavní receptory jsou označovány FcRgamma IIa a FcR gamma IIIa, jež jsou zodpovědné za vychytávání opsonizovaných trombocytů. Aktivace FcRgamma IIA receptoru na povrchu makrofágu cestou trombocytu s navázanou protilátkou spouští intracelulární signalizační dráhu zabezpečenou SYK tyrozin kinázovým receptorem. Fostamatinib, orální inhibitor slezinné tyrosin kinázy (SYK), dosáhl primárního léčebného cíle v rámci v randomizované dvojité zaslepené klinické studii fáze 3. Tato klinická studie byla určena pro léčbu dospělých pacientů s chronickou imunitní trombocytopenií (ITP). Na základě této klinické studie byl lék registrován a můžeme ho použít v klinické praxi. V rámci sdělení přinášíme data našich pacientů léčených fostamatinibem.

„These data demonstrate the potential benefit of fostamatinib for chronic ITP patients who are in need of new treatment options,” said Raul Rodriguez , president and chief executive officer of Rigel. All of the patients from this study who met the stable platelet response endpoint enrolled in the long-term, Phase 3 extension study and continued to maintain their platelet levels for months past the initial study period of 24 weeks. **Fostamatinib and ITP**

Unlike other therapies that modulate the immune system in different ways or stimulate platelet production, fostamatinib may address the underlying autoimmune basis of ITP by impeding platelet destruction. Na rozdíl od jiných terapií, které modulují imunitní systém (imunosupresiva, rituximab, kortikoidy) nebo stimulují tvorbu trombocytů (TPO agonisté), působí fostamatinib přes inhibici destrukce trombocytů. Fostamatinib potentially offers a compelling addition to the treatment options available for ITP patients. Fostamatinib nabízí další racionální možnost léčby pacientů s ITP.

P49

Frequency of Antithrombin Deficiency in Venous thromboembolism. Are We Still Aware of It?

Petr Dulíček, Petr Sadílek, Zuzana Thibaud, Eva Ivanova

Hematologie, IV. interní hematologická klinika, FN a LF v Hradci Králové, Hradec Králové, Česko

Thrombophilia testing has been widely accessible in the new millennium. However, in most of the cases of thrombophilia testing, results have had no clinical consequences. The awareness about other thrombophilias has faded. Congenital AT deficiency is an infrequently encountered genetic risk factor for venous thromboembolism (VTE) and different subtypes vary with regard to their thrombotic risk. We have decided to analyze the frequency of antithrombin deficiency in different cohorts of patients with thrombosis and tried to formulate indications for its testing. AT deficiency was found in 4% of patients with idiopathic VTE ≤ 50 y. of age (325p., the mean age of 1st VTE was 33.5 y.), in 1% of patients with splanchnic vein thrombosis (90p. with thrombosis of portal, mesenteric, splenic veins and Budd-Chiari syndrome). In cohort of female with VTE in association with contraceptive pill use or pregnancy AT deficiency was found in 5,4% (850 female, the mean of the first VTE 26 y., age range 16-50y.). In patients with central venous thrombosis AT deficiency was not found. We consider testing useful in all individuals with idiopathic venous thrombosis occurring up to 45 years of age, as well as in all female with VTE in pregnancy and puerperium. Females with VTE on contraceptive pills only if onset of VTE was within the first year of use and with the absence of other additional risk factor. We recommend long-term anticoagulation after idiopathic VTE and thromboprophylaxis for all females with VTE related to pregnancy and puerperium and all their future pregnancies.



P50

EHA 2022**Analýza variant genu ANKRD26 v 5' nepřekládané oblasti u kohorty pacientů s podezřením na dědičné hematologické onemocnění**

Kateřina Staňo Kozubík^{1, 2)}, Zuzana Vrzalová^{3, 2)}, Jakub Trizuljak^{4, 1, 2)}, Jakub Hynšt¹⁾, Paulína Likavcová¹⁾, Petr Smejkal^{5, 6)}, Lenka Radová^{1, 4)}, Jiří Štika^{3, 4, 1)}, Ivona Blaháková^{3, 1)}, Šárka Pospíšilová^{1, 4, 2)}, Michael Doubek^{2, 4, 1)}

¹⁾Výzkumná skupina Šárky Pospíšilové - Centrum molekulární medicíny- Středoevropský technologický institut, CEITEC MU, Brno, Česko

²⁾Interní hematologická a onkologická klinika - Společná pracoviště s Fakultní nemocnicí Brno - pracoviště medicíny dospělého věku - Lékařská fakulta, Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česko

³⁾Centrální laboratoř Genomika - Centrum molekulární medicíny - Středoevropský technologický institut, CEITEC MU, Brno, Česko

⁴⁾Ústav lékařské genetiky a genomiky - Společná pracoviště s Fakultní nemocnicí Brno - pracoviště dětské medicíny - Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česko

⁵⁾Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česko

⁶⁾Katedra laboratorních metod - Pracoviště nelékařských oborů - Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česko

Varianty v 5' nepřekládané oblasti genu ANKRD26: c.-116C>T až c.-140C>G byly popsány jako kauzální pro vznik trombocytopenie typu 2 (THC2). Toto autozomálně dominantní onemocnění se typicky prezentuje mírnou až středně těžkou trombocytopenií s minimem symptomů, nicméně představuje zvýšené riziko malignit, zejména myeloproliferací. Frekvence variant ve výše specifikované oblasti ANKRD26 je neznámá s výjimkou c.-140C>G, která je dle dbSNP u 6,2 % nefinské evropské populace.

Naším cílem bylo zjistit: 1) zastoupení variant ve sledované oblasti genu ANKRD26 v kohortě pacientů s podezřením na dědičné

hematologické onemocnění (DHO) ve srovnání se zdravou českou populací, 2) vliv těchto variant na výskyt THC2, 3) zda v případě varianty c.-140C>G nejde o polymorfismus.

Od roku 2019 byly analyzovány exomy 65 pacientů a rodinných příslušníků ze 42 rodin s podezřením na DHO: 17 z 8 rodin mělo variantu ve sledované oblasti genu ANKRD26, z toho 14 variantu c.-140C>G (2 homozygoti) a 3 z jedné rodiny variantu c.-118 C>T. Z deseti nositelů varianty c.-140C>G, kde byly k dispozici výsledky agregace trombocytů, se u osmi projevila hypoagregace alespoň po jednom induktoru (tab.1). V souboru pacientů s variantou c.-140C>G byli 2 s esenciální trombocytémií, 1 s mnohočetným myelomem (MM) a 1 se sarkomem. Trombocytopenie byla přítomna u 4 pacientů: 1 s variantou c.-140C>G (MM) a 3 s variantou c.-118C>T. Patogenita varianty c.-118C>T byla již publikována týmem italských vědců. Analýzou 349 genomů zdravé české populace (projekt ACGT) byla detekována ve sledované oblasti ANKRD26 pouze varianta c.-140C>G u 44 (21,5 %) lidí (1 homozygot).

K určení patogenity varianty c.-140C>G provádíme funkční analýzu: expresi genu ANKRD26 v trombocytech. Vzhledem k frekvenci varianty c.-140C>G u ACGT souboru předběžná data naznačují, že varianta pravděpodobně není tak patogenní, jak bylo publikováno.

Podpořeno: NU20-08-00137; FNBr, 65269705; MUNI/A/1330/2021; MUNI/11/SUP/22/2020;

CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448; MUNI/A/1224/2022.



P52

EHA 2022

Familial erythrocytoses in the Czech Republic – genetic characterization and hepcidin regulation

Lucie Sochorcová¹⁾, Katarína Hlušíčková Kapraľová¹⁾, Ondřej Jahoda¹⁾, Jiřina Maňáková²⁾, Eva Kriegová²⁾, Barbora Králová¹⁾, Jana Fialová Kučerová¹⁾, Martina Divoká³⁾, Daniela Procházková⁴⁾, Dagmar Pospíšilová⁵⁾, Vladimír Divoký¹⁾, Monika Horváthová¹⁾

¹⁾Ústav biologie, Lékařská fakulta Univerzity

Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

²⁾Ústav imunologie, Lékařská fakulta Univerzity

Palackého v Olomouci, Olomouc, Česko

³⁾Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, Česko

⁴⁾Dětská klinika, Fakulta zdravotnických studií, Univerzita

J. E. Purkyně, Ústí nad Labem, Česko

⁵⁾Dětská klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, Česko

Background: Absolute erythrocytosis is a condition characterized by elevated erythrocyte mass. Familial erythrocytoses represent a group of rare inherited red blood cell disorders caused by mutations in genes involved in erythropoietin receptor (EPOR) signal transduction, hypoxia signaling pathway, or hemoglobin-oxygen affinity regulation. Nevertheless, up to 70% of patients have unknown etiology. Similarly, the coordination of erythropoietic activity with iron homeostasis in different subtypes of familial erythrocytoses needs to be clarified. Aims: We performed molecular-genetic analysis of 13 pediatric patients with inherited erythrocytosis from the Czech Republic and assessed co-regulation of erythropoiesis and iron metabolism, including evaluation of hepcidin and its negative erythroid regulator erythroferrone (ERFE). Methods: Genomic DNA was used for Sanger sequencing, next generation sequencing (NGS), or whole exome sequencing (WES). The sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin (EPO) was determined in vitro. Serum EPO levels and iron status parameters were measured; hepcidin and ERFE levels were determined with commercial ELISA kits. Results: Using targeted Sanger sequencing we found a causative mutation in

5/13 patients from the cohort. Three unrelated patients with low EPO levels and hypersensitivity of erythroid progenitors to EPO harbored mutations in EPOR. A known heterozygous c.5967insT EPOR mutation was identified in two of them; the third patient carried a novel heterozygous c.11092delTG EPOR mutation. Both these mutations lead to a truncation of EPOR. A previously reported heterozygous p.G537R mutation in hypoxia-inducible factor alpha (HIF2A), encoded by EPAS1, was detected in two unrelated patients with normal EPO levels and EPO-hypersensitive erythroid progenitors. Targeted NGS of erythrocytosis-associated genes was applied in the other 6/13 patients. The analysis was negative in all but one patient in whom a rare germline JAK2 variant (p.N1108S) was identified, known from triple-negative myelofibrosis patients and presumably predisposing to acute myeloid leukemia. The remaining 2/13 patients, siblings with plethora, splenomegaly, normal sensitivity of erythroid progenitors to EPO, and elevated/normal EPO, were subjected to WES. A known mutation in a cryptic exon of VHL gene (c.340+770T>C) was found in a homozygous state in both of them; their parents were heterozygous asymptomatic carriers of this mutation. We then focus on the assessment of iron metabolism; 6 patients from the cohort (2 EPOR-mutant, 2 HIF2A-mutant, and 2 VHL-mutant) were available for hepcidin and ERFE measurements. All EPOR-mutant and HIF2A-mutant patients had normal serum iron and ferritin levels, and reduced/subnormal transferrin saturation; both VHL-mutant patients were iron deficient. Slightly elevated ERFE and low/undetectable hepcidin levels were observed in HIF2A- and VHL-mutant patients. On the other hand, EPOR-mutant patients had normal hepcidin and ERFE levels below the detection threshold, suggesting that ERFE is not the main regulator of hepcidin in EPOR-mutated erythrocytosis. Summary/Conclusion: We identified disease-causing mutations in 7/13 erythrocytic patients from our cohort. Despite the use of targeted NGS, almost half of the cases remained idiopathic. In these patients, WES or WGS should be used. We also suggest that EPOR-mutant erythrocytoses differentiate from HIF2A- and VHL-mutant erythrocytoses not only



in low EPO levels, but also in the regulation of systemic iron homeostasis.

Grants support: NV19-07-00412; IGA_LF_2022_003.

Keywords: Erythrocytosis, Erythropoietin receptor, Hpcidin, Hypoxia-sensing



23. PRAŽSKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY

Hematologie 2023 18.–20. 1. 2023
POST-ASH

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

137

OŠETŘOVATELSKÝ PROGRAM (S01 – S09)

**S01****TUMOR LYSIS SYNDROM A SYNDROM Z UVOLNĚNÍ CYTOKINŮ**

Prokop Vodička

I. interní klinika – hematologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice

Komplikace léčby u hemato-onkologických pacientů mohou být stejně závažné jako jejich základní onemocnění. Včasné a správné rozpoznání těchto komplikací je nezbytné k zahájení odpovídající terapie. **Tumor lysis syndrom** (syndrom nádorového rozpadu, TLS) je akutní stav vzniklý rychlým rozpadem nádorové tkáně. Mezi diagnózy, u kterých hrozí vysoké riziko rozvoje nádorového rozpadu, patří obecně rychle rostoucí malignity, zejména agresivní lymfomy (Burkittův lymfom, difúzní velkobuněčný B-lymfom), akutní leukémie, a některé další nádory. Pacienti s renálním selháním, hyperurikémií a dehydratací společně s přítomností velké nádorové masy („bulky“) a elevací enzymu laktát dehydrogenázy v krvi jsou nejvíce ohroženi touto komplikací. Klinické projevy TLS jsou velmi nespecifické a zahrnují slabost, nechutenství, zvracení, palpitace či omezenou diurézu. Charakteristický pro TLS je nález v biochemickém rozboru krve – hyperkalémie, hyperfosfatémie, hyperurikémie, známky renálního selhání, a případně jaterního selhání. Mezi komplikace TLS patří také závažné arytmie až srdeční zástava způsobené hyperkalémií. Výše uvedené změny v biochemickém rozboru jsou základem diagnostiky. Léčba spočívá v zajištění kvalitního žilního vstupu, monitoraci vitálních funkcí a bilancí tekutin, hydrataci pacienta, případně podání diuretické podpory a léků snižujících hladinu kyseliny močové, tj. allopurinol či rasburikáza. V krajních případech je nutné provést hemodialýzu. U všech pacientů je zásadní stanovení míry rizika rozvoje nádorového rozpadu. Prevence TLS spočívá ve zvýšené hydrataci a podání allopurinolu před zahájením léčby. V některých případech podáváme také tzv. profázi před 1. cyklem chemoimunoterapie, nejčastěji se jedná o kortikoidy.

Cytokiny jsou jakožto signální molekuly součástí přirozené imunity (TNF- α , IFN- γ , IL-6 aj.). Jejich rychlé uvolnění do krevního oběhu v krátkém čase vede k tzv. **syndromu z uvolnění cytokinů** (cytokine release syndrom, CRS). Ten může být způsoben infekcí (např. SARS-CoV-2), autoimunitními chorobami, ale také imunoterapií hemato-onkologických chorob, zejména léčbou založenou na T-lymfocytech (kam řadíme CAR T-cell léčbu a tzv. bispecifické protilátky). Mezi klinické projevy CRS patří horečka, bolesti svalů, únava, nevolnost a zvracení. V těžších případech dochází k rozvoji hypotenze, desaturace, orgánové toxicitě (jaterní či renální selhání), koagulopatii, někdy až šokovému stav s nutností katecholaminové podpory či intubace a umělé plicní ventilace. Až 95 % nemocných léčených pomocí CAR T-cell rozvine CRS (většinou však lehčí formy), proto je nezbytná správná monitorace pacientů ve vysokém riziku CRS, která zahrnuje pravidelné fyzikální vyšetření pacienta, telemetrii, měření vitálních funkcí vč. teploty, bilance tekutin a odběry krve (IL-6, fibrinogen). U lehčích forem CRS je pacient léčen symptomaticky, v těžších případech podáváme monoklonální protilátku anti-IL-6 tocilizumab a kortikosteroidy.

Při včasném rozpoznání a správném managementu je prognóza TLS a CRS velmi dobrá.

S02**KOMPLIKACE A KVALITA ŽIVOTA DĚTÍ S AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKÉMIÍ LÉČENÝCH CHEMOTERAPIÍ VE SROVNÁNÍ S ARSENTRIOXIDEM**

Yvona Vodárková, Jitka Wintnerová

FN Motol, Klinika dětské hematologie a onkologie, Praha

Akutní myeloidní leukémie (AML) tvoří u dětí pouze 15% všech leukémií a je tedy významně méně častá než akutní lymfoblastická leukémie (ALL). Akutní promyelocytární leukémie (APL) je jedním ze subtypů AML s významným rizikem krvácivých a trombotických komplikací při diagnóze. APL má u dětí



stejné zastoupení mezi AML jako je tomu u dospělých, děti však mají při diagnóze častější výskyt leukocytózy.

APL byla až do 80.let minulého století neléčitelným onemocněním, které vedlo k úmrtí během několika týdnů. Zařazením all-trans-retinové kyseliny (ATRA) do léčebného protokolu v kombinaci s chemoterapií znamenalo významné zlepšení výsledků léčby. Další významný pokrok přineslo zavedení léčby ATRA s arsentrioxidem (ATO) bez použití chemoterapie. V přednášce analyzujeme komplikace provázející léčbu APL konvenční chemoterapií+ATRA ve srovnání s léčbou ATRA+ATO. Ve dvou kazuistikách se především zaměříme na toxicitu, komplikace a kvalitu života během léčby.

S03

ZÁSADY ANTIBIOTICKÉ TERAPIE U HEMATO-ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ

Prokop Vodička

I. interní klinika – hematologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice

Infekční komplikace jsou u pacientů s hemato-onkologickými malignitami časté v důsledku imunoprese způsobené protinádorovou léčbou, ale i základním onemocněním. Rozvoj infekce bývá velmi rychlý a tato komplikace je jednou z nejčastějších příčin morbidit pacientů s nádory krvetvorby. Infekce bývá způsobena bakteriálními a virovými patogeny či plísněmi z okolí pacienta, významným zdrojem jsou též endogenní (často rezistentní) kmeny bakterií, které pacienta kolonizují. Mezi rizikové faktory dále patří stav maligního onemocnění, věk a komorbidit pacienta. Pro dobrý efekt antibiotické terapie je rozhodující správné určení zdroje infekce. Nejčastějším zdrojem bývají dýchací cesty, urogenitální trakt, gastrointestinální trakt, měkké tkáně a krevní řečiště. Terapii začínáme zpravidla empiricky širokospektrým antibiotikem vybraným na základě klinického stavu pacienta, jeho laboratorních hodnot (C-reaktivní protein, prokalcitonin, přítomnost renální či jaterní insuficience

apod.) a zobrazovacích nálezů (zejm. RTG hrudníku, USG břicha), případně předchozích výsledků kultivací. Kontrolní kultivace (dutina ústní, nos, sputum, moč, rektum, defekty měkkých tkání, hemokultury) včetně odběru k vyšetření PCR SARS-CoV-2 a chřipky, které určí aktuální osídlení pacienta významnými patogeny, jsou nezbytné při rozhodování o další úpravě léčby (cílení na konkrétní patogen). Důležité je také sérologické vyšetření z odběrů krve (respirační patogeny, herpetické viry, zoonózy apod.) – to pomůže odhalit obtížně kultivovatelné mikroorganismy. Při samotné léčbě je zásadní dodržovat odpovídající dávku antibiotika odvíjející se od hmotnosti pacienta a případných orgánových dysfunkcí. Je třeba zajistit optimální rozestup mezi jednotlivými dávkami a rychlost podání tak, aby byla léčebná hladina vyšší než minimální účinná koncentrace léku a zároveň nepřekračovala toxickou dávku. Délka léčby závisí na stavu pacienta, typu patogenu a použitého antibiotika, a zpravidla se pohybuje od 5 dní do 2 týdnů, v některých případech může být i dlouhodobější (např. infekce mykobakteriemi, osteomyelitida). Velmi nebezpečné pro imunosuprimované pacienty na protinádorové terapii jsou infekce způsobené intracelulárními patogeny a plísněmi, na které je třeba myslet při nedostatečném efektu širokospektrých antibiotik.

Febrilní neutropenie je závažný, život ohrožující stav charakterizovaný tělesnou teplotou nad 38 °C a počtem neutrofilních granulocytů pod $0,5 \times 10^9/l$. Při rozvoji febrilní neutropenie je nutná okamžitá agresivní širokospektrá antibiotická terapie. V důsledku nedostatečné léčby či přítomnosti jiných rizikových faktorů dochází u malé části nemocných k rozvoji sepse. Ta patří mezi nejčastější příčiny úmrtí pacientů s hematologickými malignitami.

V rámci **prevence** rozvoje infekce se podle očekávané délky neutropenie a tíže imunoprese rozhoduje o profylaktickém podávání antibiotik (ciprofloxacin, co-trimoxazol), antivirotik (acyklovir) či antimykotik (flukonazol). Tato profylaktická léčba může zabránit rozvoji život ohrožujících infekcí, na druhé straně má ale své nežádoucí účinky, a proto je třeba o ní rozhodovat uvážlivě.

**S04****PROBLEMATIKA ŽILNÍCH VSTUPŮ
V AMBULANTNÍ PRAXI HOO FN PLZEŇ**

Jana Chovancová

Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň

Problematika zajištění žilních vstupů je aktuálním tématem. Na našem pracovišti - Hematologicko-onkologickém oddělení FN Plzeň - je zajištění žilního vstupu jednou z nejčastějších ošetrovatelských intervencí u pacienta a v jeho léčbě má nezastupitelnou úlohu.

Vhodný typ žilního vstupu volíme pacientovi na míru podle jeho plánované terapie, stavu jeho žilního řečiště a zohledňujeme také preferenci pacienta samotného. K léčbě můžeme zvolit krátkodobý, střednědobý nebo dlouhodobý žilní přístup, periferní nebo centrální. Každý druh žilního vstupu má svoje indikace a rizika, výhody a nevýhody.

V našem příspěvku obecně představíme možné typy žilních přístupů a jejich nejčastější využití. Prostřednictvím fotodokumentace uvedeme jejich nejčastější komplikace a možnosti jejich řešení tak, jak je vidíme v praxi na našem pracovišti. Konkrétně uvedeme četnost reálného použití jednotlivých žilních vstupů a procentuálního zastoupení jejich komplikací v HOO ambulantní praxi našeho pracoviště.

S05**BEZPEČNÉ PODÁNÍ PARENTERÁLNÍCH LÉČIV
(NEJEN) U HEMATOLOGICKÝCH PACIENTŮ**Jana Vedrová¹, Petra Rozsivalová²¹*Oddělení klinické farmacie, ÚHKT Praha, Praha, Česko*²*Nemocniční lékárna - odd. klinické farmacie Fakultní nemocnice Hradec Králové, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, Česko*

Medikační pochybení patří mezi velmi časté nežádoucí události při poskytování zdravotnických služeb a může mít závažné důsledky nejen pro pacienta, ale také pro zdravotnické pracovníky i samotného poskytovatele zdravotních služeb. Proto je jedním ze základních bezpečnostních cílů každého zdravotnického zařízení zajištění kvalitního a bezpečného podávání léčivých přípravků.

Řada parenterálních léčivých přípravků musí být před vlastní aplikací pacientovi upravena. Správné ředění a podávání těchto léčiv je základním předpokladem pro zajištění maximální účinnosti a bezpečnosti terapie. Jedním z úkolů klinického farmaceuta, jako člena multidisciplinárního týmu zdravotníků, je zajistit správné (tj. účinné, a přitom bezpečné a účelné) podávání léčiv. V rámci této mezioborové spolupráce je nápomocný zdravotním sestram a sestry by se neměly obávat jeho služeb využít.

Přednáška bude věnována problematice správného podání parenterálních léčiv, budou uvedeny základní příklady inkompatibilit, vč. kazuistik.

**S06****„PRÁVA ZDRAVOTNICKÝCH PRACOVNÍKŮ A MOŽNOSTI OBRANY V PŘÍPADĚ NEOPRÁVNĚNÝCH ZÁSAHŮ“**

Radek Halouzka

*BBMRI-ERIC, Common Service ELSI Expert, PRÁVNÍ ODDĚLENÍ / LEGAL DEPARTMENT
Masarykův onkologický ústav, Brno*

Většina příspěvků z konferencí a dalších odborných akcí, pokud se již týkají nelékařských zdravotnických pracovníků, jsou zaměřeny na jejich povinnosti při poskytování zdravotních služeb, zejména ve vztahu k pacientům, ale i dalším osobám. Méně se již hovoří o jejich právech a o možnostech jejich ochrany a obrany. Do jisté míry je to logické, neboť slabší stranou ve vztahu mezi poskytovatelem zdravotních služeb (zdravotnickým pracovníkem) a pacientem je přirozeně pacient, oslaben jednak svojí nemocí, ale také skutečností, že nedisponuje odbornými znalostmi ve shodném rozsahu jako zdravotnický pracovník. Toto slabší postavení pak zákonodárce logicky kompenzuje mj. širším rozsahem práv pacientů zakotveným do právních předpisů. To však neznamená, že bychom práva zdravotnických pracovníků v právních předpisech nenalezli anebo že by tato měla být opomíjena, zvláště pak za situace, kdy jsou právě i zdravotničtí pracovníci terčem útoků, a to jak slovních, tak i fyzických ze strany pacientů či dalších osob (např. ze strany osob pacienty doprovázejících).

Cílem mého příspěvku je tak alespoň částečně splatit dluh, který v tomto ohledu máme vůči zdravotnickým pracovníkům, a vymezit jednak jejich práva, která lze dovodit z právních předpisů, a potom se zabývat možnostmi ochrany a prosazování jejich práv, a to i za pomoci poskytovatelů zdravotních služeb, tedy zaměstnavatelů zdravotnických pracovníků. Stranou však nezůstane ani vymezení těch nejzákladnějších povinností zdravotnických pracovníků, neboť jak je patrné z praxe, byť jsou si těchto zdravotničtí pracovníci min. v teoretické rovině vědomi, stále dochází k jejich nedodržování a zdravotničtí pracovníci tak musí čelit negativním následkům s tím spojených.

S07**MÍRA PRÁVNÍ ZODPOVĚDNOSTI ZA POSTUPY A ROZHODNUTÍ – PODÁVÁNÍ LÉKŮ, DEKUBITY, PÁDY**

Ivana Dvořáčková

*Vedoucí pracovní skupiny soudních znalců při prezidiu České asociace sester ČR
Zástupkyně náměstkyně pro ošetrovatelskou péči
Fakultní nemocnice Hradec Králové*

Odpovědnost je široký právní, morální a etický pojem, který označuje ručení osoby za nějakou věc či jednání.

Zodpovědnost ukazuje na plnění odpovědnosti, nejen např. za sebe, ale i za svěřené činnosti a věci. Většina z nás to dělá a přijímá jako samozřejmý nárok na sebe, zejména proto, aby se na něj druzí mohli spoléhat. Proto je zodpovědnost tak hledaná kvalita v řídicích i podřízených funkcích. Naproti tomu i příliš ostré vědomí odpovědnosti a rizik může vést k situaci, že dotýčný odpovědný člověk se neodvážá rozhodovat zodpovědně, že bude váhat a zajišťovat se, čímž může způsobit škodu nebo nezdár.

V jakém rozsahu sahá pravomoc a tím pádem i odpovědnost nelékařských zdravotnických pracovníků, to nám určuje vyhláška č. 55/2011 Sb. v platném znění o činnostech zdravotnických pracovníků a jiných odborných pracovníků. Poslední novela vyhlášky je 158/2022, která vyšla k 1.7.2022. Činnosti jsou zde řazeny dle paragrafů pro jednotlivé odbornosti z řad nelékařů a v jednoduchém členění na činnosti vykonávané bez odborného dohledu a bez indikace lékaře, bez odborného dohledu na základě indikace lékaře, pod odborným dohledem lékaře a pod odborným dohledem zdravotnického pracovníka se specializovanou způsobilostí. Každý zaměstnanec by měl mít jako součást své náplně práce stanovené kompetence, které se budou opírat o tuto vyhlášku a budou individuálně přizpůsobeny činností, provozu a možnostem daného nelékařského zdravotnického pracovníka.



Co to v praxi znamená? Jen pár příkladů o odpovědnosti sester za ošetrovatelskou péči o pacienta:

- Dle vyhlášky 55/2011, §4 Všeobecná sestra, (3) „všeobecná sestra může vykonávat bez odborného dohledu **na základě indikace lékaře**“ b) podávat léčivé přípravky s výjimkou radiofarmak, nejde-li o nitrožilní injekce nebo infuze u dětí do 3 let, pokud dále není uvedeno jinak.
 - › Jak je možné, že ve zdravotnické dokumentaci najdeme zápisy sester „Podán Novalgin tbl., bolest VAS 1“ bez ordinace lékaře nebo bez splnění podmínky k podání?
- Dle vyhlášky 55/2011, §4 Všeobecná sestra, (1) „bez odborného dohledu a **bez indikace lékaře**, v souladu s diagnózou stanovenou lékařem poskytuje, případně zajišťuje základní a specializovanou ošetrovatelskou péči prostřednictvím ošetrovatelského procesu. Přitom zejména může: g) hodnotit a ošetřovat poruchy celistvosti kůže a chronické rány a ošetřovat stomie.“
 - › Stává se, že v ošetrovatelské dokumentaci není žádný zápis o tom, že pacient má dekubit, jak byl ošetřován a v překladové zprávě je pacient uveden bez problémů v této oblasti. V příjmové dokumentaci v jiném zdravotnickém zařízení je popsán dekubit 3. i 4. stupně.
- Dle vyhlášky 55/2011, §3 Činnosti zdravotnického pracovníka s odbornou způsobilostí, (1) „Zdravotnický pracovník **bez odborného dohledu a bez indikace** v rozsahu své odborné způsobilosti c) provádí zápisy do zdravotnické dokumentace a další dokumentaci vyplývající z jiných právních předpisů a pracuje s informačním systémem poskytovatele zdravotních služeb.“
 - › Jiným právním předpisem je zde myšlena vyhláška 98/2012 Sb. o zdravotnické dokumentaci, §1 (2) „Zdravotnická dokumentace v návaznosti na zjištěné informace o zdravotním stavu pacienta dále obsahuje **g) záznamy o poskytnuté ošetrovatelské péči, včetně záznamů o poskytnuté nutriční péči a léčebně rehabilitační péči.**“
 - › Dle výše uvedeného si může každý poskytovatel zdravotní péče uzpůsobit ošetrovatelskou dokumentaci dle jeho potřeb. V mnoha případech jsou zápisy sester nevypovídající, např. pacient vertikalizován (z lehu do sedu? nebo ze sedu do stoje? nebo chodí?), duplicitní (záznamy o stravě na dvou formulářích), je stále veden plán ošetrovatelské péče s uváděním

ošetrovatelských diagnóz (není legislativní požadavek, náročnost na čas personálu), nebo zápisy chybí zcela (např. o příjmu stravy pacienta s rozsáhlým dekubitem). Pokud nejsou činnosti ve zdravotnické/ošetrovatelské dokumentaci zdokumentovány, lze usuzovat, že nebyly provedeny.

- Všeobecná sestra, která pracuje na ambulanci, nemůže mít stejnou náplň práce a kompetence jako sestra, která pracuje na jednotce intenzivní péče, protože jejich činnosti jsou rozdílné.

V části prezentace jsou zpracovány tři kazuistiky – ublížení na zdraví z nedbalosti při aplikaci injekce, usmrcení z nedbalosti způsobené pádem pacienta, ublížení na zdraví z nedbalosti pro hrubé zanedbání péče pro hluboké proleženiny.

Zpracování znaleckého posudku v oblasti ošetrovatelství se zejména opírá o stanovené kompetence jednotlivých zdravotnických pracovníků, ale také o záznamy ve zdravotnické/ošetrovatelské dokumentaci. Pokud je dokumentace insuficientní, kompetence pracovníků neplněny nebo překročeny, může znalecký posudek negativně vyznít pro zaměstnance i poskytovatele zdravotnických služeb.



PALIATIVNÍ PÉČE – WORKSHOP

S08

I SEBEPÉČE ZDRAVOTNÍKŮ

Zuzana Čepelíková

Klinika paliativní medicíny, VFN Praha

„Sebepéče není jen teplá vana a dobré jídlo“, ale týká se především všímavosti a pozornosti a je základní prevencí PTSD a syndromu.

Přehledová přednáška bude následována praktickými tipy a cvičeními (“co mohu pro sebe udělat teď, aby mi bylo za pár okamžiků lépe?”)

S09

I REFLEXE PANDEMIE

Kateřina Rusinová

Klinika paliativní medicíny, VFN Praha

Každá zátěžová situace v sobě nese potenciál příležitosti ke změně. Co bychom si ze “starého fungování” rádi zanechali? Co jsme se naučili během pandemie nového a mohlo by dobře fungovat do budoucna? Blok k reflexi a sdílení zkušeností během péče o pacienty v době pandemie.

OŠETŘOVATELSKÝ PROGRAM – POSTERY

PS01

REHABILITACE U PACIENTŮ S ROZTROUŠENOU SKLEROZOU NA HEMATOONKOLOGII

Kateřina Hašová, Marcel Koňářík, Kateřina Horáková

Klinika hematatoonkologie, Fakultní nemocnice Ostrava

Na naší hematatoonkologické klinice jsme v období od roku 2018 do roku 2022 pečovali o 12 pacientů s roztroušenou sklerózou (RS), kteří u nás podstoupili autologní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT).

V roce 2021 jsme získali dar od Nadačního fondu Petra Zoubka ro hematatoonkologické pacienty zařízení motomed. Autoimunitní onemocnění se léčí pomocí HSCT již více než dvě desetiletí a v současnosti jsou nejrychleji rostoucí indikační skupinou. Autologní i alogenní HSCT lze provádět pacientům s těžkým autoimunitním onemocněním rezistentním na standardní terapie. European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) zveřejnila v roce 2012 multidisciplinární pokyny, které zahrnují obecné zásady výběru pacientů, odběru kmenových buněk, manipulace se štěpem, režimů přípravy, podpůrné péče a sledování¹.

V příspěvku popisujeme kazuistiku 35-leté pacientky s roztroušenou sklerózou, která na naší klinice podstoupila autologní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Pacientka byla na začátku terapie ve špatné psychické kondici, odkázána na invalidní vozík. Hned po podání štěpu začala rehabilitaci, jak pod vedením fyzioterapeuta, tak individuálně na motomedu.

Po 17 dnech po převodu štěpu byla schopna provést několik kroků.



Možnost aktivity i mimo cvičení s fyzioterapeutem bylo pro pacientku obrovským impulzem a motivačním prvkem.

Klíčová slova: roztroušená skleróza, autologní transplantace hematopoetických buněk, motomed, fyzioterapie

Literatura:

1. Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, Chabannon C, et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant.* (2019) 54:1525–52. doi: 10.1038/s41409-019-0516-2

PS02

Protektivní péče při léčbě cytostatiky

Michaela Watzlawiková, Libuše Kolková, Marcel Koňářík

Klinika hematonekologie, FN Ostrava

Léčba cytostatiky přináší řadu nežádoucích účinků na organismus. Podle typu cytostatika bývají poškozovány různé orgánové soustavy a úkolem protektivní péče je negativní dopady v co největší možné míře eliminovat. Práce je přehledem nejčastěji používaných cytostatik v hematonekologii, jejich toxického potenciálu a možnostech ochrany ohrožených orgánů.

Klíčová slova: cytostatika; protektivní; ochrana; hematonekologie



Aqeel **Abbas** O08, P11
Pau **Abrisqueta** O08, P11
Miroslava K. **Adamcová** O03, O04
Meritxell **Alberich-Jorda** O03, O04
Alex **Allepuz** P39
Natividad **Alquezar-Artieda** P07
Julia **Alten** E01
Ladislav **Anděra** P12
Per-Ola **Andersson** P11
Luca **Arcaini** O08
Farrukh **Awan** P11
Petr **Bader** P02
Veronika **Bachanová** P01
Jiří **Baloun** P27
Michela **Bardini** E01
David **Belada** O05, O08, O10, P03, P11, P14, P17, P20
Monika **Beličková** O11, P30, P31, P32, P33, P34, P37
Petra **Bělohávková** E02
Kateřina **Benešová** P03, P29
Kateřina **Benková** O01
Petr **Berkovský** P16
Andrea **Biondi** E01
Ivona **Blaháková** P50, P51
Petra **Blahovcová** O10, P03
Jan **Blatný** E06
Michaela **Bohúnová** P25, P35
Lisa **Brizzolara** E01
Joshua **Brody** P11
Peter **De Nully Brown** O05
Lenka **Bryjová** P35
Richard **Burack** O05
Pavel **Burda** P41
Daniel **Buša** P44, P45
Elliot **Cahn** O05
Eliás **Campo** E08
Vít **Campr** O10, P03
Miguel Ángel Canales **Albendea** P11

Gunnar **Cario** E01
Carla **Casulo** O05
Giovanni **Cazzaniga** E01
James **Cerhan** O05
Ela **Cerovská** P30
Petr **Cetkovský** O01
Michael **Clausen** O05
Jonathon **Cohen** O05
Valentino **Conter** E01
Kateřina **Čábelová** P35
Miroslava **Čedíková** P43
Zuzana **Čepelíková** S08
Jaroslav **Čermák** E04, P30, P31, P32, P33, P34, P37
Libor **Červinek** P35, P48
Barbora **Čudová** O11
Martin **Čulen** P44, P45
Nikola **Čuřík** P41
Torsten **Dahlén** P39
Jean-Hugues **Dalle** P02
Petr **Daněk** O03, O04
R. Eric **Davis** P22
Paola **De Lorenzo** E01
Sven de **Vos** O08
Kateřina **Dědečková** P04
Tereza **Dekořová** P09
Minh **Dinh** O08, P11
Martina **Divoká** P52
Vladimír **Divoký** O11, P52
Miluše **Dolečková** P16
Alexandra **Dolníková** P08, P12, P29, P41
Jana **Dorazilová** P27
Lenka **Dostálová** P51
Michaela **Dostálová Merkerová** P31, P32, P33, P37
Michael **Doubek** E12, O01, O07, P25, P27, P35, P50, P51
Kristina **Drott** O08, P11
Johannes **Duell** P17
Petr **Dulíček** P49

Juraj **Đuraš** O10, P03, P14
Ivana **Dvoráčková** S07
Petr **Džubák** P23
Cornelia **Eckert** E01
Pablo **Engel** P28
Lorenzo **Falchi** O08, P11
Tereza **Feglarová** P06, P10, P35, P36
Javier **Fernandez** P28
Germano **Ferreira** P39
Jana **Fialová Kučerová** P52
Karel **Fišer** P28
Patrik **Flodr** P23, P40
M. Carolina **Florian** O03, O04
Christopher R. **Flowers** O05
František **Folber** O01
Adam **Folta** P35, P45
Renata **Formankova** P19
Kristína **Forsterová** P29
Ciara **Freeman** O05
Jan **Frič** P06, P10, P35, P36
Jonathan **Friedberg** O05
Eva **Froňková** O01, P26, P29
Tomáš **Fürst** O05
Lubica **Gahérová** P14, P20
Tarec **Galaly** O05
Maher **Gandhi** O05
Alejandro Martín **García-Sancho** P11
Herve **Ghesquieres** O05
Hana **Gmucová** P09
Jan **Grohmann** P01, P14, P15
Tomáš **Gucký** O11
Jaromír **Gumulec** E07
Jan **Gurský** O11
Thomas **Habermann** O05
Radek **Halouzka** S06
Veronika **Hanáčková** P01, P14, P15
Jitka **Hanzalová** P18



Kateřina Hašová	S08, S09	Ondřej Jahoda	P52	Jana Kotašková	O06, P05, P25, P35
Ondřej Havránek	P08, P24	Lasse Jakobsen	O05	Tomáš Kozák	P04, P20
Eliza Hawkes	O05	Andrea Janíková	O05, O10, P03	Dana Králová	P16
Tomáš Heizer	P29	Iveta Janotová	P18	Barbora Králová	P52
Mats Hellström	O08, P11	Lucie Janstová	P06, P10, P35, P36	Alexandra Kredátusová	P01, P14, P15, P20
Karel Helman	P08	Marie Jarošová	O06, P25, P35	Zdeněk Krejčík	P30, P31, P32, P33, P37
Ivana Hermanova	P07	Marek Jedlička	P06, P10, P35, P36	Robert Kriedel	O05
Václav Heřman	P22, P24	Ivana Ježíšková	P35, P45	Eva Kriegová	P20, P40, P52
Katerina Hlozkova	P07	Pavel Jindra	P09, P21	Justina Krotka	E01
Katarína Hlušíčková Kapraľová	P52	Anna Jonášová	E03, P32, P37, P38, P42	Vladimír Kryštof	O11
Harald Holte	O08	Radek Jorda	P08	Jitka Křížková	P41
Dušan Holub	P23	Brad Kahl	O05	Adam Kuba	P40
Monika Holubová	P09, P21, P43	Monika Kaisrlíková	P31, P33, P34	David Kundrát	P30, P31, P32, P33, P34, P37
Jan M. Horáček	O01	Tomáš Kalina	P28, P41	Kristýna Kupcová	P22, P24
Daniel Horák	P27	Jana Karolová	P29	Terezia Kurucová	P25
Julia Horakova	P19	Daniel Kavan	P07	Kateřina Kuželová	P10
Kateřina Horáková	S08, S09	Dmitry Kazantsev	P12, P29	Daniela Kužilková	P07, P18, P28
Monika Horváthová	P52	Cristina Daniela Kelemen	P12	Hans Kvasnicka	E08, E09
Alena Houdková	P18	Petra Keslova	P19	Adriana Ladungová	P44
Lenka Hovorková	E01	Mouhamad Khouja	P17	Adam Láznicka	P41
Viera Hrabčáková	O06	Hana Klamová	P41	Zuzana Lenertová	P31, P33, P34
Štěpán Hrabovský	O01	Magdaléna Klánová	P08, P29	Sirpa Leppä	O08
Iveta Hradilová	O11	Kateřina Klásková	P04	Lori A. Leslie	O08, P11
Ondřej Hrušák	P18, P26	Jiří Kléma	P32, P33	Catharina Lewerin	P11
Andrea Hruštinová	P32, P33, P37	Pavel Klener	O09, P03, P08, P12, P22, P29, P41	Paulína Likavcová	P50
Martin Hutchings	O08	Robin Klieber	P09, P21, P43	Brian Link	O05
Jan Hýl	P44	Camille Kockerols	P39	Franco Locatelli	P02
Jakub Hynšt	P50	Rolf Koehler	E01	Yusuf Lodhi	P44
Pavla Chaloupková	O11	Amelie Koehrmann	E01	Tomáš Loja	P45
Thomas Chatzikonstantinou	O07	Juraj Kokavec	O12, P46, P47	Izidore Lossos	O05
Chan Y. Cheah	O08	Alexandra Kolenova	P19	Pieterella Lugtenburg	O08
David Chiron	P08	Marcel Koňářik	S08, S09	Marie Lukášová	P14, P20
Alena Chourová	P16	Eva Koniřová	E05	Daniel Lysák	E13, P09, P21
Jana Chovancová	S04	Kateřina Kopečková	P03	Pei M. Aui	P28
Tereza Chrbolková	P22, P24	Pavla Kořalková	O11	John M. Burke	P17
Jacob Haaber Christensen	O08, P11	Tereza Kořánová	P10	Diana Macečková	P21, P43
Eva Ivanova	P49	Zdeněk Kořístek	O01	Mária Maco	P04, P14, P20



Kateřina **Machová Poláková** O02, P41
Diana **Maláriková** P08, P12, P29
Jiřina **Maňáková** P52
Andrea **Marečková** O06, P25, P35
Jana **Marková** P04, P14, P20
Peter **Martin** O05
Eva **Mašínová** P06, P10, P35, P36
Francesca **Matteini** O03, O04
Matthew **Maurer** O05
Jiří **Mayer** P39, P45
Ester **Mejstříková** P18, P26
Reid W. **Merryman** O08
Jaroslav **Michálek** P23
Dana **Mikulenková** P34
Mirko **Milosevic** O03, O04
Lubomir **Minařík** O12, P38
Jiří **Minařík** P23
Heidi **Móciková** O05, O10, P03, P04, P14, P20
Tomas **Mracek** P07
František **Mrázek** P40
Denisa **Myslivcová** O11
Markéta **Nádeníková** P06
Mayur **Narkhede** P11
Loretta **Nastoupil** O05
Jana **Navrátilová** P01, P14, P15
Martina **Navrátilová** P23
Veronika **Navrkalová** O06, P05, P25
Nikola **Niederlová** O11
Marcel **Nijland** O08, P11
Petr **Novak** P07
Michaela **Nováková** P18, P26
Grzegorz S. **Nowakowski** P17
Fritz **Offner** P11
Iva **Ondečková** P24
Eva **Ondroušková** O06, P35
Pavel **Ostašov** P21
Pavel **Otáhal** E14

Mariana **Pacheco-Blanco** P22, P24
Veronika **Palušova** P51
Anna **Panovská** P05, P35
Tomáš **Papajík** P01, P14, P15, P20, P40
Petr **Pecina** P07
Alena **Pecinova** P07
Michaela **Pešová** P51
Lucie **Peterková** O03
Christina **Peters** P02
Kristýna **Pimková** O12
Jan **Pirnos** P03
Pavel **Pitule** P43
Karla **Plevová** O06, P05, P25
Zdeněk **Plichta** P27
Eva **Pokorná** P08, P12, P41
Daniela **Pokrivčáková** O06
Kamila **Polgárová** O10
Václava **Polívková** P41
Jakub **Porc** O06, P05
Šárka **Pospíšilová** O06, P05, P25, P27, P50, P51
Dagmar **Pospíšilová** P52
Christiane **Pott** P17
Eliska **Potuckova** P07
Luděk **Pour** E11, O06
Jan **Procházka** P46, P47
Vít **Procházka** O05, O10, P01, P03, P14, P15, P20
Daniela **Procházková** P52
Vladimír **Proks** P27
Václav **Ptáčník** O10
Joan **Puñet-Ortiz** P28
Markéta **Racková** O03
Lenka **Radová** P05, P50, P51
Nooralam **Rai** O03, O04
Luděk **Raida** P40
Ali **Rana** O08, P11
Šárka **Ransdorfová** P34
Kamila **Rébllová** P25

Tomáš **Reigl** P05
Hana **Remešová** P30
Andrea **Rennerova** P19
Leona **Reznickova** P19
Petr **Riha** P19
Jennie **Roberts** P07
Jakub **Rohlena** O03, O04
Kateřina **Rohlenová** O03, O04
Petra **Rozsivalová** S04, S05
Kateřina **Rusinová** S08, S09
Petr **Ryšavý** P33
Eva **Řezníčková** O11
Petr **Řiha** P26
Petr **Sadílek** P49
Cyril **Salek** P19
Lydia **Scarfò** O07
Petr **Sedlacek** P19
Radislav **Sedláček** P46, P47
Petr **Sedláček** O03, P02
Krystof **Seferna** P19
Laurie **Sehn** O05
Jana **Senavova** P22
Jana **Seňavová** P24
John **Seymour** O05
Petr **Schandl** P16
Martin **Schrapppe** E01
Aneta **Skotnicova** P19
Karin **Smedby** O05
Petr **Smejkal** P50
Dagmar **Smitalová** P35
Alexandra **Smith** O05
Sylvia **Snuwaert** P11
Lucie **Sochorcová** P52
Petr **Soukup** O01
Dana **Sovilj** P08, P12
Lucie **Sramkova** P19
Dana **Srbová** P41



Kateřina **Staňo Kozubík** P50, P51
Julia **Starková** P07
Jan **Starý** E01, P18, P19, P26
Kateřina **Steinerová** O10, P03
Pavel **Stolbenko** P16
Tomáš **Stopka** O12, P38, P42, P46, P47
Tomas **Stopka** P38, P42
Miroslav **Strnad** P08
Radana **Studená** P27
Jan **Stuchly** E01
Michael **Svatoň** O03, P29
Hana **Svozilová** P27
Alice **Sýkorová** P03, P14, P20
Jana **Szabová** P06, P10, P35, P36
Katarína **Szikszai** P37
Cyril **Šálek** O01, P19, P30, P41
Martin **Šimkovič** O07
Karolina **Škvárová Kramaržová** O03
Jiří **Šmejkal** P35
Michal **Šmída** P44, P51
Petra **Šmuhařová** P35
Martin **Špaček** O07
Lucie **Šrámková** O03, P18, P19, P26
Jaroslav **Štěrba** P13
Jiří **Štika** P50, P51
Martin **Štork** O06
Veronika **Švubová** P06, P10, P35, P36
Daniel A. **Tennant** P07
Zuzana **Thibaud** P49
Tomáš **Tomáš** P23
Jakub **Trizuljak** P50
Jan **Trka** E01, O01, P07, P19
Marie **Trkova** E01
Marek **Trněný** O05, O10, P03, P08, P12, P17, P29
Iva **Trsová** P31, P32, P33, P34, P37
Liliana **Tušková** P29
Helena **Urbánková** O11, P01, P14, P15

Barbora **Vakrmanová** P26
Veronika **Valková** P19
Maria Grazia **Valsecchi** E01
Menno C. **van Zelm** P28
Karolína **Vaničková** O03, O04
Martina **Vášková** P18
Jana **Vedrová** S04, S05
Joost S.P. **Vermaat** P11
Jitka **Veselá** P31, P33, P34
Diego **Villa** O05
Andrea **Visentin** O07
Umberto **Vitolo** O08
Yvona **Vodárková** S01, S02
Prokop **Vodička** P03, S01, S03
Elena **Vodičková** P18
Lucy **Vojtová** P27
Martin **Vostrý** P31
Hana **Votavová** P31, P34
Zuzana **Vrzalová** P50, P51
Steve **Wagner** P17
Björn E. **Wahlin** P11
Björn **Wahlin** O05
Maeve Waldron-**Lynch** P17
Liwei **Wang** O08, P11
Yucui **Wang** O05
Michaela **Watzlawiková** PS02
Caroline **Weibull** O05
Barbora **Weinbergerová** P35
Peter **Westerweel** P39
Lucie **Winkovska** E01
Jitka **Wintnerová** S01, S02
David **Wormser** P39
Lillian **Yau** P39
Marketa **Zaliova** E01, P07, P26
Kristýna **Závacká** P25
Zuzana **Zemanová** P29, P38, P42
Martin **Zimmermann** E01

David **Zogala** O10
Jan **Zuna** E01
Martina **Zwyrtkova** P07
Daniela **Žáčková** P35, P39



MÍSTO KONÁNÍ KONFERENCE

23. pražské hematologické dny: Hematologie 2023 – Post-ASH

se uskuteční v Clarion Congress Hotel Prague.

Adresa:

Freyova 33

190 00 Praha 9

www.clarioncongresshotelprague.com/cs

Čtyřhvězdičkový Clarion Congress Hotel Prague se nachází na Praze 9 ve Vysočanech, přímo na trase linky B Vysočanská. Od historického centra Prahy je vzdálen pouhých 15 minut jízdy městskou hromadnou dopravou. Hotel je výborně dostupný jak MHD, tak i automobilem, který je možné zaparkovat na hotelovém parkovišti.





REGISTRACE

Po celou dobu konference je registrace umístěna ve vstupním foyer ve 3 patře hotelu.

Registrační přepážka bude otevřena v následujících časech:

středa 18. 1. 2023	12:00 – 19:00 hodin
čtvrtek 19. 1. 2023	7:30 - 19:00 hodin
pátek 20. 1. 2023	8:00 - 13:00 hodin

Registrační poplatky na místě:

Lékař, VŠ	1.800 Kč
NLZP (všeobecná sestra, laborant)	900 Kč
Student, důchodce	700 Kč
Aktivní účastníci (prezentující autoři)	zdarma
VIP host, výbor, čestný člen ČHS	zdarma

Veškeré platby na místě bude možné provést pouze v českých korunách.

Registrační poplatek zahrnuje:

- * vstup na odborný program během celé konference
- * kongresovou tašku s materiály
- * volný vstup na výstavu firem
- * účast na posterové sekci s občerstvením
- * občerstvení během přestávek, obědy, uvítací večer dne 18. 1. 2023

CERTIFIKÁTY

Akreditovaná akce systému celoživotního vzdělávání je garantována ČLK a hodnocena kreditními body. Vzdělávací akce je pořádána dle Stavovského předpisu ČLK č. 16.

Pro NLZP je akce garantována ČAS.

Potvrzení o účasti, certifikáty ČLK a ČAS budou zaslány elektronicky do 14 dnů po skončení konference.



STRAVOVÁNÍ



Kávové přestávky:
foyer
konferenčních sálů,
sál Meridian



Obědy:
hotelová restaurace Veduta (2. patro)
Obědy budou vydávány:
čtvrtek 19. 1. 2023 / pátek 20. 1. 2023 v určených časech

Uvítací večer:
restaurace Veduta
(2.patro),
středa 18. 1. 2023 od 19:30 hodin

Každý registrovaný účastník obdrží v kongresové tašce 2 obědové lístky.

JMENOVKY

Každý účastník konference včetně vystavovatelů obdrží při registraci jmenovku, která ho opravňuje ke vstupu do daných prostor.

Barvy jmenovek:

Červená	Modrá	Žlutá	Hnědá	Šedá
lékař, VŠ	NLZP (všeobecná sestra, laborant)	VIP, čestní členové, hosté kongresu	vystavovatelé	organizační tým

Bez jmenovky nebude vstup povolen – při ztrátě bude vystavena kopie jmenovky proti úhradě 300 Kč.

DOPRAVA

Clarion Congress Hotel je snadno dostupný linkou B metra (žlutá linka) do **stanice Vysočanská**.

Bližší informace o dopravě v Praze najdete na www.dpp.cz

PARKOVÁNÍ

Parkování není zahrnuto v registračním poplatku a náklady na něj si hradí každý účastník sám. Nákupní galerie Fenix disponuje 600 místy.

Parkování zdarma: 3 hodiny během týdne a 5 hodin o víkendu.

K parkování je možné využít hotelové garáže, PATRO -3 (značeno jako P2). Bližší informace na registrační přepážce.



INFORMACE K AKTIVNÍ ÚČASTI

Jednací jazyk

Jednacím jazykem konference bude čeština, slovenština a angličtina (bez simultánního překladu).

Informace pro přednášející

Přednášky prezentované přes PC (dataprojektor) je nezbytné předat na USB flash. Přednášky můžete předávat technikům ve Vašem přednáškovém sále **od středy 18. 1. 2023 od 12:00 hodin, nejpozději 60 minut před zahájením programu vašeho přednáškového bloku**, jinak nemůžeme garantovat bezproblémový průběh Vaší prezentace.

Média si, prosím, vyzvedněte po ukončení Vašeho programového bloku.

POSTERY

Postery budou umístěny na panelech o maximálním rozměru 200 cm (šířka) x 200 cm (výška), v sále Meridian (3. patro).

Posterové tabule budou označeny čísly, které odpovídají posterové části programu (P01 – P52).

Postery budou vystaveny po celou dobu konání konference.

Instalace posterů: středa 18. 1. 2023 od 12:00 hod.

Deinstalace posterů: pátek 20. 1. 2023 po 13:00 hod.

Pomůcky k instalaci budou k dispozici v prostoru posterové sekce.

V rámci posterové sekce bude organizována řízená diskuse.

**Prosíme autory sdělení, aby byli přítomni u svého posteru během celé doby vymezené k diskusi:
ve čtvrtek 19. 1. 2023 od 18:30 do 20:00 hod. (sál Meridian).**

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

Sborník neprošel jazykovou úpravou.

Autoři odpovídají za obsahovou i formální stránku svého příspěvku.



Legenda k plánu výstavní plochy

- 1 Novartis s.r.o.
- 2 ROCHE s.r.o.
- 3 Bristol-Myers Squibb spol. s r.o.,
Celgene s.r.o. (A Bristol-Myers Squibb Company)
- 4 Gilead Sciences s.r.o.
- 5 Pfizer, spol. s r.o.
- 6 AbbVie s.r.o.
- 7 Astellas Pharma s.r.o.
- 8 CSL BEHRING s.r.o.
- 9 Janssen-Cilag s.r.o.
- 10 AOP Orphan Pharmaceuticals GmbH
Member of the AOP Health Group
- 11 Amgen s.r.o.
- 12 BIOMEDICA ČS, s.r.o.
- 13 SARSTEDT spol. s r.o.
- 14 Siemens Healthcare s.r.o.
- 15 TRIGON PLUS s.r.o.
- 16 sanofi-aventis, s.r.o.
- 17 Zentiva, k.s.
- 18 Grifols s.r.o.
- 19 medac GmbH - organizační složka
- 20 Octapharma CZ s.r.o.
- 21 Sandoz s.r.o.
- 22 Swixx Biopharma s.r.o.
- 23 Takeda Pharmaceuticals Czech Republic s.r.o.
- 24 Angelini Pharma Česká republika s.r.o.
- 25 GlaxoSmithKline, s.r.o.
- 26 AstraZeneca Czech Republic s.r.o.
- 27 HEMATOLOGIE-online.cz
- 28 Steiner, s.r.o.
- 29 Abbott Laboratories, s.r.o.



GENERÁLNÍ PARTNEŘI



HLAVNÍ PARTNEŘI



PARTNEŘI

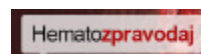




VYSTAVOVATELÉ



Mediální partneři



VŠEM PARTNERŮM A VYSTAVOVATELŮM DĚKUJEME ZA ÚČAST A PODPORU!