

AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE – NOVINKY V DIAGNOSTICE A LÉČBĚ

Konference EHA 2018, konaná ve Stockholmu, se věnovala extenzivně oblasti preleukemických predispozičních stavů a dále vlivu stárnutí na patogenizi akutní myeloidní leukemie (AML). V oblastech molekulární diagnostiky a genomiky AML se zaměřila na identifikaci a funkční charakterizaci somatických a germinálních variant. Byly též představeny nové přístupy v léčbě AML včetně imunoterapie. V neposlední řadě byly prezentovány nové potenciální cíle protinádorové terapie a mechanismy agresivity a terapeutické rezistence AML.

Vrozené predispozice k AML

Význam genetických změn pro vznik AML je nesporný, jak informovala přednáška J. Fitzgibbona [Barts Cancer Institute, Londýn]. Identifikaci pacientů s predispozicí k AML komplikují variabilita a latence začátku AML. Klasické familiární případy jsou sporadické, tvoří asi 5%, kdy ze studované rodiny jsou nejčastěji postiženi dva jedinci. První mutace zjištěná u AML predispozic byla nalezena v genu *CBFB* (*AML1*) takřka před 20 lety [Song, Sullivan, et al. 1999], následovaná mutacemi v *RUNX1*, *CEBPA*, *TERT*, *ETV6*, či *GATA2*. Neustále jsou objevovány nové mutace, například recentně v genu *DDX41*, vedoucí k AML [Kobayashi, Kobayashi, et al. 2017], v tomto případě z preleukemických klonů po alogenní transplantaci kostní dřeně.

Co mají vrozené mutace těchto predispozičních genů společné a co odlišné? Především přispívají odlišně k rozličným syndromům selhání krvetvorby či s krvetvorbou souvisejícím syndromům, k početním odchylkám (trombocytopenie) či myeloidním malignitám. Důležitý byl též objev syndromu familiární AML s mutacemi *CEBPA*, u kterého byla část mutací germinální a část somatická [Smith, Cavenagh, et al. 2004]. Kooperací těchto dvou typů mutací došlo k postupnému vzniku onemocnění. Existuje však rozdíl mezi vrozenými a sporadickými mutacemi v řadě aspektů včetně genových oblastí, tzv. „hot spots“, ve kterých vznikají.

Zdá se, že existuje stále značný prostor pro nalézání nových predispozičních mutací u AML, jak ukázala analýza 95 rodin s AML a též s myelodysplastickými syndromy (MDS), které byly charakterizovány NGS myeloidním panelem [NGS, next-generation sequencing]. Asi polovina germinálních mutací byla zjištěna v již dříve s AML asociovaných genech. U zbylé poloviny byl aplikován exomový přístup [WES, whole-exome sequencing], avšak ve výsledku došlo prozatím u každého pacienta k identifikaci desítek suspektních germinálních variant, jež vyžadují následné analýzy a validace. Velmi důležité je uvědomit si i limitace přístupu NGS, jimiž jsou u některých pacientů exis-

tující intragenní delecce, jež lze charakterizovat např. pomocí komparativní genomové hybridizace [CGH, comparative genome hybridization]. Latence vzniku AML a redukovaná penetrance pro příbuzné nosiče germinálních variant patří mezi důležité faktory. Existují rodiny, kde jsou někteří členové nesoucí mutaci v době analýzy zcela asymptomatictí. Existují i určité kompenzační aktivity zdravých alel, mezi které patří epigeneticky ovlivněná nadprodukce exprese z nemutované alely. Některé mutace vyvolávají genetické kompenzace, například mutace v oblasti *SAMD9L* na chromozomu 7 vede k indukované delecí chromozomu 7 či až k monosomii 7 [Pastor, Sahoo, et al. 2018]. Jak lze správně monitorovat germinální změny u hematologických onemocnění? Jistě by měly být dosud identifikované genetické cíle germinálních změn (*ACD*, *ANKRD26*, *ATG2B*, *CEBPA*, *DDX41*, *ETV6*, *GATA2*, *RUNX1*, *SRP72*, *TERC* a *TERT*) sledovány společně se somatickými mutacemi, a to včetně zapojení globálních přístupů [WES], jelikož identifikace rodin nesoucích predispozici k AML by měla vést ke klinickým rozhodnutím stran použití genotoxické terapie či zařazení mezi dárce tkání.

Leukemické kmenové buňky a jejich mikroprostředí

Ke studiu leukemických buněk je zapotřebí disponovat modely,

jež budou vhodné ke studiu patogeneze a testování nových léků. Takovými modely byly v minulosti leukemické buněčné linie, avšak problém tohoto přístupu je, že většinu leukemií nelze přenést do kultury, a proto mají výsledky na buněčných liniích jen omezené využití. Důvod této nižší frekvence *in vitro* transformace spočívá především v tom, že se vzorkem leukemie není přeneseno mikroprostředí kostní dřene, ve kterém se leukemické buňky přirozeně nalézají. Cílem je tedy dle přednášky M. Raaijmakerse [Erasmus Cancer Institute, Rotterdam] porozumět vztahu nádoru a mikroprostředí, mj. mezenchymálním kmenovým buňkám (MSC), endoteliálním či osteogenním buňkám. Tento fakt podporuje zjištění, že kotransplantace MSC s nádorovými buňkami MDS/AML signifikantně zvyšuje pravděpodobnost přihojení leukemie v myši [Medyouf, Mossner, et al. 2014]. Naopak, narušení mikroprostředí zablokuje vznik trilineární myelodysplazie v myši a následně AML v modelech pro Diamond-Shwachmannův syndrom. Dalšími důležitými buňkami mikroprostředí jsou osteogenní progenitory, jejichž narušení vede též k narušení krvetvorby. Zdá se, že mezi významné signální dráhy v MSC patří dráha WNT obsahující β -katenin a APC. V MSC byl dále ve vztahu k myelodysplazii zjištěn expresní program zánětu, jenž může vést až ke genotoxicitě v hematopoetických kmenových buňkách mechanismem aktivace reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a k zablokování buněčného cyklu v G0-G1 fázi. Mediátorem tohoto procesu může být i mo-

lekula vápník vázající extracelulární S100 protein s názvem S100A8/A9 a dále též senzor genového poškození a transkripční faktor p53. Tento předpoklad potvrzuje expresní profil S100A8/A9 v buňkách mikroprostředí ve vztahu k transformaci do AML u myelodysplastických pacientů [Zambetti, Ping, et al. 2016]. Dalším příkladem je onemocnění juvenilní myelomonocytární leukemií (JMML), jejíž vztah se zánětem v MSC a především s jejich mutačním profilem byl prokázán [Dong, Yu, et al. 2016]. Další práce ukazují, že narušení mikroprostředí mezenchymálních a vaskulárních buněk (tzv. „niche“) je pravděpodobně jedním z induktorů leukemogeneze [Duarte, Hawkins, et al. 2018].

Jak klinicky stratifikovat pacienty s myeloidními malignitami podle mutačních profilů?

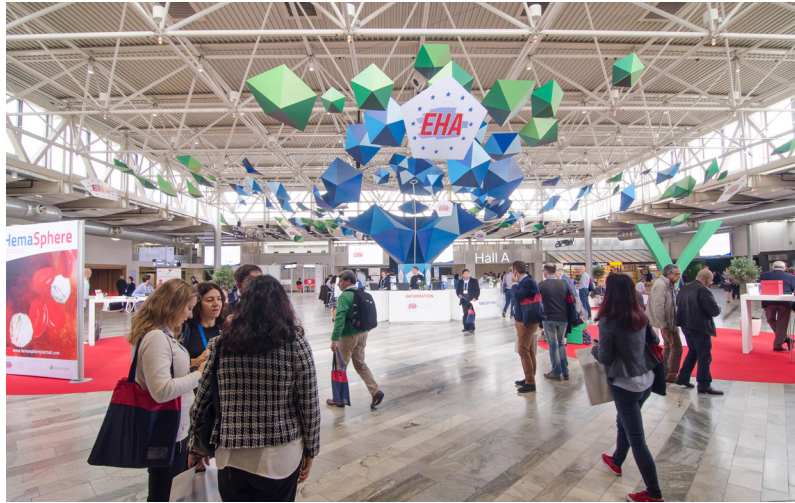
M. Cazzola [Universita Pavia] představil aktuální pohled na využití mutačních profilů. Zatímco současné metody zlatého standardu v hematologii povětšinou zahrnují cytologii a cytogenetiku, až nyní se dostávají do popředí molekulární metody. Cytogenetika detekuje změny asi u 50% pacientů, avšak u molekulárních analýz se dostáváme nad 90%. Navíc se zdá, že somatické mutace u predispozičních stavů mají značný dopad a jejich zjišťování se dostává do popředí zájmu zdravé populace. Kwok a spoluautoři [Kwok, Hall, et al. 2015] odhalili ve své práci mutační překryv mezi MDS a stavy často spojenými s některými symptomy označovanými jako pre-MDS. Některá doporučení pro posuzování mutací ve vztahu k alelické frekvenci mutací VAF (> 2%) byly pro MDS navrženy

s cílem posoudit, zda se zjištěné mutace nacházejí v dominantním klonu. Překvapivě, velmi malé procento pre-MDS přechází v hematologickou malignitu, což ukazuje na vliv stochasticity v průběhu leukemogeneze. Druhou možností je, že zjištěné mutace u pre-MDS nemusejí mít charakter tzv. „driver“ mutace. Mutace v myeloidních genech již také ovlivňují novou WHO klasifikaci myeloidních malignit, mj. se zapojením predispozičních mutací (např. *GATA2*, *CEBPA*). Některé mutace mají značný prognostický význam (*TP53* a *SF3B1*) [Malcovati, Papaemmanuil, et al. 2011]. Mutace v genu sestřihového aparátu, *SF3B1*, mohou usnadnit identifikaci MDS pacientů s prstenčitými sideroblasty, jež dobře odpovídají na léčbu luspatercetem [Platzbecker, Germing, et al. 2017]. Dále, existuje zjevný překryv mezi mutacemi *TP53* a monosomiemi či komplexními změnami, což naznačuje, že některé mutace mohou být induktory cytogenetických změn. Počet mutací se zdá být v souladu s agresivitou nemoci [Papaemmanuil, Gerstung, et al. 2013]. Mutace v *TP53* mohou též signalizovat potenciální refrakternost terapie 5q- syndromu lenalidomidem. Klony s mutacemi *TP53* mohou teoreticky též odpovídat na terapii decitabinem či jinými inhibitory DNMT (DNMTi). Mutace zjišťované u MDS a AML jsou nadále klíčovým ukazatelem vrozených predispozičních stavů – v jejich identifikaci a odhadu odpovědi na léčbu. Současná literatura ukazuje na nezastupitelný význam rutinního zjišťování molekulárních změn v klinickém provozu u myeloidních malignit,

a to ve všech zásadních terapeutických přístupech.

Epigenetická terapie u AML

Z přednášky A. Weie [Alfred Hospital, Melbourne] vyplývá, že terapeutické cílení na mechanismy určující strukturní vlastnosti chromatinu je pro odstranění AML buněk významné. Chromatinová struktura je organizována v nukleozomech a též v komplexnějších strukturách, tzv. solenoidech, které v sebe přecházejí na základě relaxačních či kondenzačních signálů rozličných epigenetických modifikací. V tomto procesu hrají roli enzymy: histonové deacetylázy a acetylázy HDAC/HAT, DNA metylázy a demethylázy DNMT/DNMD a histonové metylázy a demethylázy HMT/HMD. Řada z těchto enzymů je cílem mutací u AML či myelodysplazií (MDS a MDS/MPS). Zatímco některé mutace u AML vznikají v průběhu nemoci během selekce na chemoterapii, jiné, a zdá se že většina, jsou zjištěny jen v malé frekvenci již při diagnóze. Starší pacienti s AML mají více mutací ve srovnání s mladšími pacienty, protože jsou navýšeny o mutační vzorec stárnutí. U těchto starších pacientů s AML je léčba s DNMTi efektivní terapií první volby. Konkrétně decitabin (DEC) se jeví jako relativně účinný lék pro klony s mutací *TP53* (Welch, Petti, et al. 2016). Zdá se, že DEC může být též velmi dobrým induktorem pro kompletní hematologickou remisi (CR, complete remission) u AML. Byly studovány i některé nové DNMTi, např. guadecitabin, typický pro svoji stabilitu, avšak prozatím se zcela nepodařilo zlepšit výsledky získané u klasických hypometylačních agens (HMA).



Ilustrační obrázek – Used with permission of the European Hematology Association. All rights reserved. © European Hematology Association

Otázkou tedy zůstává, jak jinak lze zlepšit výsledky s DNMTi? Jak vyřešit rezistenci na HMA? Stále nevyjasněnou otázkou je, zda přidání další terapie k DNMTi patří mezi nejlepší možné přístupy? Zda využít kombinaci s vybranými kinázovými inhibitory: sorafenibem, midostaurem, ponatinibem? Eventuálně, zda lze zvýšit vliv HMA pomocí inhibice BCL2 venetoklaxem? Prozatím to studie menšího rozsahu zcela nenaznačují, i když konkrétně u kombinatorní léčby azacitidinem (AZA) + venetoklaxem (VEN) panuje značný optimismus. Mezi alternativní přístupy terapie AML patří ovlivnění exprese epigenetických enzymů (EZH2, LSD1, PRMT5, DNMT, HDAC). Určitý přístup reprezentuje kombinace AZA + panobinostat (PAN) (HDACi), avšak prozatím též ve studiích menšího rozsahu bez očekávaného benefitu. Další možností je pracinostat, aktuálně v kombinaci s AZA. Vedlejší produkt terapie HMA je vyšší produkce neoantigenů po léčbě s DNMTi,

což může být využito v následném zapojení checkpoint inhibitorů. Příkladem je výše zmíněný pozitivní efekt kombinace nivolumabu (NIVO) + AZA. Dalším přístupem je zapojení inhibitorů IDH (IDH, isocitrát dehydrogenáza) a omezení patogenetického vlivu 2-HG (2-hydroxy glutarátu), jež negativně ovlivňuje aktivitu TET2 a Jumonji-H3K27 demethyláz. Příkladem je enasidenib (IDH2i), jež efektivně indukuje molekulární remisi, či ivosidenib (IDH1i). Dalším cílem terapie může být jaderný enzym LSD1, jež blokuje prodiferenční transkripční faktory, mj. PU.1, a tedy LSD1i, například v kombinaci s kyselinou all-trans-retinovou (ATRA) mají potenciál v diferenciací terapii. Dalším cílem je jaderný enzym DOT1L, který má též svůj inhibitor (pinometostat) procházející studií fáze I. Dalším přístupem jsou BET inhibitory zacilující na bílkoviny obsahující tzv. bromodomény. Závěrem, přestože je cílem dostat do studií řadu nových léků, ty jsou aplikovány

již značně předlěčeným pacientům s významně komplexními změnami, což limituje i pravděpodobnost zjištění jakéhokoli pozitivního léčebného účinku.

Recentní vývoj v imunoterapii AML

M. Subklewe [Klinikum der Universität, Mnichov] ve své přednášce představila koncepty současné imunoterapie AML. Důvodem pro rozvoj alternativních přístupů terapie je známý fakt, že přežívání u AML je trvale nízké, což je mimo jiné i ovlivněno tím, že 50 % mladých a 85 % dospělých pacientů relabuje. Otázkou a klíčovým cílem tedy je, jak eradikovat chemorezistentní AML buňky. Je obecně známo, že mezi úspěšné imunoterapeutické přístupy v prevenci relapsu patří použití T-buněk z DLI (donor lymphocyte infusion) po transplantaci kostní dřeně. Na tomto podkladě lze vyvinout strategie pro buněčné rozpoznání a odstraňování klonů AML. Strategie obsahují tyto přístupy: a) odblokování T-buněk (checkpoint inhibice); b) indukce existujících T-buněk; c) „inženýrování“ T-buněk. Monoterapie zaměřená na „checkpoint“ bílkoviny PD-1 a PD-L1 (využívající leukemické buňky pro odblokování imunitní antileukemické kontroly) však nebyla dosud významně úspěšná, jedním z vysvětlení je, že AML mají relativně méně mutací ve srovnání se solidními tumory a rovněž že PD-L1 není exprimován na buňkách AML na počátku onemocnění. Checkpoint inhibitory nivolumab (NIVO) a ipilimumab (IPI) byly tedy kombinovány s DNMTi, konkrétně s AZA; např. AZA + NIVO a byl zjištěn efekt prodlužující celkové přežívání

(OS, overall survival) a celkovou četnost odpovědí (ORR, overall response rate) u r/r (relabující a rezistentní) AML, prozatím však jen ve studiích menšího rozsahu. Předpokládaná spolupráce checkpoint inhibitorů a AZA garantuje jistý příslib pro následné studie. Z dalších přístupů je nyní zkoušena vakcinace s manipulovanými dendritickými buňkami, jež vedla k indukci antigen specifických T-buněk s cílem omezit růst nádorové masy u předlěčených pacientů. Tato strategie se dle prozatímních dat jeví jako bezpečná. Nabízejí se také následující možnosti: využití fúzních buněk DC-AML (dendritických buněk s AML myeloblasty), či tvorba TCR transgenních T-buněk s WT1 specificitou, nebo cílení imunoterapie na povrchové myeloidní antigeny, CD33 a CD123, jelikož jsou ubikvitně exprimovány u AML pomocí CD33/CD3 bispecifických protilátek (AMG 330) (Krupka, Kufer, et al. 2014). Lintuzumab cílící na CD33 nepřinesl významný úspěch, naopak gemtuzumab ozagamicin, představující monoklonální protilátku anti-CD33 vázanou s cytotoxickým lékem (kalicheamicinem), je úspěšně testován u AML, kde vykazuje pozitivní vliv na OS u relabovaných pacientů, prozatím ve studiích menšího rozsahu. Další postup tvoří bispecifické protilátky (CD33/CD3) přidávané k 3 + 7 režimu, aktuálně zkoumané ve studii zaměřené na r/r AML. Problém této strategie však může představovat významná hematologická toxicita (neutropenie). Prozatím nejsou známy konečné výsledky studií s bispecifickými protilátkami, avšak předběžné výsledky naznačují jejich relativně vysoký

klinický přínos. Také chimerické antigenní receptorové T-buňky (CAR T) aktuálně procházejí fází I studií AML menšího rozsahu. Mezi známé přístupy patří cílení na antigen CD123. Probíhá rozbor vedlejších účinků. Nyní dochází též k masivnímu využití proteomiky k identifikaci nových cílů chemoterapie u AML (Perna, Berman, et al. 2017). Podrobné strategie pro imunoterapii AML jsou recentně též shrnuty (Lichtenegger, Krupka, et al. 2017).

Nové přístupy v léčbě myeloidních malignit s rizikem transformace do AML

Z přednášky U. Platzbeckera [Dresden University] vyplývá, že mezi základní přístupy u MDS patří stratifikace dle rizika přechodu do AML. Nízkorizikové nemoci jsou léčeny symptomaticky, zatímco u rizikových pacientů hraje roli diferenciací a cytoreduktivní terapie. Cytokiny, EPO-alfa a darbopoetiny, jsou významnými induktory erytroidní odpovědi. V tomto mohou hrát roli i další látky inhibující inflamozom, které zahrnují i TNF (tumor necrosis factor), jež patří mezi silný faktor pro vznik cytopenií u MDS. Dalšími faktory jsou tzv. myeloidní supresorické buňky (MDSC), jež lze inhibovat pomocí zacílení na CD33. Vhodným lékem může být v tomto směru lenalidomid. Překvapivě EPO příliš neposílil efekt AZA v kombinační léčbě, což naznačuje, že obě tyto látky mají jiné buněčné cíle. Využívá se také aktivace endogenní produkce EPO. Příkladem je roxadustat blokuující HIF1a. Další strategií je použití krátkodobě nízké dávky HMA u nerizikových pacientů s časným rozvojem

MDS. Aplikovat lze rovněž inhibitory aktivinového receptoru (luspatercept/sotatercept) pro terapii anemií u MDS s mutací *SF3B1*. V případě trombocytopenií jsou nyní u nerizikových MDS pacientů zkoušeny romiplostin/eltrombopag, a to včetně kombinací s AZA.

V případě rizikových pacientů je HMA (AZA či decitabin [DEC]) přístup zcela dominantní pro ty, kteří nejsou indikováni k alogenní transplantaci. Též je zkoušen stabilnější HMA analog, guadecitabin. Recentně se zdá být velmi nadějná kombinace HMA + VEN, nyní zkoumaná ve studii většího rozsahu. U starších pacientů s AML se používá také AZA + pevonedistat (PEV). Dále je u pacientů s MDS/AML zkoušen inhibitor proteinu hedgehog. Jedním z přístupů pro testování strategií léčby u MDS je tzv. „pick a winner“, při kterém se s AZA zkoušejí postupně různé látky. V případě selhání léčby HMA je minimální odhad přežití. Pro tyto případy platí, že čím intenzivnější přístup je přijat, tím větší je počet úmrtí ve vztahu k léčbě. Nyní je v tomto směru zkoušen rigosertib, jenž má, jak se zdá, mírně pozitivní efekt, avšak finální data nejsou k dispozici. Některé další molekulární cíle: *FLT3*, *TP53/MDM2*, *BCL2*, *AXL* ukazují na budoucnost léčby specifickými inhibitory.

Epigenetická demetylační terapie někdy vede k déle trvajícím remisím, a proto se výzkum soustředí na vývoj účinnějších léků tohoto typu, jak shrnul M. Luebert [Freiburg University]. U některých pacientů, kteří odpovídali na HMA terapii, byla zjištěna monosomie 7, patřící mezi vyso-

ce agresivní molekulární znaky. Navíc, HMA terapie je řazena mezi základ pro kombinatorní studie hledající synergistický či aditivní efekt, příkladem je třeba přidání venetoklaxu. Mezi léky zvyšující aktivitu HMA-DEC a prodlužující přežívání patří též ATRA. Je pravděpodobné, že ATRA účinkuje jako inhibitor vznikající rezistence na HMA. HMA-AZA má pravděpodobně efekt ve spolupráci s DLI v prevenci relapsu po transplantaci [Steinmann, Bertz, et al. 2015]. Zdá se, že kombinace HMA-DEC může být ovlivněna pomocí vitamínu C, a to ve vztahu k produkci neoantigenů. Kombinace HMA-AZA má též význam pro přípravu, tzv. přemostění („bridging“), k alogenní transplantaci [Lubbert, Bertz, et al. 2013], dále je toto téma řešeno v EORTC studii pro indukční terapii u AML [AML 21: 3 + 7 vs. DEC].

Na EHA konferenci byly též prezentovány výsledky studie **ATRA + oxid arsenitý (ATO)** u pacientů bez vyššího rizika s akutní promyelocytární leukemií – L. Ciccaroni [Řím]. Předchozí studie AML17 AIDA vs. ATRA-ATO ukázala větší přínos u ATRA-ATO. Nynější studie APL0406 byla provedena na 276 pacientech ATRA-ATO vs. ATRA-chemo. Výsledky: EFS (event free survival) 96,6 vs. 77,4%, OS 98 vs. 89,8%, DFS (disease free survival) 96,6 vs. 79,8% hovořily rovněž pro ATRA-ATO. Také incidence relapsů 15,5 vs. 1% ukázala na nesporný význam kombinace ATRA-ATO.

Studii fáze II SL-401 zaměřenou na malignity blastických plazmacytoidních a dendritických buněk (BPDCN) prezentoval N. Pemmaraju [MD Anderson

CC, Texas]. BPDCN je nečetné onemocnění, agresivní zejména ve dřeni, kůži a uzlinách, z čehož vyplývá i design testování terapeutické odpovědi včetně PET-CT. Přežití je 10–14 měsíců. Terapie zaciluje na IL3Ra (tagraxofusp), do studie bylo zahrnuto celkem 42 pacientů, u tří čtvrtin z nich vedla uvedená terapie k odpovědi, u poloviny došlo ke kompletní remisi. Tato terapie byla též využita pro přemostění pacientů s CR před alogenní transplantací.

S výsledky **studie LI-1 LD-ARAC s tosedostatem** u starších pacientů s AML seznámil M. Dennis [Manchester]. Tosedostat, proteazomový inhibitor aminopeptidáz, je dobře tolerovaný lék. Studie se týkala starších pacientů s r/r AML (medián sledování 24 měsíců, medián věku 76 let). CR/CRi bylo 24 vs. 14% pro kombinovanou léčbu, zatímco známky toxicity byly v obou ramenech podobné. Čas do relapsu byl v obou ramenech podobný. Pacienti, kteří dosáhli CR, měli delší přežívání.

Nově vyvíjené epigenetické léky a jejich cíle

Epigenetické mechanismy včetně rozličných enzymatických procesů jsou reverzibilní, a proto jsou i atraktivním cílem rozličných léků. F. Prosper [Universidad de Navarra, Pamplona] představil řadu terapií postavených na tzv. malých molekulách, z nichž některé jsou aktuálně ve vývoji, jiné již v praxi. Příkladem jsou nově vyvíjené **inhibitory metylace DNA (DNMTi) a histonů (HMTi)**. Zajímavou kategorií jsou duální inhibitory: proti G9a-HMT a DNMT1. „Pipeline“ obsahovala vedle designu

in vitro a *in vivo* také testování včetně zjištění IC50 (inhibiční koncentrace s 50% účinkem) a toxicity. Biochemické profilování knihovny siRNA vedlo k identifikaci účinných inhibitorů včetně molekuly CM272, vedoucí k inhibici proliferace a indukci apoptózy u AML linií. CM272 inhibuje účinně DNMT1 a DNMT3B v koncentraci 300 nM. Mechanismus účinku obsahuje aktivaci odpovědi na interferon, jež imunologickým mechanismem zablokuje nádorový růst. *In vivo* experimenty potvrdily protinádorový efekt. Myší model MLL-AF9 byl použit pro testování CM272 společně s checkpoint inhibitory PD-1 a PD-L1. Další citlivé tumory byly mj. linie uroteliálního karcinomu v jednotkách mikroM koncentrace. PDX (patient derived xenograft) model pro uroteliální karcinom byl použit, aby ukázal vliv CM272 na rozvoj metastáz včetně prodloužení přežívání těchto PDX myší, u nichž došlo k aktivaci interferonové odpovědi. Ta prokázala, že CM272 indukoval imunitně mediováný antitumorový efekt. Tato práce, kde jsou výsledky podrobně prezentovány a shrnuty, byla recentně publikována (San Jose-Eneriz, Agirre, et al. 2017).

V sekci vývoje nových epigenetických léčiv představila L. Altucci [Institute of Genetics and Biophysics, Neapol] též **inhibitory histonových modifikací**. Epigenetické modifikace jsou totiž biomarkery nádorového procesu a představují oblast překryvu genomu s epigenomem v průběhu nádorové transformace. Histonové modifikace jsou tvořeny a odstraňovány klíčovými epigenetickými enzymy,

jež jsou často cílem somatických mutací. Předmětem výzkumu je t(15,17) podtyp AML: APL, jež je aktuálně léčena kombinací ATRA-ATO, přestože výjimečně dochází k rozvoji vysoce agresivní, tzv. aAPL. U této aAPL formy jsou vazebná místa pro PML/RARA na DNA hyperacetylované. Cílem bylo tedy vytvořit látku blokující acetylaci zmíněných cílových oblastí. Design byl zaměřen na duální inhibici represivní modifikace H3K27Me a aktivační modifikace H3K27Ac. Nový inhibitor, jež má duální aktivitu jako HATi a EZH2i, vede k poklesu histonové acetylace (MC2884), prokazatelně inhibuje acetylaci v nízké mikromolární koncentraci *in vitro*, indukuje apoptózu a je funkční také v PDX modelu zmíněného podtypu leukemie.

IL1RAP je membránový protein exprimovaný na kmenových buňkách. Byly vyvinuty **protilátky (Ab) proti IL1RAP**, jak ukázal D. Mitchell [New York]. Byl také vytvořen myší KO model pro IL1RAP. Zacilení na IL1RAP s monoklonálními a polyklonálními protilátkami (mAb a pAb) inhibuje růst a proliferaci AML nádorových linií. IL1RAP je exprimován u AML v diagnóze, ale i při relapsu. V buněčném modelu s FLT3-ITD měly neutralizující protilátky vliv na odstranění FLT3-ITD buněk a signální dráhu FLT3-ITD (Mitchell, Barreyro, et al. 2018). Fyziologická dráha IL1RAP též obsahuje KIT signální dráhu. Závěrem, model IL1RAP jako terapeutický cíl AML obsahuje regulační kontrolu signálních drah FLT3 a KIT.

M. Chapellier [University of Lund] prezentovala ve své před-

nášce některé nové **cytokinové terapie AML**. Byl proveden globální screening kmenových AML buněk na cytokiny: nejprve byly buňky označeny tzv. bar kódy, následovala kultivace s různými cytokiny, poté došlo k jejich injekci do PDX modelů. Po připojení byly buňky izolovány a sekvenovány pomocí NGS, tím se zjistilo, jaký cytokin měl hlavní roli v přežívání nádorových buněk. Došlo tak k identifikaci TNF SF13, jež selektivně podporuje růst AML buněk. Data byla validována na myším modelu. Následně byl vytvořen KO (knockout) model v myši vedoucí k poklesu GMP (granulocytárních monocytárních progenitorů). Sekvenováním bylo zjištěno, že některé signální dráhy kooperují s TNFSF13 včetně dráhy TNF alfa.

Signální **dráha fosfoinositidů představuje cíl protinádorové terapie** zahrnující například PI3K, jak sdělil v přednášce A. Woolley [University of Toronto]. INPP4B je součástí této dráhy. Exprese INPP4B je zvýšená u progenitorů některých AML pacientů s horší prognózou. Byl vytvořen myší KO model pro INPP4B, který má zjevný deficit v myelopoéze. V modelu MLL-AF9 má KO INPP4B signifikantní vliv na pokles AML rysů (pokles počtu myeloblastů a vyšší zapojení myeloidní diferenciace) včetně prodloužení přežívání postižených myší s AML a vyšší senzitivity na cytarabin. Data dále naznačují vliv KO modelu na hladinu PI(3)-fosfátu, nadprodukce INPP4B zvyšuje PI(3)-fosfát a posiluje mechanismus autofagie skrze hladinu kalcia.

Sekundární AML: biologie, epidemiologie a epigenetická terapie

Sekundární AML (sAML), jak prezentoval T. A. Graubert [Boston], vznikají po proběhlém MDS, či myeloproliferativní nemoci (MPN), dále u selhání kostní dřene, či jako následky léčby – „therapy-related“ (tAML) – po radioterapii nebo chemoterapii pro solidní tumory. Jak často ovlivňují germinální varianty vznik AML? Publikace (Wartiovaara-Kautto U, Hirvonen Elina AM, et al. 2018) ukazuje, že nejméně v 10% všech případů AML. Vedle predispozičních syndromů je dalším faktorem kondice („fitness“) křivky, a to zejména poruchy vznikající během stárnutí, kdy dochází k řadě pre-MDS a pre-AML stavů (ARCH, CHIP, CCUS, ICUS), jež jsou charakterizovány rozličnými genetickými, ale i fenotypovými změnami okrajového významu, avšak s potenciálem transformace do agresivní nemoci. Modely pro vznik sAML jsou uvedeny v souhrnném článku (McNerney, Godley, et al. 2017). Aktuálně je tedy cílem intenzivní screening perzistujících klonů, jejich analýza ve vztahu k terapeutické citlivosti/rezistenci a dále i zvážení takové terapie, která pokryje i preexistující minoritní klony.

Definice sAML zahrnuje předchozí hematologické klonální nemoci či cytoreduktivní terapii, jak zaznělo v prezentaci L. S. Granfeldt Østgård [Aarhus University]. Klinická studie v Dánsku mezi lety 2005–2015 ukazuje na 20% incidenci sAML a 7% tAML, zatímco zbylé tři čtvrtiny jsou *de novo* AML. sAML jsou povětšinou následky MDS,

především CMML a EB2. 70% sAML je normálního karyotypu, 90% obsahuje cca 3 somatické mutace (v případě CMML v genech *TET2*, *ASXL1*, a *SRSF2*). Dalším ukazatelem přechodu do AML může být i progresse myelofibrózy. CPSS-Mol představuje rizikové skóre pro CMML, zahrnující tyto parametry: WBC, MB, transfuze a mutace včetně *ASXL1*. Riziko transformace u myeloproliferativních nemocí (MPN) je značně nižší než u MDS: ET1 2%, PV 7%, MF 11%. Hydroxyurea a interferon nejsou asociovány se vznikem AML a též neovlivňují výsledky terapie u sAML, jelikož k transformaci dochází i u dosud neléčených pacientů s MPN. Mezi typické geny u MPN vykazující asociace s sAML patří: *CALR*, *RUNX1*, *TET2*, *TP53*. Jaký je osud MPN-sAML? Je velmi špatný, průměrné přežívání činí (MedOS) 6,6 měsíce a v případě léčby intenzivní terapií až 9,4 měsíce. Pro MDS-AML jsou však klinická data ještě horší.

Pacienti s sAML jsou většinou starší, mohou mít germinální predispozice, CHIP, předchozí protinádorovou léčbu, orgánovou dysfunkci, remisi předchozí hematologické malignity, jak shrnula M. T. Voso [University of Roma]. Dohromady tvoří tAML a sAML asi čtvrtinu AML. Přežívání této skupiny je horší ve srovnání s *de novo* AML (Roman, et al. Cancer Epidemiol 2016). Prognostika sAML obsahuje karyotyp (1/4 je komplexní, 1/3 je však normální) a také další parametry včetně těch klinických (rovněž integraci v IPSS-R). Mezi významné prediktory vzniku sAML patří mutační stav *TP53*

[Lindsley, NEJM 2015 a 2017], zatímco mutace *ASXL1*, *TET2* a *DNMT3A* vzhledem k asociaci v klonální křivce středního potenciálu (CHIP) nebyly v tomto směru sledovány. Některé sAML mají vzácné chromozomální translokace: asi 10% tAML jsou tzv. tAPL, jež jsou stále výrazně senzitivní na ATRA/ATO. Terapie sAML též obsahuje standardní léčbu včetně AZA, avšak s horšími výsledky, nicméně je stále superiorním přístupem pro starší pacienty nevhodné k transplantaci (Sengsayadeth, Labopin, et al. 2018). Nové léky pro sAML jsou mj. CPX-351 s lipozomální modifikací standardních léků (ARAC) (Cortes, et al. Lancet 2014), jež se zdá účinnější ve srovnání s indukci 3 + 7. Dalším účinným lékem je ABT-199 (VEN) v kombinaci s DEC, frekvence navozených CR je cca 70%. Přednášky o sAML souhrnně ukázaly klinickou závažnost a relativně četný výskyt ve skupině AML pacientů.

prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.
BIOCEV a 1. interní klinika 1. LF UK
a VFN, Praha
e-mail: tomas.stopka@lf1.cuni.cz

Autor participuje na národním projektu udržitelnosti center výzkumu LQ1604.

Literatura

- DONG L, YU WM, ZHENG H. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature*, 2016, 539(7628): p. 304–308.
- DUARTE D, HAWKINS ED, AKINDURO O, et al. Inhibition of Endosteal Vascular Niche Remodeling Rescues Hematopoietic

- Stem Cell Loss in AML. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(1): p. 64–77 e66.
- KOBAYASHI S, KOBAYASHI A, OSAWAY, et al. Donor cell leukemia arising from preleukemic clones with a novel germline DDX41 mutation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*, 2017, 31(4): p. 1020–1022.
 - KRUPKA C, KUFER P, KISCHEL R, et al. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330. *Blood*, 2014, 123(3): p. 356–365.
 - KWOK B, HALL JM, WITTE JS, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*, 2015, 126(21): p. 2355–2361.
 - LANCET JE, CORTES JE, HOGGE DE, et al. Phase 2 trial of CPX – 351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. *Blood*, 2014, 123(21): p. 3239–3246.
 - LICHTENEGGER FS, KRUPKA C, HAUBNER S, et al. When azanucleoside treatment can be curative: nonintensive bridging strategy before allografting in older patients with myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2013, 31(6): p. 822–823.
 - MALCOVATI L, PAPAEMMANUIL E, BOWEN DT, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2011, 118(24): p. 6239–6246.
 - McNERNEY ME, GODLEY LA, Le BEAU MM. Therapy – related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): p. 513–527.
 - MEDYOUF H, MOSSNER M, JANN JC, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(6): p. 824–837.
 - MITCHELL K, BARREYRO L, TODOROVA TI, TAYLOR SJ, et al. IL1RAP potentiates multiple oncogenic signaling pathways in AML. *J Exp Med*, 2018, 215(6): p. 1709–1727.
 - PAPAEMMANUIL E, GERSTUNG M, MALCOVATI L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2013, 122(22): p. 3616–3627; quiz 3699.
 - PASTOR VB, SAHOO SS, BOKLAN J, et al. Constitutional SAMD9L mutations cause familial myelodysplastic syndrome and transient monosomy 7. *Haematologica*, 2018, 103(3): p. 427–437.
 - PERNA F, BERMAN SH, SONI RK, et al. Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML. *Cancer Cell*, 2017, 32(4): p. 506–519 e505.
 - PLATZBECKER U, GERMING U, GOTZE KS, et al. Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. *Lancet Oncol*, 2017, 18(10): p. 1338–1347.
 - SAN JOSE-ENERIZ E, AGIRRE X, RABAL O, et al. Discovery of first-in-class reversible dual small molecule inhibitors against G9a and DNMTs in hematological malignancies. *Nat Commun*, 2017, 8: 15424 p.
 - SENGSAYADETH S, LABOPIN M, BOUMENDIL A, et al. Transplant Outcomes for Secondary Acute Myeloid Leukemia: Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation Study. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24(7): p. 1406–1414.
 - SMITH ML, CAVENAGH JD, LISTER TA, et al. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2004, 351(23): p. 2403–2407.
 - SONG WJ, SULLIVAN MG, LEGARE RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*, 1999, 23(2): p. 166–175.
 - STEINMANN J, BERTZ H, WASCH R, et al. 5-Azacytidine and DLI can induce long-term remissions in AML patients relapsed after allograft. *Bone Marrow Transplant*, 2015, 50(5): p. 690–695.
 - WARTIOVAARA-KAUTTO U, HIRVONEN EAM, PITKANEN E, et al. Germline alterations in a consecutive series of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2018, Epub ahead of print.
 - WELCH JS, PETTI AA, MILLER CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*, 2016, 375(21): p. 2023–2036.
 - ZAMBETTI NA, PING Z, CHEN S, et al. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(5): p. 613–627.