

# FLT3 mutácie u pacienta s AML: incidencia, možnosti diagnostiky a vplyv na manažment liečby

MUDr. Eva Mikušková, PhD.<sup>1</sup>, RNDr. Renata Lukačková<sup>2</sup>, RNDr. Imrich Hikkel, PhD.<sup>3</sup>, Mgr. Michaela Zrubcová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika onkohematológie LF UK, Národný onkologický ústav, Bratislava

<sup>2</sup>Oddelenie klinickej genetiky, Medirex, a. s., Bratislava

<sup>3</sup>Oddelenie lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav, Bratislava

**Úvod:** Akútna myeloblastová leukémia (AML) je klonové malígne ochorenie krvotvorby prevažne staršieho veku. Jeho výsledkom je hromadenie abnormálnych nezrelých buniek v kostnej dreni. Tieto bunky narušujú normálnu krvotvorbu, prenikajú do cirkulácie a môžu infiltrovať aj iné orgány. Kedysi fatálne ochorenie je dnes vyliečiteľné u 35 – 40 % mladších pacientov. Zaujímavou mutáciou s negatívnym vplyvom na prežívanie pacientov je mutácia tyrozínkinázy Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3) s opisovanou incidenciou v literatúre okolo 30 % u novodiagnostikovaných pacientov s AML.

**Súbor pacientov a metódy:** Retrospektívne sme analyzovali výsledky pacientov v SR z obdobia dvoch rokov – z dvoch genetických pracovísk s celonárodnou pôsobnosťou. Realizovali sme vyšetrenie mutácií FLT3 génu: FLT3-ITD a FLT3-TKD kodón D835 u 364 pacientov s novodiagnostikovanou AML v období rokov 2016 (189 pacientov) a 2017 (175 pacientov).

**Výsledky:** Identifikovali sme celkovo 44 pacientov s pozitívou FLT3-ITD a 18 pacientov s pozitívou FLT3-D835. Spolu to predstavuje 62 pacientov s mutáciou FLT3: 33 pacientov bolo zachytených v roku 2016 a 29 v roku 2017. V našom súbore sme zistili 17 % ročnú incidenciu z celkového počtu novodiagnostikovaných AML (17,4 % v roku 2016; 16,5 % v roku 2017). V porovnaní s literárnymi údajmi máme nižšiu incidenciu. Tento fakt si vysvetľujeme rôznou citlivosťou metodiky vyšetrení v jednotlivých krajinách, veľkosťou súboru, ale aj genetickou populačnou variabilitou, vekom pacientov a faktormi prostredia. V súčasnosti stanovujeme už aj tzv. alelovú záťaž génu (pomer mutant/wild type).

**Záver:** AML vzniká často na podklade rekurentných genetických zmien, ktoré predstavujú možné terapeutické ciele. Pochopenie biológie ochorenia a vývoj nových liekov je predpokladom zásadného zlepšenia prognózy. Do liečby AML sú inkorporované nové cieľové lieky, ktoré zmenili liečebné výsledky u definovaných skupín pacientov, ako napr. midostaurín, gemtuzumab ozogamicín v 1. línii liečby a enasidenib v liečbe relaps/refraktérnej AML. Je schválená aj nová lipozomálna forma daunorubicínu/cytarabínu, ktorá môže zmeniť štandard liečby u starších pacientov.

**Vysoká frekvencia FLT3 mutácií a ich prognostická relevantnosť u dospelých i detských AML z nich robí vhodný terapeutický cieľ.**

**Kľúčové slová:** akútna myeloblastová leukémia, mutácia FLT3, incidencia, FLT3-ITD, FLT3-D835

## FLT3 mutations in AML: incidence, diagnostics options and its impact on treatment management

**Purpose:** Acute myeloid leukemia (AML) is clonal hematologic malignancy occurring mainly in elderly population, resulting into clonal expansion of myeloid blasts in the peripheral blood, bone marrow, circulation and infiltrated into other tissues. Formally a life-threatening disease is now curable in 35 – 40 % of younger patients. In newly diagnosed AML cases there have been noticed an interesting mutation in the tyrosine kinase Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3) (published incidence about 30 %) that negatively affect the survival.

**Patients' cohort and methods:** Retrospectively we have analyzed data collected by two genetic laboratories covering patients from whole Slovakia over past two year period. In 364 patients newly diagnosed AML, we have tested FLT3 mutations: FLT3-ITD, FLT3-TKD codon D835 (189 pts in 2016 and 175 pts in 2017).

**Results:** Altogether, we have found 62 pts bearing FLT3 mutation. Out of them 44 pts were FLT3-ITD and 18 FLT3-TKD codon D835 positive resp. In 2016 there have been identified 33 of those cases and the remaining 29 cases were diagnosed in 2017. By analyzing our patients' cohort we have found that the yearly incidence in all newly diagnosed AML cases is about 17% (17.4% in 2016 and 16.5% in 2017 resp.). In our case, the incidence was lower comparing to already published data that can be explained by the assessment test sensitivity varying from country to country, size of an examined patients' cohort, genetic variability in given population, age of patients and environmental factors. Nowadays, we also perform the gene allelic burden (mutant/wild type ratio) assessment.

**Conclusion:** Genetic changes found in AML can be used as possible therapeutic targets. Understanding of the disease biology and new drug development is vital for radical prognosis improvement. AML treatment incorporates new targeted drugs such as midostaurin, gemtuzumab ozogamicine in the 1st line and enasidenib in relaps/refractory AML that changed treatment results in predefined group of patients. New liposomal form of daunorubicine/cytarabine is approved, which can change the standard treatment in elderly population. High frequency of FLT3 mutations and their prognostic relevance in adult and pediatric AML patients represent a suitable therapeutic target.

**Key words:** Acute myeloid leukemia, FLT3 mutation, incidence, FLT3-ITD, FLT3-D835

Onkológia (Bratisl.), 2018;13(3):199-204

## Úvod

Akútna myeloblastová leukémia (AML) je klonové maligne ochorenie krvotvorby prevažne staršieho veku. Jeho výsledkom je hromadenie abnormálnych nezrelých buniek v kostnej dreni. Tieto bunky narušujú normálnu krvotvorbu, prenikajú do cirkulácie a môžu infiltrovať aj iné orgány. Patogeneticky AML spôsobuje mnoho rôznych genetických/epigenetických aberácií a tieto sú zodpovedné za rôznorodú odpoveď na liečbu. Početné genetické abnormality poukazujú na vysokú heterogenitu ochorenia. Prognóza pacientov s AML je vo veľkej miere determinovaná práve biológom choroby (1 – 3).

Medián veku pri stanovení diagnózy je 68 – 70 rokov (4, 5). Incidencia nových pacientov s AML v Európe je odhadovaná na 3 – 4 pacientov na 100 000 obyvateľov/ročne; v USA 4,3 na 100 000 podľa SEER (the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program v USA – register SEER 2018 – roky 2010 – 2015) (4 – 7). Počet úmrtí bol 2,8 pacientov na 100 000 obyvateľov ročne. Tieto údaje boli upravené na vek a založené na prípadoch a úmrtiach v rokoch 2010 – 2015 v SEER. V tomto registri bolo v rokoch 2008 – 2014 päťročné prežívanie pacientov na úrovni 27,4 % (4).

Kedysi vždy fatálne ochorenie je dnes vyliečiteľné u 35 – 40 % mladších pacientov. Medián celkového prežívania (OS) po piatich rokoch u mladších (18 – 60 rokov) dospelých pacientov s AML je približne 40 %. Ochorenie je oveľa agresívnejšie u starších jedincov nad 60 rokov, ktorých dlhodobo prežíva približne len 10 %. Preto existuje veľká medicínska potreba zlepšiť výsledky liečby pacientov s AML (8).

Diagnóza spočíva v dôkaze > 20 % blastov myeloidného radu. Blasty sa charakterizujú viacfarebnou prietokovou cytometriou. Typicky exprimujú na svojom povrchu CD33 a CD13. Štandardné cytogenetické vyšetrenie karyotypu a molekulové vyšetrenie pri AML v súčasnosti predstavuje základný pilier rozhodovania sa o rizikovom profile pacienta a stratégii liečby 1. línie (1, 2). V posledných rokoch presná identifikácia a charakterizácia genetických aberácií značne zlepšila pochopenie patogenézy AML. Na základe presne definovaných ge-

**Tabuľka.** 2017 European Leukemia Net stratifikácia podľa genetického rizika

Riziko:	Cytogenetické/molekulové abnormality:
Priaznivé	t(15;17)(q22;q12~21); <i>PML-RARA</i> t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) alebo t(16;16)(p13;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutant/ <i>FLT3-ITD</i> <sup>negat</sup> alebo <i>FLT3-ITD</i> <sup>low allelic ratio</sup> <i>CEPBA</i> mutant (bialeická, <i>FLT3-ITD</i> <sup>negat</sup> )
Intermediárne	<i>NPM1</i> mutant a <i>FLT3-ITD</i> <sup>high allelic ratio</sup> Wt <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> <sup>low allelic ratio</sup> t(9;11)(p22q23); <i>MLL3-KMT2A</i> cytogenetické abnormality neklasifikované ako priaznivé alebo nepriaznivé
Nepriaznivé	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); prestavba <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21q26.2) alebo t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> -5 alebo del(5q), -7, -17/abn(17p) Wt <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> <sup>high allelic ratio</sup> komplexná prestavba karyotypu monozómový karyotyp (MK+) mutovaný <i>RUNX1, ASXL1, TP53</i>

netických zmien sa pacienti stratifikujú do rizikových skupín z hľadiska relapsu. Posledná aktualizácia ELN 2017 (European LeukemiaNet) rozdelila pacientov do troch skupín (tabuľka) (2).

### Incidenca *FLT3* mutácií

Pacienti s AML s normálnym karyotypom (AML CN) sa charakterizujú podľa molekulových abnormalít. Najčastejšími postihnutými génmi sú *NPM1* a *FLT3* (9, 10).

Incidenca jednotlivých genetických markerov je stále predmetom vedeckého výskumu a rôznych analýz. Zaujímavou mutáciou s negatívnym vplyvom na prežívanie pacientov je mutácia tyrozínkinázy *Flt3* s opisovanou incidenciou v literatúre okolo 30 % u novodiagnostikovaných pacientov s AML (10 – 13). Prognostický vplyv *FLT3-ITD* je modifikovaný súbežnými mutáciami, ako sú nukleofosmín (*NPM1*) a *DNMT3A*. U pacientov s AML CN s mutáciou *NPM1* je mutácia *FLT3-ITD* prítomná asi u 45 % pacientov. Pacienti s mutáciou *NPM1* bez mutácie *FLT3-ITD* majú priaznivú prognózu (14 – 16).

### Štruktúra a funkcia receptorovej *Flt3* tyrozínkinázy

*Flt3* (FMS-like tyrosine kinase 3) je membránový receptor s vnútornou tyrozínkinázovou doménou. Skladá sa zo štyroch častí, medzi ktoré patrí extracelulárna väzbová doména pre *Flt3* ligand, transmembránová doména, juxtamembránová doména a intracelulár-

na väzbová kinázová doména. Receptor *Flt3* je primárne exprimovaný na myeloidných a lymfoidných progenitorových bunkách (diferenciáciou sa stráca) a s variabilnou expresivitou aj na zrelej elementoch monocytového radu (17). Ak nie je *Flt3* receptor stimulovaný, je v monomérskej forme s inaktivovanou, nefosforylovanou intracelulárnou kinázovou doménou. V prípade naviazania *Flt3* ligandu dochádza ku konformačnej zmene receptora a dochádza k jeho dimerizácii, čo vedie k aktivácii tyrozínkinázovej domény.

Dôsledkom aktivácie dochádza prostredníctvom ďalších cytoplazmatických proteínov (*SHC* proteíny, *GRB2*, *GAB2*, *SHIP*, *CBL*) ku kaskádovitej fosforylácii, čo má za následok aktiváciu sekundárnych mediátorov (*MAP* kináza (*MAP/ERK*), *STAT5*, *AKT/PI3*). Toto v bunkovom jadre vedie k aktivácii proliferácie, k inhibícii apoptózy a k blokáde diferenciácie buniek. Aktivácia *Flt3* všeobecne reguluje mnohé bunkové procesy, ktoré sú kritické pri riadení normálnej krvotvorby a bunkového rastu (18).

### Aktivačné mutácie *FLT3* génu

Aktivačné mutácie *FLT3* génu vedú ku konštitatívnej aktivácii receptora aj v neprítomnosti ligandu, čo prispieva k deregulácii bunkového cyklu, a tým k procesu leukemickej transformácie. Sú prítomné približne u 30 % pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou a patria tak k najčastejším genetickým aberáciám AML.

Rozlišujeme dva typy týchto mutácií. Prvým typom sú mutácie v zmene dĺžky *FLT3* (zahrnujú interné tandemové duplikácie *FLT3-ITD*), ktoré postihujú juxtamembránovú doménu. Veľkosť *ITD* je veľmi rôzna od 3bp až po viac ako 400bp. Mutácie *FLT3-ITD* (internal-tandem duplication) sa vyskytujú približne u 20 – 30 % pacientov, nielen pri AML CN, ale aj u pacientov s APL a AML t(6;9)(p23;q34) a veľkom narastajú (10, 12, 13). Druhým typom sú bodové substitučné alebo krátke delečné a inzerčné mutácie v tyrozínkinázovej doméne (*FLT3-TKD*) (17).

Mutácie *ITD* sú vždy in-frame, čítací rámec zostáva zachovaný a vzniká funkčný proteín, avšak s aberantnou funkciou. Dôsledkom mutácie je narušená autoinhibičná konformácia juxtamembránovej domény a receptor tak zostáva stále v aktívnom stave. Príčina vzniku interných duplikácií nie je dodnes objasnená. Druhá skupina mutácií (*FLT3-TKD*) postihuje vysokokonzervovanú sekvenciu aktivačnej slučky tyrozínkinázovej domény, najčastejšie kodón D835. Klinický význam bodových mutácií v tyrozínkinázovej doméne *FLT3* génu je menej známy a je stále predmetom diskusií (*FLT3-TKD*). Ich incidenciu sa v literatúre opisuje okolo 5 – 10 %.

Napriek tomu, že obidva typy mutácií vedú ku konštitutívnej aktivácii receptora, signalizačné dráhy aktivované *FLT3-ITD* a *FLT3-TKD* sú odlišné. Nález *FLT3-ITD* je mnohonásobným negatívnym ukazovateľom klinického priebehu AML. Opakovane sa však poukázalo na odlišný klinický priebeh skupiny s vysokou alelovou náložou (> 0,5) *FLT3-ITD/wt* (pomer mutant/wild type) v porovnaní s nízkou alelovou náložou (2). Prognostickú hodnotu *FLT3-TKD* sa dosiaľ nepodarilo presne definovať a zostáva kontroverzná (19, 20). Signalizácia *FLT3-TKD* podobne ako pri nemutovanom receptore vedie len k slabej fosforylácii *STAT5* proteínov. Intenzívna *STAT5* signalizácia je pozorovaná v AML blastoch s *FLT3-ITD*. Aktivované *STAT* proteíny sú vo forme dimérov translokované do jadra, kde sa viažu na regulačné sekvencie mnohých génov, ktoré sú zapojené v procese bunkovej proliferácie, a tým sa ovplyvňuje ich transkripčná aktivita. Distribúcia *STAT5*

proteínov je signifikantne rozdielna u pacientov bez *ITD* mutácie ako s mutáciou. U prvej skupiny sú *STAT5* proteíny situované prevažne v cytoplazme, zatiaľ čo u pacientov s *FLT3-ITD* prevláda lokalizácia v jadre. Okrem dvoch hlavných typov mutácií v géne *FLT3* boli identifikované bodové mutácie v exóne 14 v oblasti kódujúcej juxtamembránovú doménu. Mutácie v *FLT3* géne boli opísané u pacientov s AML, B-ALL a MDS (21). Mutačný stav *FLT3* génu je dôležitým prognostickým ukazovateľom práve pri AML CN, najmä prítomnosť interných tandemových duplikácií v exónoch 14 a 15 znamená pre pacientov s normálnym karyotypom signifikantné zhoršenie prognózy z hľadiska skrátenia trvania kompletnej remisie (KR), prežívania bez choroby (PFS – progression free survival), s negatívnym dosahom na celkové prežívanie a býva asociovaný s rezistenciou na kombinovanú chemoterapiu.

### Možnosti diagnostiky

Klinicky validované testovanie mutácií *FLT3* je založené na princípe PCR (polymerase chain reaction) technik z genomickej DNA izolovanej zo vzoriek pacientov s AML. Najčastejšie sa získava DNA z periférnej krvi alebo kostnej drene pacientov. Percentuálne zastúpenie blastov je dôležité, pretože nízky počet ovplyvňuje senzitivitu použitej analýzy. Bežne používaným postupom v genetických laboratóriách je opísaná metodika podľa Murphy et al. (22), čo je vlastne duplexné testovanie pre oba typy *FLT3* mutácií v jednej skúmavke: PCR priméry (označené fluorochrómom) obklopujúce juxtamembránovú kódujúcu sekvenciu, amplifikujú mutácie *FLT3-ITD*, zatiaľ čo druhý súbor primérov amplifikuje sekvenciu kinázovej domény v tej istej reakčnej reakcii. Existujú však aj modifikácie PCR technik založené na použití primérov tak s fluorescenčným, ako i bez fluorescenčného značenia, ale princíp detekcie zostáva nezmenený (23, 24).

Amplifikované fragmenty sa oddeľujú pomocou kapilárnej gélovej elektroforézy a fluorochrómové signály sa analyzujú pomocou softvérového programu, ako je GeneMapper. EcoRV štiepenie produktov PCR bude štiepiť fragment kinázovej domény, ak nie je prítomná *TKD*

mutácia v D835 (alebo I836). Je dôležité poznamenať, že ani jeden produkt PCR nie je sekvenovaný; analýza jednoducho určuje, či je prítomná/neprítomná mutácia *FLT3-TKD* alebo v prípade mutácií *FLT3-ITD* dĺžku inzercie a stanovenie alelovej nálože (allelic ratio). Pre mutácie *FLT3-ITD* sa alelový pomer vzťahuje na frekvenciu alely s *ITD* v porovnaní s frekvenciou alely divokého typu (*wt*) (22).

Na prípadnú detekciu minimálnej reziduálnej choroby (MRD) pomocou *FLT3-ITD* sú potenciálnym diagnostickým nástrojom metódy sekvenovania novej generácie (NGS) s vyšším pokrytím. Táto technika by sa mohla použiť na detekciu relapsu ešte pred nástupom klinických príznakov a na cielené prispôbenie liečby pomocou inhibítorov *FLT3* (25). Použitie detekcie *FLT3* na detekciu minimálnej reziduálnej choroby pomocou klasickej PCR detekcie je otáznou pre jeho veľkú heterogenitu, počet klonov u pacienta, alelovú záťaž, miesto inzercie a nestabilitu.

### Súbor pacientov a metódy

Retrospektívne sme analyzovali výsledky pacientov v SR z obdobia dvoch rokov – z dvoch genetických pracovísk s celonárodnou pôsobnosťou. Realizovali sme vyšetrenie mutácií *FLT3*: *FLT3-ITD* a *FLT3-TKD* kodón D835 u 364 pacientov s novodiagnostikovanou AML v období rokov 2016 a 2017.

### Metóda I

Genómová DNA bola izolovaná z kostnej drene pomocou kitu NucleoSpin Blood (Machrey-Nagel, GmbH & Co). PCR analýzy *FLT3-ITD* a *FLT3* D835 mutácie boli realizované podľa už publikovaných protokolov s určitými modifikáciami (23, 24). Amplifikácia oblastí nesúcich mutáciu *ITD* a D835 bola uskutočnená použitím primérov **5-*FLT3ITD*** (5'-[6FAM]GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC -3') a **3-*FLT3ITD-R6*** (5'- CCT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC -3'), respektíve **5-*FLT3-D835F*** (5'- CCG CCA GGA ACG TGC TTG -3') a **5-*FLT3-D835R*** (5'- GCA GCC TCA CAT TGC CCC-3'). PCR reakcia bola prevedená v objeme 20 µl obsahujúcom priméry (3 µM každého), DNA (10, respektíve 25 ng) a 1x GoTaq G2 Master Mix (Promega, Co). PCR amplifikácia prebiehala v 35 cykloch: 94 °C 2 minúty



iniciálne, 94 °C 30 sekúnd, 66 °C (ITD), respektíve 60 °C (D835) 30 sekúnd, 72 °C 1 minúta, s finálnym krokom 72 °C 7 minút. V prípade analýzy *FLT3*-ITD boli 2 µl PCR zmesi pridané do 18 µl zmesi formamidu a štandardu molekulových hmotností a analyzované na 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc) s POP-7 polymérom. Dáta boli analyzované použitím softvéru Gene Mapper. Alelická záťaž bola následne vypočítaná ako pomer plochy píku reprezentujúceho *FLT3*-ITD oproti súčtu plôch píkov reprezentujúcich všetky PCR produkty (*FLT3*-ITD aj štandardné *FLT3*). V prípade analýzy *FLT3* D835 bolo 10 µl PCR zmesi štiepené restriktčnou endonukleázou FastDigest EcoRV(Eco321) (ThermoFisher Scientific, Inc). Produkty po štiepení boli následne analyzované na 2 % agarózovom géli, respektíve na 9 % polyakrylamidovom géli.

## Metóda II

Genómová DNA bola izolovaná z kostnej drene extrakciou pomocou QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Germany) a následne spektrofotometricky kvantifikovaná použitím Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Pri identifikácii prítomnosti mutácií D835 a ITD v géne *FLT3* bola použitá PCR metóda podľa publikovaného protokolu (23, 24). Amplifikácia špecifických oblastí nesúcich mutácie ITD a D835 bola prevedená s použitím obidvoch párov špecifických primérov **F-ITD *FLT3*** (5'- GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC -3') a **R-ITD *FLT3*** (5'- CCT TCA GCA TTT TGA CCG CAA CC -3'), respektíve **F-D835 *FLT3*** (5'- CCG CCA GGA ACG TGC TTG -3') a **R-D835 *FLT3*** (5'- GCA GCC TCA CAT TGC CCC-3'). Reakčná zmes obsahovala 5µl DNA (s koncentráciou 15ng/µl), 10x reakčný buffer II, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTP, 2 x forward primér 10 µM, 2x reverse primér 10 µM, 5U/ µl AmpliTaq Gold DNA polymerázu (ThermoFisher Scientific, Inc) a doplnená sterilnou vodou do objemu 20 µl. PCR amplifikácia prebiehala v 40 cykloch: 95 °C 10 minút iniciálne, 95 °C 45 sekúnd, 56 °C 1 minúta, 72 °C 1 minúta, s finálnym krokom 72 °C 10 minút. Amplifikované PCR produkty boli následne štiepené pomocou restriktč-

ného enzýmu ECORV (ThermoFisher Scientific, Inc), kde sa produkty (fragmenty) obsahujúce mutáciu D835 v danom mieste neštiepia. Takto pripravené produkty boli následne separované pomocou elektroforézy (Bioanalyser 2100, Agilent) s využitím čipu Agilent DNA 1000 Kit Quick Start Guide. V prípade stanovenia alelovej záťaže ITD sa počítal pomer plochy píku reprezentujúceho *FLT3*-ITD oproti súčtu plôch píkov reprezentujúcich všetky alely *FLT3* (*FLT3*-ITD aj *FLT3*-wt). V prípade prítomnosti mutácie *FLT3*-D835 sa produkt nedokázal poštiepiť v danom špecifickom mieste, a preto bol u pozitívneho pacienta s touto mutáciou prítomný len jeden fragment.

## Výsledky

Identifikovali sme celkovo 44 pacientov s pozitivitou *FLT3*-ITD a 18 pacientov s pozitivitou *FLT3*-D835. Spolu to predstavuje 62 pacientov s mutáciou *FLT3*: 33 pacientov bolo zachytených v roku 2016 a 29 v roku 2017. V našom súbore sme zistili priemernú 17 % ročnú incidenciu z celkového počtu novodiagnostikovaných AML (17,4 % v roku 2016; 16,5 % v roku 2017). V porovnaní s literárnymi údajmi máme nižšiu incidenciu. Tento fakt si vysvetľujeme rôznou citlivosťou metodiky vyšetrení v jednotlivých krajinách, veľkosťou súboru, ale aj genetickou populačnou variabilitou a faktormi prostredia. V súčasnosti stanovujeme už aj tzv. alelovú záťaž génu (pomer mutant/wild type).

Významným dôvodom je aj selekcia pacientov – u starších a veľmi starých pacientov s AML, ktorí mnohí nemajú realizované genetické vyšetrenie z dôvodov zlého výkonnostného stavu, odmietania liečby a/alebo diagnostickej kostnej drene. Keďže incidencia mutácií *FLT3* vekom narastá, predpokladáme „stratu informácie“ v tejto poddiagnostikovanej skupine.

## Manažment liečby AML

Kombinovaná liečba „7+3“ – cytarabín (7 dní) spolu s antracyklínom (3 dni) – bola viac ako 30 rokov a stále je základom indukčnej liečby AML (1 – 3, 8, 26). Postremisné stratégie sa skladajú z intenzívnej chemoterapie a vysoko-

dávkovanej terapie s následnou auto-lógnou alebo alogénnou transplantáciou kmeňových buniek (TKB) podľa rizika relapsu u daného pacienta (tabuľka) (2, 3). Výsledky liečby sa časom mierne zlepšili, najmä úspešnou komplexnou podpornou starostlivosťou a integráciou alogénnej transplantácie kostnej drene. Aj tak je 5-ročné prežívanie pacientov mladších ako 60 rokov stále len okolo 40 % (8, 26).

Kombinácie cytotoxickej liečby s cieľovou liečbou by mohli zlepšiť prežívanie. Cieľovú liečbu môžeme rozdeliť do troch skupín (2, 3, 26, 27):

1. Lieky, ktoré zasahujú konkrétne mutáciu, ktorá pôsobí ako onkogénny efektor pri AML s rekurentnými genetickým abnormalitami. Príkladom sú inhibítory *FLT3* (midostaurín, quizartinib, gilteritinib, crenolanib) a *IDH* (enasidenib, ivosidenib).
2. Lieky, ktoré narúšajú kľúčové metabolické cesty a homeostázu bunky bez priameho poškodenia DNA alebo jej opravy. Príklady zahŕňajú epigenetické modifikátory (hypometylačné látky – napr. azacitidín, BET inhibítory, LSD1 a DOT1L inhibítory) a lieky indukujúce apoptózu (bcl2 antagonisty – napr. venetoklax).
3. Lieky, ktoré sú kombináciou cytotoxických činidiel naviazaných na protilátke, ako sú imunokonjugáty (ADC) (napr. gentuzumab ozogamycín).

Napriek tomu, že došlo k významnému vývoju cieľovej liečby, nebudeme sa jednotlivým možnostiam v tomto článku ďalej venovať.

## Vplyv mutácie *FLT3* na manažment liečby

U novodiagnostikovaných pacientov s AML s aktivačnými mutáciami *FLT3* je základom indukcia „7+3“ (2, 3, 26). Pre nepriaznivé výsledky tejto skupiny sa dostala do popredia otázka intenzifikácie dávky. Burnett et al. (28) dokumentovali profit pri eskalácii antracyklínu (daunorubicín 90 mg/m<sup>2</sup> vs 60 mg/m<sup>2</sup>) v indukcii práve u tejto skupiny pacientov. Gentuzumab ozogamycín v skupine AML s nepriaznivým rizikom nepriniesol žiadny benefit v kombinácii s „7+3“ (29). Pacienti s *FLT3*-ITD (NPM1 mutant a *FLT3*-ITD<sup>high allelic ratio</sup>, Wt NPM1 a *FLT3*-ITD<sup>low allelic ratio</sup>, Wt NPM1 a *FLT3*-ITD<sup>+</sup>

high allelic ratio), hlavne bez mutácie NPM1 a s vysokou alelovou záťažou, profitujú z možnosti alogénnej TKB (30 – 32). Dokonca aj u starších pacientov s dobrým výkonnostným stavom pri rozhodovaní medzi indukciou a epigenetickou liečbou dávame prednosť chemoterapii pri FLT3-ITD mutante, ak to celkový stav dovoľuje. Hypometylačná liečba je preferovaná len pri horšom výkonnostnom stave (33 – 35).

Frekvencia mutácií FLT3 pri AML, jeho lokalizácia na povrchu bunky a jeho asociácia s nepriaznivou prognózou ho robia atraktívnym cieľom. Posledných 10 rokov boli vo vývoji viaceré malé molekuly – inhibítory Flt3 tyrozínkinázy. Väčšina kompetovala o ATP väzobné miesto aktívnej kinázy. Napriek snahe fokusovať iba FLT3 boli viaceré multikinázové a vykazovali aktivitu aj proti KIT, PDGFR, VEGFR a JAK2 a iným (sorafenib, sunitinib, lestaurtinib, tandutinib). V monoterapii vykazovali slabú antileukemickú aktivitu vrátane midostaurínu. Existujú početné štúdie kombinujúce inhibítory FLT3 s chemoterapiou s kontroverznými výsledkami: napr. lestaurtinib nepriniesol benefit po pridaní k 1. línii, sorafenib má kontroverzné výsledky a sunitinib je limitovaný jeho toxicitou pri vyšších dávkach (36 – 38).

Najsľubnejšie výsledky v rámci klinických štúdií dosiahol midostaurín v kombinácii so štandardnou intenzívnou chemoterapiou „7+3“ ako jediný inhibítor FLT3 1. generácie s multikinázovou aktivitou (c-Kit, PDGFR, FLT3). V randomizovanej štúdií fázy III CALGB 10603 (RATIFY) bolo zaradených 717 mladších pacientov s AML s mutovaným FLT3-ITD a FLT3-TKD (18 – 59 rokov). Dizajn štúdie bol postavený na štandardnej indukcií „7+3“ v kombinácii s midostaurínom vs placebo. Nasledovala štandardná konsolidácia vysokými dávkami cytozín-arabinozidu. Všetci pacienti mali udržiavaciu liečbu midostaurín vs placebo jeden rok od randomizácie. Alogénna TKB bola vykonaná u 57 % pacientov z celej skupiny (28,1 % skupina midostaurín, 22,7 % skupina placebo). V indukcií dosiahlo kompletnú remisiu 58,9 % pacientov v ramene s midostaurínom vs 53,5 % v ramene s placebom. Kombinácia midostaurínu s chemoterapiou signifikantne zlepšila

celkové prežívanie (OS) s HR 0,78 (95 % CI: 0,63 – 0,96, p = 0,009) s mediánom OS 74,7 mesiaca (95 % CI, 31,5 – nedosiahnutý) v ramene s midostaurínom v porovnaní s 25,6 mesiaca (95 % CI, 18,6 – 42,9) pre rameno s placebom. Tieto výsledky boli nezávislé od mutačného stavu (ITD alebo TKD) alebo alelovej záťaže (39). Na základe týchto výsledkov bol midostaurín povolený liekovými autoritami – FDA v USA (apríl 2017) a EMA v Európe (júl 2017) – na liečbu FLT3 pozitívnej AML v kombinácii s chemoterapiou.

Sľubné výsledky očakávame od potenejších a selektívnejších FLT3 inhibítov TKI 2. generácie – quizartinibu, crenolanibu a gilteritinibu (36 – 38).

### Záver

Faktorom určujúcim spôsob liečby je klinická a prognostická úvaha, a nie počet blastov. Riziko určujú tieto dva faktory: 1) úmrtnosť v súvislosti s liečbou (TRM – treatment-related mortality) a 2) pravdepodobnosť rezistencie k štandardnej liečbe. Hlavným prediktorom rezistencie je cytogenetika s monozómovým karyotypom, a, samozrejme, aj iné definované genetické abnormality (2). AML vzniká často na podklade rekurentných genetických zmien, ktoré predstavujú možné terapeutické ciele. Vysoká frekvencia FLT3 mutácií a ich prognostická relevantnosť u dospelých i detských AML z nich robí vhodný terapeutický cieľ.

Do algoritmu liečby AML sú v súčasnosti inkorporované nové cieľové lieky (2), ktoré signifikantne zmenili liečebné výsledky u definovaných skupín pacientov, ako napr. midostaurín (39) a gemtuzumab ozogamicín (40, 29, 41) v 1. línii liečby a enasidenib v liečbe relaps/refraktérnej AML (42). Je schválená aj nová lipozomálna forma daunorubicínu/cytarabínu, ktorá pravdepodobne zmení štandard liečby u starších pacientov (43, 44).

Optimálne využitie FLT3 inhibítov TKI zostáva predmetom výskumu. Nezodpovedané sú niektoré otázky optimálnej sekvencie TKI v algoritme liečby AML (multikinázové vs 2. generačné). Nejasné je postavenie udržiavacej liečby po alogénnej TKB a napríklad aj ich úloha v liečbe relaps/refraktérnej AML a pri premostení k alogénnej TKB. Pri

trvalej inhibícii FLT3-mutovaných AML je výzvou do budúcnosti použitie kombinovanej cieľovej liečby.

### Literatúra

1. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-474.
2. Döhner H, Estey EH, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-447.
3. Estey E. Acute myeloid leukemia: 2016 Update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2016;91(8):824-46.
4. The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program USA: Cancer Stat Facts. Available from: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aml.html>>.
5. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179-4187.
6. Orphanet: the portal for rare diseases and orphan drugs. Available from: <[https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=EN&Expert=519](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=EN&Expert=519)>.
7. Visser O, Trama A, Maynadié M, et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *Eur J Cancer*. 2012;48(17):3257-3266.
8. Schlenk RF, Döhner H. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:324-330.
9. 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.
10. Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368:2059-2074.
11. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-1542.
12. Moreno I, Martin G, Bolufer P, et al. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2003;88(1):19-24.
13. Schneider F, Hoster E, Schneider S, et al. Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML). *Ann Hematol*. 2012;91(1):9-18.
14. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011-4020.
15. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-1918.
16. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*. 2014;124(23):3441-3449.
17. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13-15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(10):910-924.
18. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152.
19. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, et al. FLT3 D835/1836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute my-

- eloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*. 2008;111(3):1552-1559.
20. O'Donnel MR, Tallman MSL, Abboud CN, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Myeloid Leukemia Version II.2016. [http://www.nccn.org/NCCN\\_Guidelines\\_for\\_treatment\\_of\\_cancer\\_by\\_site/AML](http://www.nccn.org/NCCN_Guidelines_for_treatment_of_cancer_by_site/AML) (accessed on 2 October 2016).
21. Rocnik JL, Okabe R, Yu J, et al. Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood*. 2006;108(4):1339-1345.
22. Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J Mol Diagn*. 2003;5(2):96-102.
23. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97(8):2434-2439.
24. Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, et al. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood*. 2003;102(7):2387-2394.
25. Bibault JE, Figeac M, Hélevaut N, et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(26):22812-22821.
26. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(1):53-61.
27. PerI AE. The role of targeted therapy in the management of patients with AML. *Hematology* 2017;1(24):2281-2294.
28. Burnett AK, Russell NH, Hills RK. Higher daunorubicin exposure benefits FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(3):449-452.
29. Castaigne S, Pautas C, Terre C, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2012;379(9825):1508-1516.
30. Lin PH, Lin CC, Yang HI, et al. Prognostic impact of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with internal tandem duplication of FLT3. *Leuk Res*. 2013;37(3):287-292.
31. Ho AD, Schetelig J, Bochtler T, et al. Allogeneic stem cell transplantation improves survival in patients with acute myeloid leukemia characterized by a high allelic ratio of mutant FLT3-ITD. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(3):462-469.
32. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016;127(1):62-70.
33. Klepin HD. Geriatric perspective: how to assess fitness for chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Hematology* 2014;2014(1):8-13.
34. Wang ES. Treating acute myeloid leukemia in older adults. *Hematology* 2014;2014(1):14-20.
35. Dombret H, Itzykson R. How and when to decide between epigenetic therapy and chemotherapy in patients with AML. *Hematology*. 2017;2017(1):45-53.
36. Kayser S, Schlenk F. Targeting the FLT3 Mutation in Acute Myeloid Leukaemia. *European Oncology & Haematology*, 2017;13(2):Epub ahead of print.
37. Grunwald MR, Levis MJ. FLT3 Tyrosine Kinase Inhibition as a Paradigm for targeted Drug Development in Acute Myeloid Leukemia. *Sem Hematol*. 2015;52(3):193-199.
38. Best-Aguilera C, Gómez-Vázquez OR, GuzmánHernández AE, et al. Treatment of Acute Myeloid Leukemia with the FLT3 Gene Mutation. *Curr Oncol Rep*. 2017;19(3):21.
39. Stone RM, Mandrekas S, Laumann C, et al. Midostaurin, a multi-targeted kinase inhibitor, improves overall survival when added to standard chemotherapy in adults age 18 – 60 with FLT3 mutant acute myeloid leukemia (AML): results from a randomized, prospective, placebo-controlled, double-blind trial, CALGB 10603/RATIFY [abstract]. *Blood*. 2015;126(23). Abstract 6.
40. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30(32):3924-3931.
41. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):986-996.
42. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA et al. Enasidenib in mutant-IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(6):722-731.
43. Cortes JE, Goldberg SL, Feldman EJ, et al. Phase II, multicenter, randomized trial of CPX351 (cytarabine:daunorubicin) liposome injection versus intensive salvage therapy in adults with first relapse AML. *Cancer*. 2015;121(2):234-242.
44. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, et al. Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 713 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML [abstract]. *J Clin Oncol*. 2016;34(suppl). Abstract 7000.

SK1806846788

**MUDr. Eva Mikušková, PhD.**  
 Klinika onkohematológie  
 LF UK, NOÚ  
 Klenová 1, 833 10 Bratislava  
 eva.mikuskova@nou.sk

