



Prof. Dr. med.  
Markus G. Manz  
Zürich

Dr. med. Alexandre  
Theocharides  
Zürich

## Ausgewählte Studien aus der Hämato-Onkologie

vorgestellt und kommentiert von Prof. Markus G. Manz und Dr. Alexandre Theocharides  
Zentrum für Hämatologie und Onkologie, UniversitätsSpital Zürich

Alexandre.Theocharides@usz.ch

Grinfeld J et al. N Engl J Med 2018;379:1416-30

### Klassifizierung und personalisierte Prognose bei myeloproliferativen Neoplasien

**Hintergrund:** Die myeloproliferativen Neoplasien (MPN) Polycythemia vera (PV), Essentielle Thrombozythämie (ET), und Myelofibrose (MF), sind chronische hämatologische Neoplasien mit unterschiedlichen Progressionsraten. Die genomische Charakterisierung von Patienten mit MPN bietet das Potenzial für eine personalisierte Diagnose, Risikostratifizierung und Behandlung.

**Methode:** Die kodierenden Exons von 69 «myeloischen» Neoplasien wurden bei Patienten mit MPN sequenziert. Die Driver-Mutationen und die Änderungen der Kopienzahl wurden umfassend charakterisiert. Es wurden eine genomische Klassifikation für MPN und mehrstufige prognostische Modelle zur Vorhersage des Outcomes in individuellen Patienten entwickelt. Die Klassifikations- und Prognosemodelle wurden in einer externen Kohorte validiert.

**Resultate:** Total 2035 Patienten wurden analysiert. Insgesamt 33 Gene wiesen sogenannte Driver-Mutationen bei mindestens 5 Patienten auf, wobei Mutationen in JAK2, CALR oder MPL die alleinige Anomalie bei 45% der Patienten waren. Die Anzahl der Driver-Mutationen nahm mit dem Alter und fortschreitender Erkrankung zu. Driver-Mutationen, Keimbahnpolymorphismen, und demographische Variablen konnten unabhängig die Diagnose ET und PV voneinander unterscheiden. Ebenso konnte vorausge-

sagt werden, ob ein Patient sich in einer chronischen Krankheitsphase (i.e. PV oder ET) oder in der MF-Phase befindet.

Es wurden acht genomische Untergruppen definiert, die unterschiedliche klinische Phänotypen zeigten, darunter Blutparameter, Risiko einer leukämischen Transformation und ereignisfreies Überleben. Durch Integration von 63 klinischen und genomischen Variablen, wurden prognostische Modelle erstellt, die die Erstellung von persönlich zugeschnittenen Vorhersagen über das Outcome bei MPN Patienten in der chronischen Phase und in der MF-Phase möglich machten. Das vorhergesagte und das beobachtete Outcome korrelierte gut mit der internen Kreuzvalidierung einer Trainingskohorte und einer unabhängigen externen Kohorte. Innerhalb einzelner Kategorien von bereits bestehenden prognostischen Modellen, konnten diese Modelle die Vorhersagegenauigkeit verbessern.

**Schlussfolgerungen:** Eine umfassende genomische Charakterisierung identifizierte verschiedene genetische Untergruppen und ermöglichte eine Klassifizierung von MPN auf der Grundlage von kausalen biologischen Mechanismen. Die Integration von genomischen Daten mit klinischen Variablen ermöglicht eine personalisierte Vorhersage über Outcome von Patienten und kann die Behandlung von Patienten mit MPN unterstützen.

#### Kommentar

- ▶ MPN sind eine heterogene Gruppe hämatopoetischer Stammzellerkrankung, die nach internationalen Kriterien (meist WHO) diagnostiziert werden. Nicht selten ist jedoch die Abgrenzung der einzelnen Entitäten Polycythaemia vera (PV), Essentielle Thrombozythämie (ET) und Myelofibrose (MF) trotz Verwendung dieser Kriterien uneindeutig. Die meisten MPN-Patienten tragen eine Mutation in der Januskinase 2 (JAK2) oder im Chaperone Calreticulin (CALR).
- ▶ In dieser Studie mit >1800 MPN (>1300 ET-Patienten, vorwiegend aus der PT1-Studie; N Engl J Med 2005;353(1):33–45) wurden die Patienten mittels zielgerichteter Sequenzierung von 69 Genen, Untersuchung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (für Kopienzahlanalyse und Analyse von Keimbahnloci, welche mit MPN assoziiert sind) und in einer Subgruppe Sequenzierung des ganzen Exoms untersucht.
- ▶ Fast die Hälfte (45%) aller MPN Patienten tragen nur eine somatische Mutation. Zwei bei MPN weniger bekannte Genmutationen wurden beschrieben; PP1MD-Mutationen wurden bei 38 Patienten (1.9%) detektiert. Mutationen in MLL3 (total 20 Patienten, 1%) wurden bei sieben Patienten mit sogenannter triple-
- ▶ negativer (d.h. ohne JAK2-, CALR- oder MPL-Mutation) ET und MF nachgewiesen.
- ▶ Ein wichtiger Beitrag liefert die Studie zur Unterscheidung von PV- und ET-Patienten; Nicht selten gelingt die Abgrenzung dieser beiden Entitäten trotz stringenter Anwendung der WHO-Kriterien nicht. Im Vergleich zu ET-Patienten haben PV-Patienten häufiger homozygote JAK2-Mutationen (als Folge eines Verlusts der Heterozygotie auf Chromosom 9p) und Mutationen in NF-E2, einem kritischen Transkriptionsfaktor für die Erythropoese. Mutationen in NF-E2 können z.B. mittels next generation sequencing (NGS)-Analyse detektiert werden. Des Weiteren ist im Vergleich zur ET das mediane Alter von PV-Patienten höher und es sind häufiger Männer betroffen. Interessanterweise sind bestimmte Keimbahn-Polymorphismen signifikant mit ET assoziiert.
- ▶ Bereits bekannt ist, dass Mutationen in ASXL1, EZH2, IDH1/2 und SRSF2 signifikant mit leukämischer Transformation und verkürztem Gesamtüberleben assoziiert sind. Diese Studie zeigt, dass PV- und ET-Patienten mit Mutationen im RAS-Onkogen, dem Spliceosom-Komplex oder epigenetischen Regulatoren ein erhöhtes Risiko für die Transformation in eine MF aufweisen.

- Die Studie integriert aber auch klinische Parameter und zeigt, dass das Risiko von Tod in der chronischen MPN-Phase nicht durch genomische Parameter beeinflusst wird. Diese Patienten sterben (wenn sie gut therapiert werden) an nicht MPN-bedingten (Alters-assoziierten) Komplikationen. Die genomischen Parameter sind v.a. für die Beurteilung des Transformationsrisikos von ET/PV in eine MF/AML relevant.
- Die Studie verwendet zudem verschiedene Darstellungen, um das Risiko der Transformation in eine MF/AML zu veranschaulichen. Am Schluss der Arbeit wird auch ein «Tool» prä-

sentiert, welches eine individuelle, personalisierte Prognose bei MPN-Patienten erlaubt. Dieses «Tool» ist ab sofort online verfügbar (<https://cancer.sanger.ac.uk/mpn-multistage/>) und wird in Zukunft mit in die Beratung von MPN-Patienten einbezogen werden können. Insbesondere die Unterscheidung von MPN-Patienten in chronischer Phase mit hohem Progressionsrisiko und MPN-Patienten mit guter Prognose sollte hierbei erleichtert werden.

- Eine Limitierung der Studie ist sicher, dass vorwiegend ET-Patienten in die Analyse eingeschlossen wurden.

Ruella M et al. Nat Med 2018;24(10):1499–503

## Resistenzinduktion gegen die chimäre Antigenrezeptor T-Zelltherapie durch Transduktion einer einzelnen leukämischen B-Zelle

Es wird von einem Patienten berichtet, der 9 Monate nach der Infusion mit CD19- CAR T-Zellen (CTL019) mit einer CD19-negativen Leukämie rezidierte, welche aberrant das anti-CD19 CAR exprimiert. Das CAR-Gen wurde unbeabsichtigt während der Herstellung der CAR T-Zellen in eine einzelne leukämische B-Zelle eingeführt. Das CAR Produkt band in cis an das CD19-Epitop auf der Oberfläche der leukämischen B-Zellen und maskierte es so vor der Erkennung durch CTL019. Dies führte zu einer Resistenz gegen CTL019.

Orlando EJ et al. Nat Med 2018;24(10):1504–6

## Genetische Mechanismen des Zielantigenverlustes bei der CAR19-Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Genetische Mutationen in CD19 und Verlust von Heterozygotie wurden zum Zeitpunkt eines CD19-negativen Rezidivs nach CAR T-Zelltherapie identifiziert. Die Mutationen sind in der Mehrzahl der resistenten Leukämiezellen vorhanden und führen zu einem trunkeierten Protein mit einer nicht-funktionalen oder fehlenden Transmembranen-Domäne. Dies resultiert in einem irreversiblen Verlust des Oberflächenantigens. CAR T-Zellen gegen alternative Zielproteine oder kombinierte CAR-Strategien könnten in dieser Situation in Zukunft eingesetzt werden.

### Kommentar

- Die Zulassung von CD19 CAR T-Zellen in der Schweiz für refraktäre/rezidierte B lymphoblastische Leukämie (B-ALL) bei Kindern und refraktäres/rezidiertes diffuses grosszelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) bei Erwachsenen steht bevor. Aufgrund mehrerer bereits publizierten Studien und Erfahrung an anderen Zentren rezidivieren 7-25% der Patienten mit B-ALL mit einer CD19-negativen Erkrankung (sogenannte «Epitop-Flucht»).
- Mechanismen für die Epitop-Flucht wurden bereits an CD19-negativen B-ALL Zellen nach CAR T-Zelltherapie untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Spleissvarianten im Exon 2 von CD19 zu einer defekten Oberflächenexpression des Epitops führen. Des Weiteren können Spleissvarianten in Exon 5 und 6 zu einer trunkeierten Form des CD19 Proteins führen. Unbekannt

bleibt, ob diese Varianten als direkte Folge der CAR T-Zelltherapie entstehen oder, ob es sich um vorbestehende CD19-negative B-ALL Klone handelt, welche unter dem Therapiedruck expandieren. Als weitere Möglichkeit der Epitop-Flucht wurde ein Wechsel der Linienzugehörigkeit von einer lymphatischen zu einer myeloischen CD19-negativen Erkrankung beschrieben.

- In den beiden vorgestellten Publikationen werden zwei weitere Mechanismen beschrieben, die CD19-negative Rezidive nach CAR T-Zelltherapie erklären können. In der Studie von Orlando et al. wurden bei 12/17 B-ALL Patienten mit CD19-negativem Rezidiv Mutationen in Exon 2 bis 5, welche zu einer trunkeierten Form mit fehlendem Membrananker von CD19 führen identifiziert. Diese Mutationen waren weder vor Therapie, noch in CD19-positiven B-ALL Zellen nachweisbar. Auch wurden keine Spleissvarianten oder ein Wechsel der Linienzugehörigkeit wie oben beschrieben festgestellt. Somit handelt es sich hierbei um de novo Mutationen, die unter dem Druck der Immuntherapie entstehen.
- In der Studie von Ruella et al. wird ein singulärer Fall eines pädiatrischen Patienten mit B-ALL und CD19-negativem Rezidiv beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass der anti-CD19 CAR in eine einzige B-ALL-Zelle bei der Produktion der CAR T-Zellen eingeführt wurde. Dieser Klon wurde mit allen anderen Zellen dem Patienten reinfundiert und expandierte anschließend. Doch wie erklärt sich das CD19-negative Rezidiv bei diesem Patienten? Die Autoren zeigen, dass das CAR-Molekül das CD19 Protein an der Oberfläche der B-ALL Zelle bindet und es so vor den CAR T-Zellen maskiert. Sie konnten das Phänomen in vitro reproduzieren und auch zeigen, dass das gleiche Phänomen in vitro mit CD22 CARs auftreten kann. Bis jetzt ist dies der einzige von 369 beschriebenen Fällen mit CD19-negativem Rezidiv nach CAR T-Zelltherapie mit Epitop-Maskierung als ursächliches Phänomen. Die Autoren konnten auch keine prädiktive Marker für dieses Phänomen identifizieren. Sie konnten jedoch nachweisen, dass ein höherer Anteil an klonalen B-Zellen im Apheresat mit einer höheren Leukämiepersistenz assoziiert ist.
- Somit sind bis dato vier Mechanismen, die zur Entstehung eines CD19-negativen Rezidivs bei CD19 CAR T-Zelltherapie beschrieben; 1. Alternatives Splicing, 2. Wechsel der Linienzugehörigkeit, 3. De novo Mutationen mit Verlust des Membranankers, 4. Epitop-Maskierung.
- Strategien, um die Flucht von CAR T-Zellen zu verhindern werden aktuell untersucht; An CAR T-Zellen mit Spezifität für mehrere Antigene und CAR T-Zellen, welche eine endogene anti-Tumor Reaktion des Immunsystems auslösen wird aktuell gearbeitet.