

UNIVERZITA KARLOVA  
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**Léčba dospělých pacientů s akutní lymfoblastovou leukémií  
s prospektivním sledováním minimální reziduální nemoci  
v České republice v letech 2007–2020**

HABILITAČNÍ PRÁCE

Cyril Šálek

Praha 2021

## Obsah

<b>Předmluva</b> .....	<b>4</b>
<b>Teoretický úvod</b> .....	<b>5</b>
<b>Akutní leukémie</b> .....	<b>5</b>
<b>Akutní lymfoblastová leukémie</b> .....	<b>6</b>
<b>Genetické změny u B-prekurzorové akutní lymfoblastové leukémie</b> .....	<b>6</b>
<i>ETV6-RUNX1</i> a hyperdiploidie .....	6
<i>BCR-ABL1</i> .....	7
Přestavby genu <i>KMT2A (MLL)</i> .....	8
Hypodiploidie .....	8
<i>TCF3-PBX1</i> .....	9
<i>IGH-IL3</i> .....	9
Intrachromosomální amplifikace chromosomu 21 .....	9
Ph-like ALL .....	9
Přestavby genů <i>DUX4</i> , <i>MEF2D</i> a <i>ZNF384</i> .....	10
<b>Genetické změny u T-akutní lymfoblastové leukémie</b> .....	<b>11</b>
Transkripční faktory .....	12
<i>NOTCH1</i> .....	12
<i>CDKN2A/2B</i> .....	13
Signální dráha JAK/STAT .....	13
Signální dráha PI3K/AKT .....	13
<i>NUP214-ABL1</i> .....	13
Časná prekursorová T-ALL (ETP-ALL) .....	14
<b>Minimální reziduální nemoc</b> .....	<b>14</b>
Průtoková cytometrie .....	15
Molekulárně genetické metody pro detekci MRN u ALL .....	16
Sekvenování nové generace .....	18
Kapková digitální PCR .....	19
<b>Pacienti a metodika</b> .....	<b>21</b>
<b>Cíle</b> .....	<b>26</b>
<b>Výsledky</b> .....	<b>27</b>
<b>Léčba <i>BCR-ABL1</i>–negativní akutní lymfoblastové leukémie</b> .....	<b>27</b>
<b>Léčba <i>BCR-ABL1</i>–pozitivní akutní lymfoblastové leukémie</b> .....	<b>33</b>
<b>Prognostický význam nízkých pozitivit MRN</b> .....	<b>38</b>
<b>Diskuze</b> .....	<b>41</b>
<b>Léčba akutní lymfoblastové leukémie dospělých podle MRN</b> .....	<b>41</b>
Léčba <i>BCR-ABL1</i> –negativní akutní lymfoblastové leukémie .....	41
Léčba <i>BCR-ABL1</i> –pozitivní akutní lymfoblastové leukémie .....	46
<b>Prognostický význam nízkých pozitivit MRN</b> .....	<b>48</b>
<b>Akademické protokoly pro léčbu ALL v České republice</b> .....	<b>51</b>
<b>Porovnání metod pro hodnocení MRN</b> .....	<b>52</b>
<b>Detekce a prognostický význam Ph-like fenotypu</b> .....	<b>53</b>
<b>Závěr</b> .....	<b>55</b>
<b>Summary</b> .....	<b>57</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>59</b>
<b>Literatura</b> .....	<b>61</b>

<b>Přílohy .....</b>	<b>74</b>
<b>Příloha 1:</b>	
Low levels of minimal residual disease after induction chemotherapy for <i>BCR-ABL1</i> -negative acute lymphoblastic leukaemia in adults are clinically relevant.. .....	74
<b>Příloha 2:</b>	
Early MRD response as a prognostic factor in adult patients with acute lymphoblastic leukemia.....	75
<b>Příloha 3:</b>	
Comparison of Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction and Eight-color Flow Cytometry in Assessment of Minimal Residual Disease in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. ....	76
<b>Příloha 4:</b>	
Rapid identification of BCR/ABL1-like acute lymphoblastic leukemia patients using a predictive statistical model based on quantitative real time-polymerase chain reaction: clinical, prognostic and therapeutic implications.....	77
<b>Příloha 5:</b>	
Genomic landscape of B-other acute lymphoblastic leukemia in an adult retrospective cohort with a focus on BCR-ABL1-like subtype. ....	78
<b>Příloha 6:</b>	
Sensitivity and reliability of DNA-based mutation analysis by allele-specific digital PCR to follow the clonal evolution of resistant BCR-ABL1-positive cells.. .....	79

## Předmluva

Předkládaná habilitační práce je výsledkem mého soustavného vědeckého zájmu o problematiku akutní lymfoblastové leukémie (ALL) dospělých. Této problematice se věnuji od roku 2008 na půdě Ústavu klinické a experimentální hematologie ÚHKT a 1. LF UK v neodmyslitelné spolupráci s dalšími klinickými a vědeckými pracovišti sdruženými v České leukemické studijní skupině – pro život (CELL). Mé výzkumné aktivity na tomto poli byly formovány aktivním členstvím v Evropské pracovní skupině pro akutní lymfoblastovou leukémií dospělých (EWALL).

Práce obsahuje dosud nepublikovanou analýzu výsledků léčby 297 dospělých pacientů s akutní lymfoblastovou leukémií léčených v letech 2007–2020 v pěti českých hematologických centrech používajících léčebná schémata inspirovaná pediatrickými protokoly, jejichž součástí je prospektivní sledování minimální reziduální nemoci (MRN). Její součástí je soubor šesti původních vědeckých prací, které jsou *in extenso* řazeny samostatně formou příloh. Tyto práce jsou opatřeny komentářem a zasazeny do kontextu mých odborných aktivit. Popis metodiky, stejně jako vlastní odborná diskuse jsou součástí jednotlivých originálních publikací a nejsou v habilitačním spise překládány a duplikovány.

Je mou milou povinností na tomto místě poděkovat především prof. MUDr. Petru Cetkovskému, Ph.D., MBA za dlouholetou podporu a prostor, který mi poskytl pro odborný růst a rozvoj vlastní výzkumné činnosti. Dík patří všem kolegům z klinického úseku ÚHKT, kteří se podílejí na léčbě ALL. Aktivity na poli akutní lymfoblastové leukémie si nelze představit mimo kontext výše zmíněné studijní skupiny CELL a zástupců všech participujících center, zejména prof. MUDr. Michaela Doubka, Ph.D. a MUDr. Františka Folbera, Ph.D. Za hlubší uvedení do problematiky molekulární genetiky leukémií a odborné diskuse děkuji doc. Mgr. Kateřině Polákové Machové, Ph.D., Mgr. Haně Remešové, Ph.D., Ing. Jaroslavu Polákovi *in memoriam* a kolektivu laboratoře CLIP při Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol. Velmi si vážím pomoci Ing. Pavly Pecherkové, Ph.D. a MUDr. Jana Vydry, Ph.D. se statistickým zpracováním dat. V neposlední řadě vyjadřuji nesmírný vděk své rodině za inspiraci, toleranci a vřelé, stimulační prostředí.

V Praze 10. prosince 2021

## Teoretický úvod

### Akutní leukémie

Akutní leukémie představují heterogenní skupinu zhoubných onemocnění krvetvorby, charakterizovanou nekontrolovanou klonální proliferací leukemických blastů v kostní dřeni, jejich neschopností vyzávat a útlakem normální hematopoézy. Podle příslušnosti leukemických blastů ke konkrétní vývojové linii hematopoézy jsou rozlišovány akutní leukémie myeloidní (AML) a lymfoblastové (ALL).

Suverénní metodou pro stanovení liniové příslušnosti konkrétní akutní leukémie je imunofenotypizační vyšetření průtokovou cytometrií. Pomocí monoklonálních protilátek značených fluorochromy lze stanovit přítomnost konkrétních epitopů v cytoplasmě a na membráně blastů. Kombinace konkrétních znaků pak definuje nejen B-lymfoidní a T-lymfoidní linii, ale také linii myeloidní. Kritéria příslušnosti k jednotlivým liniím krvetvorby jsou definována Světovou zdravotnickou organizací (Swerdlow *et al*, 2017):

- myeloidní řada:  
MPO (imunofenotypizačně, imunohistochemicky nebo cytochemicky) *nebo* monocytární diferenciaci (nejméně 2 z následujících znaků: NSE, CD11c, CD14, CD64, lysozym);
- T-lymfoidní řada:  
cytoplasmatická CD3 (imunofenotypizačně pomocí anti-CD3-ε protilátky) *nebo* povrchová CD3;
- B-lymfoidní řada:  
silná exprese CD19 a zároveň silná exprese alespoň jednoho z následujících znaků: CD79a, cytoplasmatická CD22, CD10 *nebo* slabá exprese CD19 a zároveň silná exprese alespoň dvou z následujících znaků: CD79a, cytoplasmatická CD22, CD10.

Vzácně mohou leukemické blasty vykazovat současně znaky myeloidní i lymfoidní linie. Takové leukémie se označují jako leukémie se smíšeným fenotypem (MPAL = mixed phenotype acute leukemias).

## Akutní lymfoblastová leukémie

ALL je nejčastějším nádorovým onemocněním dětského věku s vrcholem incidence mezi druhým a pátým rokem života. V dospělosti představuje kolem 20 % akutních leukemií. Incidence u dospělých čítá 1,6/100 000 obyvatel. Nárůst případů ve vyšším věku je pozvolný, zvyšuje se však podíl prognosticky nepříznivých cytogenetických variant, jako je Ph-pozitivní ALL.

Prognosticky se ALL dětského a dospělého věku zásadně liší. Zatímco u pediatrických pacientů docílí remise 95 % a dlouhodobě přežívá více než 90 % pacientů (Conter *et al*, 2010, Sary *et al*, 2014), v dospělosti kolísá míra remise při léčbě standardními polychemoterapeutickými protokoly mezi 60–92 % a celkové přežití v neselektovaných kohortách kolísá kolem 30–50 % (Bassan & Hoelzer, 2011, Jabbour *et al*, 2015, Malard & Mohty, 2020). K příčinám se řadí vyšší podíl prognosticky nepříznivých cytogenetických abnormalit, horší tolerance intenzivní chemoterapie i limitace léčby komorbiditami a větší orgánovou toxicitou.

## Genetické změny u B-prekursorové akutní lymfoblastové leukémie

Z genetického pohledu je ALL charakterizována sekvenční akumulací genových mutací, jejichž charakter a vzájemná kooperace je určující pro zařazení do konkrétních klasifikačních systémů i pro prognózu pacientů (Paietta *et al*, 2021, Moorman *et al*, 2021). Mezi primární genetické změny definující často již preleukemický klon jsou řazeny chromosomální translokace, které jsou podkladem vzniku chimerických fúzních genů, a aneuploidie. Sekundární genetické změny představují změny v počtu kopií segmentů DNA (copy number alterations, CNA) a bodové mutace. Řadí se k nim alterace v genech pro lymfoidní transkripční faktory (*IKZF1*, *PAX5*, *EBF1*), regulaci buněčného cyklu (*CDKN2A/CDKN2B*, *RB1*) a transkripce (*ETV6*, *ERG*), apoptózu a epigenetické změny (Mullighan *et al*, 2007). Na rozdíl od primárních změn, které jsou vlastností celého leukemického klonu, mají sekundární změny často subklonální charakter (Anderson *et al*, 2011).

### *ETV6-RUNX1* a hyperdiploidie

Prognosticky příznivou skupinu ALL tvoří leukémie s fúzí *ETV6-RUNX1* a ALL s hyperdiploidní sadou chromosomů. Obě jednotky jsou popisovány až u 60 % dětských ALL, zatímco v dospělosti čítají <10 % případů (fúze *ETV6-RUNX1* se v dospělosti vyskytuje zcela

raritně) (Swerdlow *et al*, 2017). Tento nepoměr je považován za jednu z příčin rozdílů ve výsledcích léčby pediatrických a dospělých pacientů s ALL.

Fúzní gen *ETV6-RUNX1* vzniká chromosomovou translokací t(12;21)(p13;q22), která nebývá patrna při klasické cytogenetické analýze. Pro její detekci je nutné užít techniky FISH nebo PCR. Za fyziologických podmínek tvoří protein RUNX1 společně s jaderným vazebným faktorem CBF $\beta$  heterodimer, který má funkci transkripčního faktoru regulujícího řadu cílových genů nezbytných pro normální hematopoezu. Fúzní protein ETV6-RUNX1 tuto regulaci narušuje. Zárodečné mutace v genu *ETV6* jsou spojeny s vrozenou predispozicí k ALL, avšak <1 % dětí, které se rodí s fúzním genem *ETV6-RUNX1*, rozvine ALL (Zelent *et al*, 2004, Zuna *et al*, 2011).

Skupina leukémií s vysokou hyperdiploidií je definována přítomností 51–65 chromosomů bez strukturních změn. Nadpočetné chromosomy se vyskytují nenáhodně, většinou jsou ztrojeny chromosomy 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 a X (Moorman *et al*, 2003). Příznivý prognostický vliv se nevztahuje na skupinu s falešnou hyperdiploidií, která vzniká zdvojením hypodiploidní sady chromosomů a je naopak prognosticky nepříznivým znakem (Harrison *et al*, 2004).

#### *BCR-ABL1*

Filadelfský chromosom (Ph<sup>+</sup>) vzniklý translokací t(9;22)(q31.1;q11.2) je přítomen u 2–5 % dětských ALL a 25 % dospělých ALL. V populaci starších dospělých dosahuje jeho incidence 50 % (Moorman *et al*, 2010, Chiaretti *et al*, 2013). Vzniklý fúzní gen *BCR-ABL1* kóduje chimerický onkoprotein, který je konstitučně aktivní tyrozinovou kinázou přímo ovlivňující řadu buněčných procesů, včetně apoptózy, diferenciace a buněčné adheze. Tím, že zpomaluje přechod mezi G2 a M fází buněčného cyklu, umožňuje opravy poškozené DNA, což má za následek rezistenci k chemoterapii a radioterapii. Historicky patří *BCR-ABL1* mezi faktory spojované se špatnou prognózou, ovšem v éře inhibitorů tyrosinových kináz se výsledky léčby výrazně zlepšily (Fielding *et al*, 2014).

Podle lokalizace zlomového místa na chromosomu 22 vznikají dva různě velké onkoproteiny: 190 kd velký protein (p190, zlom minor), který je přítomen u dvou třetin Ph<sup>+</sup> ALL, a 210 kd velký protein (p210, zlom major), jenž je nalézán ve třetině případů Ph<sup>+</sup> ALL a u všech pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Typ fúzního transkriptu ovlivňuje léčebnou odpověď, která je horší u pacientů s isoformou p210 (Cimino *et al*, 2006).

Některé Ph+ ALL vznikají na úrovni multipotentních hematopoetických prekurzorů. Fúze *BCR-ABL1* je u nich přítomna i v ostatních krvetvorných liniích, což kompromituje interpretaci transkriptů fúzního genu po dosažení remise. Tyto ALL se svou klonální charakteristikou podobají chronické myeloidní leukémii v lymfoidním blastickém zvratu a bylo pro ně navrženo označení CML-like ALL (Hovorkova *et al*, 2017).

Ph+ ALL je na genetické úrovni provázena řadou přídatných genetických změn, jejichž výskyt má zřejmý prognostický dopad. Nejčastěji jsou popisovány delece *IKZF1* (84 %), *PAX5* (36 %) a *CDKN2A* (32 %) (Mullighan *et al*, 2008, Fedullo *et al*, 2019). Mutace v nejčastěji deletovaném transkripčním faktoru *IKZF1* (Ikaros) jsou považovány za rizikový faktor *per se* (Stanulla *et al*, 2020). Nositelem negativní prognózy je především dominantně negativní isoforma *IKZF1* v kombinaci s delecemi *CDKN2A* nebo *PAX5* (Fedullo *et al*, 2019).

#### Přestavby genu *KMT2A* (*MLL*)

Chromosomové translokace t(v;11q23.3) jsou nejčastější mutací popisovanou u dětí do 1 roku (v 80 %), v dospělosti tvoří ~10 %. Jsou spojeny s nezralým imunofenotypem, vyšším počtem leukocytů při diagnóze, extramedulárním postižením CNS, horší odpovědí na léčbu, vyšší incidencí relapsů a signifikantně horším přežitím v porovnání s ostatními typy ALL (Swerdlow *et al*, 2017). ALL s přestavbou lokusu 11q23.3 často koexprimují myeloidní znaky a tvoří podstatnou část akutních leukémií se smíšeným fenotypem B/myeloidních.

Gen *KNMT3A* má u ALL celou řadu translokačních partnerů. Nejčastějším je *AFF1* (*AF4*) při t(4;11)(q21.3;q23.3). Druhým nejčastějším pak *MLLT1* (*ENL*) při t(11;19)(q23.3;p13.3), který je nadto často přítomen u monoblastových AML. Dalšími translokačními partnery mohou být zejména *MLLT4* (*AF6*), *MLLT3* (*AF9*) a *MLLT10* (*AF10*). Tyto translokace tvoří dohromady 85 % všech ALL z této skupiny.

*KNMT3A* je histonová methyltransferáza, která reguluje transkripci svým vlivem na remodelaci chromatinu. Mezi její cílové geny patří geny ze skupiny *HOX* a *IKZF1*, které mají zásadní roli ve vývoji lymfocytů (Winters & Bernt, 2017). Leukémie s přestavbou *KNMT3A* vykazují nízkou frekvenci sekundárních mutací, což podporuje hypotézu, že tato přestavba je sama o sobě schopna navodit leukemickou transformaci (Andersson *et al*, 2015).

#### Hypodiploidie

U hypodiploidních leukémií jsou nalézány ztráty různých chromosomů, které se mohou vyskytovat společně se strukturálními změnami. Téměř haploidní karyotyp s <30 chromosomy



je popisován výhradně u ALL dětského věku, nízké hypodiploidní s 30–39 chromosomy je nalézán u <5 % pediatrických i dospělých pacientů. Hypodiploidní ALL jsou často doprovázeny typickými mutacemi. U ALL s nízké hypodiploidní sadou chromosomů to jsou mutace *IKZF1*, mutace aktivující signální dráhy RAS a PI3K nebo mutace v genech *RBI* a *TP53* (Holmfeldt *et al*, 2013). Hypodiploidie je prognosticky nepříznivým jevem.

#### *TCF3-PBX1*

Fúzní gen *TCF3-PBX1* je popisován u 3 % pediatrických a 6 % dospělých ALL (Mullighan, 2012). Je důsledkem translokace t(1;19)(q23;p13). Fúzní protein TCF3-PBX1 interferuje s funkcí fyziologického transkripčního faktoru TCF3 a HOX proteinu PBX1. Prognostický význam je nejasný. Dříve byl považován za negativní prognostický faktor, v číe intenzivních polychemoterapeutických protokolů je negativní vliv této fúze v pediatrické populaci setřen. Fúze je spojována s větším rizikem relapsu v CNS a horší prognózou v případě relapsu (Jeha *et al*, 2009). Některé protokoly pro léčbu dospělých pacientů řadí fúzi *TCF3-PBX1* nadále mezi faktory definující vysoké riziko (Beldjord *et al*, 2014).

#### *IGH-IL3*

Vzácně jsou popisovány translokace mezi genem *IL3* a genem pro těžký řetězec *IGH* při translokaci t(5;17)(q31.1;q32.1). Důsledkem je zvýšená exprese interleukinu 3 a s tím spojená eozinofilie. Prognostický význam je nejasný.

#### Intrachromosomální amplifikace chromosomu 21

Některé dětské ALL vykazují četné amplifikace a ztráty v průběhu celého chromosomu 21, které jsou doprovázeny amplifikací lokusu 21q22.12 s genem *RUNX1*. Pro definici ALL s intrachromosomální amplifikací chromosomu 21 (iAMP21) je klíčová přítomnost tří a více nadbytečných kopií genu *RUNX1* na jednom chromosomu 21. Změna je spojována s horší prognózou (Harrison *et al*, 2014). U dospělých pacientů je raritní.

#### Ph-like ALL

Ph-like ALL představuje novou klinickou jednotku, jejíž genový expresní profil je podobný *BCR-ABL1*–pozitivní ALL, avšak vlastní *BCR-ABL1* fúze není přítomna. Byla popsána nezávisle dvěma pracovními skupinami v roce 2009 (Den Boer *et al*, 2009, Mullighan *et al*, 2009). Klinicky se vyznačuje vyšším počtem leukocytů při diagnóze, vyšší hladinou MRN

po skončení indukční fáze léčby a horším přežitím (Roberts *et al*, 2014). Prevalence je závislá na věku: čítá 10 % dětských ALL, narůstá na 28 % ve skupině mladých dospělých (21–39 let), poté opět klesá (Roberts *et al*, 2017).

Jednotka tvoří podskupinu „B-other“ leukémií, které nenesou žádnou z výše uvedených známých chromosomálních či karyotypických změn. Ph-like leukémie jsou charakterizovány vysokou četností změn v genech pro transkripční faktory (zejména delece *IKZF1*, které jsou přítomny u 70–80 % dospělých s Ph-like ALL) (Roberts *et al*, 2017, Herold *et al*, 2017, Jain *et al*, 2017), mutacemi vedoucími k deregulaci buněčných receptorů a kinázových drah. Patří mezi ně změny exprese a mutace *CRLF2* (55–60 %), deregulace tyrozinových kináz rodiny *ABL*, kinázy *JAK2* (7 %), genu pro erythropoetinový receptor *EPOR* (3–10 %), mutace aktivující signální dráhu JAK-STAT (11 %) a RAS (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *NF1*; 6 %) (Iacobucci & Mullighan, 2017, Chiaretti *et al*, 2019). Veškeré fúzní kombinace mají zachovanou intaktní tyrosinovou kinázu, která je typicky konstitučně aktivní.

Gen *CRLF2* je lokalizován na pohlavním chromosomu Xp22.3/Yp11.3 a kóduje jednu z podjednotek thymického stromálního lymfopoetinového receptoru (TSLP), který je nezbytný v časně fázi vývoje B-lymfocytů. Zvýšená exprese *CRLF2* je nejčastěji důsledkem kryptické translokace do lokusu pro těžký řetězec imunoglobulinů (*IGH-CRLF2*) nebo intersticiální delece telomerové oblasti vedoucí ke vzniku fúze *P2RY8/CRLF2* (častější u dětí), méně často je způsobena bodovou mutací (Russell *et al*, 2017). Většina Ph-like leukémií se zvýšenou expresí *CRLF2* má současně další mutace vedoucí k aktivaci signálních drah JAK-STAT nebo RAS (Roberts *et al*, 2017). Terapeutický potenciál v této skupině mají cílené inhibitory JAK-STAT, PI3K a BCL2 signalizace (Reshmi *et al*, 2017).

Další podskupina Ph-like ALL nese mutace v rodině kináz ABL. Do této skupiny patří fúze s geny pro kinázy *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRA* a *PDGFRB*. Tyto leukémie jsou citlivé k inhibitorům *ABL1* imatinibu a dasatinibu (Zhang, Y. *et al*, 2018).

Poslední podskupinu Ph-like leukémií tvoří případy s translokací genu *JAK2*, který má více než 14 známých fúzních partnerů, a přestavby genu *EPOR*. Tyto jednotky jsou citlivé k *JAK2* inhibitoru ruxolitinibu (Reshmi *et al*, 2017).

#### Přestavby genů *DUX4*, *MEF2D* a *ZNF384*

V nedávné době byly pomocí techniky vysoce výkonného sekvenování nové generace (NGS) identifikovány nové podtypy BCP-ALL obsahující rekurentní fúze genů pro vazebné faktory DNA. Patří k nim gen pro double homeobox 4 (*DUX4*), myocyte enhancer factor 2D (*MEF2D*) a zinc finger protein 384 (*ZNF384*).

ALL s přestavbou genu *DUX4*, který kóduje klíčový transkripční faktor uplatňující se v embryonálním vývoji, tvoří 4–7 % dětské a dospělé ALL. Zatímco v normální B-lymfocytech *DUX4* exprimován není, u BCP-ALL vedou fúze *DUX4* s geny pro *IGH* nebo *ERG* k jeho zvýšené expresi. Leukémie s přestavbou *DUX4* se vyznačují dobrou prognózou (Yasuda *et al*, 2016, Zhang, J. *et al*, 2016).

Přestavby genu *MEF2D* jsou popisovány u 2–4 % dětských a 2–7 % dospělých BCP-ALL. Cílovým genem tohoto transkripčního faktoru je histonová deacetyláza 9 (*HDAC9*), což vedlo k pokusům léčebně ovlivnit tuto leukémii inhibítorem HDAC panobionstatem. Leukémie s přestavbou *MEF2D* mají střední prognózu (Gu *et al*, 2016, Ohki *et al*, 2019).

Leukémie s přestavbou *ZNF384* se vyznačují koexpresí myeloidních markerů nebo splňují diagnostická kritéria pro MPAL B/myeloidní. Představují 3–5 % dětských a 3–8 % dospělých BCP-ALL. Typická je aktivace signální dráhy JAK-STAT, kterou lze blokovat cílenými inhibitory. Zatímco u dětí měly tyto leukémie horší léčebnou odpověď na prednison, u dospělých mají relativně dobrou prognózu (Hirabayashi *et al*, 2017, Qin *et al*, 2021, Moorman *et al*, 2021).

### Genetické změny u T-akutní lymfoblastové leukémie

Prognostický význam chromosomálních změn, genových fúzí a dalších mutací je u T-ALL méně zřetelný, než je tomu u BCP-ALL. Jedním z důvodů je skutečnost, že ačkoliv jsou změny karyotypu přítomny u 50–70 % pacientů s T-ALL, nejsou většinou detekovány klasickou cytogenetickou analýzou, neboť se jedná o kryptické fúze. Příkladem může být fúzní gen *STIL-TALI*, který je pouze vzácně odrazem translokace t(1;14)(p32;q11). V naprosté většině vzniká jako důsledek intersticiální delecce 1p32 nezachytitelné klasickým cytogenetickým vyšetřením (Janssen *et al*, 1993).

S nástupem sekvenčních technik nové generace (exomového, celogenomového, transkriptomového sekvenování) byla popsána řada nových molekulárně genetických změn, včetně vzájemných vazeb mezi mutacemi, alterovanými signálními drahami a konkrétními subtypy T-ALL. Častým jevem u T-ALL je skutečnost, že mutace a genové zlomy se nacházejí v nekódujících oblastech mimo vlastní geny, a není je tedy možné zachytit klasickým RNA screeningem (Liu *et al*, 2017). Každá T-ALL nese více než 10 biologicky relevantních genomických změn, které spolu rozmanitě kooperují v procesu transformace normálních T-buněčných prekurzorů do agresivních leukemických buněk (Girardi *et al*, 2017).

Některé národní studijní skupiny mají definovány mutační panely, s jejichž pomocí identifikují rizikové genetické profily T-ALL. Příkladem je panel francouzské studijní skupiny GRAALL zahrnující geny *NOTCH1*, *FBXW7*, *RAS* a *PTEN*, jehož výsledek je jedním z faktorů zvažovaných při indikaci alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT) (Trinquand *et al*, 2013).

### Transkripční faktory

Společnou vlastností všech T-ALL je ektopická exprese některého z transkripčních faktorů (Girardi *et al*, 2017). Byly popsány čtyři mechanismy vedoucí ke zvýšené expresi těchto faktorů:

- translokace do oblasti genu pro podjednotku T-buněčného receptoru (TCR);
- přestavba do oblasti jiné regulační sekvence;
- duplikace nebo amplifikace transkripčního faktoru;
- mutace vedoucí ke vzniku nové regulační sekvence s funkcí zesilovače (enhanceru).

Nejčastější variantou, která je popisována přibližně u poloviny pacientů s T-ALL, jsou přestavby zahrnující geny pro podjednotky T-buněčného receptoru (TCR) v lokusech 14q11 (geny *TRA* a *TRD* pro podjednotky  $\alpha$  a  $\delta$ ) a 7q34 (gen *TRB* pro podjednotku  $\beta$ ). Mezi transkripční faktory, jejichž exprese je touto cestou zvýšena, patří *TLX1* (*HOX11*) v lokusu 10q24.3 (30 % dospělých T-ALL), *TLX3* (*HOX11L2*) v lokusu 5q35.1 (10–15 % dospělých ALL). Dalšími geny, které často translokují do oblasti genů TCR, jsou geny pro transkripční faktory *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *OLIG2*, *LMO1*, *LMO2*, *NKX2-1*, *NKX2-2*, *HOXA*, *MYC* a *MYB* (De Keersmaecker *et al*, 2005).

### *NOTCH1*

Signální dráha NOTCH1 má klíčovou úlohu v procesu, ve kterém se multipotentní hematopoetický progenitor zadá T-lymfoidní linii, stejně jako v regulaci dalšího vývoje thymocytů (Radtke *et al*, 2013). Mutace aktivující NOTCH1 signalizaci představují hlavní onkogenní událost ve vývoji T-ALL. Jsou popisovány ve více než 50 % případů. V dalších 10–15 % případů jsou přítomny inaktivující mutace *FBXW7*. Důsledkem inaktivace tohoto negativního regulátoru je stabilizace NOTCH1 proteinu a aberantní aktivace jeho signální dráhy (Weng *et al*, 2004). Potlačení signalizace NOTCH1 dráhy pomocí inhibitorů  $\gamma$ -sekretázy nespĺnilo očekávání z důvodu nedostatečného protinádorového účinku a výrazné toxicity

(Papayannidis *et al*, 2015). Jedním z cílových genů regulovaných NOTCH1 dráhou je *MYC*. Jeho funkce mohou být inhibovány inhibitory bromodomény (Ott *et al*, 2012).

#### *CDKN2A/2B*

Genové alterace v lokusu 9q21, kde jsou lokalizovány geny *CDKN2A* a *CDKN2B*, jsou popisovány u 70–80 % T-ALL. Inaktivace těchto genů představuje častý mechanismus alterace dráhy nádorového supresoru *TP53* u ALL. Deregulace obou genů je zpravidla důsledkem homozygotních delecí, v případě *CDKN2B* je navíc často nalézána hypermethylace v promotorové oblasti (Jang *et al*, 2019).

#### Signální dráha JAK/STAT

Zásadní roli ve vývoji normálních T-lymfocytů má signalizace JAK/STAT iniciovaná vazbou interleukinu 7 na receptor IL7R. Kaskádovitá fosforylace proteinů JAK1 a JAK3 vede k fosforylaci a dimerizaci proteinu STAT5, který translokuje do jádra a reguluje transkripci řady genů, včetně rodiny antiapoptotických proteinů BCL-2. Aktivující mutace v genech *IL7R*, *JAK1*, *JAK3* a *STAT5* jsou popisovány u 20–30 % T-ALL (Vicente *et al*, 2015). Často se vyskytují společně s mutacemi *TLX*, *HOXA* a u časně prekurzorové T-ALL (Zhang, J. *et al*, 2012).

#### Signální dráha PI3K/AKT

Aktivace dráhy PI3K/AKT vede k zvýšení metabolismu, proliferaci a snížení stupně apoptózy v buňce. U T-ALL je zvýšená aktivace většinou způsobena inaktivujícími mutacemi nebo delecemi genu *PTEN*, jehož produkt je hlavním regulátorem přeměny PIP3 na PIP2 v úvodu kaskády. Další možnosti aktivace představují aktivující mutace v genech pro podjednotky PI3K, AKT a mTOR (Cante-Barrett *et al*, 2016).

#### *NUP214-ABL1*

U 6 % T-ALL je přítomna kryptická fúze v lokusu 9q34 dávající vznik fúznímu genu *NUP214-ABL1*. Má funkci konstitučně aktivní tyrosinové kinázy, která aktivuje STAT5 a signalizaci v kaskádě RAS-MAPK (De Keersmaecker *et al*, 2014). Jedná se o slabý onkogen, který je u T-ALL vždy doprovázen zvýšenou expresí *TLX1* nebo *TLX3* (Graux *et al*, 2004). Vzácně jsou popisovány T-ALL s jinými translokačními partnery *ABL1* (*EML1-ABL1*, *ETV6-*

*ABL1*). Leukémie z této skupiny vykazují citlivost k inhibitorům tyrozinových kináz (Durinck *et al*, 2015).

#### Časná pekursorozová T-ALL (ETP-ALL)

ETP-ALL představuje samostatnou podjednotku vznikající z velmi časného prekurzoru vývojově zadaného do T-lymfoidní linie. Je charakterizovaná chybějící expresí znaků CD1a a CD8 a slabou nebo chybějící expresí znaku CD5 za současné přítomnosti jednoho nebo více myeloidních či kmenových markerů (CD34, CD117, CD13, CD33, CD11b nebo CD65) (Coustan-Smith *et al*, 2009). Jedná se o geneticky heterogenní skupinu s deregulovanou signalizací v řadě signálních drah (JAK/STAT, RAS), mutacemi v hematopoetických a lymfoidních transkripčních faktorech (*RUNX1*, *IKZF1*, *ETV6*, *GATA 3*, *EP300*) a mutacemi vedoucími ke ztrátě funkce epigenetických regulátorů (*EZH2*, *SUZ12*, *EED*, *SETD2*). Příznačné je chybění mutací v *NOTCH1* a přítomnost mutací *FLT3*, *DNMT3A*, *IDH1* a *IDH2* typických spíše pro myeloidní leukémie (Zhang, J. *et al*, 2012, Neumann *et al*, 2013). Genový expresní profil ETP-ALL je podobný hematopoetickým kmenovým buňkám.

ETP-ALL tvoří 10–12 % dětských a 8–10 % dospělých T-ALL. Klinicky se vyznačuje rezistencí k indukční léčbě a pomalejší kinetikou MRN, což se při léčbě standardními protokoly odráží v horší prognóze (Jain *et al*, 2016). Při léčbě moderními protokoly s intenzifikací terapie podle MRN se přežití pacientů zásadně neliší od ostatních rizikových ALL (Patrick *et al*, 2014, Bond *et al*, 2017).

#### Minimální reziduální nemoc

Maligní buňky, které setrvávají v organismu i po dosažení kompletní hematologické remise a nejsou detekovatelné standardní mikroskopickou analýzou, jsou označovány jako minimální reziduální nemoc (MRN) (Campana & Pui, 1995). K její kvantifikaci je možné použít cytogenetickou analýzu, multiparametrovou průtokovou cytometrii (FCM), kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (qPCR) a metody NGS. Hodnota MRN je závislá na citlivosti použité metodiky, proto je v současnosti upřednostňován termín měřitelná reziduální nemoc. V praxi rutinně používanými metodami FCM a qPCR je v současnosti možné detekovat leukemické buňky s citlivostí  $10^{-4}$  až  $10^{-6}$ .

MRN je parametrem, který měří individuální odpověď pacienta na podanou léčbu. Řada studií prokázala, že přetrvávající nebo znovu se objevivší MRN je nezávislým a klinicky

zásadním rizikovým faktorem, který poskytuje přídatnou prognosticky relevantní informaci ke vstupním klinickým a genetickým parametrům (Hourigan *et al*, 2017, Bruggemann *et al*, 2012, Berry *et al*, 2017, Gokbuget *et al*, 2019). Kromě přesnějšího určení hloubky remise MRN umožňuje individualizovat postremisní léčbu a časně detekovat relabující onemocnění.

Je třeba zdůraznit, že MRN je třeba interpretovat vždy s ohledem na použitou metodiku, fázi léčby a v kontextu daného léčebného protokolu. Prognostický význam se může lišit v závislosti na předcházející léčbě (jiný u chemoterapeutických protokolů pediatrického typu než u méně intenzivních protokolů, jiný při léčbě cílenými léky), i léčbě následující po bodě, kdy byla MRN měřena (Stutterheim *et al*, 2021).

#### Průtoková cytometrie

Principem metody je identifikace povrchových a cytoplasmatických znaků exprimovaných na leukemických blastech pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek. Metodicky lze identifikovat a následně monitorovat spektrum aberantně exprimovaných znaků definovaných při diagnóze označovaných jako LAIP (imunofenotyp asociovaný s leukémií) nebo v každém vzorku pátrat po abnormálních diferenciačních a maturačních profilech konkrétní krvetvorné linie (přístup DfN, odlišný od normálu). Výhodou přístupu DfN je možnost sledovat MRN i v případech, kdy nelze při diagnóze jasně definovat LAIP nebo když není k dispozici diagnostický vzorek. Nadto se tímto přístupem snižuje riziko falešné negativity v případě, že dojde ke ztrátě exprese znaků přítomných při diagnóze (fenomén označovaný jako imunofenotypový posun) (Chen & Wood, 2017). Odborná konsorcia doporučují oba přístupy kombinovat, což běžně umožňují přístroje s osmi a vícebarevnými panely protilátek. Uvedeného postupu se využívá zejména u AML, kde častěji nelze definovat vstupní LAIP (zejména u leukémií s monocytární diferenciací) a fenomén imunofenotypického posunu je méně vzácný (Schuurhuis *et al*, 2018).

Metodu FCM lze pro detekci MRN použít u 90 % akutních leukémií. Analýza je rychlá, výsledek je znám do několika hodin. To umožňuje zařadit měření MRN do protokolů již v průběhu indukční léčby, čehož se využívá u ALL (Basso *et al*, 2009). Ke zřetelným výhodám patří i nižší cena. Limitující může být závislost na kvalitě vstupního vzorku, zejména v situaci, pokud je MRD měřena v hypocelulární kostní dřeni. V období regenerace kostní dřene po podané chemoterapii mohou některé lymfoidní prekurzory koexprimovat znaky typické pro ALL, což může vést k falešné pozitivitě měření. O fenoménu imunofenotypového posunu již



byla zmínka výše. Metoda je v pokročilém stádiu standardizace s cílem eliminovat zmíněná rizika a zajistit reprodukovatelnost výsledků mezi laboratořemi (Kalina *et al*, 2019).

#### Molekulárně genetické metody pro detekci MRN u ALL

Kinetika reziduální nemoci v časných fázích léčby představuje samostatný a klinicky relevantní rizikový faktor, na jehož základě je možné stratifikovat pacienty do nových prognostických skupin bez ohledu na tradiční rizikové faktory (počet leukocytů v době diagnózy, imunofenotyp, cytogenetika). Zásadní diskriminační hodnotu má hodnota MRN v 10. až 16. týdnu léčby, tedy po 2–3 blocích intenzivní léčby, která v řadě národních protokolů rozhoduje o intenzifikaci léčby pomocí alogenní HSCT (Bruggemann *et al*, 2012, Gokbuget *et al*, 2019).

Pro sledování MRN jsou v Evropě konsenzuálně doporučovány metody založené na PCR. V běžné klinické praxi jsou rozšířeny dva metodické přístupy: 1) analýza a kvantifikace klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory (IG/TR); 2) analýza a kvantifikace specifických fúzních genů.

#### Analýza klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory

Současným standardem pro sledování MRN u ALL jsou metody analyzující klonální přestavby genů pro imunoglobulinové řetězce a T-buněčné receptory (IG/TR). Dochází k nim během časného vývoje B a T lymfocytu. V procesu rekombinace se z řady alternativních kódujících sekvencí vytváří definitivní sekvence složená ze segmentů V (variable), D (diversity) a J (joining). Oblasti DNA, které spojují jednotlivé segmenty, se označují jako N segmenty. Vznikají náhodnými insercemi či delecemi, jsou značně heterogenní a představují genetický „otisk prstu“ specifický pro jeden konkrétní buněčný klon. U ALL je možné detekovat konkrétní V(D)J přestavbu IG/TR, která charakterizuje příslušný lymfoblastový klon, tuto přestavbu sekvenovat a navrhnout primery pro PCR tak, aby ve výsledném transkriptu byl obsažen specifický N segment. Pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) lze pak detekovat MRN se senzitivitou v rozmezí  $10^{-4}$  až  $10^{-5}$  (Cazzaniga & Biondi, 2005).

Metoda je v současnosti vysoce standardizovaná jak technologicky, tak ve smyslu interpretace výsledků (van der Velden *et al*, 2007). Byly definovány podmínky pro stanovení senzitivity a kvantitativního rozmezí metody, které musí být referovány spolu s každým výsledkem (Bruggemann *et al*, 2010). Výhodou je použití stabilní DNA jako výchozího materiálu a skutečnost, že metoda může být použita u většiny BCP-ALL a T-ALL. Senzitivita



zpravidla o 0,5 až 1,0 logaritmus převyšuje citlivost průtokové cytometrie. Riziko falešné positivity či negativity z důvodu klonální evoluce je relativně nízké, přesto se doporučuje pro účely sledování MRN identifikovat dvě specifické přestavby. Nevýhodou metody je její náročnost časová a finanční.

Jako vstupní materiál k vyšetření je preferována kostní dřev. U BCP-ALL jsou hladiny MRN v periferní krvi 2,1krát nižší, u T-ALL kvantita MRN v kostní dřevě a periferní krvi dobře koreluje (Kotrova *et al*, 2020).

Obtíže přináší interpretace pozitivních výsledků v nekvantifikovatelném rozmezí metody. Mohou představovat skutečnou MRN i nespecifický signál z neklonálních lymfocytů. Po skončení indukční léčby dosahuje nekvantifikovatelné positivity MRN ~15 % dospělých pacientů s Ph-negativní ALL. Ve srovnání s pacienty, kteří jsou MRN negativní, je jejich prognóza signifikantně horší (Gokbuget *et al*, 2017, Salek *et al*, 2021). Absolutní kvantifikaci MRN v této problematické skupině umožní až zavedení metody NGS do běžné praxe (viz dále).

#### Kvantifikace transkriptu fúzních genů

MRN u ALL s chromosomálními translokacemi vedoucími ke vzniku fúzních genů může být sledována pomocí kvantifikace transkriptů těchto fúzních genů. Zmiňované možnosti se u dospělých pacientů standardně využívá u 25 % leukémií s fúzí *BCR-ABL1*. Stejného přístupu je možné využít u leukémií charakterizovaných fúzemi *ETV6-RUNX1*, *KMT2A-AFF1* a *TCF3-PBX1*. Zlomová místa mezi partnerskými geny jsou rozprostřena do dlouhých segmentů nekódujících oblastí DNA. Optimálním materiálem pro detekci transkriptů je proto RNA, která nese jednu z relativně malého množství sestřihových variant daného fúzního genu. Primery pro kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR) jsou shodné pro všechny pacienty s příslušnou fúzní variantou (Gabert *et al*, 2003).

Výhodou metody je vysoká senzitivita (až  $10^{-5}$ ), menší náročnost, nízká cena a fakt, že není nutné disponovat diagnostickým materiálem. Riziko představuje nestabilita RNA a větší nebezpečí kontaminace vzorku. Výsledný transkript je ovlivněn nejen počtem buněk nesoucích příslušný fúzní gen, ale také počtem transkriptů fúzního genu v leukemické buňce, který se může lišit pacient od pacienta i mezi jednotlivými leukemickými buňkami téhož pacienta. Získaná MRN tak nepředstavuje absolutní kvantifikaci MRN. Tuto nevýhodu bude možné překonat zavedením technik digitální PCR nebo sledováním fúzních transkriptů na genomické úrovni pomocí specifických primerů (Hindson *et al*, 2013, Hovorkova *et al*, 2017). V případě

fúze *BCR-ABL1* dosud nebylo dosaženo úplné standardizace metodiky pro její kvantifikaci; konsensuální metodická doporučení jsou průběžně aktualizována (Pfeifer *et al*, 2019).

### Sekvenování nové generace

Sekvenování nové generace (NGS) je revoluční technologie schopná generovat miliony až miliardu unikálních čtení („readů“) cílových sekvencí. Umožňuje simultánně detekovat celé spektrum mutací specifických pro konkrétního pacienta (Pastore & Levine, 2015). Mírou mutační nálože je frekvence mutované alely (VAF) udávaná jako podíl čtení obsahujících mutaci a celkového počtu čtení daného genového lokusu. Klon s nejvyšší frekvencí VAF je označován jako zakladatelský klon. Může se skládat z dalších subklonů, které kromě zakladatelské mutace obsahují další aberace s nižší VAF. NGS tak dává představu o celé škále potenciálně kooperujících mutací u jednoho pacienta.

Senzitivita je u NGS udávána v procentech zachycených VAF: senzitivita 1 % VAF odpovídá záchytu 1 buňky s heterozygotní mutací mezi 50 testovanými buňkami. Je závislá na dalším parametru, pokrytí („coverage“), který udává počet čtení konkrétního lokusu v průběhu jednoho sekvenačního běhu. Toho přístupu je možné využít pro sledování MRN. Běžně užívané NGS platformy mají senzitivitu umožňující detekci 2–5 % VAF. Pomocí komplikovaných korekčních mechanismů k filtrování sekvenačních chyb, lze senzitivitu zvýšit až na 0,01–0,5 % VAF (Yoest *et al*, 2020).

Metoda NGS je aplikovatelná na diagnostický vzorek i na materiál získaný v průběhu léčby. Výhodou je možnost získat enormní množství sekvenačních dat v krátkém čase a relativně levně. K nevýhodám patří náročnost na expertní bioinformatickou analýzu.

Aplikace metody NGS pro detekci MRN u ALL umožňuje odlišit nespecifickou amplifikaci neklonálních přestaveb v průběhu regenerace kostní dřeně, která při použití standardní metodiky může způsobovat falešnou pozitivitu mimo kvantifikační rozmezí testu. Výhodou je možnost sledování celého spektra klonálních přestaveb IG/TR naráz a nezávislost na diagnostickém materiálu (Kotrova *et al*, 2015, Della Starza, Chiaretti *et al*, 2019). NGS eliminuje nutnost používat pro každého individuálního pacienta specifické primery pro detekci přestaveb IG/TR. Ve srovnání se standardní qPCR má NGS větší prediktivní hodnotu pro relaps (Kotrova *et al*, 2015, Della Starza, De Novi *et al*, 2019). Péčí konsorcia EuroClonality-NGS metoda je metoda v pokročilém stupni standardizace pro účely sledování MRN u ALL (Bruggemann *et al*, 2019).

## Kapková digitální PCR

Zásadní výhodou kapkové digitální PCR (ddPCR) pro sledování MRN je možnost absolutní kvantifikace MRN na DNA úrovni bez nutnosti tvořit standardní křivku z diagnostického materiálu. Cílová DNA je rozdělena do více než 20 000 kapének olejové emulze tak, že v ideálním případě každá z kapének obsahuje jednu, několik málo nebo žádnou kopii DNA. Metoda využívá stejných pacient-specifických primerů a sond, jako qPCR pro detekci přestaveb IG/TR. PCR reakce vedoucí k amplifikaci cílové sekvence probíhá samostatně v každé z kapének. Po skončení reakce se měří intenzita fluorescence a každá z kapének je vyhodnocena jako pozitivní nebo negativní. Absolutní kvantita cílové sekvence ve vstupním vzorku je určena statickým výpočtem (Coccaro *et al*, 2020). Metoda významně snižuje riziko nespecifické amplifikace IG/TR přestaveb a podobně jako NGS umožňuje stanovit pozitivitu MRN i ve vzorcích, které jsou standardními technikami hodnoceny jako pozitivní nekvantifikovatelné (MRNnq). Nevýhodou je zatím cena i nutnost speciálního přístrojového vybavení.

Srovnání diskutovaných metod pro detekci MRN přehledně shrnuje Tabulka 1.

**Tabulka 1.** Srovnání metod pro detekci MRN u ALL.

	FCM	IG/TR qPCR	fúzní geny RT-qPCR	ddPCR	NGS
<b>individuální design</b>	ano pro LAIP ne pro nové přístupy	ano	ne	ano	ne
<b>senzitivita</b>	4 barvy: $10^{-4}$ 8 barev: $10^{-5}$ 8 barev a $>10^6$ buněk: $10^{-6}$	$10^{-4}$ až $10^{-5}$	$10^{-4}$ až $10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$ až $10^{-7}$ závisí na množství DNA
<b>kvantifikace</b>	absolutní	absolutní při $\geq 10^{-4}$ ; při $< 10^{-4}$ semikvantitativní	relativní	absolutní	absolutní
<b>závislost na diagnostickém materiálu</b>	ne	ano	ne	ano	ne
<b>aplikovatelnost</b>	$>90$ %	90–95 %	30–40 %	90–95 %	$>95$ %
<b>doba analýzy</b>	hodiny	týdny	dny	hodiny	1 týden
<b>materiál a jeho stabilita</b>	buněčná suspenze nestabilní	DNA stabilní	RNA nestabilní	DNA stabilní	DNA stabilní
<b>dodatečná informace</b>	heterogenita vyšetřované populace	žádná	žádná	žádná	klonální repertoár; přesná identifikace zlomů

Citováno podle (Contreras Yametti *et al*, 2021); upraveno.

## Pacienti a metodika

Práce zahrnuje analýzu výsledků léčby intenzivně léčených dospělých pacientů s akutní lymfoblastovou leukémií diagnostikovaných mezi léty 2007 a 2020 v pěti hematologických centrech v České republice: Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze a fakultních nemocnicích v Brně, Hradci Králové, Olomouci a Ostravě. Data byla extrahována z databáze DATOOL České leukemické skupiny – pro život (CELL) ke dni 5.4.2021. Všichni pacienti podepsali souhlas s ukládáním svých anonymizovaných dat do výše uvedené databáze, stejně jako souhlas s využitím biologického materiálu pro vědecké účely ve shodě s Helsinskou deklarácí Světové lékařské asociace.

Celkem bylo léčeno 297 pacientů. Pacienti s *BCR-ABL1*-negativní a *BCR-ABL1*-pozitivní ALL byly analyzovány odděleně. Vstupní charakteristiky pacientů jsou shrnuty v Tabulkách 2 a 3.

**Tabulka 2.** Charakteristika souboru pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL.

<b>pacientů celkem</b>	<b>203</b>	
<b>věk</b>		
medián (roky), rozmezí	36,0	18–64
<35 let	95	46,8 %
35–55 let	91	44,8 %
>55 let	17	8,4 %
<b>pohlaví</b>		
muži	123	60,6 %
ženy	80	39,4 %
<b>počet leukocytů při diagnóze</b>		
<b>BCP-ALL</b>		
medián ( $\times 10^9/l$ ), rozmezí	7,3	0,6–724
vysoké ( $>30 \times 10^9/l$ )	18 %	
<b>T-ALL</b>		
medián ( $\times 10^9/l$ ), rozmezí	43,3	1,2–542
high ( $>100 \times 10^9/l$ )	55 %	
<b>karyotyp</b>		
normální	71	35,0 %
abnormální	92	45,3 %
změny ploidie	53	
komplexní karyotyp	25	
t(v;11q23.3)	12	
del(9)(p21)	9	
neznámý	40	19,7 %

<b>molekulární genetik</b>		
bez přestavby	165	81,3 %
přestavby přítomny	28	13,8 %
z nich 17 (61 %) mělo přestavbu <i>KMT2A (MLL)</i>		
nevyšetřeno	10	4,9 %
<b>imunofenotyp</b>		
<b>BCP-ALL</b>	<b>140</b>	<b>69,0 %</b>
ProB (B-I)	26	12,8 %
CommonB (B-II)	88	43,4 %
PreB (B-III)	21	10,3 %
neurčeno	5	2,5 %
<b>T-ALL</b>	<b>63</b>	<b>31,0 %</b>
ProT (T-I)	7	3,5 %
PreT (T-II)	21	10,3 %
CorticalT (T-III)	22	10,8 %
MatureT (T-IV)	1	0,5 %
neurčeno	10	4,9 %
<b>riziko dle GMALL</b>		
standardní	90	44,8 %
vysoké	104	51,7 %
neurčeno	9	3,5 %
<b>infiltrace CNS</b>		
ne	163	80,3 %
ano	38	18,7 %
z nich: CNS2	22	
CNS3	16	
neurčeno	2	1,0 %
<b>léčba rituximabem</b>		
ano	29	14,3 %
ne	154	75,9 %
chybí data	20	9,8 %
<b>rok diagnózy</b>		
2007–2012	84	41,4 %
2013–2020	119	58,6 %

Vysvětlivky: CNS1, bez záchyty leukemických blastů v mozkomšním moku; CNS2,  $\leq 5$  leukocytů v 1  $\mu\text{l}$  mozkomšního moku, blasty přítomny; CNS3,  $> 5$  leukocytů v 1  $\mu\text{l}$  mozkomšního moku, blasty přítomny. Do skupiny CNS3 jsou řazeni i pacienti s ložiskem v CNS nebo periferní parézou hlavového nervu a přítomností blastů v CNS.

Standardní riziko dle GMALL zahrnuje pacienty se vstupní leukocytózou  $< 30 \times 10^9/l$  a commonB nebo preB fenotypem bez  $t(v;11q23.3)$  a pacienty s leukocytózou  $< 100 \times 10^9/l$  a corticalT fenotypem. Podmínkou je dosažení kompletní remise pro prvním bloku indukční chemoterapie.

**Tabulka 3.** Charakteristika souboru pacientů s *BCR-ABL1*–pozitivní ALL.

<b>pacientů celkem</b>	<b>94</b>	
<b>věk</b>		
medián (roky), rozmezí	44,5	19–65
<35 let	28	29,8 %
35–55 let	40	42,6 %
>55 let	26	27,6 %
<b>pohlaví</b>		
muži	51	54,3 %
ženy	43	45,7 %
<b>počet leukocytů při diagnóze</b>		
medián (x 10 <sup>9</sup> /l), rozmezí	25,4	1,1–466
vysoké (>30 x 10 <sup>9</sup> /l)	47 %	
<b>karyotyp</b>		
t(9;22)	44	46,8 %
t(9;22) s ACA	19	20,2 %
neznámý	31	33,0 %
<b>typ přestavby <i>BCR-ABL1</i></b>		
minor	52	55,3 %
major	22	23,4 %
minor + major	6	6,4 %
nespecifikováno	14	14,9 %
<b>imunofenotyp</b>		
ProB (B-I)	1	1,1 %
CommonB (B-II)	74	78,7 %
PreB (B-III)	16	17,0 %
neurčeno	3	3,2 %
<b>infiltrace CNS</b>		
ne	67	71,2 %
ano	16	17,0 %
z nich: CNS2	9	
CNS3	7	
chybí data	11	11,7 %
<b>rok diagnózy</b>		
2007–2012	39	41,5 %
2013–2020	55	58,5 %

Vysvětlivky: ACA = přídavné chromosomální abnormality.

Pacienti s *BCR-ABL1*–negativní ALL byli léčeni prodle protokolu GMALL 07/2003 a z něj odvozeného protokolu ALL CELL 2012 Junior. Protokol je založen na sekvenčním podání dvou indukčních a sedmi konsolidačních chemoterapeutických bloků a prospektivním

sledování MRN metodou qPCR. Nedosažení negativity MRN do 18. týdne léčby je považováno za samostatný rizikový faktor a je důvodem k intenzifikaci léčby provedením alogenní HSCT. Podrobný popis protokolu je k dispozici online (clinical.trials.gov identifikátor NCT00198991).

Nemocní s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL byli léčeni chemoterapií v kombinaci s inhibitorem tyrosinové kinázy imatinibem 400–600 mg/den podávaném od prvního dne indukce I do alogenní HSCT. Sedmdesát sedm (81,9 %) pacientů dostávalo chemoterapii dle výše uvedeného protokolu GMALL 07/2003 (CELL Junior 2012), 12 pacientů (12,8 %) bylo léčeno dle protokolu hyperCVAD, 5 pacientů (5,3 %) ve věku >55 let dostalo redukovanou chemoterapii dle protokolu ALL CELL 2012/Ph+ elderly.

MRN byla testována v kostní dřeni metodou PCR v protokolem stanovených časech, tedy po skončení indukce I (den 26), po skončení indukce II (den 46), před zahájením konsolidace I (týden 11), před zahájením konsolidace II (týden 16), později před zahájením dalších konsolidačních cyklů nebo před provedením HSCT. Primárním cílem pro stanovení MRN byly specifické přestavby IG/TR (u Ph-negativní ALL) nebo transkript *BCR-ABL1* (u Ph-pozitivní ALL). Výsledky MRN byly kvantifikovány a interpretovány v souladu se standardy konsorcia EuroMRD (van der Velden *et al*, 2007, Bruggemann *et al*, 2010, Pfeifer *et al*, 2019). Minimální senzitivita esejí byla  $10^{-4}$ . Vzorky s detekovanou MRN na hladině  $\geq 10^{-4}$  byly interpretovány jako MRN-pozitivní (MRNq). Hodnoty MRN  $< 10^{-4}$  byly považovány za nekvantifikovatelně pozitivní (MRNnq). Za negativní byly považovány vzorky s nedetekovatelnou MRN při zachované minimální senzitivitě  $10^{-4}$ , tedy vzorky splňující definici kompletní MRN odpovědi (CMR).

Analýza je retrospektivní. Celkové přežití (OS) udává čas od diagnózy do data úmrtí nebo posledního kontaktu. Přežití bez nemoci (DFS) je definováno jako čas od dosažení remise do relapsu, úmrtí nebo posledního kontaktu. Efekt MRN na přežití u pacientů podstupujících HSCT byl hodnocen od data transplantace. HSCT byla hodnocena jako časově závislá proměnná. Vstupní data pacientů byla hodnocena metodami deskriptivní statistiky. Vliv kategorických parametrů na funkci přežití byl odhadován metodou dle Kaplana-Meiera. Pro srovnání křivek přežití mezi skupinami byl použit oboustranný log-rank test. Funkce rizik kontinuálních proměnných byly hodnoceny metodou Coxova proporcionálního regresního modelování. Rizikové faktory pro OS a DFS byly určeny za pomoci multivariantního Coxova modelu proporcionálních rizik. Všechny analýzy byly provedeny na hladině významnosti 5 %



( $p < 0,05$ ). K výpočtům byl použit statistický software IBM SPSS v23 a MATLAB R2021a (The MathWorks Inc.).

## Cíle

1. Zhodnotit výsledky léčby dospělých pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL léčených podle protokolu GMALL 07/2003 (CELL Junior 2012).
2. Zhodnotit výsledky léčby dospělých pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL.
3. Analyzovat klinický význam nízkých pozitivit MRN v průběhu indukční a časné fázi konsolidační léčby dospělých pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL.
4. Porovnat prognostický význam MRN hodnocený metodou průtokové cytometrie a qPCR.
5. Validovat model pro rychlou identifikaci pacientů s Ph-like fenotypem.

## Výsledky

### Léčba *BCR-ABL1*–negativní akutní lymfoblastové leukémie

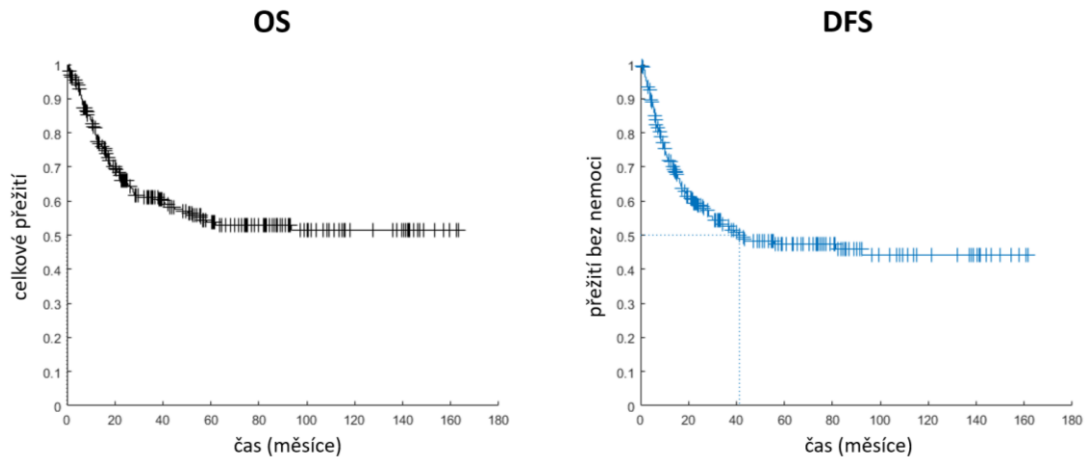
Medián sledování v kohortě pacientů s *BCR-ABL1*–negativní ALL činil 33,5 měsíce (rozmezí 0,6–120 měsíců). Sto osmdesát devět (93,1 %) pacientů dosáhlo kompletní remise, 5 (2,4 %) bylo primárně refrakterních. V průběhu indukční fáze léčby zemřelo 6 (3,0 %) pacientů, údaj o výsledku indukční léčby chyběl u 3 (1,5 %) pacientů. Relaps byl zaznamenán u 70 (34,5 %) pacientů; medián doby do relapsu dosahoval 10,6 měsíců (rozmezí 1,5–87,6 měsíců). V době uzávěrky dat před analýzou bylo 120 (59,1 %) pacientů naživu. Přežití ve 3 a 5 letech dosahovalo 63,5 % a 55,9 % pro OS a 54,5 % a 49,7 % pro DFS.

Hodnotili jsme vliv vstupních parametrů na přežití. Vedle základních klinických charakteristik jako je věk, cytogenetický nález, liniová příslušnost, počet leukocytů při diagnóze a riziková skupina dle GMALL a infiltrace CNS (definice uvedena v Tabulce 2) jsme analyzovali význam léčby rituximabem, rozdíl ve výsledcích léčby mezi pacienty léčenými před a po roce 2012, provedli jsme landmark analýzu v týdnu 11 pro zhodnocení vlivu negativity MRN a studovali jsme vliv provedení alogenní HSCT v první kompletní remisi. Posledně jmenovaný parametr byl hodnocen jako časově závislá proměnná. Výsledky párových analýz jsou shrnuty v Tabulce 4 a graficky znázorněny křivkami přežití (Obr. 1–11).

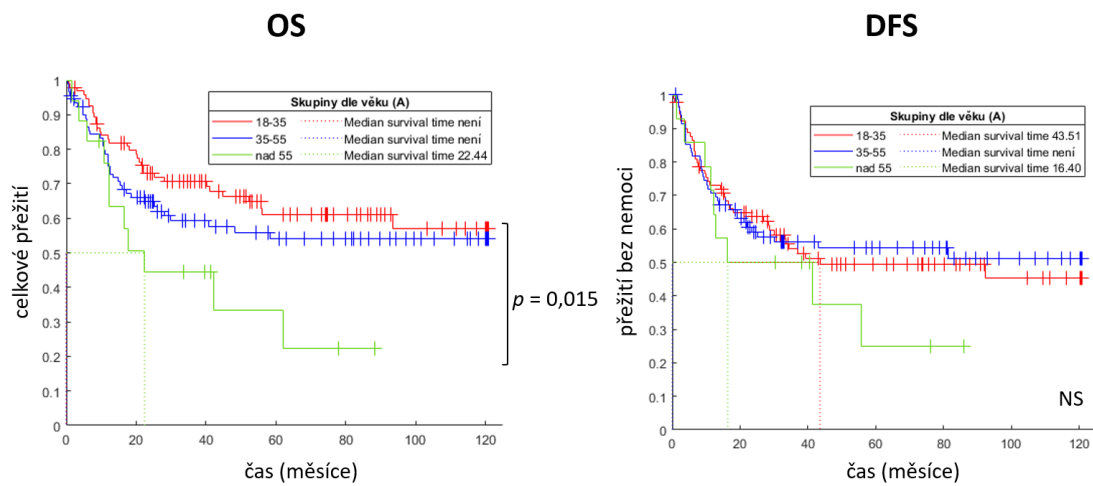
**Tabulka 4.** Analýza přežití pacientů s *BCR-ABL1*–negativní ALL.

		n	celkové přežití		přežití bez nemoci	
			medián, 95% CI (měsíce)	přežití ve 3/5 letech (%)	medián, 95% CI (měsíce)	přežití ve 3/5 letech (%)
<b>celkem</b>		203	NR	63,5/55,9	55,6	54,5/49,7
<b>věk</b>	<35 let	95	NR	70,6/61,0	43,5 (–)	54,0/49,5
	35–55 let	91	NR	59,2/54,1	NR	56,1/54,3
	>55 let	17	22,4 (11,3–33,6)	44,3/33,3	16,4 (0,0–54,4)	50,0/25,0
	<i>p</i>		0,015		NS	
<b>karyotyp</b>	normální	88	NR	72,2/65,2	NR	58,0/56,2
	hyperdiploidní	25	NR	60,0/60,0	NR	57,1/52,0
	ostatní	50	42,1 (11,4–69,8)	57,7/44,2	34,4 (–)	47,9/40,5
	<i>p</i>		0,05		NS	
<b>imunofenotyp</b>	BCP-ALL	141	NR	66,0/60,0	43,5 (–)	54,9/48,4
	T-ALL	62	NR	56,8/56,8	81,5 (–)	53,8/53,8
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>hyperleukocytóza při dg</b>	ne	153	NR	66,9/58,2	92,3 (–)	56,8/50,6
	ano	50	55,9 (–)	52,0/48,0	33,3 (–)	47,2/47,2
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>riziko dle GMALL</b>	standardní	90	NR	69,5/61,7	NR	59,2/54,2
	vysoké	104	62,1 (–)	58,6/51,1	39,3 (0,0–84,0)	50,1/45,3
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>infiltrace CNS</b>	ne	163	NR	67,4/60,7	NR	58,2/54,2
	ano	38	29,7 (0,0–59,5)	48,2/37,0	19,1 (10,3–27,9)	39,6/31,7
	<i>p</i>		0,016		0,043	
<b>léčba rituximabem</b>	ne	154	NR	62,6/52,7	41,3 (0,0–87,6)	53,0/47,9
	ano	29	NR	54,5/54,5	NR	51,6/51,6
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>MRN v týdnu 11</b>	negativní	61	NR	84,7/72,6	NR	67,1/60,3
	pozitivní	40	52,2 (21,0–83,3)	56,8/41,6	22,0 (5,5–38,5)	42,0/38,5
	<i>p</i>		<0,001		0,005	
<b>HSCT v 1. CR</b>	ne	121	48,1 (22,9–73,4)	53,1/44,0	41,3 (0,1–82,4)	39,4/33,9
	ano	82	NR	78,4/73,3	NR	74,5/70,7
	<i>p</i>		<0,001		<0,001	
<b>rok diagnózy</b>	2007–2012	84	52,2 (–)	57,1/47,6	30,0 (11,1–49,0)	46,3/42,5
	2013–2020	119	NR	68,2/64,2	NR	62,3/56,1
	<i>p</i>		0,05		NS	

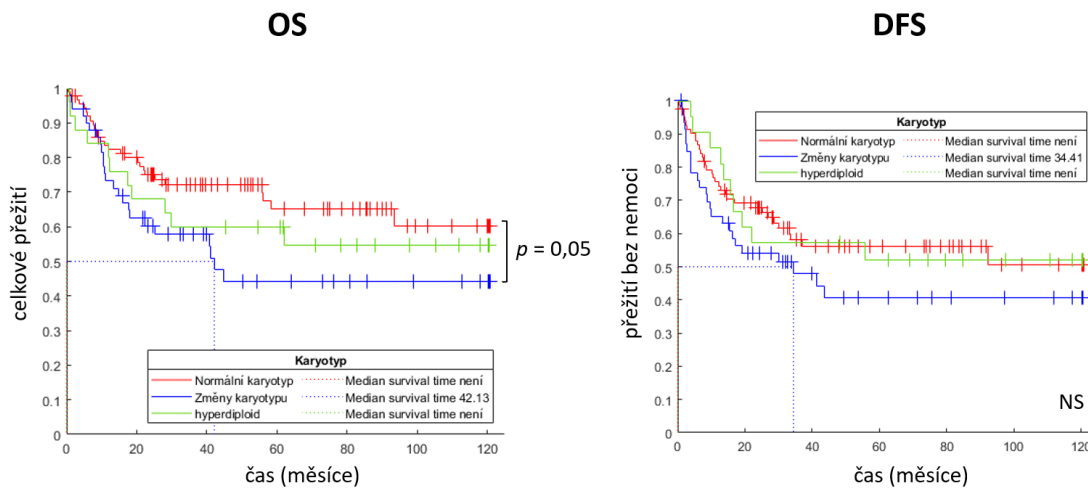
**Obr. 1.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL, celá kohorta.



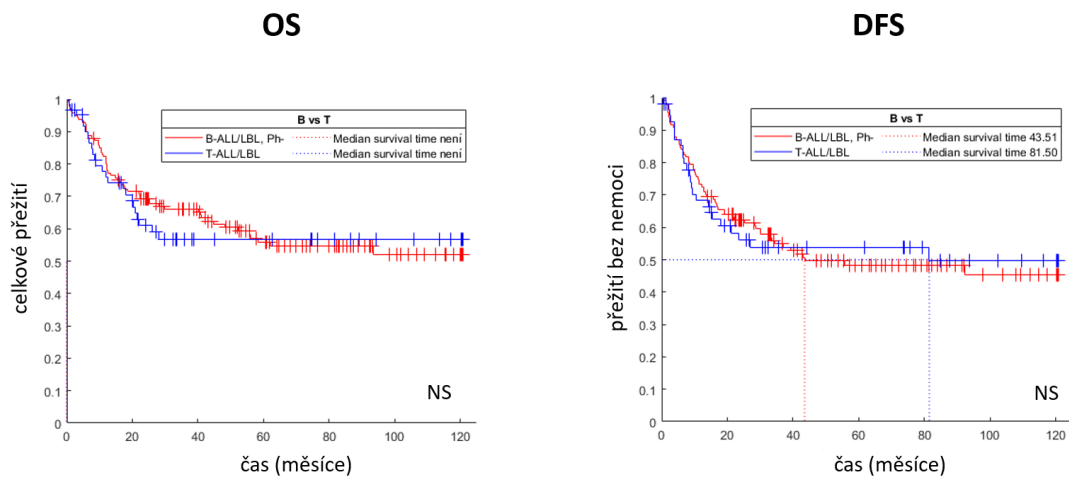
**Obr. 2.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle věku při diagnóze.



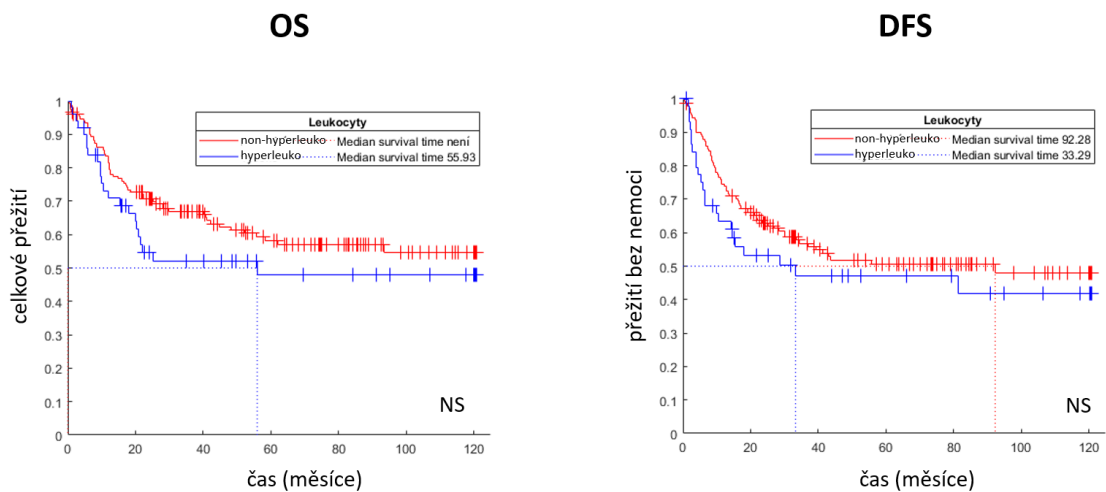
**Obr. 3.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle vstupního karyotypu.



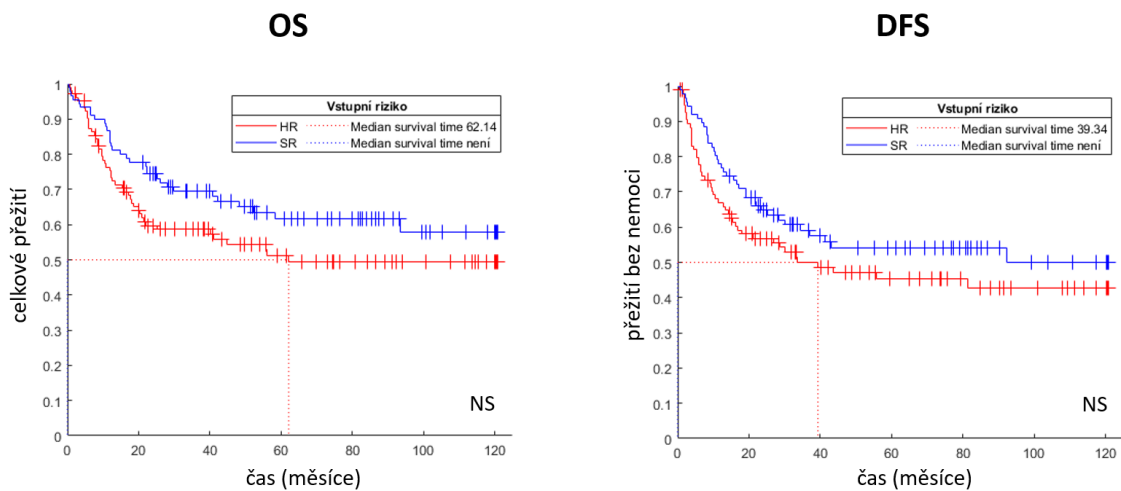
**Obr. 4.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle imunofenotypu.



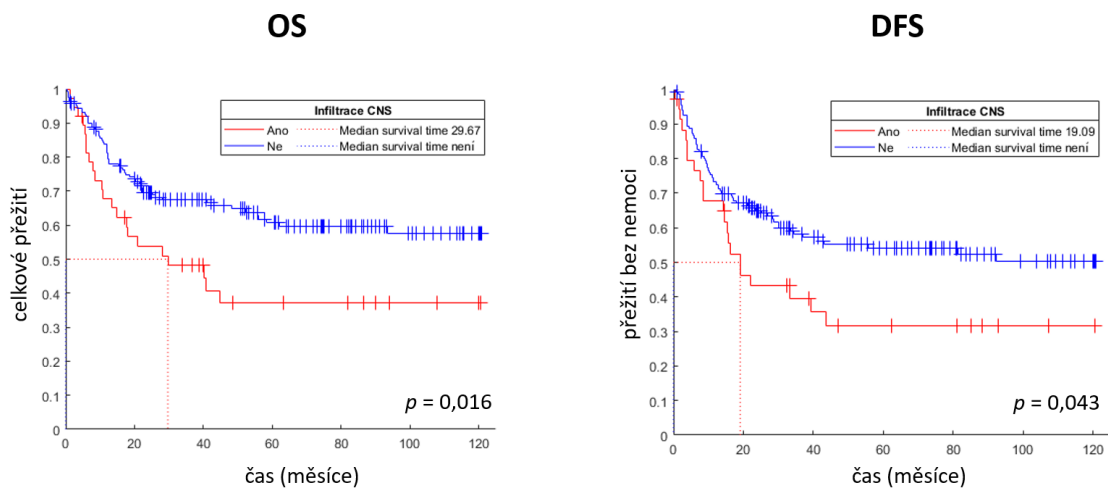
**Obr. 5.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle počtu leukocytů při diagnóze.



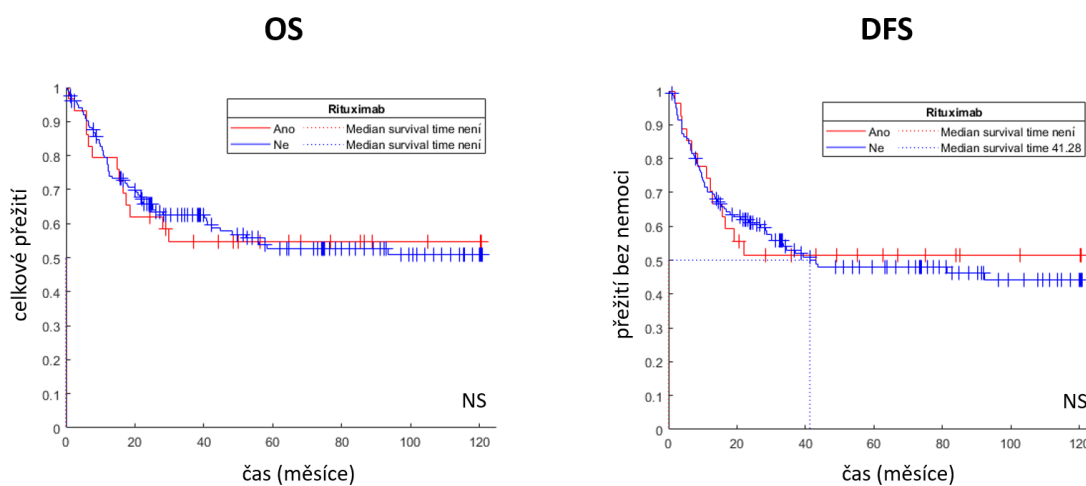
**Obr. 6.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle rizikové skupiny dle GMALL.



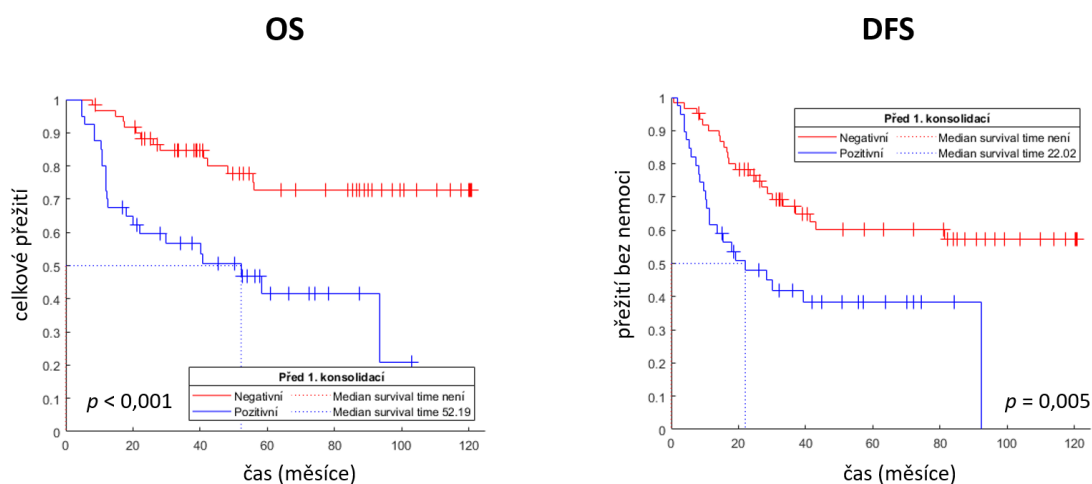
**Obr. 7.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle infiltrace CNS při diagnóze.



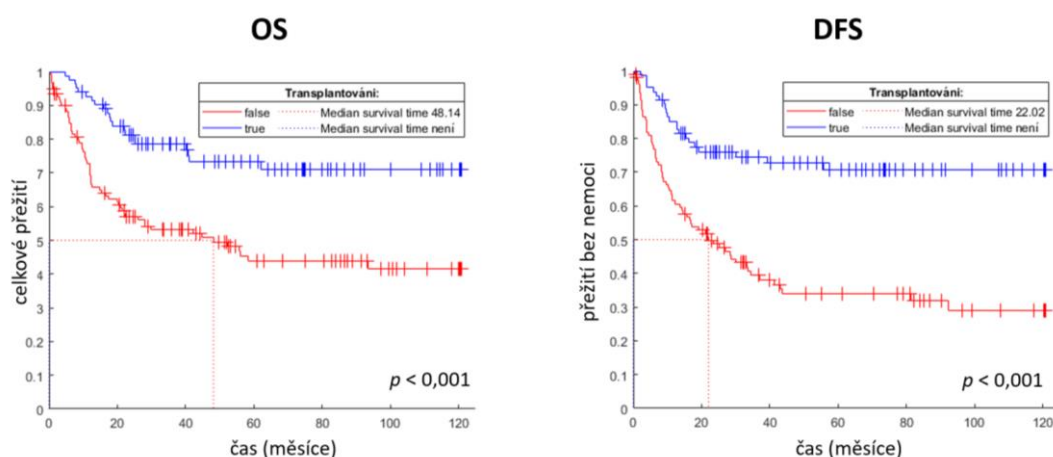
**Obr. 8.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle léčby rituximabem.



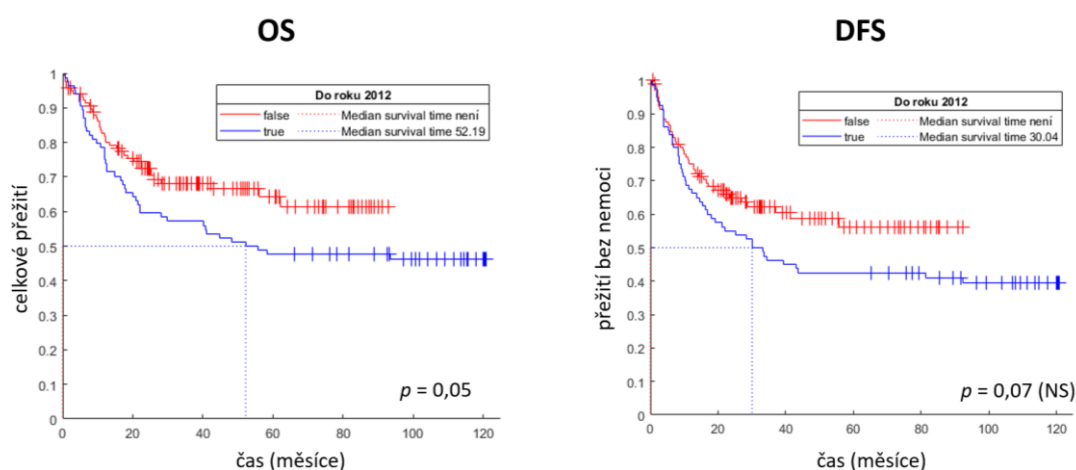
**Obr. 9.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle MRN v týdnu 11.



**Obr. 10.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle HSCT v 1. kompletní remisi.



**Obr. 11.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle roku zahájení léčby.

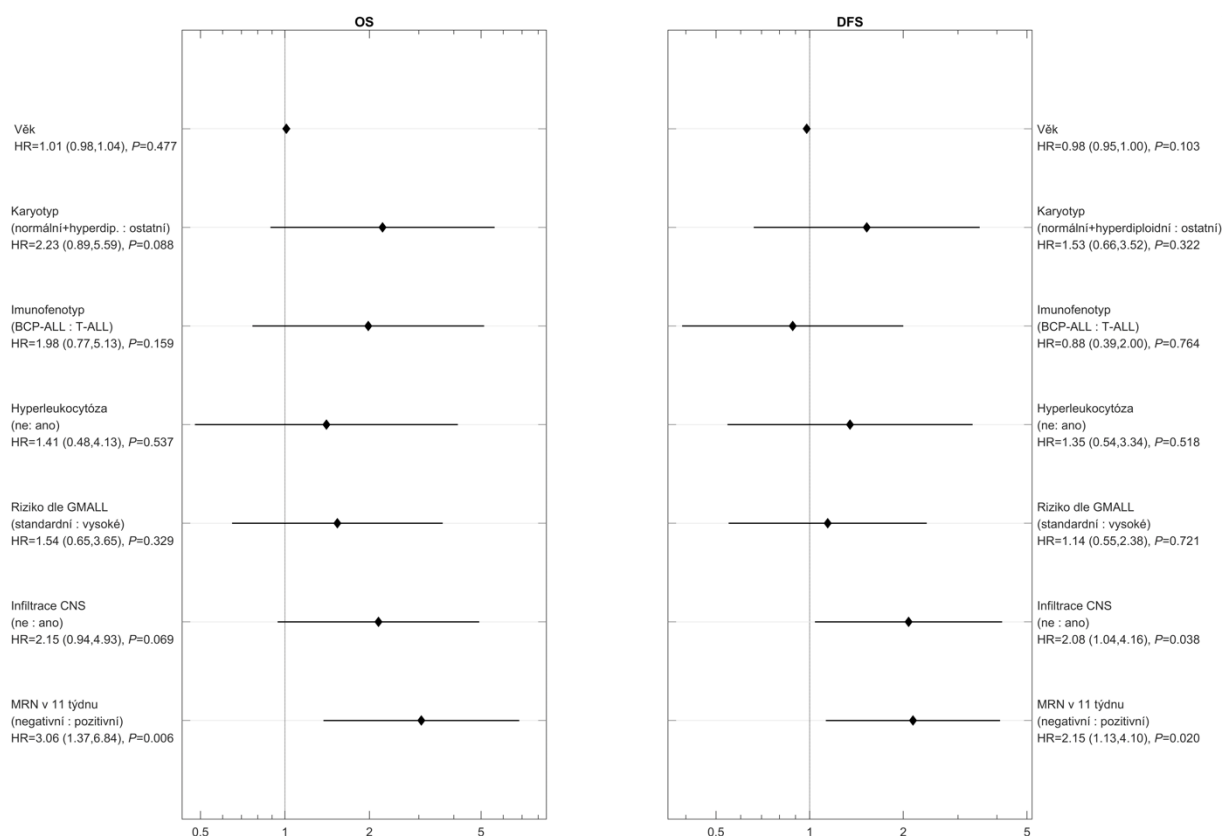


Byla provedena multivariantní analýza faktorů ovlivňujících přežití (Obr. 12). Zařazeny byly standardní rizikové faktory charakterizující onemocnění před zahájením léčby, tedy věk, karyotyp, imunofenotyp, počet leukocytů při diagnóze, riziková skupina dle GMALL a vstupní infiltrace CNS. K nim byla jako landmark parametr přiřazena hodnota MRN v týdnu 11, tedy před zahájením konsolidační fáze léčby. HSCT v první kompletní remisi do analýzy zařazena nebyla, neboť v protokolu indikujícím transplantační léčbu na základě hodnoty MRN nešlo o nezávislou proměnou. Jako jediný faktor, který samostatně ovlivňoval celkové přežití, byla identifikována MRN v týdnu 11 s HR 3,06 (95%CI 1,37–6,84;  $p = 0,006$ ). Pro přežití bez



progrese byla významná vstupní infiltrace CNS s HR 2,08 (95%CI 1,04–4,16;  $p = 0,038$ ) a MRN v týdnu 11 s HR 2,15 (95%CI 1,13–4,10;  $p = 0,020$ ).

**Obr. 12.** Multivariantní analýza faktorů ovlivňujících přežití u *BCR-ABL1*–negativní ALL.



### Léčba *BCR-ABL1*–pozitivní akutní lymfoblastové leukémie

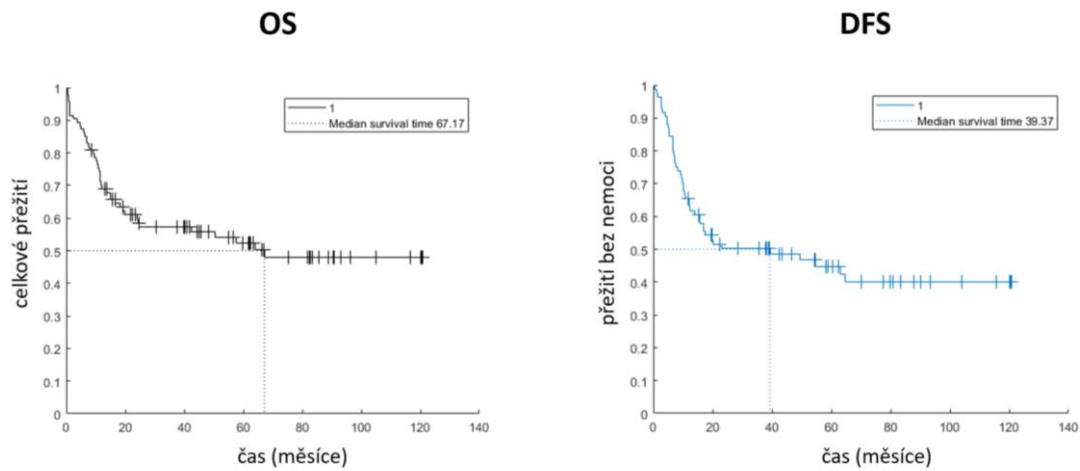
Medián sledování skupiny pacientů s *BCR-ABL1*–pozitivní ALL činil 24,5 měsíce (rozmezí 0,3–120 měsíců). Osmdesát čtyři (89,4 %) pacientů dosáhlo kompletní remise, 1 (1,0 %) byl primárně refrakterní. V průběhu indukční fáze léčby zemřeli 4 (4,3 %) pacienti, údaj o výsledku indukční léčby chyběl u 5 (2,3 %) pacientů. Zrelabovalo 26 (27,7 %) pacientů; medián doby do relapsu činil 8,6 měsíců (rozmezí 3,6–40,5 měsíců). V době uzávěrky dat před analýzou bylo 49 (52,1 %) pacientů naživu. Přežití ve 3 a 5 letech dosahovalo 57,2 % a 52,4 % pro OS a 50,2 % a 44,9 % pro DFS.

V analýze přežití jsme samostatně sledovali efekt věku, přídatných chromosomálních změn, počtu leukocytů při diagnóze, typu přestavby *BCR-ABL1* a infiltrace CNS. Podobně jako v kohortě *BCR-ABL1*–negativních pacientů byly hodnoceny temporální parametry, konkrétně dosažení negativity MRN v týdnu 11, provedení alogenní HSCT v 1. CR a léčby před či po roce 2012. Výsledky jsou přehledně uvedeny v Tabulce 5 a graficky znázorněny křivkami přežití (Obr. 13–21).

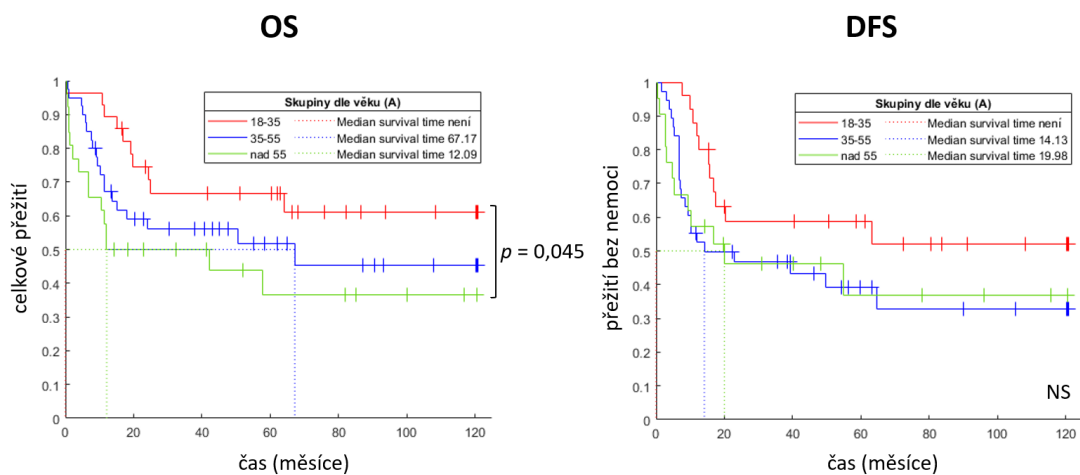
**Tabulka 5.** Analýza přežití pacientů s *BCR-ABL1*–pozitivní ALL.

		n	celkové přežití		přežití bez nemoci	
			medián, 95% CI (měsíce)	přežití ve 3/5 letech (%)	medián, 95% CI (měsíce)	přežití ve 3/5 letech (%)
<b>celkem</b>		94	67,2	57,2/52,4	39,4	50,2/44,9
<b>věk</b>	<35 let	28	NR	66,7/66,7	NR	58,7/58,7
	35–55 let	40	67,2 (–)	56,1/51,8	14,1 (0,0–52,6)	46,8/39,3
	>55 let	26	12,1 (0,0–54,9)	50,0/36,5	20,0 (0,0–68,5)	46,2/36,9
	<i>p</i>		0,045		NS	
<b>karyotyp</b>	t(9;22)	44	50,5 (–)	54,5/47,0	22,9 (0,0–50,7)	47,9/39,5
	t(9;22) s ACA	19	NR	73,7/73,7	63,1 (0,0–161,3)	58,8/58,8
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>počet leukocytů při dg</b>	≤30 x 10 <sup>9</sup> /l	50	67,2 (–)	61,1/55,6	54,8 (0,0–115,3)	55,1/48,7
	>30 x 10 <sup>9</sup> /l	44	50,5 (–)	52,6/48,6	16,9 (0,0–55,5)	45,3/41,2
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>typ přestavby</b>	minor	58	NR	67,7/64,8	63,1 (–)	58,3/52,7
	major	22	42,3 (–)	54,6/47,7	16,9 (4,4–29,5)	44,4/44,4
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>infiltrace CNS</b>	ne	67	NR	67,6/63,0	63,1 (–)	58,1/53,1
	ano	16	24,8 (0,0–87,8)	48,1/48,1	12,6 (1,8–23,3)	38,1/38,1
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>MRN v týdnu 11</b>	≤10 <sup>-3</sup>	18	NR	72,2/59,1	54,8 (–)	55,0/48,1
	>10 <sup>-3</sup>	13	NR	65,9/65,9	22,9 (–)	44,9/44,9
	<i>p</i>		NS		NS	
<b>HSCT v 1. CR</b>	ne	32	10,6 (5,9–15,2)	23,2/18,5	10,0 (4,9–15,0)	13,0/6,5
	ano	62	NR	74,8/69,8	NR	64,7/59,8
	<i>p</i>		<0,001		<0,001	
<b>rok diagnózy</b>	2007–2012	39	15,0 (4,6–25,5)	38,5/33,3	16,9 (8,4–25,4)	43,8/37,5
	2013–2020	55	NR	71,0/68,1	NR	54,3/51,1
	<i>p</i>		<0,001		NS	

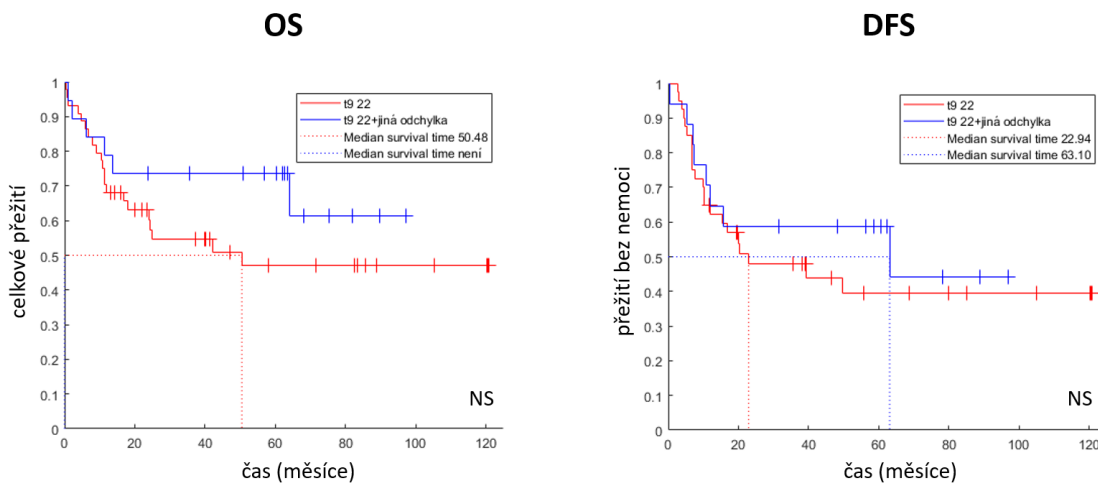
**Obr. 13.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL, celá kohorta.



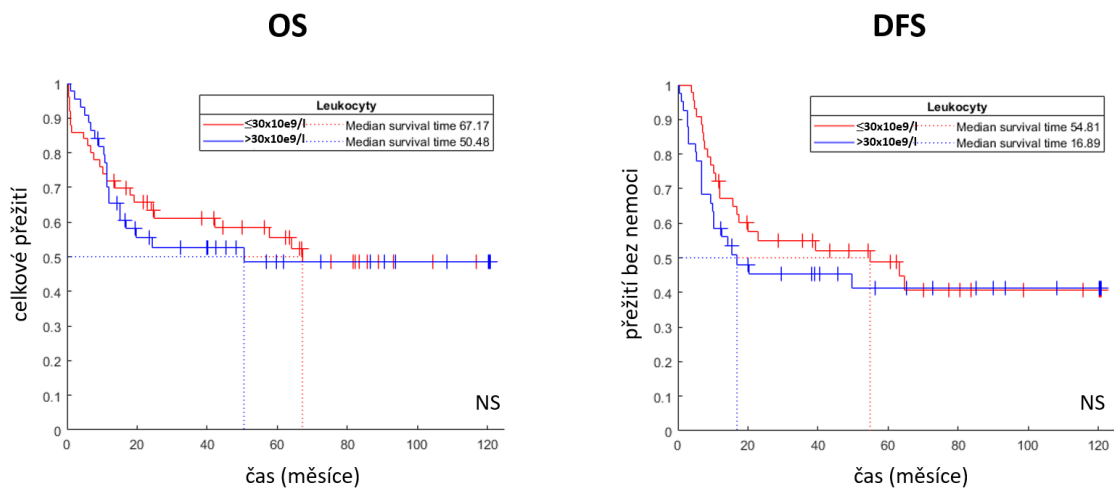
**Obr. 14.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL podle věku při diagnóze.



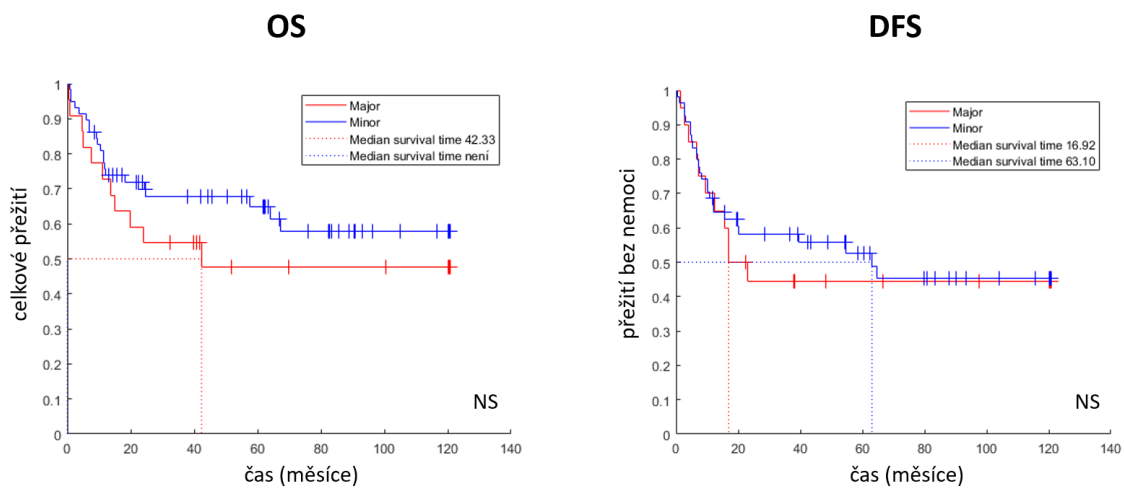
**Obr. 15.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL podle vstupního karyotypu.



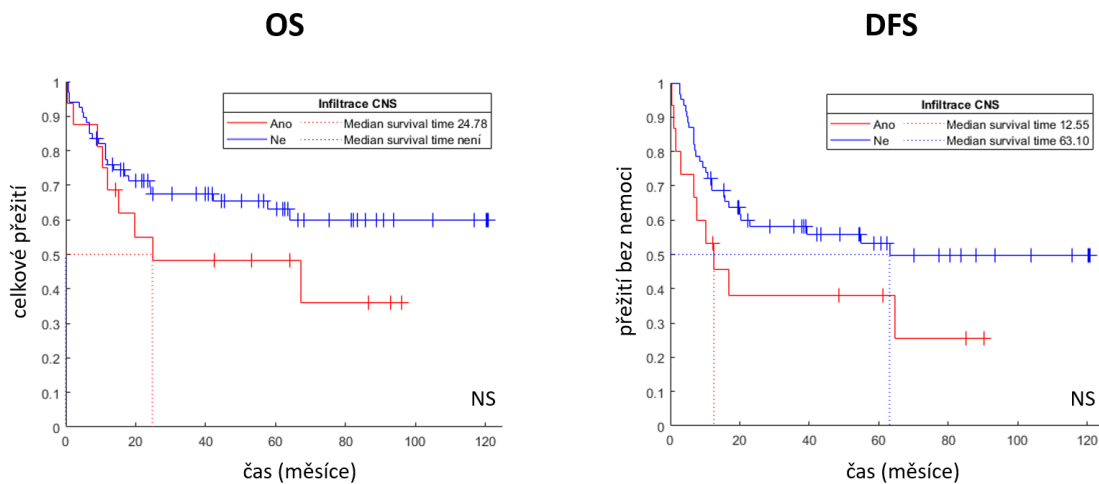
**Obr. 16.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL podle počtu leukocytů při diagnóze.



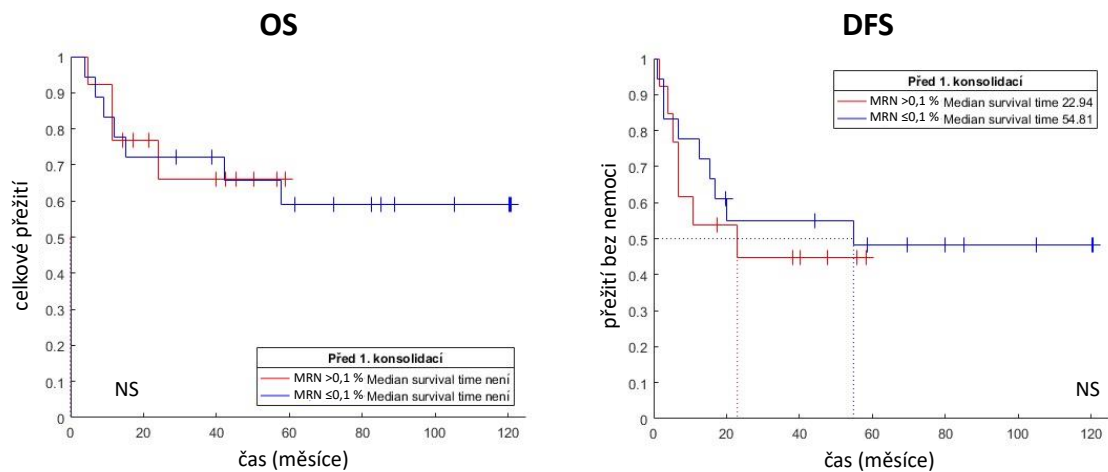
**Obr. 17.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL podle typu přestavby *BCR-ABL1*.



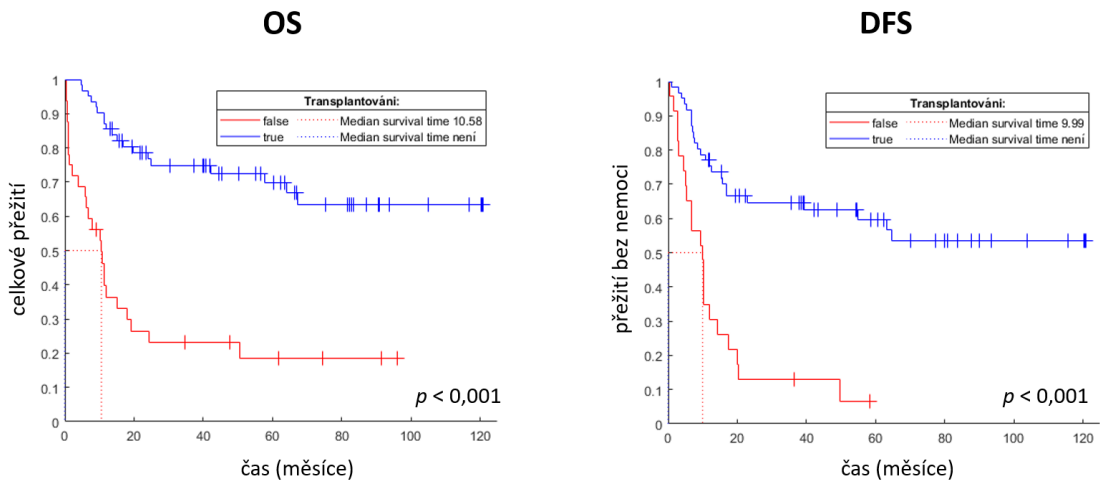
**Obr. 18.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL podle infiltrace CNS při diagnóze.



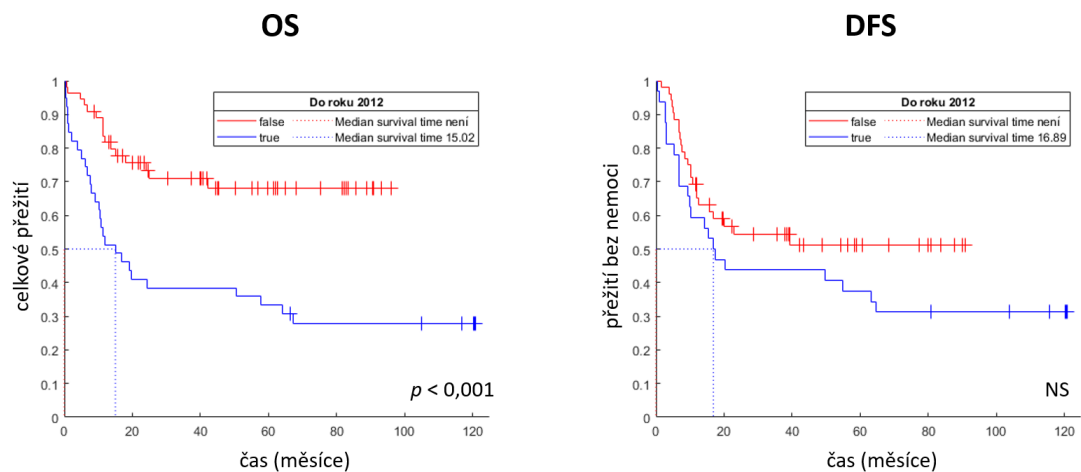
**Obr. 19.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL podle MRN v týdnu 11.



**Obr. 20.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL podle HSCT v 1. kompletní remisi.

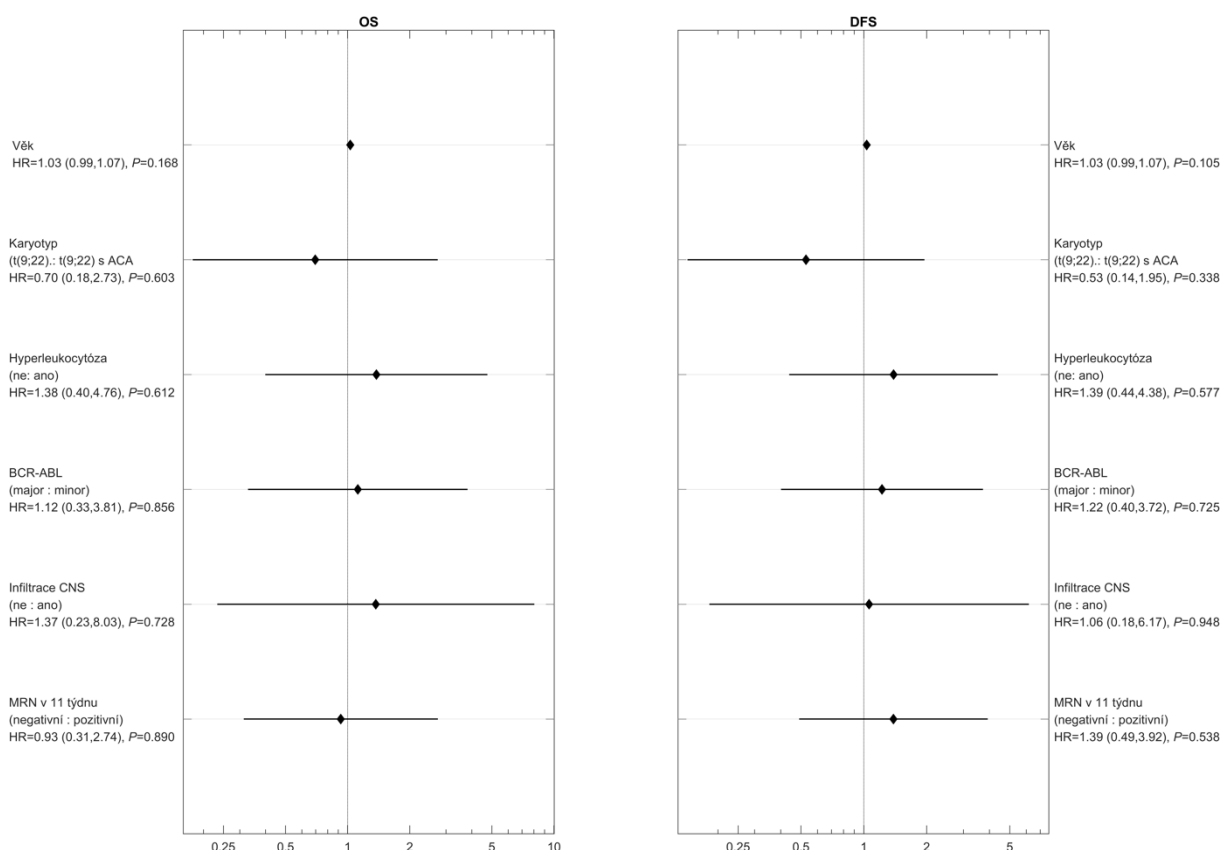


**Obr. 21.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL podle roku zahájení léčby.



V multivariantní analýze faktorů ovlivňujících přežití nebyl žádaný z prognostických faktorů vyšetřovaných při diagnóze identifikován jako nezávislý prognostický faktor pro OS nebo DFS (Obr. 22). Na rozdíl od *BCR-ABL1*-negativní ALL, ale v souladu s výsledky univariantní analýzy nebyla jako signifikantní shledána ani hladina MRN před zahájením indukční fáze léčby (Obr. 19).

**Obr. 22.** Multivariantní analýza faktorů ovlivňujících přežití u *BCR-ABL1*-pozitivní ALL.



### Prognostický význam nízkých pozitivit MRN

Zhodnocení prognostického vlivu nízkých pozitivit MRN v časně konsolidační fázi dospělých pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL léčenou dle protokolu GMALL 07/2003 (CELL Junior 2012) jsme věnovali samostatnou publikaci, která tvoří [Přílohu 1](#). Součástí publikace jsou i křivky přežití pro OS a DFS porovnávající prognostický význam dosažení kompletní MRN odpovědi (CMR), nízké positivity MRN (MRN<sub>nq</sub>) a positivity (MRN<sub>q</sub>) v 11. týdnu léčby, tedy před zahájením prvního konsolidačního cyklu. Na tomto místě otiskujeme

výstupy analýzy prognostického významu různých hladin MRN měřené 26. den léčby, tedy po skončení 1. indukčního cyklu (Tabulka 6), v 11. týdnu léčby (Tabulka 7) a v 16. týdnu léčby (Tabulka 8).

**Tabulka 6.** Prognostický význam hladin MRN po 1. indukčním cyklu (den 26).

	OS		DFS	
<b>CMR</b> <b>n = 41 (37,3 %)</b>				
medián přežití (měsíce), rozmezí 3-leté/5-leté přežití (%)	NR 85,1/73,4	a	NR 68,7/65,1	d
<b>MRNnq</b> <b>n = 20 (18,2 %)</b>		c		f
medián přežití (měsíce), rozmezí 3-leté/5-leté přežití (%)	29,4 (20,8–38,0) 41,1/32,9		23,8 (9,8–37,8) 35,1/28,1	
<b>MRNq</b> <b>n = 49 (44,5 %)</b>		b		e
medián přežití (měsíce), rozmezí 3-leté/5-leté přežití (%)	52,2 (9,2–95,2) 57,5/45,4		17,8 (5,8–29,8) 37,0/33,3	
	<sup>a</sup> P = 0,006; HR 3,6 (1,5–8,7)		<sup>d</sup> P = 0,04; HR 2,4 (1,1–5,2)	
	<sup>b</sup> NS; HR 1,1 (0,5–2,3)		<sup>e</sup> NS; HR 0,8 (0,4–1,7)	
	<sup>c</sup> P = 0,002; HR 3,2 (1,5–7,1)		<sup>f</sup> P = 0,003; HR 2,8 (1,5–5,4)	

**Tabulka 7.** Prognostický význam hladin MRN před zahájením 1. konsolidačního cyklu (týden 11).

	OS		DFS	
<b>CMR</b> <b>n = 55 (60,4 %)</b>				
medián přežití (měsíce), rozmezí 3-leté/5-leté přežití (%)	NR 83,7/74,0	a	NR 67,1/61,5	d
<b>MRNnq</b> <b>n = 20 (22,0 %)</b>		c		f
medián přežití (měsíce), rozmezí 3-leté/5-leté přežití (%)	57,7 (14,4–21,4) 68,9/42,3		31,2 (0–28,1) 47,9/41,0	
<b>MRNq</b> <b>n = 16 (17,6 %)</b>		b		e
medián přežití (měsíce), rozmezí 3-leté/5-leté přežití (%)	17,9 (14,4–21,4) 43,8/35,0		11,7 (5,6–56,7) 30,0/30,0	
	<sup>a</sup> p = 0,02; HR 3,0 (1,3–7,2)		<sup>d</sup> p = 0,05; HR 2,3 (1,1–4,7)	
	<sup>b</sup> NS; HR 0,6 (0,2–1,5)		<sup>e</sup> NS; HR 0,6 (0,3–1,4)	
	<sup>c</sup> p < 0,001; HR 4,6 (2,0–11,0)		<sup>f</sup> p = 0,002; HR 3,5 (1,6–7,5)	

**Tabulka 8.** Prognostický význam hladin MRN před zahájením 2. konsolidačního cyklu (týden 16).

	OS		DFS	
<b>CMR</b> <b>n = 61 (66,3 %)</b>				
medián přežití (měsíce), rozmezí	NR	] a	91,8	] d
3-leté/5-leté přežití (%)	82,1/72,1		61,5/59,1	
<b>MRNnq</b> <b>n = 19 (20,7 %)</b>		] c		] f
medián přežití (měsíce), rozmezí	29,7 (0,9–58,4)		19,8 (10,1–29,6)	
3-leté/5-leté přežití (%)	49,4/32,9		31,5/23,6	
<b>MRNq</b> <b>n = 12 (13,0 %)</b>		] b		] e
medián přežití (měsíce), rozmezí	19,6 (0–53,9)		11,7 (0–25,8)	
3-leté/5-leté přežití (%)	50,0/37,5		41,7/41,7	
	<sup>a</sup> <i>p</i> = 0,001; HR 3,9 (1,7–8,9)		<sup>d</sup> <i>p</i> = 0,01; HR 2,7 (1,4–5,4)	
	<sup>b</sup> <i>NS</i> ; HR 0,9 (0,4–2,4)		<sup>e</sup> <i>NS</i> ; HR 1,1 (0,4–2,8)	
	<sup>c</sup> <i>p</i> = 0,009; HR 3,8 (1,5–9,6)		<sup>f</sup> <i>NS</i> ; HR 2,2 (0,9–5,2)	



## Diskuze

### Léčba akutní lymfoblastové leukémie dospělých podle MRN

Snahy evropských národních skupin na poli léčby ALL dospělých byly v uplynulých třech dekádách formovány snahou zavést do léčby intenzivní polychemoterapeutické bloky inspirované složením i designem pediatrických protokolů. Příkladem postupné optimalizace tohoto přístupu jsou protokoly německé studijní skupiny GMALL, kde každá nová verze protokolu vedla k stupňovitému zlepšení přežití (Ludwig *et al*, 1998, Gokbuget *et al*, 2012). Německý přístup se stal inspirací pro Českou leukemickou skupinu – pro život (CELL), která zprvu na pozvání představitelů GMALL převzala protokol 07/2003 (clinical.trials.gov identifikátor NCT00198991) a později jej dále samostatně rozvíjela a modifikovala (protokol ALL CELL Junior 2012).

Do klinické praxe českých pracovišť se dostal protokol inspirovaný pediatrickým přístupem a stratifikující riziko nemoci podle dynamiky MRN měřené standardizovanou metodou qPCR. První léta představovala výzvu, kdy jsme se seznamovali se specifiky intenzivního přístupu kombinujícího až osm léků v jednom léčebném bloku, stejně jako s novými chemoterapeutiky, která do té doby byla užívána pouze v léčbě pediatrické populace. V tomto ohledu bylo nejnáročnější získat zkušenosti s podáním asparaginázy. První zkušenosti s novým léčebným přístupem vedly k signifikantně lepším výsledkům přežití našich pacientů oproti předchozím dekádám (Šálek *et al.*, 2012) a protokol GMALL 07/2003 vstoupil do běžné léčebné praxe participujících pracovišť CELL.

### Léčba *BCR-ABL1*–negativní akutní lymfoblastové leukémie

Výsledky léčby pacientů s *BCR-ABL1*–negativní ALL v českých hematologických centrech z let 2007–2020 jsou srovnatelné s výstupy velkých národních studií, které v tu dobu probíhaly na referenčních západních pracovištích (Rowe *et al*, 2005, Thomas *et al*, 2010, Huguet *et al*, 2018). V českých centrech se poprvé podařilo v kohortě intenzivně léčených pacientů překonat 50% pro celkové přežití (Obr. 1). Při zohlednění data diagnózy se ukázalo, že přežití nemocných diagnostikovaných v letech 2013–2020 je signifikantně lepší než u pacientů z let 2007–2012 (OS ve 3 letech 68,2 % vs. 57,1 %,  $p = 0,05$ ; Obr. 11). Pozitivní trend je patrný i v parametru DFS. Je pravděpodobné, že výsledek odráží větší zkušenost

pracovišť s intenzivním protokolem, se zvládnáním specifických vedlejších účinků některých léčiv, zejména pegylované asparaginázy, úspěchy v prevenci mykotických komplikací podmíněné zavedením profylaktické léčby posakonazolem i v léčbě infekčních komplikací, lepšími výsledky transplantační léčby a samozřejmě i novými možnostmi cílené léčby relapsu hematologického i molekulárního.

Analýzu vlivu jednotlivých rizikových faktorů na přežití tvoří série párových srovnání, která velmi často potvrzují trend ve prospěch jedné z porovnávaných skupin. Ten je patrný z průběhu křivek přežití, nicméně statistický výstup je zatížen nízkým počtem pacientů v souboru a nevychází signifikantně ( $p > 0,05$ ). K získání většího počtu pacientů by bylo třeba sbírat data v delším časovém intervalu, což by však – jak naznačeno výše – přineslo předpojatost ve prospěch osob léčených v pozdější době s přístupem k novějším lékům. Je tedy možné sledovat trend v delším přežití u pacientů mladších věkových skupin, zejména adolescentů a mladých dospělých ve věku do 35 let (OS a DFS ve 3 letech 70,6 % a 54,0 % vs. 59,2 % a 56,1 % ve věku 35–55 let vs. 44,3 % a 50,0 % ve věku >55 let; Obr. 2). Právě mladí dospělí profitují z intenzivních protokolů pediatrického typu, na nichž dosahují dlouhodobého přežití 67–78 % (Boissel & Baruchel, 2018, Stock *et al*, 2019).

Cytogenetická analýza je standardním diagnostickým vyšetřením u ALL a především v pediatrických kohortách představuje karyotyp silný prognostický faktor používaný ke stratifikaci pacientů do ramen s různou intenzitou léčby. Naše analýza prokázala signifikantně lepší OS pacientů s normálním karyotypem oproti nemocným s cytogenetickými abnormalitami, vyjma hyperdiploidie (Obr. 3). Horší přežití vykazovala skupina pacientů s cytogenetickými abnormalitami, mezi nimiž byli nejvíce zastoupeni nemocní s komplexním karyotypem nebo delecí genu *CDKN2A* (*p16*). Nepodařilo se naopak prokázat příznivý vliv hyperdiploidie, která definuje dobrou prognózu v dětských kohortách (Dastugue *et al*, 2013).

V naší kohortě nebyl pozorován rozdíl v přežití mezi pacienty s BCP a T fenotypem, ačkoliv některé studie ukazují na delší přežití nemocných s T-ALL (Obr. 4) (Dores *et al*, 2012, Neumann *et al*, 2020) Stírání rozdílu mezi oběma skupinami ve prospěch BCP-ALL je přisuzován novým lékům, zejména blinatumomabu, inotuzumabu ozogamicinu a anti-CD19 CAR-T lymfocytům, které přinášejí nové šance pro pacienty s relapsem BCP-ALL, zatímco poslední registrovanou novinkou pro léčbu relapsu T-ALL, jejíž efekt je poněkud rozporuplný, se stal nelarabin v roce 2005.

V křivkách přežití je patrný trend k lepšímu přežití pacientů bez vstupní hyperleukocytózy (Obr. 5) a se standardním rizikem dle klasifikačního systému GMALL (definováno v Tabulce 2; Obr. 6). Rozdíly v OS činí v obou případech 10 %, na limitovaném množství subjektů však nedosahují statistické významnosti. Význam standardních rizikových faktorů, které jsou určující pro zařazení do příslušné rizikové skupiny GMALL, je v analýze zastřen větším podílem transplantovaných pacientů ve skupině s vysokým rizikem (62 ze 104, tj. 59,6 %), zatímco ve skupině standardního rizika podstoupilo HSCT jen 18 z 90 (20,0 %) nemocných.

Byl pozorován statisticky významný rozdíl v přežití pacientů v závislosti na vstupní leukemické infiltraci CNS (Obr. 7). Pacienti s nálezem leukemických blastů v mozkomíšním moku v čase diagnózy měli signifikantně kratší OS i DFS ( $p = 0,016$  a  $0,043$ ). Za pozitivní nález byla považována jakákoliv přítomnost blastů v mozkomíšním moku při cytologickém vyšetření (status CNS2 + CNS3, definováno v Tabulce 2), tedy nikoliv pouze infiltrace blasty při lymfocytární pleocytóze v mozkomíšním moku (status CNS3). Interpretace tohoto výsledku je obtížná a vyžádá si samostatnou studii srovnávající různé metodické přístupy k vyšetření mozkomíšního moku na různých pracovištích. Ačkoliv vstupní leukemická infiltrace CNS je obecně považována za negativní prognostický faktor, s výjimkou polské (PALG) jej žádná z evropských leukemických skupin nepovažuje za parametr rozhodující o intenzifikaci léčby pomocí alogenní HSCT (Giebel *et al*, 2019).

Byla publikována řada prací poukazující na horší prognózu pacientů s BCP-ALL a pozitivitou znaku CD20 (Maury *et al*, 2016, Thomas *et al*, 2009). Naši pacienti s více než 20% expresí znaku CD20+ na leukemických blastech byli v souladu s protokolem léčení infuzí rituximabu před každým z cyklů chemoterapie. Analýza přežití neprokázala rozdíl v přežití mezi skupinami nemocných, kteří dostali a nedostali anti-CD20 protilátku (Obr. 8).

Potvrdili jsme silný prognostický význam časného dosažení MRN negativity měřené v 11. týdnu po skončení indukční léčby. OS a DFS ve 3 letech u pacientů s kompletní molekulární odpovědí dosahovalo 84,7 % a 67,1 %, což kontrastovalo s 56,8 % a 42,0 % u pacientů s detekovatelnou MRN ( $p < 0,001$  a  $0,005$ ; Obr. 9). Klinický význam hladiny MRN v 11. týdnu byl nezávislý na standardních prognostických faktorech (věk, karyotyp, imunofenotyp, počet leukocytů při diagnóze, riziková skupina dle GMALL) (Obr. 12).

Data ukazují, že perzistence MRN před zahájením konsolidační fáze léčby a dále zejména po skončení prvního konsolidačního bloku chemoterapie je závažným negativním

prognostickým faktorem pro přežití. V současné době je pro pacienty s BCP-ALL a perzistující MRN nebo molekulárním relapsem k dispozici léčba bispecifickou monoklonální protilátkou blinatumomabem, která v této indikaci dosahuje 78 % odpovědí (Gokbuget *et al*, 2018). Otázkou zůstává, zda všichni pacienti, kteří jsou z indikace perzistence MRN indikováni k cílené léčbě a dosáhnou na ní CMR, mají podstoupit alogenní HSCT. Zodpovědět se jí snaží probíhající klinické studie (MolAct1; clinical.trials.gov identifikátor NCT03109093).

Silný prognostický význam pro přežití mělo provedení alogenní HSCT v první kompletní remisi, a to jak v univariantní (Obr. 10), tak multivariantní analýze (Obr. 12). Neprokázali jsme rozdíl v OS mezi pacienty v molekulární remisi, kteří byli nebo nebyli transplantováni. Signifikantní rozdíl však byl vyjádřen v analýze EFS (85,4 % vs. 59,3 %,  $p = 0,018$ ; Tabulka 9, Obr. 23). Křivky naznačují, že část pacientů bez HSCT relabuje kolem dvacátého měsíce léčby, tedy ještě před skončením udržovací terapie. Moderní imunoterapie dává většině z nich šanci na dosažení druhé remise a následné provedení alogenní HSCT. Předpokládáně je kumulativní incidence relapsu (CIR) transplantovaných pacientů nižší než netransplantovaných, avšak 36,6% CIR u pacientů v CMR bez HSCT je nečekaně vyšší než ukazují výstupy velkých evropských skupin (Patel *et al*, 2010, Huguet *et al*, 2018, Ribera *et al*, 2020). Nabízí se otázka, do jaké míry je negativita MRN silnějším prognostickým faktorem než některé z klasických rizikových faktorů určujících skupinu vysokého rizika.

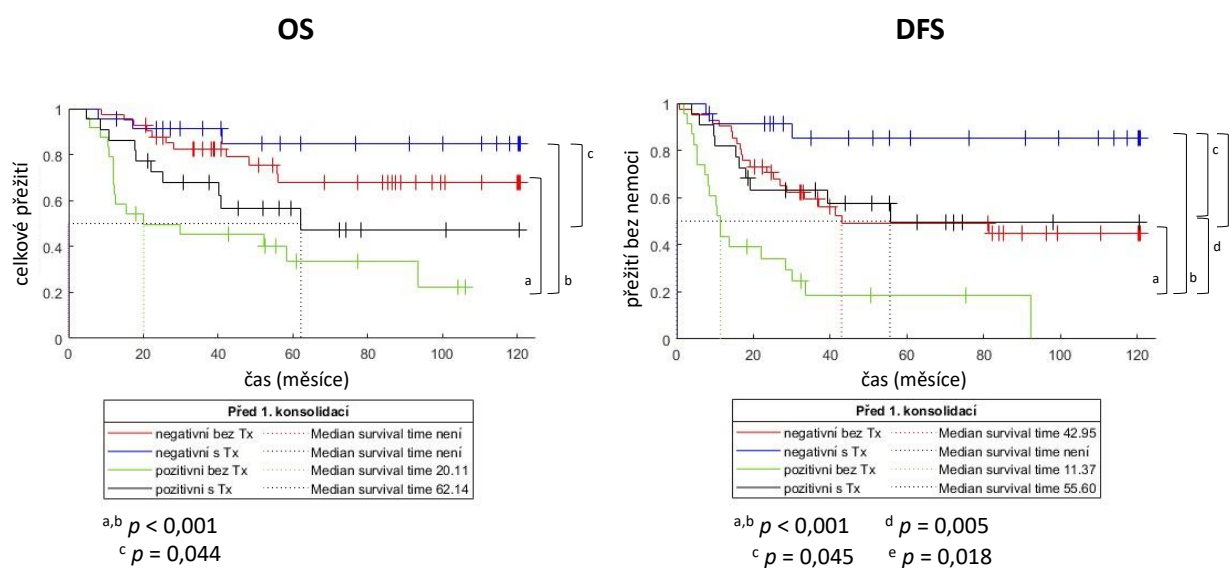
Tato analýza nebyla primárně koncipována na hodnocení výsledků transplantační léčby nebo léčby relapsu, avšak nabízí se několik faktorů, které mohou být příčinou přepojatosti. Zejména jde o časovou předpojatost, neboť subjekty byly léčeny v intervalu 14 let, kdy se zásadně proměnily možnosti prevence a léčby komplikací HSCT, stejně jako možnosti léčby relapsu moderními imunoterapeutickými přístupy (blinatumomab, inotuzumab ozogamicin).

**Tabulka 9.** Analýza přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle MRN v týdnu 11 a HSCT v 1. kompletní remisi.

	n (%)	celkové přežití		přežití bez nemoci		CIR ve 3/5 letech (%)
		medián, 95% CI (měsíce)	přežití ve 3/5 letech (%)	medián, 95% CI (měsíce)	přežití ve 3/5 letech (%)	
MRNneg bez HSCT	41 (37,3)	NR	82,4/68,0	43,0 (0,0–109,9)	59,3/49,0	36,6/41,5
MRNneg s HSCT	23 (20,9)	NR	91,1/84,6	NR	85,4/85,4	8,7/8,7
MRN+ bez HSCT	24 (21,8)	20,1 (0,0–64,0)	45,1/33,4	11,4 (9,5–13,3)	18,3/18,3	66,7/66,7
MRN+ s HSCT	22 (20,0)	62,1 (–)	67,6/56,3	55,6 (–)	63,3/49,3	13,6/13,6

Vysvětlivky: CIR = kumulativní incidence relapsu.

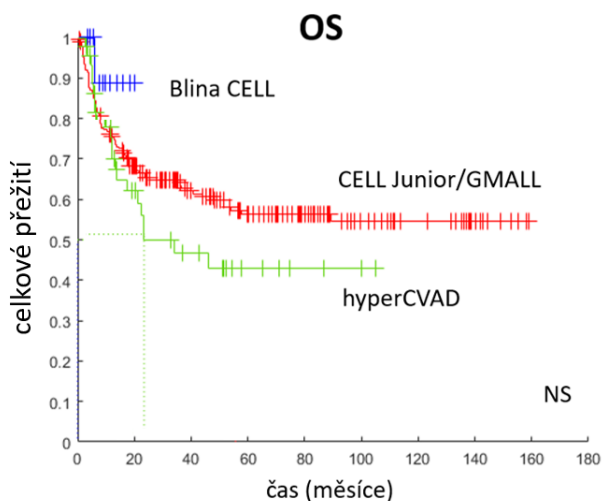
**Obr. 23.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle MRN v týdnu 11 a HSCT v 1. kompletní remisi.



Srovnání výsledků léčby podle protokolu GMALL 07/2003 (CELL Junior 2012) a méně intenzivního protokolu hyperCVAD ukazuje na trend lepšího přežití u pacientů léčených podle protokolu pediatrického typu (medián OS nedosažen vs. 27,7 měs., OS v 5 letech 56 % vs. 42 %; medián DFS nedosažen vs. 27,7 měs., DFS v 5 letech 50 % vs. 33 %), ačkoliv rozdíl mezi oběma křivkami není statisticky významný (Obr. 24). Naději představuje naznačený tvar křivky přežití pacientů léčených dle akademického protokolu Blina-CELL s bispecifickou monoklonální protilátkou blinatumomabem v indukční fázi léčby. Ačkoliv bylo ve srovnání

zahrnuto jen prvních 18 pacientů, jsou výsledky přinášející 97 % kompletních remisí a 89 % přežití v prvním roce léčby bez HSCT důvodem k optimistickým očekáváním.

**Obr. 24.** Přežití pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL podle použitého léčebného protokolu.



#### Léčba *BCR-ABL1*-pozitivní akutní lymfoblastové leukémie

Úspěšnost léčby pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL zaznamenala v posledních 20 letech dramatické zlepšení, v jehož základech stojí zavedení cílené léčby inhibitory tyrozinové kinázy podávaném paralelně s chemoterapií. Výsledky studií velkých evropských národních skupin zaznamenaly až dvacetiprocentní nárůst v celkovém přežití, jak ukazuje srovnání studií italské skupiny GIMEMA, kde OS ve 2 letech stoupl z 25 % v éře před imatinibem na 55 % po zavedení imatinibu (Bassan *et al*, 2000, Bassan *et al*, 2010). Naše výsledky ukazují OS ve 3 a 5 letech 57,2 % a 52,4 % (Obr. 13) a v mezinárodním srovnání plně ob stojí. Podtyp ALL, pro který byla historicky vyčleňována samostatná riziková skupina „very high risk“, se postupně z hlediska parametru celkového přežití stal standardně rizikovou ALL, což ukazuje srovnání s kohortou pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL, kde OS ve 3 a 5 letech činilo 63,5 % a 55,9 % (Tabulka 4).

Podmínkou tohoto zlepšení je schopnost absolvovat intenzivní léčbu zahrnující konsolidaci formou alogenní HSCT. V našem souboru dosahovaly OS a DFS v 5 letech ve skupině pacientů transplantovaných v první kompletní remisi 69,8 % a 59,8 % a významně se lišily od přežití pacientů bez HSCT (18,5 % a 6,5 %,  $p < 0,001$ ; Obr. 20). Tyto výsledky jsou

zcela srovnatelné s velkými kohortami, např. s francouzskou, kde přežití transplantovaných v 5 letech bylo 62 % a peritransplantační morbidita a mortalita dosahovala 25,6 % (Chalandon *et al*, 2015).

V kohortě pacientů s *BCR-ABL1*–pozitivní ALL byl ještě markantněji vyjádřen rozdíl ve výsledcích léčby nemocných léčených před a po roce 2012 (Obr. 21). Výsledky odrážejí nejen vývoj na poli podpůrné léčby, standardizaci transplantačních protokolů a větší možnosti v léčbě infekčních i imunologicky podmíněných potransplantačních komplikací, ale také změnu ve složení indukční terapie. V dodatku protokolu GMALL 07/2007 z roku 2012 byla v rameni pro *BCR-ABL1*–pozitivní ALL redukována myelotoxická léčba, zejména vypuštěním antracyklinů. Při současné terapii imatinibem byla zkrácena doba neutropenie, snížena incidence infekčních komplikací, výrazně redukována časná morbidita i mortalita, a větší počet pacientů tak mohl podstoupit alogenní HSCT. Tomu nasvědčuje i statisticky významný rozdíl v podílu transplantovaných pacientů v letech 2007–2012 (20 z 39, tj. 51,3 %) a v letech 2013–2020 (42 z 55, tj. 76,4 %;  $p = 0,011$ ).

Analýza skupiny pacientů s *BCR-ABL1*–pozitivní ALL je významně limitována malým množstvím subjektů. Nebylo tak možné statisticky prokázat prognostický vliv řady parametrů, kterým byl ve větších kohortách prognostický význam přiznán. Při srovnání skupin dle věku bylo prokázáno lepší přežití skupiny adolescentů a mladých dospělých do 35 let (AYA) pouze pro OS (Obr. 14). Nemohli jsme prokázat negativní vliv přídatných chromosomálních změn na přežití (Obr. 15), ačkoliv literárně jsou genové delece, především delece genů *CDKN2A/B*, prokázány jako faktor negativně ovlivňující přežití (Pfeifer *et al*, 2018). Přítomnost CNA u *BCR-ABL1*–pozitivní ALL měla negativní dopad na přežití i u pacientů léčených kombinovanou imunoterapií ve studii D-ALBA s blinatumomabem a dasatinibem v první linii léčby, kde nejhorších výsledků dosahovala právě skupina nemocných s genotypem *IKZF1* plus (Foa *et al*, 2020).

Podobně jsme nebyli schopni ukázat rozdíl v přežití mezi pacienty s přestavbou *BCR-ABL1* minor oproti přestavbě major (Obr. 17), i když jiné studie ukázaly na horší molekulární odpověď nemocných s přestavbou major (Foa *et al*, 2011), patrně z důvodu, že major přestavba postihuje časnější hematopoetický prekurzor a je exprimována nejen v nádorově transformované lymfoidní linii (Hovorkova *et al*, 2017).

Již v analýze publikované roku 2016 jsme ukázali na pomalejší průběh MRN u *BCR-ABL1*–pozitivní ALL. Čas do dosažení molekulární remise byl 2,3x delší než u *BCR-ABL1*–

negativní ALL (Salek *et al*, 2016; Příloha 2). Ani na větším souboru se nepodařilo efekt časné MRN odpovědi prokázat. Nebyl pozorován rozdíl v přežití pacientů, kteří dosáhli negativity MRN v týdnu 11, či nikoliv (Obr. 19). Tento výsledek koresponduje s pozorováním francouzské skupiny GRAALL ve studii GRAAPH-2005, kde osoby v kompletní remisi s  $MRN \geq 10^{-3}$  před transplantací neměli horší přežití než pacienti v hlubší molekulární odpovědi (Chalandon *et al*, 2015, Dhedin *et al*, 2015). Zásadní prognostický význam je přisuzován sledování transkriptu *BCR-ABL1* po provedené HSCT.

Výše zmíněná francouzská studie dále ukázala, že přežití nemocných, kteří dosáhli před transplantací velké molekulární odpovědi (transkript *BCR-ABL1* <0,1 %), se nelišilo, pokud byli transplantováni alogenně nebo autologně. Tato studie se stala základem úvah o odkladu alogenní transplantační léčby u pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní B-ALL v molekulární remisi až do doby případného relapsu (viz dále: Akademické protokoly pro léčbu ALL v České republice). Této strategii nahrává i recentně publikovaná analýza srovnávající léčbu podle protokolu hyperCVAD v kombinaci se třemi generacemi TKI, kde pacienti s poklesem transkriptu *BCR-ABL1* <0,01 % v průběhu prvních 3 měsíců léčby neprofitovali z transplantačního přístupu (Sasaki *et al*, 2021). Možnou budoucí strategii naznačují i první výsledky kompletně bezchemoterapeutických přístupů k léčbě první linie, kde kombinace blinatumomabu s dasatinibem vedla k OS ve 2 letech ve výši 95 % (Foa *et al*, 2020), kombinace blinatumomabu s ponatinibem v průběžné analýze dokonce dosahovala OS v 1 roce 100 % (Short *et al*, 2021).

### Prognostický význam nízkých pozitivit MRN

Prospektivní hodnocení MRN se v průběhu posledních 15 let stalo integrální součástí většiny evropských akademických léčebných protokolů (německého GMALL, francouzského GRAAL, britského UKALL, italského NILG, španělského PETHEMA) (Gokbuget *et al*, 2012, Beldjord *et al*, 2014, Patel *et al*, 2010, Bassan *et al*, 2009, Ribera *et al*, 2020). MRN je konsensuálně hodnocena po skončení prvního bloku indukční léčby (týden 4/den 26), na konci indukční fáze (týden 5–6) a po prvních třech blocích chemoterapie (týden 12–16). Po zhodnocení výsledků léčby podle zmíněných národních se klíčový moment pro rozhodování o intenzifikaci terapie na základě MRN přesunul do časnějších fází léčby, konkrétně do intervalu mezi 10. a 16. týdnem. V naší analýze nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v přežití podle MRN měřené před prvním a druhým blokem konsolidační léčby v týdnech 11 a 16. Ve



shodě s našimi dříve publikovanými výsledky (Salek *et al*, 2016; Příloha 2) považujeme MRN měřenou v týdnu 11 za zásadní parametr pro hodnocení odpovědi na polychemoterapeutickou léčbu dle protokolu GMALL 07/2003 (CELL Junior 2012).

V recentně publikované analýze jsme ukázali, že klinickou relevanci mají jakékoliv positivity MRN v 11. týdnu léčby a že hodnoty pacientů s pozitivní nekvantifikovatelnou MRN (MRNnq) mají negativní prognostický význam srovnatelný s pacienty s kvantifikovatelnou náloží (MRNq) (Salek *et al*, 2021; Příloha 1).

Dále jsme pozorovali horší DFS v 5 letech u pacientů s MRNnq v týdnu 16 než u pacientů s MRNq. Tento zdánlivý paradox může být způsoben nízkým počtem pacientů, nicméně nabízí se i vysvětlení, že odkládání léčby do doby, až pacienti dosáhnou MRNq, je provázeno vznikem chemorezistentních klonů, což následně vede k horším výsledkům léčby (molekulárního) relapsu.

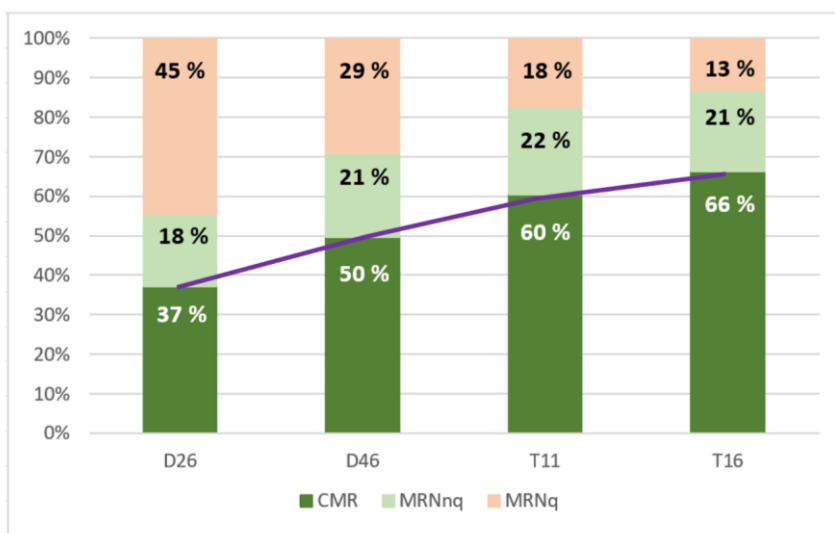
Dosažení kompletní MRN odpovědi (CMR) již po prvním indukčním cyklu (den 26) definuje skupinu pacientů vyznačující se pětiletým OS 73,4 % a DFS 65,1 %. Pacienti, kteří 26. den léčby dosáhli MRNnq, vykazovali střední prognózu. Tři čtvrtiny z nich (12 z 16) dospěli do CMR před zahájením konsolidační léčby v 11. týdnu a zůstali v remisi, zatímco zbývajících 25 % bylo i nadále MRNnq. Naopak z 37 pacientů, kteří měli v den 26 MRNq, dosáhlo CMR v týdnu 11 jen 9 (24 %). Dynamiku vývoje MRN v průběhu indukční a časné konsolidační fáze léčby znázorňuje Obr. 25.

Odběr kostní dřeně bezprostředně po skončení druhé fáze indukční léčby (den 46) je zatížen skutečností, že v tuto dobu se pacienti nacházejí v aplázii po podané chemoterapii nebo ve fázi regenerace kostní dřeně. Tím je dáno vyšší riziko falešné positivity z důvodu nespecifického nasedání IG/TR primerů na regenerující polyklonální lymfocyty. Je to pravděpodobně i důvod, proč výsledky v intervalu MRNnq v tomto časovém bodě nevykazují prognostický vliv na přežití.

Pacienti, kteří byli na základě zhodnocení diagnostických parametrů a MRN na konci indukce zařazeni do skupiny vysokého rizika, podstoupili alogenní HSCT. Hladina MRN před vstupem do HSCT představuje nezávislý rizikový faktor pro přežití po transplantaci (Gokbuget *et al*, 2012, Dhedin *et al*, 2015). Naše kohorta, v níž jsme hodnotili prognostický význam MRN, čítala pouze 39 transplantovaných pacientů, z nichž ve skupině MRNq před HSCT byli pouze tři. Tato skutečnost omezuje interpretaci získaných výsledků, byli jsme nicméně schopni

prokázat výhodu dosažení CMR i ve srovnání s MRNnq pro OS (33,3 % vs. 83,7 %, HR 4,3,  $p = 0,03$ ). Podobný trend byl patrný i pro DFS (33,3 % vs. 80,0 %, HR 3,2,  $p = 0,07$ ).

**Obr. 25.** Molekulární odpověď pacientů s *BCR-ABL1*-negativní ALL v průběhu indukční a časně konsolidační fáze léčby dle protokolu GMALL 07/2003 (CELL Junior 2012).



Data potvrzují signifikantně lepší přežití transplantovaných pacientů, kteří do HSCT vstupují v CMR. Neumožňují však odpovědět na otázku, zda přidání dalšího léčebného cyklu pacientům s pozitivní MRN a následné dosažení CMR povede i k lepšímu přežití po HSCT. Že je to pravděpodobné, ukázala analýza německé skupiny GMALL, která se zaměřila na pacienty se selháním molekulární odpovědi v týdnu 16 (Gokbuget *et al*, 2017).

Nízké pozitivty MRN dosud nebyly považovány za klinicky relevantní. Tyto výsledky byly na základě doporučení konsorcia EuroMRD považovány na MRN negativní s doporučením k časnější kontrole (Bruggemann *et al*, 2010). Naše data prokazují, že MRNnq mají nezanedbatelný prognostický význam srovnatelný s MRNq. Zatím nepublikovaná data německé skupiny GMALL ukazují, že metodou NGS je možné tuto skupinu dále rozdělit na pacienty se skutečnou pozitivitou, respektive negativitou MRN (pozitivita MRN byla metodou NGS potvrzena u 66 % pacientů s MRNnq v 16. týdnu léčby).

Díky spolupráci s německou pracovní skupinou GMALL a vlastním aktivitám byla CELL přizvána k aktivnímu členství v Evropské pracovní skupině pro ALL dospělých (EWALL). Toto členství nám mimo jiné umožnilo účastnit se společných akademických projektů s novými cílenými léčivými u starších pacientů s ALL. Českou účast v projektu EWALL-INO s inotuzumabem v první linii léčby starších pacientů s *BCR-ABL1*-negativní BCP-ALL ALL (clinical.trials.gov identifikátor NCT03249870) zabezpečují z pozice národního koordinátora. Členství v EWALL zároveň přineslo impuls k návrhům a realizaci vlastních nekomerčních klinických projektů. Jsem autorem a hlavním koordinátorem studií Blina-CELL s blinatumomabem v první linii léčby *BCR-ABL1*-negativní BCP-ALL (clinical.trials.gov identifikátor NCT04554485) a Pona-CELL s ponatinibem v první linii léčby *BCR-ABL1*-pozitivní BCP-ALL (clinical.trials.gov identifikátor NCT04554459). Hlavním cílem obou studií je dosažení časně negativity MRN díky zařazení moderních cílených terapeutik do první linie léčby. Jde o první české klinické studie iniciované investigátorem na poli akutních leukémií.

Experimentální součástí protokolu Pona-CELL je sledování MRN metodou kapkové digitální PCR (ddPCR), a to jak na úrovni transkriptu *BCR-ABL1*, tak pomocí kvantifikace specifické fúze na genomické úrovni. Tím bude zajištěna absolutní kvantifikace MRN nezávisle na individuální variabilitě exprese mezi pacienty nebo i mezi jednotlivými buňkami téhož pacienta. K detekci a sledování dynamiky mutačních změn v kinázové doméně *BCR-ABL1* při léčbě ponatinibem bude použita metodika alelově specifické ddPCR. Metodu jsme zavedli a validovali na souboru 10 pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML), kteří vyvinuli v průběhu léčby rezistentní mutaci, a 12 pacientů s *BCR-ABL1*-pozitivní ALL a lymfoidním blastickým zvratem CML, kteří byli prospektivně vyšetřováni na přítomnost mutací. Polovina pacientů z posledně jmenované kohorty měla detekovanou rezistentní mutaci T315I, z toho 3 (25 %) v minoritním klonu již v čase diagnózy, další tři (25 %) mutaci rozvinuli v průběhu léčby. Zrelabovali čtyři pacienti. U všech byla mutace T315I v době relapsu vlastností dominantního klonu. Naše data ukázala, že alelově specifická ddPCR je senzitivní a rychlou metodou vhodnou pro sledování klonálního vývoje a detekci prognosticky významných mutací při diagnóze a v průběhu intenzivní léčby *BCR-ABL1*-pozitivní ALL (Polivkova *et al*, 2021; Příloha 3).

## Porovnání metod pro hodnocení MRN

Paralelně s měřením MRN pomocí kvantifikace specifických přestaveb IG/TR metodou qPCR byla MRN v průběhu léčby monitorována také metodou osmibarevné FCM. Již v první analýze našich pacientů jsme ukázali, že senzitivita standardní 8-barevné FCM je nižší než qPCR a v průběhu léčby klesá (Salek *et al*, 2016; Příloha 2). Největší prognostickou úlohu měla hodnota MRN měřená 11. den léčby, kdy není principiálně možné použít metodu IG/TR qPCR. Při použití diskriminačního prahu 1 % rozdělila FCM MRN kohortu *BCR-ABL1*-negativních ALL na skupinu s 3-letým přežitím 75 % a 33 % ( $p = 0,007$ ). Parametr FCM MRN v takto časně fázi léčby je možné považovat za alternativu k měření časné odpovědi na kortikosteroidy, která je jedním z nejvýznamnějších prognostických faktorů v pediatrických protokolech.

Samostatnou publikaci jsme věnovali srovnání metod FCM a IG/TR qPCR pro měření MRN v časných fázích léčby ALL. Ukázali jsme, že po prvním bloku chemoterapie mají obě metody srovnatelnou prediktivní hodnotu pro celkové přežití ( $p = 0,001$  až  $0,008$ ) i přežití bez progresu (PFS;  $0,03$  až  $0,04$ ). V souladu s výsledky diskutovanými v předešlé kapitole měla největší diskriminační význam pro predikci přežití hodnota MRN měřená metodou qPCR před zahájením konsolidační fáze léčby v 11. týdnu, když za MRN negativní byly považovány hodnoty odpovídající kompletní molekulární odpovědi ( $p = 0,002$  pro OS a  $p = 0,02$  pro PFS). V tuto fázi léčby již metoda FCM nebyla prognosticky relevantní, neboť jsme nezaznamenali žádného pacienta s pozitivou v této metodě, ovšem 11 % výsledků bylo diskordantně pozitivních v qPCR (Hrabovsky *et al*, 2018; Příloha 4).

Problém nižší senzitivity FCM by mohl být překonán zavedením pokročilejší metodiky nové generace – next generation flow (NGF) (Flores-Montero *et al*, 2017). Inovace spočívá ve výběru konkrétních protilátek a fluorochromů umožňujících odlišit MRN od fenotypických odchylek, které mohou být přítomny na regenerujících B-lymfoidních prekurzorech i normálních T-lymfocytech. Metodu NGF lze aplikovat u většiny (>95 %) ALL. Je rychlejší a lépe reprodukovatelná než NGS. Podmínkou a zároveň největším limitem je požadavek na buněčnost vyšetřovaného vzorku. Deklarované senzitivity až  $10^{-6}$  je možné dosáhnout při vyšetření  $10^7$  buněk. Tomuto požadavku však v reálné praxi z důvodu různě těžkého a dlouhého poškození hematopoézy po podané chemoterapii nelze vždy dostat.

## Detekce a prognostický význam Ph-like fenotypu

Spolupráce v rámci EWALL nám umožnila účastnit se výzkumných projektů dalších národních skupin pro ALL dospělých. Podíleli jsme se na testování algoritmu pro rychlou detekci Ph-like ALL, který byl vyvinut na pracovišti univerzity La Sapienza v Římě pod vedením dr. Sabiny Chiaretti. Projekt byl navržen v době, kdy byla obecně přijata teze o negativním prognostickém významu Ph-like fenotypu a vedly se diskuse o jeho frekvenci v jednotlivých populacích i klinickém významu v éře léčby dle MRN. Dodnes nepanuje shoda na jednotné definici Ph-like fenotypu, stejně tak se liší metodické přístupy k jeho detekci. Tyto kombinují řadu metod zahrnujících FACS, FISH, qPCR a analýzu MRN (Roberts *et al*, 2014, Fasan *et al*, 2015). Ve snaze o jednoduchý a rychlý test Ph-like fenotypu byl navržen algoritmus založený výhradně na testování genové exprese pomocí RT-qPCR. Pomocí genového expresního profilování bylo vytipováno deset genů, jejichž exprese je konstatně zvýšená u Ph-like ALL: *CRLF2*, *SOCS2*, *IFITM1*, *CD99*, *TP53INP1*, *IFITM2*, *JCHAIN*, *NUDT4*, *ADGRE5* a *SEMA6A*. Expresní data jsou zadána do počítačového modelu pracujícího na principu statistické analýzy hlavních komponent a regresní analýzy. Výstupem je číselná hodnota, která s 88,5% senzitivitou a 100% specifitou umožní diferencovat mezi Ph-like a non-Ph-like ALL. V kohortě čítající 194 pacientů s „B-other“ ALL prediktor identifikoval Ph-like profil u 54 (28 %) případů (Chiaretti *et al*, 2018; Příloha 5).

Naše účast na projektu spočívala nejen ve sdílení vzorků a klinických dat, ale také v testování reprodukovatelnosti prediktoru. V laboratoři Oddělení molekulární genetiky ÚHKKT jsme pod vedením doc. Mgr. Kateřiny Polákové Machové, Ph.D. paralelně s pracovištěm v Římě testovali expresi vytipovaných deseti genů a potvrdili reprodukovatelnost prediktoru při měření exprese v jiných laboratorních podmínkách (Chiaretti *et al*, 2019).

Dále jsme se podíleli na výzkumném projektu kolegů z brněnského pracoviště, který měl za cíl popsat incidenci a prognostický význam Ph-like fenotypu ve skupině dospělých pacientů s B-ALL léčených v České republice. Metodicky bylo kombinováno genové expresní profilování, cytogenetický a RNA screening přestaveb *CRLF2*, metoda MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) pro detekci změn v počtu kopií segmentů DNA (CNA) zahrnujících gen *IKZF1* a další prognosticky relevantní geny a NGS pro záchyt jednonukleotidových variant a malých insercí a delecí. Expresní profil definující Ph-like subtyp byl identifikován u 49 % pacientů, kteří se vyznačovali mladším věkem s mediánem 37 let (oproti 53 letům ve skupině non-Ph-like) (Hrabovsky *et al*, 2021; Příloha 6).

Ačkoliv polovina pacientů s Ph-like ALL v našem souboru nedosáhla negativity MRN před zahájením konsolidační fáze léčby (ve skupině non-Ph-like to bylo jen 13 %), nepodařilo se nám prokázat negativní vliv Ph-like fenotypu na přežití. Tři pacienti s Ph-like ALL, kteří byli léčeni novými protokoly s cílenou imunoterapií v první linii léčby, dosáhli časně molekulární remise. Předpokládáme, že začlenění nových imunoterapeutických postupů do léčby první linie dále potlačí negativní prognostický vliv pomalé MRN odpovědi, který je pozorován u Ph-like pacientů léčených standardní chemoterapií.

Analýzou CNA byla v souladu s publikovanými daty identifikována řada monoalelických a bialelických delecí (Herold *et al*, 2017). Kombinace delecí v genu *IKZF1*, *PAX5*, *CDKN2A/B* nebo *PARI* za nepřítomnosti delece *ERG*, která definuje *IKZF1*<sup>plus</sup> fenotyp, podmiňovala i v naší kohortě skupinu pacientů s horším přežitím podobně, jak již bylo popsáno u dětských pacientů (Stanulla *et al*, 2018).

Detekce Ph-like fenotypu není v současnosti v českých hematologických centrech součástí rutinní klinické praxe. Pacienti jsou indikováni k intenzifikované léčbě na základě nedostatečné MRN odpovědi, kterou se Ph-like ALL vyznačují. Tuto skupinu identifikujeme retrospektivně v rámci výzkumných projektů. Časnou detekci bychom zavedli v případě účasti na klinickém hodnocení s cílenými léčivými indikovanými na základě přítomnosti mutací v konkrétních signalizačních drahách nebo když by podání některého z cílených léčiv bylo v dané indikaci schváleno regulačními úřady. Práce prokazující účinnost pankinázového inhibitoru ponatinibu u pacientů s Ph-like ALL již byly publikovány (Lunghi *et al*, 2021).

## Závěr

Tato práce přináší původní analýzu výsledků léčby 297 dospělých pacientů s akutní lymfoblastovou leukémií (ALL) léčených v letech 2007–2020 v pěti hematologických centrech v České republice podle protokolu GMALL 07/2003 (CELL Junior 2012) s prospektivním sledováním minimální reziduální nemoci (MRN).

V kohortě *BCR-ABL1*–negativní ALL dosáhlo 189 (93,1 %) pacientů kompletní remise, refrakterních bylo 5 (2,4 %) pacientů, časná mortalita byla 3,0 %. Relaps byl zaznamenán u 70 (34,5 %) nemocných v mediánu 10,6 měsíců. Přežití ve 3 a 5 letech dosahovalo 63,5 % a 55,9 % pro OS a 54,5 % a 49,7 % pro DFS. Významně lepší celkové přežití měli mladí dospělí do 35 let ( $p = 0,015$ ), pacienti bez vstupní infiltrace CNS ( $p = 0,016$ ), s negativitou MRN před zahájením konsolidační léčby ( $p < 0,001$ ), transplantovaní v 1. kompletní remisi ( $p < 0,001$ ) a nemocní léčení po roce 2012 ( $p = 0,05$ ). V multivariantní analýze byla jediným nezávislým faktorem ovlivňujícím celkové přežití MRN v 11. týdnu léčby (HR 3,06;  $p = 0,006$ ). Pro přežití bez progresu byla významná vstupní infiltrace CNS s HR 2,08 ( $p = 0,038$ ) a MRN v 11. týdnu s HR 2,15 ( $p = 0,020$ ).

Ve skupině *BCR-ABL1*–pozitivní ALL dosáhlo kompletní remise 84 (89,4 %) pacientů, refrakterní byl 1 (1,0 %) pacient, časná mortalita byla 4,3 %. Zrelabovalo 26 (27,7 %) nemocných v mediánu 8,6 měsíců. Přežití ve 3 a 5 letech dosahovalo 57,2 % a 52,4 % pro OS a 50,2 % a 44,9 % pro DFS. Statisticky lepší celkové přežití měli transplantovaní pacienti ( $p < 0,001$ ) a nemocní diagnostikovaní po roce 2012 ( $p < 0,001$ ).

Analýzou MRN měřené pomocí přestaveb IG/TR v průběhu indukční a v časné fázi konsolidační léčby jsme prokázali, že nízké nekvantifikovatelné pozitivivity (MRN<sub>nq</sub>) je nutné považovat za klinicky relevantní s negativním prognostickým dopadem srovnatelným s kvantifikovatelnými hodnotami MRN (MRN<sub>q</sub>). Pacienti s MRN<sub>nq</sub> po prvním indukčním cyklu (den 26), před prvním (týden 11) a druhým konsolidačním cyklem léčby (týden 16) měli OS a DFS v 5 letech 32,9 % a 28,1 %, 42,3 % a 41,0 %, 32,6 % a 23,6 %, což se statisticky nelišilo od OS a DFS pacientů s MRN<sub>q</sub> v daných fázích léčby (45,4 % a 33,3%, 35,0 % a 35,0 %, 37,5 % a 41,7 %). Na základě těchto výsledků navrhuje, aby i nízké pozitivivity MRN ( $\leq 10^{-4}$ ) detekované v časných fázích léčby byly důvodem k léčebné intervenci a intenzifikaci léčby.

Uvedené poznatky mají bezprostřední klinickou odezvu v původních akademických klinických projektech s moderními prostředky cílené terapie v první linii léčby, které mají za primární cíl dosažení časné negativity MRN coby klíčového prognostického faktoru pro přežití. Hodnota MRN před zahájením konsolidační fáze léčby je v nich považována za faktor určující intenzitu konsolidační léčby. Konkrétně definuje kohortu nemocných, u nichž je indikována intenzifikace pomocí alogenní HSCT.

Paralelním měřením MRN metodou FCM a qPCR jsme ukázali na vyšší senzitivitu molekulárně genetických metod pro predikci relapsu.

Podíleli jsme se na přípravě a validaci jednoduchého prediktoru pro časnou identifikaci Ph-like ALL založeném na testování genové exprese pomocí RT-qPCR. Tento model umožňuje s více než 88% senzitivitou a 100% specifitou rychle identifikovat pacienty s Ph-like fenotypem, což je předpokladem pro vedení klinických studií zaměřených na intenzifikaci léčby tohoto rizikového subtypu.



## Summary

This work presents an original analysis of 297 adult patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) treated from 2007 to 2020 in five hematology centers in the Czech Republic according to the 07/2003 GMALL protocol (CELL Junior 2012) with prospective monitoring of minimal residual disease (MRN).

In the *BCR-ABL1*-negative ALL cohort, 189 (93.1%) patients achieved complete remission and 5 (2.4%) patients were refractory. Early mortality was 3.0%. Relapse was reported in 70 (34.5%) patients at a median of 10.6 months. Survival at 3 and 5 years was 63.5% and 55.9% for OS and 54.5% and 49.7% for DFS. Young adults up to 35 years of age ( $p = 0.015$ ), patients without initial CNS infiltration ( $p = 0.016$ ), with MRD negativity before the start of consolidation treatment ( $p < 0.001$ ), transplantation in first complete remission ( $p < 0.001$ ) and patients treated after 2012 ( $p = 0.05$ ) had significantly better overall survival. MRD at week 11 of treatment was the only independent factor influencing overall survival on multivariate analysis (HR 3.06;  $p = 0.006$ ). Central nervous system infiltration and MRD at week 11 were proven as independent prognostic factors for DFS with HR 2.08 ( $p = 0.038$ ) and 2.15 ( $p = 0.020$ ), respectively.

In the *BCR-ABL1*-positive ALL group, 84 (89.4%) patients achieved complete remission and 1 (1.0%) patient was refractory. Early mortality was 4.3%. Twenty-six (27.7%) patients relapsed at a median of 8.6 months. Survival at 3 and 5 years was 57.2% and 52.4% for OS and 50.2% and 44.9% for DFS. Transplanted patients ( $p < 0.001$ ) and patients diagnosed after 2012 ( $p < 0.001$ ) had statistically better overall survival.

Analysis of MRD measured using IG/TR rearrangements during induction and early consolidation treatment demonstrated that low non-quantifiable positivities (MRDnq) should be considered clinically relevant with a negative prognostic impact comparable to quantifiable MRD (MRDq). Patients with MRDnq after the first induction cycle (day 26), before the first (week 11) and second (week 16) consolidation treatment cycle had OS and DFS at 5 years 32.9% and 28.1%, 42.3% and 41.0%, 32.6% and 23.6%, which was not statistically different from OS and DFS of patients with MRNq at the given treatment stages (45.4% and 33.3%, 35.0% and 35.0%, 37.5% and 41.7%). Based on these results, we suggest that low-level MRD of the order of  $10^{-4}$  or even lower – if detected at the beginning or during early phase of

consolidation therapy – should serve as a base for therapeutic interventions or treatment intensification.

Our findings have a direct clinical impact in new academic clinical studies with early MRD response as a primary endpoint. As the MRD load prior to the start of consolidation phase of therapy is a key prognostic factor for survival, we have decided to define the high-risk group merely based on MRD. These patients should profit from treatment intensification with allogeneic stem cell transplantation.

Using parallel measurements of MRD by flow cytometry and qPCR, we demonstrated the higher sensitivity of molecular testing for relapse prediction.

We participated in the preparation and validation of a simple predictor of Ph-like ALL based on measuring the expression of selected genes using RT-qPCR only. This model helps to quickly identify patients, a prerequisite for conducting clinical trials that aim to intensify first line treatment in this prognostically adverse group.

## Seznam zkratek

ACA	přidatné chromosomální změny
ALL	akutní lymfoblastová leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AYA	adolescenti a mladí dospělí (adolescents and young adults)
BCP-ALL	akutní B-prekurzorová lymfoblastová leukémie
CBF	jaderný vazebný faktor
CELL	Česká leukemická skupina – pro život
CI	konfidenční interval
CIR	kumulativní incidence relapsu
CNA	změny v počtu kopií segmentů DNA (copy number alterations)
CML	chronická myeloidní leukémie
CMR	kompletní MRN odpověď
CNS	centrální nervový systém
ddPCR	kapková digitální PCR
DfN	odlišný od normálu (different from normal)
DFS	přežití bez nemoci
ELN	Evropská leukemická skupina (European LeukemiaNet)
ETP-ALL	časná prekurzorová T-ALL
EWALL	Evropská pracovní skupina pro ALL dospělých
FISH	fluorescenční hybridizace <i>in situ</i>
FCM	multiparametrová průtoková cytometrie
GMALL	Německá multicentrická studijní skupina pro ALL dospělých
HDAC	histonová deacetyláza
HR	poměr rizik
HSCT	transplantace krvetvorných kmenových buněk
IDH	isocitrát dehydrogenáza
IG/TR	geny pro imunoglobulinové řetězce a T-buněčné receptory
LAIP	imunofenotyp asociovaný s leukémií
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MPAL	leukémie se smíšeným fenotypem
MPO	myeloperoxidáza
MRN	minimální (měřitelná) reziduální nemoc

MRNnq	MRN pozitivní nekvantifikovatelná
MRNq	MRN pozitivní kvantifikovatelná
NGF	průtoková cytometrie nové generace
NGS	sekvenování nové generace
NSE	nespecifická esteráza
OS	celkové přežití
PFS	přežití bez progresu
PIP2	fosfatidylinositol-bifosfát
PIP3	fosfatidylinositol-trifosfát
qPCR	kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase
RFS	přežití bez relapsu
RT-qPCR	kvantitativní PCR s reverzní transkripcí
T-ALL	akutní T-lymfoblastová leukémie
TCR	T-buněčný receptor
VAF	frekvence mutované alely

## Literatura

- Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F.W., Bateman, C.M., Guo, Y., Colman, S.M., Kempinski, H., Moorman, A.V., Tittley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T. & Greaves, M. (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*, **469**, 356-361.
- Andersson, A.K., Ma, J., Wang, J., Chen, X., Gedman, A.L., Dang, J., Nakitandwe, J., Holmfeldt, L., Parker, M., Easton, J., Huether, R., Kriwacki, R., Rusch, M., Wu, G., Li, Y., Mulder, H., Raimondi, S., Pounds, S., Kang, G., Shi, L., Becksfort, J., Gupta, P., Payne-Turner, D., Vadodaria, B., Boggs, K., Yergeau, D., Manne, J., Song, G., Edmonson, M., Nagahawatte, P., Wei, L., Cheng, C., Pei, D., Sutton, R., Venn, N.C., Chetcuti, A., Rush, A., Catchpoole, D., Heldrup, J., Fioretos, T., Lu, C., Ding, L., Pui, C.H., Shurtleff, S., Mullighan, C.G., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Gruber, T.A., Zhang, J., Downing, J.R. & St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome Project. (2015) The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nature Genetics*, **47**, 330-337.
- Bassan, R. & Hoelzer, D. (2011) Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 532-543.
- Bassan, R., Rohatiner, A.Z., Lerede, T., Di Bona, E., Rambaldi, A., Pogliani, E., Rossi, G., Fabris, P., Morandi, S., Casula, P., Carter, M., Lambertenghi-Deliliers, G., Lister, T.A. & Barbui, T. (2000) Role of early anthracycline dose-intensity according to expression of philadelphia chromosome/BCR-ABL rearrangements in B-precursor adult acute lymphoblastic leukemia. *The Hematology Journal : The Official Journal of the European Haematology Association*, **1**, 226-234.
- Bassan, R., Rossi, G., Pogliani, E.M., Di Bona, E., Angelucci, E., Cavattoni, I., Lambertenghi-Deliliers, G., Mannelli, F., Levis, A., Ciceri, F., Mattei, D., Borlenghi, E., Terruzzi, E., Borghero, C., Romani, C., Spinelli, O., Tosi, M., Oldani, E., Intermesoli, T. & Rambaldi, A. (2010) Chemotherapy-phased imatinib pulses improve long-term outcome of adult patients with philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Northern italy leukemia group protocol 09/00. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 3644-3652.
- Bassan, R., Spinelli, O., Oldani, E., Intermesoli, T., Tosi, M., Peruta, B., Rossi, G., Borlenghi, E., Pogliani, E.M., Terruzzi, E., Fabris, P., Cassibba, V., Lambertenghi-Deliliers, G., Cortelezzi, A., Bosi, A., Gianfaldoni, G., Ciceri, F., Bernardi, M., Gallamini, A., Mattei, D., Di Bona, E., Romani, C., Scattolin, A.M., Barbui, T. & Rambaldi, A. (2009) Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*, **113**, 4153-4162.
- Basso, G., Veltroni, M., Valsecchi, M.G., Dworzak, M.N., Ratei, R., Silvestri, D., Benetello, A., Buldini, B., Maglia, O., Masera, G., Conter, V., Arico, M., Biondi, A. & Gaipa, G. (2009) Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 5168-5174.
- Beldjord, K., Chevret, S., Asnafi, V., Huguot, F., Boulland, M.L., Leguay, T., Thomas, X., Cayuela, J.M., Gardel, N., Chalandon, Y., Boissel, N., Schaefer, B., Delabesse, E., Cave, H., Chevallier, P., Buzyn, A., Fest, T., Reman, O., Vernant, J.P., Lheritier, V., Bene, M.C., Lafage, M., Macintyre, E., Ifrah, N., Dombret, H. & Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL). (2014) Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **123**, 3739-3749.
- Berry, D.A., Zhou, S., Higley, H., Mukundan, L., Fu, S., Reaman, G.H., Wood, B.L., Kelloff, G.J., Jessup, J.M. & Radich, J.P. (2017) Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. *JAMA Oncology*, **3**, e170580.

- Boissel, N. & Baruchel, A. (2018) Acute lymphoblastic leukemia in adolescent and young adults: Treat as adults or as children? *Blood*, **132**, 351-361.
- Bond, J., Graux, C., Lhermitte, L., Lara, D., Cluzeau, T., Leguay, T., Cieslak, A., Trinquand, A., Pastoret, C., Belhocine, M., Spicuglia, S., Lheritier, V., Lepretre, S., Thomas, X., Huguet, F., Ifrah, N., Dombret, H., Macintyre, E., Boissel, N. & Asnafi, V. (2017) Early response-based therapy stratification improves survival in adult early thymic precursor acute lymphoblastic leukemia: A group for research on adult acute lymphoblastic leukemia study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **35**, 2683-2691.
- Bruggemann, M., Gokbuget, N. & Kneba, M. (2012) Acute lymphoblastic leukemia: Monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Seminars in Oncology*, **39**, 47-57.
- Bruggemann, M., Schrauder, A., Raff, T., Pfeifer, H., Dworzak, M., Ottmann, O.G., Asnafi, V., Baruchel, A., Bassan, R., Benoit, Y., Biondi, A., Cave, H., Dombret, H., Fielding, A.K., Foa, R., Gokbuget, N., Goldstone, A.H., Goulden, N., Henze, G., Hoelzer, D., Janka-Schaub, G.E., Macintyre, E.A., Pieters, R., Rambaldi, A., Ribera, J.M., Schmiegelow, K., Spinelli, O., Stary, J., von Stackelberg, A., Kneba, M., Schrappe, M., van Dongen, J.J., European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (EWALL) & International Berlin-Frankfurt-Munster Study Group (I-BFM-SG). (2010) Standardized MRD quantification in european ALL trials: Proceedings of the second international symposium on MRD assessment in kiel, germany, 18-20 september 2008. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, **24**, 521-535.
- Bruggemann, M., Kotrova, M., Knecht, H., Bartram, J., Boudjogrha, M., Bystry, V., Fazio, G., Fronkova, E., Giraud, M., Grioni, A., Hancock, J., Herrmann, D., Jimenez, C., Krejci, A., Moppett, J., Reigl, T., Salson, M., Scheijen, B., Schwarz, M., Songia, S., Svaton, M., van Dongen, J.J.M., Villarese, P., Wakeman, S., Wright, G., Cazzaniga, G., Davi, F., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, D., Groenen, P.J.T.A., Hummel, M., Macintyre, E.A., Stamatopoulos, K., Pott, C., Trka, J., Darzentas, N., Langerak, A.W. & EuroClonality-NGS working group. (2019) Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*, **33**, 2241-2253.
- Campana, D. & Pui, C.H. (1995) Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance. *Blood*, **85**, 1416-1434.
- Cante-Barrett, K., Spijkers-Hagelstein, J.A., Buijs-Gladdines, J.G., Uitdehaag, J.C., Smits, W.K., van der Zwet, J., Buijsman, R.C., Zaman, G.J., Pieters, R. & Meijerink, J.P. (2016) MEK and PI3K-AKT inhibitors synergistically block activated IL7 receptor signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **30**, 1832-1843.
- Cazzaniga, G. & Biondi, A. (2005) Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica*, **90**, 382-390.
- Chalandon, Y., Thomas, X., Hayette, S., Cayuela, J.M., Abbal, C., Huguet, F., Raffoux, E., Leguay, T., Rousselot, P., Lepretre, S., Escoffre-Barbe, M., Maury, S., Berthon, C., Tavernier, E., Lambert, J.F., Lafage-Pochitaloff, M., Lheritier, V., Chevret, S., Ifrah, N., Dombret, H. & Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL). (2015) Randomized study of reduced-intensity chemotherapy combined with imatinib in adults with ph-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **125**, 3711-3719.
- Chen, X. & Wood, B.L. (2017) Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Reviews*, **31**, 63-75.
- Chiaretti, S., Messina, M. & Foa, R. (2019) BCR/ABL1-like acute lymphoblastic leukemia: How to diagnose and treat? *Cancer*, **125**, 194-204.
- Chiaretti, S., Messina, M., Grammatico, S., Piciocchi, A., Fedullo, A.L., Di Giacomo, F., Peragine, N., Gianfelici, V., Lauretti, A., Bareja, R., Martelli, M.P., Vignetti, M., Apicella, V., Vitale, A., Li,

- L.S., Salek, C., Elemento, O., Inghirami, G., Weinstock, D.M., Guarini, A., Foà, R. (1998) Rapid identification of BCR/ABL1-like acute lymphoblastic leukemia patients using a predictive statistical model based on quantitative real time-polymerase chain reaction: clinical, prognostic and therapeutic implications. *British Journal of Haematology*, **181**, 642-652.
- Chiaretti, S., Taherinasab, A., Canichella, M., Messina, M., Piciocchi, A., Salek, C., Machova, K., Blagoevova, K., Ribera, J., Ribera, J.M., Meggendorfer, M., Haferlach, C., Guarini, A. Foà, R. (2019) The Validation of the BCR/ABL1-like Predictor across Laboratories Shows Reproducibility of Results. *Blood*, **134** (Supplement 1), 5211.
- Chiaretti, S., Vitale, A., Cazzaniga, G., Orlando, S.M., Silvestri, D., Fazi, P., Valsecchi, M.G., Elia, L., Testi, A.M., Mancini, F., Conter, V., te Kronnie, G., Ferrara, F., Di Raimondo, F., Tedeschi, A., Fioritoni, G., Fabbiano, F., Meloni, G., Specchia, G., Pizzolo, G., Mandelli, F., Guarini, A., Basso, G., Biondi, A. & Foà, R. (2013) Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. *Haematologica*, **98**, 1702-1710.
- Cimino, G., Pane, F., Elia, L., Finolezzi, E., Fazi, P., Annino, L., Meloni, G., Mancini, M., Tedeschi, A., Di Raimondo, F., Specchia, G., Fioritoni, G., Leoni, P., Cuneo, A., Mecucci, C., Saglio, G., Mandelli, F., Foà, R. & GIMEMA Leukemia Working Party. (2006) The role of BCR/ABL isoforms in the presentation and outcome of patients with philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: A seven-year update of the GIMEMA 0496 trial. *Haematologica*, **91**, 377-380.
- Coccaro, N., Tota, G., Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G. & Albano, F. (2020) Digital PCR: A reliable tool for analyzing and monitoring hematologic malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 10.3390/ijms21093141.
- Conter, V., Bartram, C.R., Valsecchi, M.G., Schrauder, A., Panzer-Grumayer, R., Moricke, A., Arico, M., Zimmermann, M., Mann, G., De Rossi, G., Stanulla, M., Locatelli, F., Basso, G., Niggli, F., Barisone, E., Henze, G., Ludwig, W.D., Haas, O.A., Cazzaniga, G., Koehler, R., Silvestri, D., Bradtke, J., Parasole, R., Beier, R., van Dongen, J.J., Biondi, A. & Schrappe, M. (2010) Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*, **115**, 3206-3214.
- Contreras Yametti, G.P., Ostrow, T.H., Jasinski, S., Raetz, E.A., Carroll, W.L. & Evensen, N.A. (2021) Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: Current practice and future directions. *Cancers*, **13**, 10.3390/cancers13081847.
- Coustan-Smith, E., Mullighan, C.G., Onciu, M., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pei, D., Cheng, C., Su, X., Rubnitz, J.E., Basso, G., Biondi, A., Pui, C.H., Downing, J.R. & Campana, D. (2009) Early T-cell precursor leukaemia: A subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.Oncology*, **10**, 147-156.
- Dastugue, N., Suci, S., Plat, G., Speleman, F., Cave, H., Girard, S., Bakkus, M., Pages, M.P., Yakouben, K., Nelken, B., Uyttebroeck, A., Gervais, C., Lutz, P., Teixeira, M.R., Heimann, P., Ferster, A., Rohrlach, P., Collonge, M.A., Munzer, M., Luquet, I., Boutard, P., Sirvent, N., Karrasch, M., Bertrand, Y. & Benoit, Y. (2013) Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*, **121**, 2415-2423.
- De Keersmaecker, K., Marynen, P. & Cools, J. (2005) Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **90**, 1116-1127.
- De Keersmaecker, K., Porcu, M., Cox, L., Girardi, T., Vandepoel, R., de Beck, J.O., Gielen, O., Mentens, N., Bennett, K.L. & Hantschel, O. (2014) NUP214-ABL1-mediated cell proliferation in T-cell acute lymphoblastic leukemia is dependent on the LCK kinase and various interacting proteins. *Haematologica*, **99**, 85-93.

- Della Starza, I., Chiaretti, S., De Propriis, M.S., Elia, L., Cavalli, M., De Novi, L.A., Soscia, R., Messina, M., Vitale, A., Guarini, A. & Foa, R. (2019) Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: Technical and clinical advances. *Frontiers in Oncology*, **9**, 726.
- Della Starza, I., De Novi, L.A., Santoro, A., Salemi, D., Tam, W., Cavalli, M., Menale, L., Soscia, R., Apicella, V., Ilari, C., Vitale, A., Testi, A.M., Inghirami, G., Chiaretti, S., Foa, R. & Guarini, A. (2019) Digital droplet PCR and next-generation sequencing refine minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **60**, 2838-2840.
- Den Boer, M.L., van Slegtenhorst, M., De Menezes, R.X., Cheok, M.H., Buijs-Gladdines, J.G., Peters, S.T., Van Zutven, L.J., Beverloo, H.B., Van der Spek, P.J., Escherich, G., Horstmann, M.A., Janka-Schaub, G.E., Kamps, W.A., Evans, W.E. & Pieters, R. (2009) A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: A genome-wide classification study. *The Lancet.Oncology*, **10**, 125-134.
- Dhedin, N., Huynh, A., Maury, S., Tabrizi, R., Beldjord, K., Asnafi, V., Thomas, X., Chevallier, P., Nguyen, S., Coiteux, V., Bourhis, J.H., Hichri, Y., Escoffre-Barbe, M., Reman, O., Graux, C., Chalandon, Y., Blaise, D., Schanz, U., Lheritier, V., Cahn, J.Y., Dombret, H. & Ifrah, N. (2015) Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with ph-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **125**, 2486-2496.
- Dores, G.M., Devesa, S.S., Curtis, R.E., Linet, M.S. & Morton, L.M. (2012) Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the united states, 2001-2007. *Blood*, **119**, 34-43.
- Durinck, K., Goossens, S., Peirs, S., Wallaert, A., Van Loocke, W., Matthijssens, F., Pieters, T., Milani, G., Lammens, T., Rondou, P., Van Roy, N., De Moerloose, B., Benoit, Y., Haigh, J., Speleman, F., Poppe, B. & Van Vlierberghe, P. (2015) Novel biological insights in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology*, **43**, 625-639.
- Fasan, A., Kern, W., Nadarajah, N., Weber, S., Schindela, S., Schlenther, N., Schnittger, S., Haferlach, T. & Haferlach, C. (2015) Three steps to the diagnosis of adult Ph-like ALL. *Blood*, **126** (Supplement 1), 2610.
- Fedullo, A.L., Messina, M., Elia, L., Piciocchi, A., Gianfelici, V., Lauretti, A., Soddu, S., Puzzolo, M.C., Minotti, C., Ferrara, F., Martino, B., Chiusolo, P., Calafiore, V., Paolini, S., Vignetti, M., Vitale, A., Guarini, A., Foa, R. & Chiaretti, S. (2019) Prognostic implications of additional genomic lesions in adult philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **104**, 312-318.
- Fielding, A.K., Rowe, J.M., Buck, G., Foroni, L., Gerrard, G., Litzow, M.R., Lazarus, H., Luger, S.M., Marks, D.I., McMillan, A.K., Moorman, A.V., Patel, B., Paietta, E., Tallman, M.S. & Goldstone, A.H. (2014) UKALLXII/ECOG2993: Addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **123**, 843-850.
- Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Paiva, B., Puig, N., Garcia-Sanchez, O., Bottcher, S., van der Velden, V.H.J., Perez-Moran, J.J., Vidriales, M.B., Garcia-Sanz, R., Jimenez, C., Gonzalez, M., Martinez-Lopez, J., Corral-Mateos, A., Grigore, G.E., Fluxa, R., Pontes, R., Caetano, J., Sedek, L., Del Canizo, M.C., Blade, J., Lahuerta, J.J., Aguilar, C., Barez, A., Garcia-Mateo, A., Labrador, J., Leoz, P., Aguilera-Sanz, C., San-Miguel, J., Mateos, M.V., Durie, B., van Dongen, J.J.M. & Orfao, A. (2017) Next generation flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, **31**, 2094-2103.
- Foa, R., Bassan, R., Vitale, A., Elia, L., Piciocchi, A., Puzzolo, M.C., Canichella, M., Viero, P., Ferrara, F., Lunghi, M., Fabbiano, F., Bonifacio, M., Fracchiolla, N., Di Bartolomeo, P., Mancino, A., De Propriis, M.S., Vignetti, M., Guarini, A., Rambaldi, A., Chiaretti, S. & GIMEMA Investigators. (2020) Dasatinib-blinatumomab for ph-positive acute lymphoblastic leukemia in adults. *The New England Journal of Medicine*, **383**, 1613-1623.
- Foa, R., Vitale, A., Vignetti, M., Meloni, G., Guarini, A., De Propriis, M.S., Elia, L., Paoloni, F., Fazi, P., Cimino, G., Nobile, F., Ferrara, F., Castagnola, C., Sica, S., Leoni, P., Zuffa, E., Fozza, C.,



- Luppi, M., Candoni, A., Iacobucci, I., Soverini, S., Mandelli, F., Martinelli, G., Baccarani, M. (2011) Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **118**, 25, 6521-6528.
- Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V.H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J.M., Cave, H., Pane, F., Aerts, J.L., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., Gonzalez, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G. & van Dongen, J.J. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a europe against cancer program. *Leukemia*, **17**, 2318-2357.
- Giebel, S., Marks, D.I., Boissel, N., Baron, F., Chiaretti, S., Ciceri, F., Cornelissen, J.J., Doubek, M., Esteve, J., Fielding, A., Foa, R., Gorin, N.C., Gokbuget, N., Hallbook, H., Hoelzer, D., Paravichnikova, E., Ribera, J.M., Savani, B., Rijneveld, A.W., Schmid, C., Wartiovaara-Kautto, U., Mohty, M., Nagler, A. & Dombret, H. (2019) Hematopoietic stem cell transplantation for adults with philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first remission: A position statement of the european working group for adult acute lymphoblastic leukemia (EWALL) and the acute leukemia working party of the european society for blood and marrow transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplantation*, **54**, 798-809.
- Girardi, T., Vicente, C., Cools, J. & De Keersmaecker, K. (2017) The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*, **129**, 1113-1123.
- Gokbuget, N., Dombret, H., Giebel, S., Bruggemann, M., Doubek, M., Foa, R., Hoelzer, D., Kim, C., Martinelli, G., Parovichnikova, E., Rambaldi, A., Ribera, J.M., Schoonen, M., Stieglmaier, J.M., Zugmaier, G. & Bassan, R. (2019) Minimal residual disease level predicts outcome in adults with ph-negative B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, **24**, 337-348.
- Gokbuget, N., Dombret, H., Bonifacio, M., Reichle, A., Graux, C., Faul, C., Diedrich, H., Topp, M.S., Bruggemann, M., Horst, H.A., Havelange, V., Stieglmaier, J., Wessels, H., Haddad, V., Benjamin, J.E., Zugmaier, G., Nagorsen, D. & Bargou, R.C. (2018) Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **131**, 1522-1531.
- Gokbuget, N., Kneba, M., Raff, T., Trautmann, H., Bartram, C.R., Arnold, R., Fietkau, R., Freund, M., Ganser, A., Ludwig, W.D., Maschmeyer, G., Rieder, H., Schwartz, S., Serve, H., Thiel, E., Bruggemann, M., Hoelzer, D. & German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. (2012) Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*, **120**, 1868-1876.
- Gokbuget, N., Bruggemann, M., Beck, J., Faul, C., Koenecke, C., Horst, H.A., Kondacki, M., Kraemer, D.M., Lutz, C., Spriewald, B., Starck, M., Rollig, C., Stelljes, M., Viardot, A., Wasch, R., Wendelin, K., Serve, H., Kneba, M., Hoelzer, D. (2017) Evaluation of Minimal Residual Disease (MRD) and MRD-Based Treatment Decisions in Ph/BCR-ABL Negative Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Experience from the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Blood*, **130** (Supplement 1), 139-139.
- Graux, C., Cools, J., Melotte, C., Quentmeier, H., Ferrando, A., Levine, R., Vermeesch, J.R., Stul, M., Dutta, B., Boeckx, N., Bosly, A., Heimann, P., Uyttebroeck, A., Mentens, N., Somers, R., MacLeod, R.A., Drexler, H.G., Look, A.T., Gilliland, D.G., Michaux, L., Vandenbergh, P., Wlodarska, I., Marynen, P. & Hagemeijer, A. (2004) Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **36**, 1084-1089.
- Gu, Z., Churchman, M., Roberts, K., Li, Y., Liu, Y., Harvey, R.C., McCastlain, K., Reshmi, S.C., Payne-Turner, D., Iacobucci, I., Shao, Y., Chen, I.M., Valentine, M., Pei, D., Mungall, K.L., Mungall, A.J., Ma, Y., Moore, R., Marra, M., Stonerock, E., Gastier-Foster, J.M., Devidas, M., Dai, Y., Wood, B., Borowitz, M., Larsen, E.E., Maloney, K., Mattano, L.A., Jr, Angiolillo, A., Salzer, W.L., Burke, M.J., Gianni, F., Spinelli, O., Radich, J.P., Minden, M.D., Moorman, A.V., Patel, B., Fielding, A.K., Rowe, J.M., Luger, S.M., Bhatia, R., Aldoss, I., Forman, S.J., Kohlschmidt, J.,

- Mrozek, K., Marcucci, G., Bloomfield, C.D., Stock, W., Kornblau, S., Kantarjian, H.M., Konopleva, M., Paietta, E., Willman, C.L., Loh, M.L., Hunger, S.P. & Mullighan, C.G. (2016) Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Communications*, **7**, 13331.
- Harrison, C.J., Moorman, A.V., Broadfield, Z.J., Cheung, K.L., Harris, R.L., Reza Jalali, G., Robinson, H.M., Barber, K.E., Richards, S.M., Mitchell, C.D., Eden, T.O., Hann, I.M., Hill, F.G., Kinsey, S.E., Gibson, B.E., Lilleyman, J., Vora, A., Goldstone, A.H., Franklin, I.M., Durrant, J., Martineau, M. & Childhood and Adult Leukaemia Working Parties. (2004) Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **125**, 552-559.
- Harrison, C.J., Moorman, A.V., Schwab, C., Carroll, A.J., Raetz, E.A., Devidas, M., Strehl, S., Nebral, K., Harbott, J., Teigler-Schlegel, A., Zimmerman, M., Dastuge, N., Baruchel, A., Soulier, J., Auclerc, M.F., Attarbaschi, A., Mann, G., Stark, B., Cazzaniga, G., Chilton, L., Vandenberghe, P., Forestier, E., Haltrich, I., Raimondi, S.C., Parihar, M., Bourquin, J.P., Tchinda, J., Haferlach, C., Vora, A., Hunger, S.P., Heerema, N.A., Haas, O.A. & Ponte di Legno International Workshop in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. (2014) An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): Cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*, **28**, 1015-1021.
- Herold, T., Schneider, S., Metzeler, K.H., Neumann, M., Hartmann, L., Roberts, K.G., Konstandin, N.P., Greif, P.A., Braundl, K., Ksienzyk, B., Huk, N., Schneider, I., Zellmeier, E., Jurinovic, V., Mansmann, U., Hiddemann, W., Mullighan, C.G., Bohlander, S.K., Spiekermann, K., Hoelzer, D., Bruggemann, M., Baldus, C.D., Dreyling, M. & Gokbuget, N. (2017) Adults with philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia frequently have IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. *Haematologica*, **102**, 130-138.
- Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte, E.N., Ruf, I.K., Hindson, B.J., Vessella, R.L. & Tewari, M. (2013) Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*, **10**, 1003-1005.
- Hirabayashi, S., Ohki, K., Nakabayashi, K., Ichikawa, H., Momozawa, Y., Okamura, K., Yaguchi, A., Terada, K., Saito, Y., Yoshimi, A., Ogata-Kawata, H., Sakamoto, H., Kato, M., Fujimura, J., Hino, M., Kinoshita, A., Kakuda, H., Kurosawa, H., Kato, K., Kajiwara, R., Moriwaki, K., Morimoto, T., Nakamura, K., Noguchi, Y., Osumi, T., Sakashita, K., Takita, J., Yuza, Y., Matsuda, K., Yoshida, T., Matsumoto, K., Hata, K., Kubo, M., Matsubara, Y., Fukushima, T., Koh, K., Manabe, A., Ohara, A., Kiyokawa, N. & Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG). (2017) ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica*, **102**, 118-129.
- Holmfeldt, L., Wei, L., Diaz-Flores, E., Walsh, M., Zhang, J., Ding, L., Payne-Turner, D., Churchman, M., Andersson, A., Chen, S.C., McCastlain, K., Becksfort, J., Ma, J., Wu, G., Patel, S.N., Heatley, S.L., Phillips, L.A., Song, G., Easton, J., Parker, M., Chen, X., Rusch, M., Boggs, K., Vadodaria, B., Hedlund, E., Drenberg, C., Baker, S., Pei, D., Cheng, C., Huether, R., Lu, C., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Tabib, Y., Dooling, D.J., Ochoa, K., Minden, M., Lewis, I.D., To, L.B., Marlton, P., Roberts, A.W., Raca, G., Stock, W., Neale, G., Drexler, H.G., Dickins, R.A., Ellison, D.W., Shurtleff, S.A., Pui, C.H., Ribeiro, R.C., Devidas, M., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Wood, B., Borowitz, M.J., Gastier-Foster, J.M., Raimondi, S.C., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Hunger, S.P., Loh, M.L. & Mullighan, C.G. (2013) The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **45**, 242-252.
- Hourigan, C.S., Gale, R.P., Gormley, N.J., Ossenkoppele, G.J. & Walter, R.B. (2017) Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, **31**, 1482-1490.
- Hovorkova, L., Zaliova, M., Venn, N.C., Bleckmann, K., Trkova, M., Potuckova, E., Vaskova, M., Linhartova, J., Machova Polakova, K., Fronkova, E., Muskovic, W., Giles, J.E., Shaw, P.J., Cario, G., Sutton, R., Stary, J., Trka, J. & Zuna, J. (2017) Monitoring of childhood ALL using BCR-ABL1 genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology. *Blood*, **129**, 2771-2781.

- Hrabovsky, S., Folber, F., Horacek, J.M., Stehlikova, O., Jelinkova, H., Salek, C., Doubek, M. & Czech Leukemia Study Group for Life. (2018) Comparison of real-time quantitative polymerase chain reaction and eight-color flow cytometry in assessment of minimal residual disease in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, **18**, 743-748.
- Hrabovsky, S., Vrzalova, Z., Stika, J., Jelinkova, H., Jarosova, M., Navrkalova, V., Martenek, J., Folber, F., Salek, C., Horacek, J.M., Pospisilova, S., Mayer, J. & Doubek, M. (2021) Genomic landscape of B-other acute lymphoblastic leukemia in an adult retrospective cohort with a focus on BCR-ABL1-like subtype. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, **60**, 760-770.
- Huguet, F., Chevret, S., Leguay, T., Thomas, X., Boissel, N., Escoffre-Barbe, M., Chevallier, P., Hunault, M., Vey, N., Bonmati, C., Lepretre, S., Marolleau, J.P., Pabst, T., Rousselot, P., Buzyn, A., Cahn, J.Y., Lheritier, V., Bene, M.C., Asnafi, V., Delabesse, E., Macintyre, E., Chalandon, Y., Ifrah, N., Dombret, H. & Group of Research on Adult ALL (GRAALL). (2018) Intensified therapy of acute lymphoblastic leukemia in adults: Report of the randomized GRAALL-2005 clinical trial. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **36**, 2514-2523.
- Iacobucci, I. & Mullighan, C.G. (2017) Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **35**, 975-983.
- Jabbour, E., O'Brien, S., Konopleva, M. & Kantarjian, H. (2015) New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, **121**, 2517-2528.
- Jain, N., Lamb, A.V., O'Brien, S., Ravandi, F., Konopleva, M., Jabbour, E., Zuo, Z., Jorgensen, J., Lin, P., Pierce, S., Thomas, D., Rytting, M., Borthakur, G., Kadia, T., Cortes, J., Kantarjian, H.M. & Khoury, J.D. (2016) Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL) in adolescents and adults: A high-risk subtype. *Blood*, **127**, 1863-1869.
- Jain, N., Roberts, K.G., Jabbour, E., Patel, K., Eterovic, A.K., Chen, K., Zweidler-McKay, P., Lu, X., Fawcett, G., Wang, S.A., Konoplev, S., Harvey, R.C., Chen, I.M., Payne-Turner, D., Valentine, M., Thomas, D., Garcia-Manero, G., Ravandi, F., Cortes, J., Kornblau, S., O'Brien, S., Pierce, S., Jorgensen, J., Shaw, K.R., Willman, C.L., Mullighan, C.G., Kantarjian, H. & Konopleva, M. (2017) Ph-like acute lymphoblastic leukemia: A high-risk subtype in adults. *Blood*, **129**, 572-581.
- Jang, W., Park, J., Kwon, A., Choi, H., Kim, J., Lee, G.D., Han, E., Jekarl, D.W., Chae, H., Han, K., Yoon, J.H., Lee, S., Chung, N.G., Cho, B., Kim, M. & Kim, Y. (2019) CDKN2B downregulation and other genetic characteristics in T-acute lymphoblastic leukemia. *Experimental & Molecular Medicine*, **51**, 1-15.
- Janssen, J.W., Ludwig, W.D., Sterry, W. & Bartram, C.R. (1993) SIL-TAL1 deletion in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **7**, 1204-1210.
- Jeha, S., Pei, D., Raimondi, S.C., Onciu, M., Campana, D., Cheng, C., Sandlund, J.T., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Howard, S.C., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V. & Pui, C.H. (2009) Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia*, **23**, 1406-1409.
- Kalina, T., Brdickova, N., Glier, H., Fernandez, P., Bitter, M., Flores-Montero, J., van Dongen, J.J.M. & Orfao, A. (2019) Frequent issues and lessons learned from EuroFlow QA. *Journal of Immunological Methods*, **475**, 112520.
- Kotrova, M., Volland, A., Kehden, B., Trautmann, H., Ritgen, M., Wasch, R., Faul, C., Viardot, A., Schwartz, S., Baldus, C.D., Gokbuget, N. & Bruggemann, M. (2020) Comparison of minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **34**, 1154-1157.
- Kotrova, M., Muzikova, K., Mejstrikova, E., Novakova, M., Bakardjieva-Mihaylova, V., Fiser, K., Stuchly, J., Giraud, M., Salson, M., Pott, C., Bruggemann, M., Fullgrabe, M., Stary, J., Trka, J. & Fronkova, E. (2015) The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*, **126**, 1045-1047.

- Liu, Y., Easton, J., Shao, Y., Maciaszek, J., Wang, Z., Wilkinson, M.R., McCastlain, K., Edmonson, M., Pounds, S.B., Shi, L., Zhou, X., Ma, X., Sioson, E., Li, Y., Rusch, M., Gupta, P., Pei, D., Cheng, C., Smith, M.A., Auvil, J.G., Gerhard, D.S., Relling, M.V., Winick, N.J., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Raetz, E., Devidas, M., Willman, C.L., Harvey, R.C., Carroll, W.L., Dunsmore, K.P., Winter, S.S., Wood, B.L., Sorrentino, B.P., Downing, J.R., Loh, M.L., Hunger, S.P., Zhang, J. & Mullighan, C.G. (2017) The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **49**, 1211-1218.
- Ludwig, W.D., Rieder, H., Bartram, C.R., Heinze, B., Schwartz, S., Gassmann, W., Loffler, H., Hossfeld, D., Heil, G., Handt, S., Heyll, A., Diedrich, H., Fischer, K., Weiss, A., Volkers, B., Aydemir, U., Fonatsch, C., Gokbuget, N., Thiel, E. & Hoelzer, D. (1998) Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: Results of the german multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood*, **92**, 1898-1909.
- Lunghi, M., Patriarca, A., Greco, M., Taherinasab, A., Della Starza, I., Cavalli, M., Gaidano, G., Foa, R. & Chiaretti, S. (2021) Ponatinib for the treatment of ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **62**, 755-757.
- Malard, F. & Mohty, M. (2020) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)*, **395**, 1146-1162.
- Maury, S., Chevret, S., Thomas, X., Heim, D., Leguay, T., Huguet, F., Chevallier, P., Hunault, M., Boissel, N., Escoffre-Barbe, M., Hess, U., Vey, N., Pignon, J.M., Braun, T., Marolleau, J.P., Cahn, J.Y., Chalandon, Y., Lheritier, V., Beldjord, K., Bene, M.C., Ifrah, N., Dombret, H. & for GRAALL. (2016) Rituximab in B-lineage adult acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **375**, 1044-1053.
- Moorman, A.V., Chilton, L., Wilkinson, J., Ensor, H.M., Bown, N. & Proctor, S.J. (2010) A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **115**, 206-214.
- Moorman, A.V., Richards, S.M., Martineau, M., Cheung, K.L., Robinson, H.M., Jalali, G.R., Broadfield, Z.J., Harris, R.L., Taylor, K.E., Gibson, B.E., Hann, I.M., Hill, F.G., Kinsey, S.E., Eden, T.O., Mitchell, C.D., Harrison, C.J. & United Kingdom Medical Research Council's Childhood Leukemia Working Party. (2003) Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **102**, 2756-2762.
- Moorman, A.V., Barretta, E., Butler, E.R., Ward, E.J., Twentyman, K., Kirkwood, A.A., Enshaei, A., Schwab, C., Creasey, T., Leongamornlert, D., Papaemmanuil, E., Patrick, P., Clifton-Hadley, L., Patel, B., Menne, T., McMillan, A.K., Harrison, C.J., Rowntree, C.J., Marks, D.I. & Fielding, A.K. (2021) Prognostic impact of chromosomal abnormalities and copy number alterations in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: A UKALL14 study. *Leukemia*, .
- Mullighan, C.G. (2012) Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, **122**, 3407-3415.
- Mullighan, C.G., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C.H., Relling, M.V., Shurtleff, S.A. & Downing, J.R. (2008) BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of ikaros. *Nature*, **453**, 110-114.
- Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., Su, X., Pui, C.H., Relling, M.V., Evans, W.E., Shurtleff, S.A. & Downing, J.R. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **446**, 758-764.
- Mullighan, C.G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L.A., Miller, C.B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B.A., Harvey, R.C., Chen, I.M., Clifford, R.J., Carroll, W.L., Reaman, G., Bowman, W.P., Devidas, M., Gerhard, D.S., Yang, W., Relling, M.V., Shurtleff, S.A., Campana, D., Borowitz, M.J., Pui, C.H., Smith, M., Hunger, S.P., Willman, C.L., Downing, J.R. & Children's Oncology Group. (2009) Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **360**, 470-480.

- Neumann, M., Bastian, L., Hanzelmann, S., Hartmann, A., Trautmann, H., Sanchez, J.O., Schlee, C., Schroeder, M.P., Fransecky, L.R., Vosberg, S., Fiedler, W., Alakel, N., Kondakci, M., Starck, M., Schwartz, S., Muller-Tidow, C., Schneller, F., Reichle, A., Burmeister, T., Greif, P.A., Bruggemann, M., Gokbuget, N., Baldus, C.D. (2020) Molecular Subgroups of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults Treated According to GMALL Protocols. *Blood*, **136** (Supplement 1), 37-38.
- Neumann, M., Heesch, S., Schlee, C., Schwartz, S., Gokbuget, N., Hoelzer, D., Konstandin, N.P., Ksienzyk, B., Vosberg, S., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Raff, T., Bruggemann, M., Hofmann, W.K., Hecht, J., Bohlander, S.K., Greif, P.A. & Baldus, C.D. (2013) Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. *Blood*, **121**, 4749-4752.
- Ohki, K., Kiyokawa, N., Saito, Y., Hirabayashi, S., Nakabayashi, K., Ichikawa, H., Momozawa, Y., Okamura, K., Yoshimi, A., Ogata-Kawata, H., Sakamoto, H., Kato, M., Fukushima, K., Hasegawa, D., Fukushima, H., Imai, M., Kajiwara, R., Koike, T., Komori, I., Matsui, A., Mori, M., Moriwaki, K., Noguchi, Y., Park, M.J., Ueda, T., Yamamoto, S., Matsuda, K., Yoshida, T., Matsumoto, K., Hata, K., Kubo, M., Matsubara, Y., Takahashi, H., Fukushima, T., Hayashi, Y., Koh, K., Manabe, A., Ohara, A. & Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG). (2019) Clinical and molecular characteristics of MEF2D fusion-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood, including a novel translocation resulting in MEF2D-HNRNP1 gene fusion. *Haematologica*, **104**, 128-137.
- Ott, C.J., Kopp, N., Bird, L., Paranal, R.M., Qi, J., Bowman, T., Rodig, S.J., Kung, A.L., Bradner, J.E. & Weinstock, D.M. (2012) BET bromodomain inhibition targets both c-myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **120**, 2843-2852.
- Paietta, E., Roberts, K.G., Wang, V., Gu, Z., Buck, G.A.N., Pei, D., Cheng, C., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O., Cheng, Z., Wu, G., Qu, C., Shi, L., Pounds, S., Willman, C.L., Harvey, R., Racevskis, J., Barinka, J., Zhang, Y., Dewald, G.W., Ketterling, R.P., Alejos, D., Lazarus, H.M., Luger, S.M., Foroni, L., Patel, B., Fielding, A.K., Melnick, A., Marks, D.I., Moorman, A.V., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Tallman, M.S., Goldstone, A.H., Mullighan, C.G. & Litzow, M.R. (2021) Molecular classification improves risk assessment in adult BCR-ABL1-negative B-ALL. *Blood*, **138**, 948-958.
- Papayannidis, C., DeAngelo, D.J., Stock, W., Huang, B., Shaik, M.N., Cesari, R., Zheng, X., Reynolds, J.M., English, P.A., Ozeck, M., Aster, J.C., Kuo, F., Huang, D., Lira, P.D., McLachlan, K.R., Kern, K.A., Garcia-Manero, G. & Martinelli, G. (2015) A phase 1 study of the novel gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. *Blood Cancer Journal*, **5**, e350.
- Pastore, F. & Levine, R.L. (2015) Next-generation sequencing and detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Ready for clinical practice? *Jama*, **314**, 778-780.
- Patel, B., Rai, L., Buck, G., Richards, S.M., Mortuza, Y., Mitchell, W., Gerrard, G., Moorman, A.V., Duke, V., Hoffbrand, A.V., Fielding, A.K., Goldstone, A.H. & Foroni, L. (2010) Minimal residual disease is a significant predictor of treatment failure in non T-lineage adult acute lymphoblastic leukaemia: Final results of the international trial UKALL XII/ECOG2993. *British Journal of Haematology*, **148**, 80-89.
- Patrick, K., Wade, R., Goulden, N., Mitchell, C., Moorman, A.V., Rowntree, C., Jenkinson, S., Hough, R. & Vora, A. (2014) Outcome for children and young people with early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *British Journal of Haematology*, **166**, 421-424.
- Pfeifer, H., Raum, K., Markovic, S., Nowak, V., Fey, S., Oblander, J., Pressler, J., Bohm, V., Bruggemann, M., Wunderle, L., Huttmann, A., Wasch, R., Beck, J., Stelljes, M., Viardot, A., Lang, F., Hoelzer, D., Hofmann, W.K., Serve, H., Weiss, C., Goekbuget, N., Ottmann, O.G. & Nowak, D. (2018) Genomic CDKN2A/2B deletions in adult ph(+) ALL are adverse despite allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, **131**, 1464-1475.

- Pfeifer, H., Cazzaniga, G., van der Velden, V.H.J., Cayuela, J.M., Schafer, B., Spinelli, O., Akiki, S., Avigad, S., Bendit, I., Borg, K., Cave, H., Elia, L., Reshmi, S.C., Gerrard, G., Hayette, S., Hermanson, M., Juh, A., Jurcek, T., Chillon, M.C., Homburg, C., Martinelli, G., Kairisto, V., Lange, T., Lion, T., Mueller, M.C., Pane, F., Rai, L., Damm-Welk, C., Sacha, T., Schnittger, S., Touloumenidou, T., Valerhaugen, H., Vandenberghe, P., Zuna, J., Serve, H., Herrmann, E., Markovic, S., Dongen, J.J.M.V. & Ottmann, O.G. (2019) Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (ph + ALL) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1. *Leukemia*, **33**, 1910-1922.
- Polivkova, V., Benesova, A., Zizkova, H., Koblihova, J., Curik, N., Motlova, E., Klamova, H., Salek, C., Machova Polakova, K. (2021) Sensitivity and reliability of DNA-based mutation analysis by allele-specific digital PCR to follow resistant BCR-ABL1-positive cells. *Leukemia*, **35**, 2419-2423.
- Qin, Y.Z., Jiang, Q., Xu, L.P., Wang, Y., Jiang, H., Dao, F.T., Chen, W.M., Zhao, X.S., Liu, Y.R., Zhang, X.H., Liu, K.Y. & Huang, X.J. (2021) The prognostic significance of ZNF384 fusions in adult ph-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive cohort study from a single chinese center. *Frontiers in Oncology*, **11**, 632532.
- Radtke, F., MacDonald, H.R. & Tacchini-Cottier, F. (2013) Regulation of innate and adaptive immunity by notch. *Nature Reviews.Immunology*, **13**, 427-437.
- Reshmi, S.C., Harvey, R.C., Roberts, K.G., Stonerock, E., Smith, A., Jenkins, H., Chen, I.M., Valentine, M., Liu, Y., Li, Y., Shao, Y., Easton, J., Payne-Turner, D., Gu, Z., Tran, T.H., Nguyen, J.V., Devidas, M., Dai, Y., Heerema, N.A., Carroll, A.J., 3rd, Raetz, E.A., Borowitz, M.J., Wood, B.L., Angiolillo, A.L., Burke, M.J., Salzer, W.L., Zweidler-McKay, P.A., Rabin, K.R., Carroll, W.L., Zhang, J., Loh, M.L., Mullighan, C.G., Willman, C.L., Gastier-Foster, J.M. & Hunger, S.P. (2017) Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: A study from the children's oncology group. *Blood*, **129**, 3352-3361.
- Ribera, J.M., Morgades, M., Montesinos, P., Tormo, M., Martinez-Carballeira, D., Gonzalez-Campos, J., Gil, C., Barba, P., Garcia-Boyer, R., Coll, R., Pedreno, M., Ribera, J., Mercadal, S., Vives, S., Novo, A., Genesca, E., Hernandez-Rivas, J.M., Bergua, J., Amigo, M.L., Vall-Llovera, F., Martinez-Sanchez, P., Calbacho, M., Garcia-Cadenas, I., Garcia-Guinon, A., Sanchez-Sanchez, M.J., Cervera, M., Feliu, E., Orfao, A. & PETHEMA Group, Spanish Society of Hematology. (2020) A pediatric regimen for adolescents and young adults with philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: Results of the ALLRE08 PETHEMA trial. *Cancer Medicine*, **9**, 2317-2329.
- Roberts, K.G., Gu, Z., Payne-Turner, D., McCastlain, K., Harvey, R.C., Chen, I.M., Pei, D., Iacobucci, I., Valentine, M., Pounds, S.B., Shi, L., Li, Y., Zhang, J., Cheng, C., Rambaldi, A., Tosi, M., Spinelli, O., Radich, J.P., Minden, M.D., Rowe, J.M., Luger, S., Litzow, M.R., Tallman, M.S., Wiernik, P.H., Bhatia, R., Aldoss, I., Kohlschmidt, J., Mrozek, K., Marcucci, G., Bloomfield, C.D., Stock, W., Kornblau, S., Kantarjian, H.M., Konopleva, M., Paietta, E., Willman, C.L. & Mullighan, C.G. (2017) High frequency and poor outcome of philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **35**, 394-401.
- Roberts, K.G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R.C., Yang, Y.L., Pei, D., McCastlain, K., Ding, L., Lu, C., Song, G., Ma, J., Becksfort, J., Rusch, M., Chen, S.C., Easton, J., Cheng, J., Boggs, K., Santiago-Morales, N., Iacobucci, I., Fulton, R.S., Wen, J., Valentine, M., Cheng, C., Paugh, S.W., Devidas, M., Chen, I.M., Reshmi, S., Smith, A., Hedlund, E., Gupta, P., Nagahawatte, P., Wu, G., Chen, X., Yergeau, D., Vadodaria, B., Mulder, H., Winick, N.J., Larsen, E.C., Carroll, W.L., Heerema, N.A., Carroll, A.J., Grayson, G., Tasian, S.K., Moore, A.S., Keller, F., Frei-Jones, M., Whitlock, J.A., Raetz, E.A., White, D.L., Hughes, T.P., Guidry Auvil, J.M., Smith, M.A., Marcucci, G., Bloomfield, C.D., Mrozek, K., Kohlschmidt, J., Stock, W., Kornblau, S.M., Konopleva, M., Paietta, E., Pui, C.H., Jeha, S., Relling, M.V., Evans, W.E., Gerhard, D.S., Gastier-Foster, J.M., Mardis, E., Wilson, R.K., Loh, M.L., Downing, J.R., Hunger, S.P., Willman, C.L.,

- Zhang, J. & Mullighan, C.G. (2014) Targetable kinase-activating lesions in ph-like acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **371**, 1005-1015.
- Rowe, J.M., Buck, G., Burnett, A.K., Chopra, R., Wiernik, P.H., Richards, S.M., Lazarus, H.M., Franklin, I.M., Litzow, M.R., Ciobanu, N., Prentice, H.G., Durrant, J., Tallman, M.S., Goldstone, A.H., ECOG & MRC/NCRI Adult Leukemia Working Party. (2005) Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: Results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*, **106**, 3760-3767.
- Russell, L.J., Jones, L., Enshaei, A., Tonin, S., Ryan, S.L., Eswaran, J., Nakjang, S., Papaemmanuil, E., Tubio, J.M., Fielding, A.K., Vora, A., Campbell, P.J., Moorman, A.V. & Harrison, C.J. (2017) Characterisation of the genomic landscape of CRLF2-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **56**, 363-372.
- Salek, C., Folber, F., Fronkova, E., Prochazka, B., Marinov, I., Cetkovsky, P., Mayer, J., Doubek, M. & Czech Leukemia Study Group - for Life. (2016) Early MRD response as a prognostic factor in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Haematology*, **96**, 276-284.
- Salek, C., Folber, F., Fronkova, E., Pecherkova, P., Jelinkova, H., Hrabovsky, S., Horacek, J.M., Cetkovsky, P., Mayer, J., Trka, J., Doubek, M. & Czech Leukemia Study Group - for Life (CELL). (2021) Low levels of minimal residual disease after induction chemotherapy for BCR-ABL1-negative acute lymphoblastic leukaemia in adults are clinically relevant. *British Journal of Haematology*, online ahead of print.
- Šálek, C., Šponerová, D., Maaloufová, J. (2012) Akutní lymfoblastická leukémie – historie a současnost. *Vnitřní lékařství*, **58** (Supplement 2), 2S20-2S26.
- Sasaki, K., Kantarjian, H.M., Short, N.J., Samra, B., Khoury, J.D., Kanagal Shamanna, R., Konopleva, M., Jain, N., DiNardo, C.D., Khouri, R., Garcia-Manero, G., Kadia, T.M., Wierda, W.G., Khouri, I.F., Kebriaei, P., Mehta, R.S., Champlin, R.E., Garris, R., Cheung, C.M., Daver, N., Thompson, P.A., Yilmaz, M., Ravandi, F. & Jabbour, E. (2021) Prognostic factors for progression in patients with philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in complete molecular response within 3 months of therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Cancer*, **127**, 2648-2656.
- Schuurhuis, G.J., Heuser, M., Freeman, S., Bene, M.C., Buccisano, F., Cloos, J., Grimwade, D., Haferlach, T., Hills, R.K., Hourigan, C.S., Jorgensen, J.L., Kern, W., Lacombe, F., Maurillo, L., Preudhomme, C., van der Reijden, B.A., Thiede, C., Venditti, A., Vyas, P., Wood, B.L., Walter, R.B., Dohner, K., Roboz, G.J. & Ossenkoppele, G.J. (2018) Minimal/measurable residual disease in AML: A consensus document from the european LeukemiaNet MRD working party. *Blood*, **131**, 1275-1291.
- Short, N.J., Kantarjian, H.M., Konopleva, M., Jain, N., Huang, X.L., Ravandi, F., Wierda, W.G., Borthakur, G., Sasaki, K., Issa, G.C., Alvarado, Y., Pemmaraju, N., Garcia-Manero, G., Thankachan, J., Garris, R., Jabbour, E. (2021) Combination of ponatinib and blinatumomab in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Early results from a phase II study. *Journal of Clinical Oncology*, **39** (Supplement), abstract 7001.
- Stanulla, M., Cave, H. & Moorman, A.V. (2020) IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Still a poor prognostic marker? *Blood*, **135**, 252-260.
- Stanulla, M., Dagdan, E., Zaliova, M., Moricke, A., Palmi, C., Cazzaniga, G., Eckert, C., Te Kronnie, G., Bourquin, J.P., Bornhauser, B., Koehler, R., Bartram, C.R., Ludwig, W.D., Bleckmann, K., Groeneveld-Krentz, S., Schewe, D., Junk, S.V., Hinze, L., Klein, N., Kratz, C.P., Biondi, A., Borkhardt, A., Kulozik, A., Muckenthaler, M.U., Basso, G., Valsecchi, M.G., Izraeli, S., Petersen, B.S., Franke, A., Dorge, P., Steinemann, D., Haas, O.A., Panzer-Grumayer, R., Cave, H., Houlston, R.S., Cario, G., Schrappe, M., Zimmermann, M., TRANSCALL Consortium & International BFM Study Group. (2018) IKZF1(plus) defines a new minimal residual disease-dependent very-poor prognostic profile in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **36**, 1240-1249.

- Stary, J., Zimmermann, M., Campbell, M., Castillo, L., Dibar, E., Donska, S., Gonzalez, A., Izraeli, S., Janic, D., Jazbec, J., Konja, J., Kaiserova, E., Kowalczyk, J., Kovacs, G., Li, C.K., Magyarosy, E., Popa, A., Stark, B., Jabali, Y., Trka, J., Hrusak, O., Riehm, H., Masera, G. & Schrappe, M. (2014) Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **32**, 174-184.
- Stock, W., Luger, S.M., Advani, A.S., Yin, J., Harvey, R.C., Mullighan, C.G., Willman, C.L., Fulton, N., Laumann, K.M., Malnassy, G., Paietta, E., Parker, E., Geyer, S., Mrozek, K., Bloomfield, C.D., Sandord, B., Marcucci, G., Liedtke, M., Claxton, D.F., Foster, M.C., Bogart, J.A., Grecula, J.C., Appelbaum, F.R. Erba, H., Litzow, M.R., Tallman, M.S., Stone, R.M., Larson, R.A. (2019) A pediatric regimen for older adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia: results of CALGB 10403. *Blood*, **133**, 1548-1559.
- Stutterheim, J., van der Sluis, I.M., de Lorenzo, P., Alten, J., Ancliffe, P., Attarbaschi, A., Brethon, B., Biondi, A., Campbell, M., Cazzaniga, G., Escherich, G., Ferster, A., Kotecha, R.S., Lausen, B., Li, C.K., Lo Nigro, L., Locatelli, F., Marschalek, R., Meyer, C., Schrappe, M., Stary, J., Vora, A., Zuna, J., van der Velden, V.H.J., Szczepanski, T., Valsecchi, M.G. & Pieters, R. (2021) Clinical implications of minimal residual disease detection in infants with KMT2A-rearranged acute lymphoblastic leukemia treated on the interfant-06 protocol. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **39**, 652-662.
- Swerdlow, S. H., E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele et al. (2017) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, fourth edition. Lyon, France: IARC.
- Thomas, D.A., O'Brien, S., Jorgensen, J.L., Cortes, J., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Verstovsek, S., Koller, C., Pierce, S., Huh, Y., Wierda, W., Keating, M.J. & Kantarjian, H.M. (2009) Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **113**, 6330-6337.
- Thomas, D.A., O'Brien, S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Ferrajoli, A., Wierda, W., Ravandi, F., Verstovsek, S., Jorgensen, J.L., Bueso-Ramos, C., Andreeff, M., Pierce, S., Garris, R., Keating, M.J., Cortes, J. & Kantarjian, H.M. (2010) Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo philadelphia chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 3880-3889.
- Trinquand, A., Tanguy-Schmidt, A., Ben Abdelali, R., Lambert, J., Beldjord, K., Lengline, E., De Gunzburg, N., Payet-Bornet, D., Lhermitte, L., Mossafa, H., Lheritier, V., Bond, J., Huguet, F., Buzyn, A., Leguay, T., Cahn, J.Y., Thomas, X., Chalandon, Y., Delannoy, A., Bonmati, C., Maury, S., Nadel, B., Macintyre, E., Ifrah, N., Dombret, H. & Asnafi, V. (2013) Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: A group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **31**, 4333-4342.
- van der Velden, V.H., Cazzaniga, G., Schrauder, A., Hancock, J., Bader, P., Panzer-Grumayer, E.R., Flohr, T., Sutton, R., Cave, H., Madsen, H.O., Cayuela, J.M., Trka, J., Eckert, C., Foroni, L., Zur Stadt, U., Beldjord, K., Raff, T., van der Schoot, C.E., van Dongen, J.J. & European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). (2007) Analysis of minimal residual disease by ig/TCR gene rearrangements: Guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*, **21**, 604-611.
- Vicente, C., Schwab, C., Broux, M., Geerdens, E., Degryse, S., Demeyer, S., Lahortiga, I., Elliott, A., Chilton, L., La Starza, R., Mecucci, C., Vandenberghe, P., Goulden, N., Vora, A., Moorman, A.V., Soulier, J., Harrison, C.J., Clappier, E. & Cools, J. (2015) Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **100**, 1301-1310.



- Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T. & Aster, J.C. (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science (New York, N.Y.)*, **306**, 269-271.
- Winters, A.C. & Bernt, K.M. (2017) MLL-rearranged leukemias-an update on science and clinical approaches. *Frontiers in Pediatrics*, **5**, 4.
- Yasuda, T., Tsuzuki, S., Kawazu, M., Hayakawa, F., Kojima, S., Ueno, T., Imoto, N., Kohsaka, S., Kunita, A., Doi, K., Sakura, T., Yujiri, T., Kondo, E., Fujimaki, K., Ueda, Y., Aoyama, Y., Ohtake, S., Takita, J., Sai, E., Taniwaki, M., Kurokawa, M., Morishita, S., Fukayama, M., Kiyoi, H., Miyazaki, Y., Naoe, T. & Mano, H. (2016) Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nature Genetics*, **48**, 569-574.
- Yoest, J.M., Shirai, C.L. & Duncavage, E.J. (2020) Sequencing-based measurable residual disease testing in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**, 249.
- Zelent, A., Greaves, M. & Enver, T. (2004) Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene*, **23**, 4275-4283.
- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Chen, S.C., Wei, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., Roberts, K.G., Pounds, S.B., Ulyanov, A., Becksfort, J., Gupta, P., Huether, R., Kriwacki, R.W., Parker, M., McGoldrick, D.J., Zhao, D., Alford, D., Espy, S., Bobba, K.C., Song, G., Pei, D., Cheng, C., Roberts, S., Barbato, M.I., Campana, D., Coustan-Smith, E., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Kleppe, M., Cools, J., Shimano, K.A., Hermiston, M.L., Doulatov, S., Eppert, K., Laurenti, E., Notta, F., Dick, J.E., Basso, G., Hunger, S.P., Loh, M.L., Devidas, M., Wood, B., Winter, S., Dunsmore, K.P., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Hong, X., Harris, C.C., Dooling, D.J., Ochoa, K., Johnson, K.J., Obenauer, J.C., Evans, W.E., Pui, C.H., Naeve, C.W., Ley, T.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R. & Mullighan, C.G. (2012) The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **481**, 157-163.
- Zhang, J., McCastlain, K., Yoshihara, H., Xu, B., Chang, Y., Churchman, M.L., Wu, G., Li, Y., Wei, L., Iacobucci, I., Liu, Y., Qu, C., Wen, J., Edmonson, M., Payne-Turner, D., Kaufmann, K.B., Takayanagi, S.I., Wienholds, E., Waanders, E., Ntziachristos, P., Bakogianni, S., Wang, J., Aifantis, I., Roberts, K.G., Ma, J., Song, G., Easton, J., Mulder, H.L., Chen, X., Newman, S., Ma, X., Rusch, M., Gupta, P., Boggs, K., Vadodaria, B., Dalton, J., Liu, Y., Valentine, M.L., Ding, L., Lu, C., Fulton, R.S., Fulton, L., Tabib, Y., Ochoa, K., Devidas, M., Pei, D., Cheng, C., Yang, J., Evans, W.E., Relling, M.V., Pui, C.H., Jeha, S., Harvey, R.C., Chen, I.L., Willman, C.L., Marcucci, G., Bloomfield, C.D., Kohlschmidt, J., Mrozek, K., Paietta, E., Tallman, M.S., Stock, W., Foster, M.C., Racevskis, J., Rowe, J.M., Luger, S., Kornblau, S.M., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Dick, J.E., Hunger, S.P., Loh, M.L., Downing, J.R., Mullighan, C.G. & St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome Project. (2016) Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, **48**, 1481-1489.
- Zhang, Y., Gao, Y., Zhang, H., Zhang, J., He, F., Hnizda, A., Qian, M., Liu, X., Gocho, Y., Pui, C.H., Cheng, T., Wang, Q., Yang, J.J., Zhu, X. & Liu, X. (2018) PDGFRB mutation and tyrosine kinase inhibitor resistance in ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **131**, 2256-2261.
- Zuna, J., Madzo, J., Krejci, O., Zemanova, Z., Kalinova, M., Muzikova, K., Zapotocky, M., Starkova, J., Hrusak, O., Horak, J. & Trka, J. (2011) ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood*, **117**, 368-9; author reply 370-1.

## Přílohy

Příloha 1:

**Šálek C**, Folber F, Froňková E, Pecherková P, Jelínková H, Hrabovský Š, Horáček JM, Cetkovský P, Mayer J, Trka J, Doubek M. **Low levels of minimal residual disease after induction chemotherapy for *BCR-ABL1*-negative acute lymphoblastic leukaemia in adults are clinically relevant.** *Br J Haematol* 2021, online ahead of print.

**[IF 2020 = 6.998]**

Příloha 2:

Šálek C, Folber F, Froňková E, Procházka B, Marinov I, Cetkovský P, Mayer J, Doubek M. Early MRD response as a prognostic factor in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Europ J Hematol*, 2016;96(3):276-284.

**[IF 2016 = 2.653]**

Příloha 3:

Hrabovský Š, Folber F, Horáček JM, Stehlíková O, Jelínková H, Šálek C, Doubek M. Comparison of Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction and Eight-color Flow Cytometry in Assessment of Minimal Residual Disease in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2018;18(11):743-748.

**[IF 2018 = 2.274]**

Příloha 4:

Chiaretti S, Messina M, Grammatico S, Piciocchi A, Fedullo AL, Di Giacomo F, Peragine N, Gianfelici V, Lauretti A, Bareja R, Martelli MP, Vignetti M, Apicella V, Vitale A, Li LS, Šálek C, Elemento O, Inghirami G, Weinstock DM, Guarini A, Foà R. **Rapid identification of BCR/ABL1-like acute lymphoblastic leukemia patients using a predictive statistical model based on quantitative real time-polymerase chain reaction: clinical, prognostic and therapeutic implications.** *Br J Haematol.* 2018; 181(5):642-652.

**[IF 2018 = 5.206]**

Příloha 5:

Hrabovský Š, Vrzalová Z, Štika J, Jelínková H, Jarošová M, Navrkalová V, Martenek J, Folber F, Šálek C, Horáček JM, Pospíšilová Š, Mayer J, Doubek M. **Genomic landscape of B-other acute lymphoblastic leukemia in an adult retrospective cohort with a focus on BCR-ABL1-like subtype.** *Acta Oncologica*. 2021; 60(6):760-770.

**[IF 2020 = 4.089]**

Příloha 6:

Polívková V, Benešová A, Žižková H, Koblihová J, Čuřík N, Motlová E, Klamová H, Šálek C, Machová Poláková K. Sensitivity and reliability of DNA-based mutation analysis by allele-specific digital PCR to follow the clonal evolution of resistant BCR-ABL1-positive cells. *Leukemia*. 2021; 35(8): 2419-2423.

**[IF 2020 = 11.528]**