

Molekulares *BCR-ABL1*-Monitoring bei CML
gemäss neuen ELN-Empfehlungen

Internationale Skala in der Schweiz etabliert

Die kürzlich veröffentlichten neuen Empfehlungen des Europäischen Leukämienetzes (ELN) basieren erstmals auf molekularen und zytogenetischen Meilensteinen. Damit wird die Quantifizierung der *BCR-ABL1*-Transkripte zu einem wichtigen Bestandteil der Überwachung des Therapieansprechens von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML). Aufgrund unterschiedlicher Analysemethoden waren die Resultate verschiedener Labore bisher nicht vergleichbar. Die Etablierung der Internationalen Skala (IS) in den Laboren der fünf Schweizer Universitätsspitäler erlaubt nun eine kontinuierliche, international vergleichbare Verlaufskontrolle dieser Patienten.



E. Opliger Leibundgut, Bern G. M. Baerlocher, Bern

Mit der Einführung der Tyrosinkinasehemmer (TKI) Imatinib, Nilotinib und Dasatinib hat sich die Prognose der Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) stark verbessert. Internationale Experten-netzwerke wie das ELN (European

LeukemiaNet) empfehlen, das Therapieansprechen mit hämatologischen, zytogenetischen und molekularen Analysen zu überwachen.¹ Den wichtigsten molekularen Meilenstein stellt dabei das gute molekulare Ansprechen (major molecular response, MMR)

dar. Gemäss den ELN-Empfehlungen von 2013 soll das molekulare Ansprechen alle 3 Monate überprüft werden, um so hinsichtlich Weiterführung bzw. Anpassung der Therapie entscheiden zu können. Das Erreichen einer MMR ist auch von prognostischer Bedeutung. Die 7-Jahres-Daten der IRIS-Studie zeigten, dass Patienten mit einer MMR nach 18 Monaten ein besseres ereignisfreies Überleben und eine geringere Progressionsrate aufwiesen als diejenigen ohne MMR zu diesem Zeitpunkt.² Neuere Daten ergaben zudem, dass Patienten, die nach 3 Monaten die 10%-Marke erreicht haben, ein besseres, langfristiges progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben aufweisen.³ Neu sind Meilensteine für das molekulare Ansprechen nach 3, 6 und 12 Monaten relevant zur Definition einer optimalen Therapieantwort bzw. eines Therapieversagens (Tab. 1).

	OPTIMAL	WARNUNG	VERSAGEN
3 Monate	BCR-ABL1 ^{IS} ≤10% und/oder Ph+ ≤35%	BCR-ABL1 ^{IS} >10% und/oder Ph+ 36–95%	Keine CHR und/oder Ph+ >95%
6 Monate	BCR-ABL1 ^{IS} ≤1% und/oder Ph+ 0	BCR-ABL1 ^{IS} 1–10% und/oder Ph+ 1–35%	BCR-ABL1 ^{IS} >10% und/oder Ph+ >35%
12 Monate	BCR-ABL1 ^{IS} ≤0,1%	BCR-ABL1 ^{IS} 0,1–1%	BCR-ABL1 ^{IS} >1% und/oder Ph+ >0
Danach	BCR-ABL1 ^{IS} ≤0,1%	CCA/Ph- (-7, 7q-)	Verlust der MMR, CCyR oder CHR, Mutationen, CCA/Ph+

CHR = komplettes hämatologisches Ansprechen, CCyR = komplettes zytogenetisches Ansprechen, MMR = gutes molekulares Ansprechen, CCA/Ph- = klonale Chromosomenaberrationen in Philadelphia-negativen Zellen, CCA/Ph+ = klonale Chromosomenaberrationen in Philadelphia-positiven Zellen

Tab. 1: Therapieansprechen auf Erstlinientherapie mit Imatinib, Nilotinib und Dasatinib gemäss ELN-Empfehlungen 2013¹

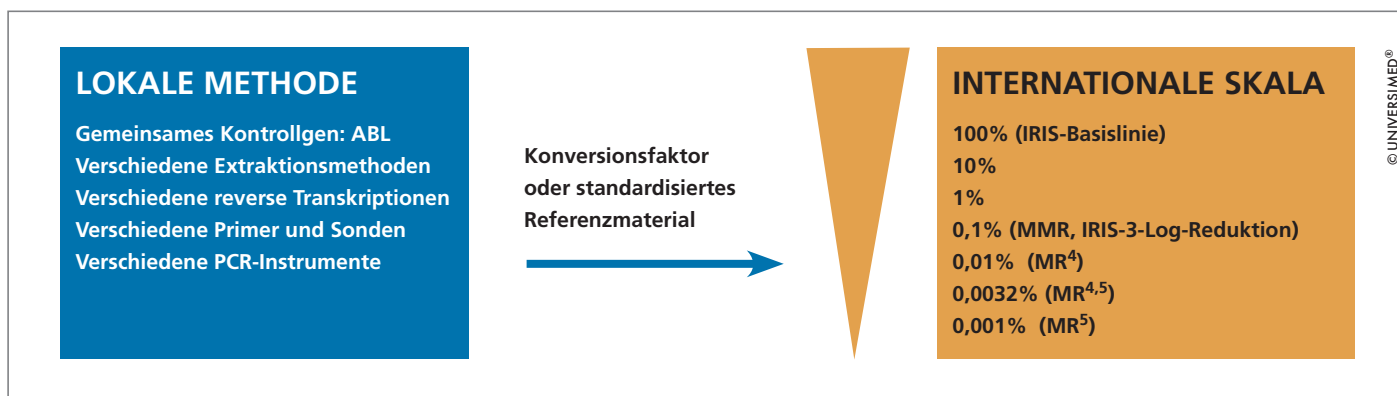


Abb. 1: Die Internationale Skala (IS) für die Quantifizierung von *BCR-ABL1* (adaptiert nach: Cross NC et al: Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2012; 26(10): 2172-5. Mit freundlicher Genehmigung von N.C. Cross)

Die RQ-PCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) stellt die sensitivste aktuell verfügbare Methode zur routinemässigen Überwachung des Therapieansprechens bei einer CML dar. Allerdings war bis vor Kurzem der direkte Vergleich von Resultaten verschiedener Labore – sei es für den individuellen Patienten oder im Rahmen multizentrischer Studien – nicht möglich, da unterschiedliche Methoden zur Analyse des *BCR-ABL1*-Transkriptspiegels und unterschiedliche Arten zur Angabe der Resultate verwendet wurden.

Das Prinzip der Internationalen Skala

Das ELN hat sich im Rahmen der EUTOS-Studie (European Treatment and Outcome Study) die Harmonisierung der *BCR-ABL1*-Analyse innerhalb Europas zum Ziel gesetzt. Ein wichtiger Schritt war dabei der Konsens der Expertengruppe, die Werte der *BCR-ABL1*-Analyse auf einer Internationalen Skala (IS) darzustellen. Der 100%-Wert dieser Skala wurde basierend auf einer Kohorte von 30 Patienten der IRIS-Studie definiert.⁴ Eine 3-Log-Reduktion des *BCR-ABL1*-Transkriptspiegels entspricht einem Wert von 0,1% auf der IS und wurde als MMR definiert (Abb. 1). Die Verwendung der IS erlaubt den direkten Vergleich der Resultate unter Beibehaltung der laborspezifischen, etablierten Methoden und Instrumente. Das Konzept der IS ist mit ähnlichen, etablierten

Vorgehensweisen bei anderen Untersuchungsmethoden, wie z.B. der INR (International Normalized Ratio) für die Prothrombin-Zeit, vergleichbar.

Der laborspezifische Konversionsfaktor

Um die Resultate einer *BCR-ABL1*-Bestimmung auf der IS ausdrücken zu können, muss für jedes Labor ein individueller, validierter Umrechnungsfaktor (conversion factor, CF) ermittelt werden (Abb. 2). Die weltweite Bestimmung der einzelnen CF erfolgte im Rahmen eines mehrstufigen Prozesses. Durch einen Austausch von Proben zwischen den initial teilnehmenden Laboren in Adelaide (AUS), London (UK) und Seattle (USA) wurden zuerst die bei der Bestimmung des *BCR-ABL1*-Transkriptes verwendeten RQ-PCR-Methoden teilweise harmonisiert und pro Labor ein CF etabliert.^{4, 5} In Europa bestimmte ein Referenzlabor pro Land (in seltenen Fällen zwei) mittels Austausch von Proben mit dem europäischen Referenzlabor in Mannheim seinen CF. Über 50 europäische Referenzlabore verfügen mittlerweile über einen validierten CF.⁶

$$BCR-ABL1^{lokal} \times CF = BCR-ABL1^S$$

Abb. 2: Berechnung des *BCR-ABL1*-Transkriptspiegels auf der Internationalen Skala (IS) basierend auf dem lokalen Resultat und dem laborspezifischen Konversionsfaktor (CF)

Etablierung der IS in der Schweiz

In der Schweiz war das Referenzlabor des Universitätsspitals Bern (akkreditiertes molekulardiagnostisches Hämatologie-Labor) für die Bestimmung der CFs der weiteren Labore verantwortlich. Dazu wurden drei Serien von Proben parallel analysiert und der laborspezifische CF mittels der Bland-Altman-Methode berechnet und validiert. Im Gegensatz zu den europäischen CFs liegen die Schweizer CFs trotz unterschiedlicher Analyseprotokolle und Instrumente in einem engen Bereich von 0,17 bis 0,5.⁶ Die hämatologischen Labore der fünf Schweizer Universitätsspitäler verfügen nun je über einen validierten CF und geben ihre Resultate auf der IS an (Abb. 3).

Da der CF durch Veränderungen in den Methoden, Reagenzien und Instrumenten beeinflusst wird, muss er in regelmässigen Abständen überprüft werden. Alle zwei Jahre muss daher eine Überprüfung des CF stattfinden, ebenso im Fall einer substanziellen Veränderung der Labormethodik, z.B. bei der RNA-Extraktion, cDNA-Synthese, dem Reaktionsprotokoll oder dem PCR-Gerät. Zudem sollten die Labore an regelmässigen externen Qualitätskontrollen teilnehmen.⁶

Die nächsten Schritte

Um den in zeitlicher und finanzieller Hinsicht aufwendigen Prozess der Etablierung und Erhaltung eines CF zu ersetzen, hat die internationale *BCR-ABL1*-Standardisierungsgruppe

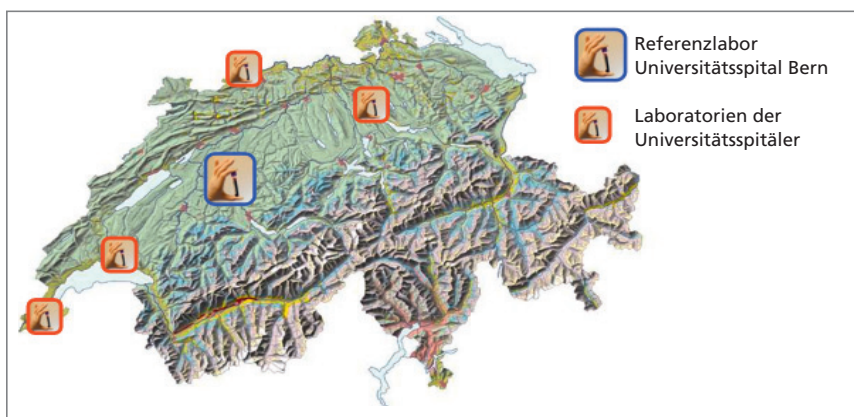


Abb. 3: Hämatologische Labore der Schweiz, welche die IS für *BCR-ABL1* verwenden

	Detektierbare <i>BCR-ABL1</i> -Transkripte	Undetektierbare <i>BCR-ABL1</i> -Transkripte	Log-Reduktion
MMR	≤0,1% <i>BCR-ABL1</i> ^{IS}		3-Log-Reduktion von der IRIS-Basislinie
MR ⁴	≤0,01% <i>BCR-ABL1</i> ^{IS}	≥10.000 <i>ABL1</i> -Transkripte*	≥4-Log-Reduktion von der IRIS-Basislinie
MR ^{4,5}	≤0,0032% <i>BCR-ABL1</i> ^{IS}	≥32.000 <i>ABL1</i> -Transkripte*	≥4,5-Log-Reduktion von der IRIS-Basislinie
MR ⁵	≤0,001% <i>BCR-ABL1</i> ^{IS}		≥5-Log-Reduktion von der IRIS-Basislinie

* Anzahl der *ABL1*-Transkripte im gleichen *cdNA*-Volumen wie für den *BCR-ABL1*-Test

Tab. 2: Definitionen der MMR (gutes molekulares Ansprechen) und MR (tiefes molekulares Ansprechen)

die Herstellung von Referenzmaterialien angeregt, die eine direkte Übertragung der Resultate auf die IS erlauben. Solch biologisches Referenzmaterial lässt sich jedoch nur durch einen schrittweisen Prozess generieren. Basierend auf gross angelegten Zelllinienkulturen wurde vor Kurzem ein primäres Referenzmaterial entwickelt, das von der WHO validiert wurde (1st WHO International Genetic Reference Panel).⁷ Dieses Material wird nun durch nationale Behörden, Referenzlabore und Firmen zur Kalibrierung sekundärer, für die Routinetestung produzierter Referenzmaterialien vertrieben. Vor Kurzem haben neun europäische Labore, inklusive des hämatologischen molekulardiagnostischen Labors des Universitätsspitals Bern, ein vom belgischen Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) hergestelltes sekundäres Referenzmaterial erfolgreich ge-

testet. Es ist geplant, dieses Material als Kalibrator in jedem analytischen Durchgang zu verwenden. Seit die TKIs der zweiten und dritten Generation (Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib, Ponatinib) als Erstlinienbehandlung bei CML-Patienten zum Einsatz kommen, erreicht ein bedeutend höherer Anteil der Patienten ein schnelles und tiefes molekulares Ansprechen.^{8,9} Zudem wird in laufenden klinischen Studien die Möglichkeit untersucht, bei Patienten, die einen nicht mehr nachweisbaren oder sehr niedrigen *BCR-ABL1*-Spiegel erreichen, die Behandlung zu stoppen. Die Definitionen einer „nicht mehr nachweisbaren Erkrankung“ oder eines kompletten molekularen Ansprechens (CMR) müssen erneuert bzw. ersetzt werden, da mit den aktuell verfügbaren RQ-PCR-Assays für *BCR-ABL1* beachtliche Unterschiede im Sensitivitätsniveau beobachtet werden, dies in Ab-

hängigkeit von der Präanalytik und den Versandbedingungen auch zwischen einzelnen Proben und bei etablierten Laboren. Kürzlich hat eine Expertengruppe die neuen Bezeichnungen MR⁴, MR^{4,5} und MR⁵ für ein tieferes Ansprechen definiert (Tab. 2).¹⁰ Einzelne Labore in Europa, darunter das molekulardiagnostische Labor des Universitätsspitals Bern, sind im Rahmen einer klinischen Studie bereits auf MR^{4,5} standardisiert. ■

Fazit

Mit der Implementierung der IS in der Schweiz wurde ein wichtiger Schritt hin zur Standardisierung der *BCR-ABL1*-Resultate abgeschlossen. Die IS wird nun von den hämatologischen Laboren der fünf Universitätsspitäler eingesetzt. Damit ist die Vergleichbarkeit der in der Schweiz und weltweit ermittelten Resultate gegeben. Es ist wünschenswert, dass alle Schweizer Labore, die eine *BCR-ABL1*-Quantifizierung durchführen, sich den Bestrebungen zur Nutzung der IS anschliessen, damit die Resultate individueller Patienten und die im Rahmen klinischer Studien erhobenen Befunde vergleichbar sind. Ärzte sollten nur Labore berücksichtigen, die zur Angabe der *BCR-ABL1*-Werte die IS verwenden und die an den Qualitätskontrollen teilnehmen.

Literatur:

- ¹ Baccarani M et al: European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122(6): 872-84
- ² Hughes TP et al: Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood* 2010; 116(19): 3758-65
- ³ Hanfstein B et al: Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia* 2012; 26(9): 2096-102
- ⁴ Hughes T et al: Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108(1): 28-37
- ⁵ Branford S et al: Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006; 20(11): 1925-30
- ⁶ Muller MC et al: Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia* 2009; 23(11): 1957-63
- ⁷ White HE et al: Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* 2010; 116(22): e111-7
- ⁸ Kantarjian HM et al: Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *Lancet Oncol* 2011; 12(9): 841-51
- ⁹ Kantarjian HM et al: Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 2012; 119(5): 1123-9
- ¹⁰ Cross NC et al: Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2012; 26(10): 2172-5
- ¹ Molekulare Diagnostik, Klinik für Hämatologie, Universitätsspital Bern
- ² Experimentelle Hämatologie, Departement für klinische Forschung, Universität Bern
- ³ Laboratoire de biologie moléculaire, CHUV, Universitätsspital Lausanne
- ⁴ Laboratoire des hémopathies malignes, HUG, Universitätsspital Genf
- ⁵ Klinik für Hämatologie, Universitätsspital Zürich
- ⁶ Abteilung für Hämatologie, Universitätsspital Basel

Korrespondenzadresse:

PD Dr. pharm. Elisabeth Oppliger Leibundgut
Univ.-Klinik für Hämatologie,
Universitätsspital Bern

Die Laborarbeiten im Zusammenhang mit dem Standardisierungsprozess und die Erstellung dieses Artikels wurden durch einen Educational Grant der Novartis Pharma Schweiz AG, Bern, unterstützt.

Autoren:

Elisabeth Oppliger Leibundgut^{1, 2}, Naomi A. Porret¹, Claire Abbal³, Régis Darbellay⁴, Jeroen S. Goede⁵, Christian Kalberer⁶, Thomas Lehmann⁶, Gabriela M. Baerlocher^{1, 2}



1 von 3 erkrankt im Laufe des Lebens an Krebs.

Darum braucht es die Krebsliga. Mehr denn je.
www.krebsliga.ch Spenden PK 30-4843-9



krebsliga

