



# APPENDIX

Samenvatting voor medisch  
niet-ingewijden

# S



## INTRODUCTIE

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is uitgevoerd bij patiënten met de ziekte chronische myeloïde leukemie (CML) of focust zich op de epidemiologie van CML.

CML is een kwaadaardige stamcelziekte en wordt gekenmerkt door woekering van rijpe en onrijpe witte bloedcellen in beenmerg, bloed en milt. Kenmerkend voor CML is de aanwezigheid van het zogenaamde Philadelphia chromosoom, het gevolg van een delingsfout van de cellen. Een deel van chromosoom 9 wisselt uit met een deel van chromosoom 22, waardoor er een abnormaal kort chromosoom 22 ontstaat met een DNA combinatie die de code bevat voor het BCR-ABL eiwit (zie figuur 1 pagina 11 van de introductie). Dit BCR-ABL eiwit is de veroorzaker van de ziekte. Het is in staat een fosfaatgroep te koppelen aan andere eiwitten waardoor deze geactiveerd of juist geremd worden (zogenaamde tyrosine kinase activiteit). Het eerste komt het meest voor. BCR-ABL veroorzaakt daardoor veranderingen in vele processen in de cel die onder andere een rol spelen bij de celdeling, de levensduur van de cel en de verankering van de cel aan de micro-omgeving. Hierdoor gaat de cel zich uiteindelijk kwaadaardig gedragen en ontstaat CML.

## KLINISCHE VERSCHIJNSELEN EN LABORATORIUM ONDERZOEK

CML is een ziekte die, indien niet goed behandeld, in drie fasen verloopt, beginnend met de sluimerende chronische fase. Uiteindelijk zal na 3-5 jaar progressie plaatsvinden, via de acceleratiefase, waarin een geleidelijke stijging van het aantal onrijpe beenmergcellen (blasten) optreedt, naar een over het algemeen snel dodelijke acute leukemie, die blastencrise wordt genoemd. Hierbij wordt het beenmerg geheel ingenomen door blasten die de normale functie van witte bloedcellen, namelijk verdediging tegen ziekteverwekkers, niet kunnen uitvoeren. Daarbij verdringen zij de normale bloedcelproductie. Ongeveer 90% van de patiënten blijkt zich ten tijde van het stellen van de diagnose in de chronische fase te bevinden. Iets minder dan de helft van de patiënten heeft op dat moment geen klachten: de ziekte wordt dan bij toeval gediagnosticeerd. Meestal is dat wanneer vanwege een andere reden bloed wordt afgenomen en er dan sprake blijkt te zijn van een fors verhoogd aantal witte bloedcellen (leucocytose). Het andere deel van de patiënten ervaart klachten als moeheid, afvallen, nachtzweeten, koorts, een vol gevoel in de buik door een vergrote milt en botpijnen. Het klinisch beeld wordt vergezeld door een massale infiltratie van tumorcellen in bloed, beenmerg en milt. Laboratoriumonderzoek laat een leucocytose zien met witte cellen (leucocyten) in alle stadia van uitrijping met of zonder een lichte stijging van het aantal blasten. Daarnaast is er vaak sprake van een toename van andere soorten witte bloedcellen zoals eosinofielen en basofielen en van bloedplaatjes (trombocyten).

Het risico op het ontstaan van een blastencrise blijkt met verschillende kenmerken samen

te hangen die bij diagnose kunnen worden vastgesteld. Aan de hand van die kenmerken kan op een meer of minder gecompliceerde wijze een score worden berekend. Inmiddels zijn er drie van dergelijke scoresystemen, de Sokal score, de Hasford score (ook wel Euro score genoemd) en de EUTOS score. Er is geen consensus over welke score het best voorstellend is, echter meestal wordt de Sokal score toegepast.

## BEHANDELING

Tot nog niet zo lang geleden was de levensverwachting van CML patiënten slecht met een gemiddelde overleving van 3-5 jaar. Behandelingsopties betroffen allogene stamceltransplantatie, interferon of chemotherapeutische middelen zoals busulfan, cytarabine en hydroxycarbamide. Allogene stamceltransplantatie, waarbij stamcellen van een donor worden toegediend aan een patiënt na een zware voorbehandeling, was de enige curatieve optie en daardoor de voorkeursbehandeling, maar ging (en gaat nog steeds) gepaard met een grote kans op, zelfs dodelijke, complicaties en was daardoor alleen voorbehouden aan jonge, fitte patiënten. Met interferon werd bij 10% -20% van de patiënten een langdurige respons behaald waarbij de cellen met de Philadelphia chromosomen verdwenen, echter het middel had zeer veel bijwerkingen en dat beperkte het gebruik. De toevoeging van het chemotherapeuticum cytarabine verbeterde de resultaten maar induceerde alleen maar meer bijwerkingen. Onder busulfan en hydroxycarbamide daalden weliswaar vaak de leucocyten maar er was geen effect op de Philadelphia positieve cellen, waardoor het natuurlijk beloop van de ziekte niet veranderde. Vanwege de goede verdraagbaarheid wordt hydroxycarbamide nog wel regelmatig gebruikt voor het verminderen van het aantal witte bloedcellen bij diagnose en als palliatieve behandeling. Interferon wordt nog wel eens gebruikt tijdens een zwangerschap, waarin de huidige beschikbare middelen gecontra-indiceerd zijn.

Eind jaren negentig van de vorige eeuw ontwikkelden onderzoekers uit Portland, Oregon in de VS en Los Angeles tezamen met Novartis een specifieke remmer van het BCR-ABL eiwit, genaamd imatinib, een zogenaamde tyrosine kinase remmers (TKI's). Dit middel betekende een revolutie in de behandeling van CML patiënten. Imatinib veroorzaakt in de meeste patiënten een zeer grote teruggang van het aantal kwaadaardige cellen. Bij chromosoomonderzoek van het beenmerg zijn dan geen Philadelphia-chromosoom bevattende cellen meer terug (cytogenetisch onderzoek) te vinden en bij DNA onderzoek (moleculair onderzoek), dat zelfs extreem kleine hoeveelheden kwaadaardige cellen kan terugvinden blijkt er nauwelijks meer ziekteactiviteit te bestaan. In de 5-jaar update van de International Randomized Study on Interferon versus ST1571 (IRIS studie), had 87% van de patiënten die imatinib gebruikten een complete cytogenetische respons (CCyR: geen Ph+ cellen meer zichtbaar) bereikt. Na 8 jaar had 86% ooit een major moleculaire respons (MMR: daling van BCR-ABL bij moleculair onderzoek onder de veilige grens van 0.1%) bereikt. Het bleek dat patiënten die zo goed reageren vrijwel nooit meer een blastencrisis

krijgen. Hierdoor verbeterde de overleving van CML patiënten enorm: terwijl de 8-jaars overleving in het pre-imatinib tijdperk varieerde tussen de 5% en 53%, afhankelijk van de risico score, bleek in de IRIS studie na 8 jaar nog 85% van de patiënten te leven, waarbij de aan CML gerelateerde sterfte slechts 7% was. Dit betrof patiënten die ondanks het gebruik van imatinib toch een blastencrisis kregen.

Momenteel wordt geadviseerd om te streven naar een volledige normalisatie van het chromosomenonderzoek (cytogenetische respons) na 6 maanden en een vermindering van het BCR-ABL DNA niveau (moleculaire respons van minder dan 0.1% na 12 maanden. Patiënten die dat bereiken hebben een vijfjaarsoverleving van bijna 100%.

In navolging van de eerste TKI imatinib, zijn er de afgelopen jaren nieuwe TKI's ontwikkeld en geïntroduceerd voor eerstelijns behandeling. Met deze middelen, dasatinib en nilotinib genaamd, worden snellere en diepere responses bereikt. Tevens werd er minder progressie naar acceleratiefase en blastencrisis gezien in patiënten die behandeld worden met nilotinib (respectievelijk bij ongeveer 1% van de patiënten) en dasatinib (ongeveer 2%) vergeleken met imatinib (4- 5%). Helaas heeft dit tot op heden nog niet geresulteerd in een verbeterde overleving voor patiënten die behandeld worden met een tweede generatie TKI. Verreweg de meeste patiënten worden nog steeds behandeld met imatinib, gezien deze de eerst beschikbare TKI was. Ondanks dat nilotinib en dasatinib sterker werken, is de meeste ervaring met betrekking tot veiligheid en bijwerkingen opgedaan met imatinib. Kortgeleden zijn de TKI's bosutinib en ponatinib geregistreerd voor tweede- of derdelijns behandeling van CML patiënten die resistent of intolerant zijn voor de andere TKI's.

## **TKI RESISTENTIE**

Ondanks de revolutionaire veranderingen in respons en overleving sinds de introductie van de TKI's, is een deel van de patiënten ongevoelig (resistent) voor deze middelen of kunnen deze niet goed verdragen. Dit betreft respectievelijk ongeveer 16% en 6%. Primair therapiefalen of verworven resistentie tegen TKI therapie kan verschillende oorzaken hebben, waaronder mutaties in een deel van het BCR-ABL eiwit. Bij een mutatie wordt de binding van de TKI aan het BCR-ABL eiwit verhinderd. Mutaties kunnen al bestaan voordat behandeling gestart is en kunnen ook ontstaan gedurende therapie. Imatinib is het meest gevoelig voor mutaties. Diverse mutaties kunnen alsnog goed gevoelig zijn voor een van de nieuwere middelen. Tot voor kort was er één mutatie waartegen geen enkele TKI actief was. Dit was de zogeheten T315I mutatie. Gelukkig is het recent geïntroduceerde ponatinib daar in veel gevallen wel werkzaam tegen.

## **CML STAMCELLEN**

Stamcellen zorgen ervoor dat levenslang bloedcellen kunnen worden gemaakt. Zij delen heel weinig en zijn goed beschermd tegen schadelijke invloeden van buitenaf, maar toch ontstaan soms afwijkingen in hun chromosomen zoals het Philadelphia chromosoom. De stamcellen worden dan leukemische stamcellen genoemd en zijn verantwoordelijk voor de productie van alle kwaadaardige voorloper- en rijpe cellen. Het gros van alle meer rijpe CML cellen wordt gedood door de TKI's, echter de leukemische stamcellen zijn in essentie ongevoelig voor de diverse TKI's en persisteren zelfs na langdurige behandeling. Deze ongevoeligheid heeft verschillende oorzaken. Stamcellen zijn zoals gezegd goed beschermd tegen invloeden van buitenaf. Ze liggen in een beschermende omgeving van beenmergsteuncellen, en zijn meestal in een rustende toestand. Ze kunnen allerlei voor hen schadelijke stoffen naar buiten de cel pompen en dat geldt ook voor TKI's. Hoewel de meer rijpe cellen dood blijken te gaan van het remmen van het BCR-ABL eiwit, gebeurt dat niet bij de leukemiestamcellen. Gevolg is dat het noodzakelijk is dat CML patiënten hun medicatie levenslang moeten innemen. Dat is vervelend omdat nogal veel patiënten lastige bijwerkingen ervaren, waaronder vooral chronische vermoeidheid. Opmerkelijk is echter dat uit Frans onderzoek blijkt dat er toch een klein deel van de patiënten is die na verloop van tijd wél kan stoppen met de behandeling, zonder dat de ziekte terugkomt. Mogelijk zijn bij deze patiënten de stamcellen wel uitgeroeid. Een andere verklaring is misschien dat het eigen immuunsysteem van de patiënt in staat is de leukemie cellen in toom te houden. Helaas betreft het slechts een beperkte groep patiënten en vanzelfsprekend is het van groot belang dat er onderzoek wordt verricht om het aantal patiënten dat succesvol kan stoppen te vergroten.

## **SAMENVATTEND**

Het beloop van CML is enorm veranderd sinds de introductie van de verschillende TKI's. De overleving is sterk verbeterd en tegenwoordig is het merendeel van de CML patiënten nog in leven. Echter, er zijn nog steeds patiënten die moeten stoppen met TKI behandeling vanwege ernstige bijwerkingen of vanwege resistentie, en deze patiënten lopen het risico op ziekte progressie.

Omdat veel patiënten last hebben van meer of minder ernstige bijwerkingen van de TKI's, is er nog steeds ruimte voor verbetering en voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische benaderingen teneinde nog betere responsen te bereiken, om TKI resistentie te verhelpen en om de stamcellen te doden.

## ONDERZOEK EN RESULTATEN BESCHREVEN IN DIT PROEFSCHRIFT

De eerste twee hoofdstukken betreffen het vóórkomen van CML in de bevolking, de behandeling en de overleving. De meeste gegevens hierover worden verkregen uit klinische onderzoeken. Echter, klinische studies hanteren vaak inclusie restricties (zoals leeftijdsgrenzen en uitsluiten van patiënten vanwege bijkomende ziekten (comorbiditeiten)) en geven daarom niet een reëel beeld van de werkelijkheid. “Population-based” studies daarentegen kennen deze vertekening niet en geven een meer realistisch beeld. Om te bepalen wat de impact van de introductie van TKI’s daadwerkelijk heeft gehad op de overleving, hoeveel patiënten behandeld worden met een TKI en wat de frequentie van voorkomen is van CML in Nederland, hebben we een “population-based” studie verricht met behulp van gegevens van de Nederlandse Kanker Registratie (NKR). Deze studie, waarbij gegevens werden verzameld van alle nieuw gediagnosticeerde CML patiënten tussen 1989 en 2012 is een van de grootste CML studies die ooit verricht is en wordt beschreven in hoofdstuk 2.

Naast dat voor het eerst de incidentie van CML in Nederland bekend werd (0.7 – 1.2 per 100.00 inwoners per jaar, afhankelijk van geslacht en periode), laten de resultaten zien dat de impact van de introductie van de TKI’s op de overleving inderdaad indrukwekkend is. De 5-jaars overleving steeg van 36% naar 79% waarbij jongere en middelbare patiënten het meest profiteerden. De sterfte werd gecorrigeerd voor de normale sterfte binnen een bepaalde leeftijdsgroep. Echter, deze studie laat zien dat er ook nog veel verbeterd kan worden. Zo bleken ouderen soms geen behandeling te krijgen met TKI’s en was daardoor de winst in overleving bij hen ook minder dan voor andere leeftijdsgroepen. Dit is opmerkelijk in een tijdperk waar alle TKI’s vergoed worden door de zorgverzekeringen en er dus geen financiële obstakels zijn. Therapeutisch nihilisme en onnodige en onjuiste voorzichtigheid bij aanwezigheid van comorbiditeiten bij het voorschrijven van een TKI zouden mogelijke verklaringen kunnen zijn. Dit is een suboptimale situatie, gezien in de meerderheid van de gevallen er een geschikte TKI is welke veilig gebruikt kan worden bij bepaalde comorbiditeiten. Om de overleving verder te verbeteren, raden wij aan om de behandeling van CML patiënten te centraliseren in ziekenhuizen met voldoende ervaring om zo de beste zorg te waarborgen.

Omdat door de NKR alleen basale informatie verzameld wordt, en er behoefte is om ook beter en meer inzicht te krijgen in behandeling, monitoring en respons, werd in 2008 de “Population based Haematological Registry for Observational Studies” (PHAROS) opgericht om de database uit te breiden. Binnen PHAROS worden gegevens verzameld van alle nieuwe gediagnosticeerde CML patiënten in Nederland en worden de patiënten jaarlijks gevolgd. Een deel van de PHAROS gegevens (regio IK-Amsterdam, IK-Rotterdam en IK-Zuid, tezamen ongeveer 10 miljoen inwoners dekkend), werd eveneens gebruikt voor een grote Europese registratie studie: de “European Treatment and Outcome Study” (EUTOS) als onderdeel van de “European Leukemia Net” (ELN) (hoofdstuk 3). Door deze



studie werden betrouwbare gegevens omtrent incidentie, demografische en klinische gegevens verkregen van CML patiënten uit 23 Europese landen. De studies beschreven in hoofdstuk 2 en 3 onderschrijven het belang van het verrichten van “population-based” studies. Niet alleen geven ze inzicht in “real-life” gegevens van CML patiënten, ze houden onze gezondheidszorg ook een spiegel voor met betrekking tot behandeling, respons en overleving. Imatinib, nilotinib en dasatinib zijn dure medicijnen (kosten per patiënt per jaar respectievelijk €30.546, €40.322 en €49.539) en gezien de prevalentie alleen maar toeneemt de komende jaren door de verbeterde overleving, heeft dit grote macro-economische consequenties en zijn kosteneffectiviteit en planning en inrichting van de gezondheidszorg belangrijke items.

In het tweede gedeelte van dit proefschrift worden twee klinische studies beschreven. Ondanks de verbetering van CML behandeling, is er dus nog steeds ruimte voor verbetering. Een mogelijke strategie om de moleculaire respons te verbeteren en de kans op ziekteprogressie te verminderen is het combineren van TKI behandeling met conventionele chemotherapie. In hoofdstuk 4 wordt een gerandomiseerde fase III studie (HOVON 78) beschreven waarin hoge dosis imatinib alléén werd vergeleken met hoge dosis imatinib in combinatie met twee opeenvolgende cycli intermediaire dosis cytarabine bij nieuw gediagnosticeerde CML patiënten. Helaas werd er na 12 maanden geen significante verbetering geobserveerd in het bereiken van een MMR in de patiëntengroep die behandeld werd met imatinib en cytarabine. Echter, deze studie behaalde niet het gewenste aantal te includeren patiënten en daardoor kunnen geen definitieve conclusies getrokken worden. Wellicht dat andere combinatiebehandelingen wel effectief zijn in het verbeteren van de respons.

Tot recent werd verondersteld dat CML patiënten levenslang met TKI's behandeld zouden moeten worden gezien de bevindingen dat leukemische stamcellen ongevoelig zijn voor TKI's en dat staken hiervan zou leiden tot toename van CML cellen en daarmee tot progressie van de ziekte. Echter, in de eerder genoemde Franse studie bleek dat sommige patiënten hun diepe respons niet verloren na het staken van imatinib. In navolging van de Fransen ontwierpen wij een gerandomiseerde studie waarin geloot werd tussen staken of continueren van imatinib bij patiënten die al gedurende 2 jaar een diepe moleculaire response hadden ( $BCR-ABL \leq 0.0032\%$ ) (hoofdstuk 5). Deze studie liet zien dat na 2 jaar 61% van de patiënten die gestopt waren ziekteprogressie hadden maar ook allemaal opnieuw weer een diepe respons behaalden na het hervatten van imatinib. De progressie trad bij vrijwel alle patiënten op binnen 7 maanden na staken imatinib. Daarentegen, 39% was nog steeds in een diepe moleculaire respons ondanks de aanwezigheid van leukemische stamcellen. Het mechanisme dat verantwoordelijk is voor deze aanhoudende responsen is speculatief maar zoals eerder genoemd, wordt vermoed dat immunologische mechanismen een belangrijke rol spelen. De vrees dat het staken van imatinib zou leiden tot genetische instabiliteit door blootstelling van leukemische

stamcellen aan BCR-ABL kinase activiteit en daardoor ziekteprogressie, bleek gelukkig ongegrond. Daarom vinden wij het veilig om imatinib te staken in geval van een diepe aanhoudende respons. Ondertussen is een grote Europese studie gaande waarin ook patiënten die nilotinib en dasatinib gebruiken in de gelegenheid zijn te stoppen.

De resultaten van deze studie in combinatie met eerdere stop-studies zou kunnen leiden tot nieuwe behandelrichtlijnen waarin staken van TKI's een onderdeel wordt. Als een deel van de CML patiënten zou kunnen stoppen met behandeling, heeft dit uiteraard grote financiële gevolgen.

In de laatste twee hoofdstukken focussen wij ons op CML biologie. Het BCR-ABL kankereiwit wordt verantwoordelijk gehouden voor vele processen in de cel die met zijn allen bijdragen aan het maligne karakter ervan. Het is daarom aannemelijk dat ze vele zogenaamde moleculaire signaleringsroutes in de cel beïnvloeden. Het identificeren van deze routes is van groot belang: zij zijn belangrijke onderzoeksonderwerpen, daar zij als mogelijk therapeutisch doel gebruikt kunnen worden in toekomstige studies. Echter, van belang is dat de effecten van het remmen of stimuleren van deze routes beperkt blijven tot de leukemische stamcellen en dat zij de normale bloedaanmaak niet verstoren omdat dat ongewenste bijwerkingen zal veroorzaken. In hoofdstuk 6 worden de huidige inzichten in deze routes en hun moleculaire doelen besproken.

Leukemische stamcellen zijn dus erg belangrijk bij CML en sinds bekend is dat zij verantwoordelijk zijn voor het persisteren van de ziekte en ziekte terugval en dat ze TKI resistentie kunnen induceren, besloten wij te onderzoeken in welk opzicht de mate van leukemische stamcellen bij diagnose en hun verhouding met de normale, gezonde stamcellen de respons op nilotinib beïnvloedt. We bepaalden dit door middel van twee technieken: multiparameter flow cytometry (MPFC) en FISH. Bij MPFC wordt gebruik gemaakt van antistoffen die binden aan eiwitten die zich aan de buitenkant van cellen bevinden. Voor elke type cel is dat anders. Door de antistoffen te labelen met een fluorescerend deeltje, kunnen wij ze herkennen en zo onderscheid maken tussen verschillende soorten cellen. Wij konden op deze manier allereerst de meest onrijpe cellen selecteren en vervolgens binnen deze celgroep ook kwaadaardige (leukemische) en niet-leukemische stamcellen herkennen omdat leukemische stamcellen naast bekende eiwitten nog andere eiwitten op hun oppervlak hebben. Bij FISH worden hele kleine, fluorescerende, stukjes DNA die aan specifieke stukjes DNA kunnen plakken (dat heet: complementair zijn), toegevoegd aan cellen. In ons geval zijn dat stukjes DNA die het BCR gen en het ABL gen herkennen op het Philadelphia chromosoom. Onder de lichtmicroscopie kan men vervolgens zien dat deze oplichtende stukjes DNA tegen elkaar aan liggen, wat betekent dat BCR en ABL gefuseerd zijn, typisch voor het Philadelphia chromosoom. Nadat op dezelfde manier als bij MPFC eerst de stamcellen werden geselecteerd, konden wij met behulp van FISH kwaadaardige van niet-kwaadaardige stamcellen onderscheiden. In deze studie (hoofdstuk 7) toonden wij aan dat de verhouding tussen het aantal

kwaadaardige en normale stamcellen ten tijde van diagnose correleert met de vroege en latere moleculaire respons maar ook met diverse klinische parameters bij diagnose en het optreden van bijwerkingen. Naast deze belangrijke bevindingen waren wij door de gebruikte methoden in staat om leukemische van normale stamcellen te onderscheiden, iets wat tot nu toe altijd erg moeilijk was. Doordat dit onderscheid mogelijk is kunnen de afzonderlijke celsoorten met elkaar vergeleken worden en zouden leukemische stamcelspecifieke aangrijpingspunten voor therapie ontdekt kunnen worden. Op dit moment zijn wij naar aanleiding van deze studie bezig met het vaststellen van de waarde van enkele van deze stamcelspecifieke doelen.

