

Randomizovaná otevřená akademická studie: srovnání standardního podání azacytidinu oproti azacytidinu s preinkubací G-CSF u myelodysplastického syndromu vyššího rizika – interim analýza

| Tomáš Stopka^{1,2}, Ľubomír Minařík^{1,2}, Vojtěch Kulvait², Michal Pešta³, Adél Schaffartziková^{1,2}, Galina Kislik⁴, Nina Dusilková², Zuzana Zemanová⁵, Anna Jonášová¹

¹Klinika hematologie, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

²1. lékařská fakulta, Karlova Univerzita, Praha

³Matematicko-fyzikální fakulta, Karlova Univerzita, Praha

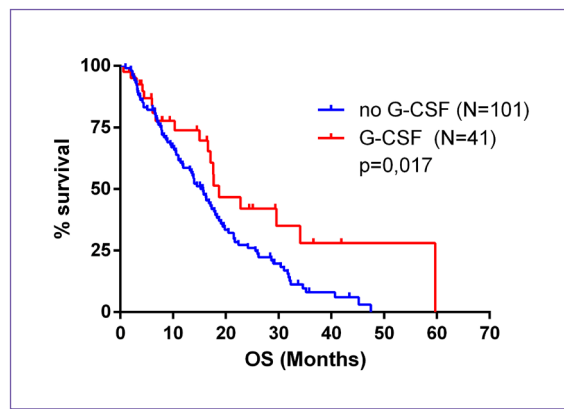
⁴Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita, Praha

⁵Centrum nádorové cytogenetiky ULBLD, 1. LF UK a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Úvod

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění krvetvorby dané diferenciační blokádou, rezultující v cytopenie s transfuzní závislostí a četnými imunitními defekty. V průběhu progresu dochází k postupné akumulaci myeloblastů s četnými cytogenetickými a genetickými abnormalitami. V této době jsou pacienti náchylní k infekčním komplikacím. Na základě předchozího výzkumu nemocných ve Všeobecné fakultní nemocnici léčených inhibitory DNA metylace, azacytidinem (AZA), jsme v registru 164 pacientů (medián věku 73) s MDS pozorovali odpověď u poloviny pacientů (ORR = 48,5%) a medián přežívání 13,8 měsíce. Jednalo se o pacienty s vyšším rizikem dle IPSS léčených v režimu 5 + 2 + 2 v dávce 75 mg/m² subkutánním podáním. Z retrospektivního pohledu na setu studovaných pacientů jsme pozorovali pozitivní vztah přežívání (19 vs. 16 měsíců, p = 0,039) a četnosti používání granulocytárního faktoru (G-CSF). Přežívání pacientů s high-risk MDS léčených AZA v závislosti na podání G-CSF je shrnuto v obrázku č. 1.

Obrázek č. 1: Vliv G-CSF na přežívání u MDS. Kaplan-Meierova křivka přežití v závislosti na podání G-CSF u MDS vyššího rizika v léčbě AZA



Zdroj: Data zpracovaná autory na základě výzkumu ve VFN v Praze

Na základě zmíněných výsledků je evidentní, že podání G-CSF během terapie AZA přináší signifikantní klinický benefit. Abychom pochopili, jakým způsobem dezigno-

vat klinickou studii k ověření účinnosti G-CSF, inspirovali jsme se některými výsledky preklinického výzkumu, který ukazoval, že aplikace G-CSF před podáním hypometylační látky má na úrovni buněčných kultur v experimentu silně prodiferenční vliv. Granulocytární faktor, jak známo, váže abundančně exprimovaný receptor na myeloidních, převážně granulocytárních progenitorech neutrofilů a stimuluje jejich přežití, proliferaci a diferenciaci skrze aktivaci myeloidního transkripčního faktoru PU.1. Autoři testující decitabin (1) prokázali vliv inhibice DNA metylace na reaktivaci genů potencující kmenovost hematopoetických prekursorů, zatímco transgenní aktivace myeloidního programu nebo po přidání G-CSF 48 hodin před podáním decitabinu vedla ke stimulaci myeloidní diferenciace. I naše vědecká skupina ukázala podobné účinky pro v ČR běžnější hypometylační látku AZA. Ukázali jsme, že AZA a G-CSF kooperují v aktivaci myeloidního programu a diferenciace (2). Abychom zlepšili celkově neuspokojivé výsledky AZA u MDS, iniciovali jsme randomizovanou klinickou studii, která porovnává standardní terapii AZA (A) s novou kombinací G-CSF + AZA (GA) u pacientů s vyšším rizikem transformace do AML.

Metodika výzkumné studie

Navržená výzkumná studie s označením GA/MDS-2013 (EudraCT No 2013-001639-38) má v plánu zahrnout 134 pacientů s MDS vyššího rizika (IPSS „int-2“ a „high“). Aktuálně po 2,5 roce vstoupilo do studie 53 pacientů. Rameno GA zahrnuje 29 a rameno A zahrnuje 24 pacientů. Celkově je medián věku 74 let, poměr pohlaví je 32 : 21 (GA 16 : 16 a A 13 : 8). Stran prognostiky je medián IPSS-R 6. Medián sledování (follow-up) je 11 měsíců. Medián počtu cyklů podání AZA je 6 cyklů. Stran MDS podtypů: EB1 a EB2 tvoří 75 %, MDS/AML do 30 %, MB tvoří 22,5 % a CMML II tvoří 2,5 %. Kandidátsví pro alogenní transplantaci krvetvorných buněk je tradičně jedním z vyřazovacích kritérií. Randomizace nových pacientů probíhá losem u monitora studie, a to v poměru 2 : 1 pro GA rameno vzhledem k tomu, že je k dispozici i kontrolní dataset jen pro rameno A. Primární cíle studie (primary endpoints) jsou: délka přežívání (OS), doba do progresu (PFS), doba do AML transformace, četnost léčebných odpovědí (ORR) a kvalita života (QoL dotazník). Dále četnost netropenií a febrilních neutropenií. Sekundární cíle GA studie jsou: molekulární biomarkery včetně mutační nálože, diferenciačních parametrů na buňkách kostní dřeně (měřeno průtokovou cytometrií). Terapeutický režim obsahuje:

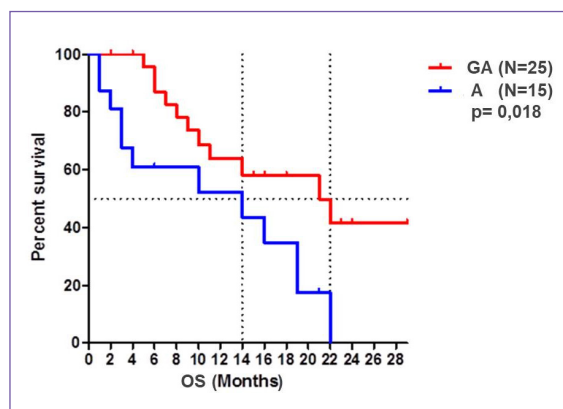
1. pro obě ramena: podání AZA subkutánně, 75 mg/m² v režimu 5 + 2 + 2;
2. pouze v ramenu GA: 48 hodin před prvním a 48 hodin před šestým injekčním podáním AZA je aplikován podkožně G-CSF.

Monitorování klinických parametrů probíhá na pravidelné bázi a průběžně jsou doplňovány i laboratorní parametry (CRF) elektronickou formou. Jsou zaznamenávány všechny klinické parametry včetně nežádoucích událostí (AE/SAE) spojených s léčbou. Stran molekulárních parametrů jsou prováděny sekvenční analýzy buněk kostní dřeně před terapií a v době klinických hodnocení po každém 4. cyklu pomocí NEBNext Direct Kit 33genový panel (miSeq). Tento 33genový panel vychází z našich předchozích zkušeností u MDS pacientů (3) ve vztahu k původně publikovaným pracím (4). Zaznamenávány jsou rozšířené analýzy diferenciačních parametrů (v 1. cyklu ve dnech -2, 0 a +9) na základě průtokové cytometrie; dále je měřena hladina rozličných cytokinů včetně G-CSF v séru pacientů, a to před terapií. Mnohovrstevný balík dat je následně analyzován multiparametrickou platformou statistické evaluace zahrnující longitudinální analýzu včetně tzv. joint modelů pro OS a OR.

Výsledky interim analýzy

Aktuálně data reprezentují 2,5 roku průběhu klinické GA studie. U 40 pacientů z aktuálně 53 zahrnutých do léčby jsou k dispozici data umožňující evaluaci. Zjištěné klinické parametry pro přežití (medián OS) jsou následující: GA rameno 11 měsíců vs. A rameno 6 měsíců. Četnost léčebných

Obrázek č. 2: Přežívání a terapeutická odpověď v GA/MDS-2013 studii; vlevo: Kaplan-Meierova křivka přežití pro rameno GA vs. vpravo pro rameno A



Zdroj: Data zpracovaná autory na základě výzkumu ve VFN v Praze

odpovědi (zahrnující kompletní a parciální remisi CR/PR a hematologické zlepšení HI) činí v ramenu GA 56 vs. 33% pro rameno A. Transformace do AML byla pro obě ramena srovnatelná.

Pro statistickou analýzu dat byl využit Coxův longitudinální model proporčního rizika obsahující časově variabilní parametry s řadovým, mnohovrstevným, logistickým, smíšeným modelem. Ze sdíleného (joint fitted) modelu byl vypočítán negativní koeficient pro rameno GA ($p = 0,0442$), jež značí signifikantní prodloužení OS v GA ramenu. Predikovaná pravděpodobnost pro GA rameno, že pacient odpoví na terapii spíše remisí než progresí, je 12,4krát vyšší než v ramenu A (a to za kontroly zbývajících parametrů, $p = 0,0016$). Stran terapeutické

toxikity nebyly pro G-CSF hlášeny nežádoucí okolnosti, a proto byla obě ramena GA i A podobně tolerována. Data popisující frekvenci neutropenií dle závažnosti jsou aktuálně ve zpracování. Hladina G-CSF byla evaluována ze dvou důvodů: a) v podobném setu pacientů jsme neměli povědomí, zda může být G-CSF u MDS nadprodukován; b) zda existují rozdíly mezi rameny GA vs. A, jež by mohly hrát roli v indukci odpovědi. Data ukazují, že hladina G-CSF je: a) srovnatelná s kontrolním setem normálních subjektů; b) nejsou rozdíly mezi rameny GA vs. A. Evaluovali jsme, zda aplikace G-CSF před podáním AZA je účinná, a k tomu jsme využili měření CD64 (FCgRI) pomocí průtokové cytometrie. FCgRI byl v minulosti zjištěn jako biomarker po podání G-CSF (5) a v ramenu GA byl zjevně upregulován. Dále jsme evaluovali mutační pro-

Obrázek č. 3: Klinické parametry GA/MDS-2013, interim analýza po 2,5 roce; vlevo shora: počet analyzovaných pacientů s minimálním sledováním ve studii, procento jednotlivých podtypů MDS, klinické parametry ramen GA vs. A (věk, cykly AZA, přežívání, progresse do AML, odpověď na léčbu, doba do progresse, doba do terapeutické odpovědi); vpravo shora: medián rizika dle IPSS-R, laboratorní parametry (leukocyty, hemoglobin, destičky, neutrofilní granulocyty, myeloblasty), cytogenetické skóre; dolní panel: počty zjištěných somatických mutací pro jednotlivé geny s klesající četností zleva

Patients (N)	GA	A	N	IPSS-R (median)	5.5	6	6										
	25	15	40														
MDS subtype (%)	GA	A	N	CBC (median)	GA	A	all										
MLD	8	0	2	WBC (x $E9$)	2.7	3.4	2.9										
EB1	24	7	7	Hb (g/L)	89	93	90										
EB2	56	47	21	PLT (x $E9$)	86	31	56										
RAEB-t	15	40	9	ANC (x $E9$)	1.1	1.6	1.2										
CMML	0	7	1	MB in PB (%)	0.9	3.1	1.2										
				MB in BM (%)	8.2	16	11										
Clinical cohort	GA	A	all	Cytogenetic score (%)	GA	A	N										
Age (median, years)	73	76	74	good (1)	4	0	1										
M:F ratio	14:11	11:4	40	intermediate (2)	32	66.7	18										
Cycles of AZA (N)	8	4	6	poor (3)	20	13.3	7										
OS (months)	11	6	11	very poor (4)	44	13.3	13										
AML progressed (%)	40	33	37.5														
ORR (%)	56	33	48														
PFS (months)	6.5	5	5														
TTR (N)	4	4	4														
GENE	TET2	RUNX1	IDH2	BCORL1	BCOR	STAG2	TP53	IDH1	DNMT3A	ASXL1	SRSF2	CEBPA	EZH2	JAK2	KDM6A	CSF3R	CUX1
N	21	10	8	8	7	7	7	6	6	6	6	5	4	4	3	2	1

Zdroj: Data zpracovaná autory na základě výzkumu ve VFN v Praze

fil pacientů s MDS s cílem: a) zjistit, zda pacienti mají typickou mutační nálož; b) zda existují a jsou významné ve smyslu jejich prognostických funkcí. Zjistili jsme, že v multivariantsní analýze dříve zjištěné, negativně prognostické mutace (6) platí za spolehlivé biomarkery i ve spektru pacientů v GA studii. V ramenu A mají pacienti s mutací DNMT3A ($p = 0,0157$), EZH2 ($p = 0,0091$), TP53 ($p = 0,0510$) a CSF3R ($p = 0,0057$) relativně kratší OS ve srovnání s GA ramenem. Pro případ OR opět platí, že mutace EZH2 (p -value 0,0208) a CSF3R (p -value 0,0424) značí horší terapeutickou odpověď pro ramena A vs. GA. To značí, že G-CSF může indukovat odpověď i u relativně rizikových pacientů. Pro některé mutace, mj. v genu *TET2*, jež patří mezi nejčtenější v našem souboru pacientů (viz obrázek č. 3), jsme vliv na odpověď při současném počtu subjektu neodhalili tak, jak bylo indikováno v jiných pracích (7).

Závěry

Aktuální výsledky studie GA/MDS-2013 ukazují po 2,5 roce od zahájení na funkčně probíhající, akademickou, randomizovanou, otevřenou studii ve VFN v Praze. GA studie přináší poznatky o pozitivním efektu přidání G-CSF k terapii AZA ve stanoveném dávkovacím schématu, a to ve smyslu prodloužení přežívání pacientů a zvýšení odpovědi na AZA u MDS s vyšším rizikem progresu do AML. V rámci sekundárních cílů jsme dosáhli některých nových poznatků, ať už ve smyslu sledování hladin cytokinů včetně G-CSF, tak i pro některé další biomarkery, mj. somatické mutace a jejich vztah k terapeutickému benefitu a délce odpovědi, jež jsou aktuálně též ve stadiu zpracování. Přestože jsou recentní výsledky velmi nadějně, v našem plánu je pokračovat ve studii a dosáhnout takového počtu analyzovaných pacientů, který by umožnil data kriticky zhodnotit a získat jednoznačné závěry, na jejichž základě bychom vydali doporučení pro terapii MDS vyššího rizika v rámci MDS skupiny při České hematologické společnosti.

Grantová podpora: tato práce byla vytvořena s podporou grantu AZV č.16-27790A.

prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.^{1,2}, MUDr. Ľubomír Mínařík^{1,2}, RNDr. Mgr. Vojtěch Kulvait, Ph.D.², RNDr. Michal Pešta, Ph.D.³, Adél Schaffartziková^{1,2}, Galina Kislik⁴, MUDr. Nina Dusílková², RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.⁵, doc. MUDr. Anna Jonášová, Ph.D.¹
¹Klinika hematologie, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
²1. LF UK, Praha

³Matematicko-fyzikální fakulta, Karlova Univerzita, Praha

⁴Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita, Praha

⁵Centrum nádorové cytogenetiky ULBLD,

1. LF UK a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

e-mail: tomas.stopka@lf1.cuni.cz

Literatura

- Hu Z, Negrotto S, Gu X, et al. Decitabine maintains hematopoietic precursor self-renewal by preventing repression of stem cell genes by a differentiation-inducing stimulus. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(6):1536–1543.
- Curik N, Burda P, Vargova K, et al. 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia* 2012; 26(8):1804–1811.
- Polgarova K, Vargova K, Kulvait V, et al. Somatic mutation dynamics in MDS patients treated with azacitidine indicate clonal selection in patients-responders. *Oncotarget* 2017; 8(67):111966–111978.
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011; 364(26):2496–2506.
- Kakinoki Y, Kubota H, Yamamoto Y. CD64 surface expression on neutrophils and monocytes is significantly up-regulated after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor during CHOP chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Hematol.* 2004; 79(1):55–62.
- Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2014;32(25):2691–2698.
- Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* 2014; 124(17):2705–2712.