

# 1. interim analýza randomizované otevřené klinické studie GA-MDS/2013

„Příspěvek k ověření účinnosti přidání granulocyty stimulujícího faktoru (G-CSF) k dosavadní terapii (5-AZACYTIDINEM) nemocných s myelodysplastickým syndromem“

| Nina Dusílková<sup>1,2</sup>, Lubomír Minařík<sup>1,2</sup>, Tomáš Stopka<sup>1,2</sup>, Anna Jonášová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>BIOCEV 1. LF UK, Vestec

<sup>2</sup>I. interní klinika – klinika hematologie VFN a 1. LF UK v Praze

## Abstrakt

Myelodysplastický syndrom je vysoce heterogenní onemocnění s vysokou incidencí u pacientů staršího věku a vysokou mortalitou. Výsledky léčby několika preparáty, které jsou v léčbě tohoto onemocnění účinné, zatím nepřinášejí očekávaný prospěch pro pacienty s myelodysplastickým syndromem s vysokým rizikem, proto se autoři této studie rozhodli zkoumat vhodné kombinace stávající terapie azacytidinem s dalšími léčivy. Po pečlivém zhodnocení dosavadních výsledků byla vybrána kombinace azacytidinu a faktor stimulujiící granulocytární kolonie. Studie GA-MDS/2013, porovnáující účinky kombináční terapie a monoterapie azacytidinem, byla schválena Státním ústavem pro kontrolu léčiv a etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. V průběhu prvního roku klinického hodnocení bylo zařazeno 25 pacientů (cílový počet pacientů je stanoven na 134). Studie GA-MDS/2013 je bezpečná ve smyslu srovnatelné progresse do akutní myeloidní leukemie v obou ramenech. Ve vybraných parametrech klinického hodnocení jsou trendy, jež naznačují benefit kombináční terapie, ale pro malý počet pacientů a krátkou dobu trvání studie nejsou tyto změny zatím statisticky signifikantní.

**Klíčová slova:** MDS, azacytidin, G-CSF, interim analýza, klinická studie

## Abstract

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous disease with high incidence in elderly patients and with high mortality rate. The results of the treatment with few drugs effective for this disease are not fully optimal for patients at high risk of MDS. Therefore, the authors of the study decided to study combination of existing

demethylation therapy for MDS with other drugs. After a careful evaluation of existing research results was selected a combination of azacitidine and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). The GA-MDS/2013 study comparing the effects of combination therapy with azacitidine monotherapy was approved by the National Institute for Drug Control and the Institutional Ethics Committee. 25 patients of 134 are currently enrolled in the clinical trial. The GA-MDS/2013 study is safe and does not lead to higher progression to AML (Acute Myeloid Leukemia) compared to the control arm. Selected clinical parameters indicate the benefit of combination therapy although they are not significant due to a small number of patients and a yet short duration of the study.

**Klíčová slova:** myelodysplastic syndrome, azacitidine, G-CSF, interim analysis, clinical study

## Úvod

Myelodysplastický syndrom (dále jen „MDS“) je dynamicky probíhající onemocnění, jehož přechod do akutní myeloidní leukemie (dále jen „AML“) či do jiných hematologických entit typu aplazie, myelofibrózy či atypické myeloproliferace nelze zatím ani predikovat, ani účinně ovlivnit. MDS se projevuje periferní cytopenií a myelodysplazií v kostní dřeni. Od klinicky zjevného nedostatku normálních krevních elementů a akumulace krevních nádorových buněk (klonálních myeloblastů) postupně progreduje. I přes stálý intenzivní výzkum je MDS jednou z nejobtížněji léčitelných hematologických malignit (1).

Od roku 2009, kdy byl na trh uveden azacytidin, nedošlo v Evropě ani přes veškeré úspěchy z posledních let, pokud jde o lepší

pochopení patofyziologických mechanismů MDS, k registraci žádného dalšího léku pro pacienty s MDS s vysokým rizikem. Azacytidin pro odbornou veřejnost a pacienty znamená velký pokrok, ale stále je vysoké procento nemocných, kteří na tuto terapii neodpoví nebo odpověď v průběhu léčby ztratí a následující průběh onemocnění se stává velmi nepříznivým.

Klinický výzkum se proto v současné době zaměřuje na zvyšování počtu odpovědí na léčbu a prodloužení doby do selhání terapie u již léčených pacientů s MDS. Takovou cestou se aktuálně zdá být výzkum experimentálně potvrzených lékových kombinací.

### Design studie GA-MDS/2013

#### Studie (klinické hodnocení)

Existuje literárně podpořený předpoklad dvou nezávislých preklinických studií, že aktivace zrání bílých krvinek pomocí dvou léků – hypometylačního agens azacytidinu (eventuálně decitabinu) a cytokinu zvaného faktor stimulující granulocytární kolonie (dále jen „G-CSF“) – povede k jejich synergickému efektu (4, 5) a tím dojde k potlačení nádorové klonální krve tvorby a současně k obnově normální krve tvorby v kostní dřeni.

Oba preparáty, azacytidin i G-CSF (6,7), jsou dnes každý zvlášť či v kombinaci s jinými léky součástí běžné terapie nemocných s MDS. Azacytidin se používá k potlačení nádorového růstu, při kterém díky hypermethylovači inhibitorů buněčného cyklu (proteinu p15INK4b, jenž je kódován genem CDKN2B) unikají leukemické buňky kontrole buněčné proliferace (2, 3). G-CSF podporuje tvorbu neutrofilních granulocytů skrze vazbu na svůj receptor na myeloidních progenitorech a aktivace klíčových transkripčních faktorů (PU.1, kódován genem SPI1) stimuluje diferenciaci kmenových buněk (8).

Nedávné výzkumy ukázaly, že preinkubace normálních kmenových buněk *in vitro* s G-CSF před aplikací inhibitoru DNA methylace je zapotřebí k tomu, aby došlo k účinné podpoře diferenciačního programu buněk (9). Cílem klinické studie GA-MDS/2013 je proto testování předpokládaného vzájemně synergického vlivu preparátů G-CSF a azacytidinu v definovaném režimu.

Design studie byl navržen tak, aby byly splněny předpoklady pro postupnou aktivaci programu krve tvorné diferenciace s G-CSF (a to především granulocytů) a tím se posílil prodiferenční vliv následně podané hypometylační terapie. První dávka G-CSF (30 či 48 MU subkutánně) je aplikována dva dny před podáním první dávky azacytidinu. Druhá dávka G-CSF je aplikována dva dny před 6. dávkou azacytidinu v režimu 5-2-2 (obvykle používaná dávka 75 mg/m<sup>2</sup>/den subkutánně s možností redukce dávky). Podání G-CSF tedy vždy o dva dny předchází

podání azacytidinu. Všechny cykly jsou podány ve stejném režimu. Celková délka kombinované léčby trvá minimálně 4 měsíční cykly s následným hodnocením odpovědi v kostní dřeni. V případě odpovědi léčba pokračuje dalšími 4 měsíčními cykly.

#### Pacienti

Klinické hodnocení je založeno na porovnání 134 pacientů s MDS s vyšším rizikem v průběhu plánovaných 5 let (pacienti s MDS léčeným podle předloženého návrhu medikace) v randomizované studii buď s, nebo bez podání G-CSF ve stanoveném režimu, a to v poměru 2 : 1. Do studie jsou zařazováni pacienti, kteří nejsou předlčení hypometylační terapií. Jedná se o pacienty starší 18 let, ve středním a vyšším riziku dle IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System), kteří nejsou kandidáty na transplantaci kostní dřene.

#### Cíl studie

Studie testuje a porovnává účinnost léčby azacytidinem v kombinaci s G-CSF, tj. rameno G-AZA dle schváleného protokolu studie GA-MDS/2013, ve srovnání s účinností léčby standardně podávaným azacytidinem, tj. rameno AZA u pacientů s MDS s vysokým rizikem (původně IPSS int-2 a high).

Hodnoceny jsou tyto parametry:

- celkové přežívání (overall survival, OS);
- počet navozených odpovědí, tj. kompletních/parciálních remisí, a hematologických odpovědí dle IWG (International Work Group) (10);
- doba do transformace do AML (progression free survival, PFS);
- dosažení transfuzní nezávislosti.

#### Výsledky

Ke dni interim analýzy (tj. po ukončení 1 roku studie) bylo do klinického hodnocení zařazeno celkem 25 pacientů po splnění vstupních kritérií a po podpisu informovaného souhlasu s účastí ve studii. Všichni pacienti byli léčeni na I. interní klinice VFN v Praze. Randomizace pacientů byla provedena v souladu se schváleným postupem studie (v rameni G-AZA bylo 18 pacientů, v rameni AZA 7 pacientů). Celkem bylo zařazeno 16 mužů a 9 žen, s mediánem věku 73 let. Každý ze zařazených do doby interim analýzy absolvoval nejméně 1 cyklus terapie. Dle klasifikace WHO z roku 2008 bylo největší procento pacientů v době vstupu do studie ve stadiu refrakterní anémie s 10 až 20% myeloblastů v kostní dřeni (RAEB2/EB2), s vysokým rizikem dle IPSS-R a normální cytogenetikou (tabulka č. 1).

#### Celkové přežívání

Přežívání účastníků studie bylo hodnoceno po prvním roce

Tabulka č. 1: Základní charakteristika pacientů ve studii GA-MDS/2013 (po prvním roce klinického hodnocení)

	G-AZA	AZA	Total
muži (počet pacientů)	10	6	16
ženy (počet pacientů)	8	1	9
věk (medián)	65–86 (71)	69–83 (74)	65–86 (73)
MDS WHO 2008 klasifikace			
RCMD (MLD)	1	0	1
RAEB 1 (EB1)	2	0	2
RAEB 2 (EB2)	10	6	16
AML/MDS	4	2	6
IPSS-R skóre			
intermediate	6	1	7
high	4	6	10
very high	7	1	8
IPSS-R cytogenetika			
very good	1	0	1
good	4	8	11
intermediate	5	3	8
poor	5	0	5

Zkratky: RCMD (MLD) – refrakterní anémie s multilineární dysplazií, RA(EB) 1 (2) – refrakterní anémie s excesem blastů 1 (2)  
 Pozn.: Studie se připravovala v letech 2013–2015, proto byla v protokolu použita klasifikace podle WHO z roku 2008.

klinického sledování. Porovnávala se obě ramena studie: rameno G-AZA (počet pacientů  $n = 18$ ), rameno AZA ( $n = 7$ ). Pro ilustraci léčebných výsledků byla využita historická data pacientů léčených azacytidinem ve stejném hematologickém centru v roce 2016 ( $n = 16$ ). Rozdíly obou křivek přežívání v případech studie (G-AZA a AZA) a retrospektivní data (AZA 2016) nejsou dle log-rank testu signifikantní. V tuto chvíli jsou výsledky G-AZA v porovnání s ramenem AZA minimálně podobné, tzn. že nebyl zaznamenán negativní trend tohoto ramene (graf č. 1).

### Progrese onemocnění

Klinické hodnocení GA-MDS/2013 bylo nastaveno tak, aby bylo co nejdříve jasné, zda může podávání G-CSF u pacientů s MDS s vysokým rizikem vést k výskytu čtenější transformace do AML. Během ročního sledování byla incidence transformace do AML na 1 pacienta v obou ramenech přibližně totožná: 0,35 pro G-AZA a 0,25 pro rameno AZA. Pro odhad celkového trendu se ramena porovnávala s retrospektivními údaji o transformaci do AML u pacientů léčených konvenční terapií AZA v roce 2016, který je 0,30. Rozdíly mezi rameny klinického hodnocení nejsou signifikantní. Na základě dosavadních výsledků se domníváme, že kombinace konvenční terapie azacytidinem s G-CSF nezvyšuje riziko transformace do AML vůči rameni AZA (graf č. 2).

### Doba transformace do AML (progression free survival, PFS)

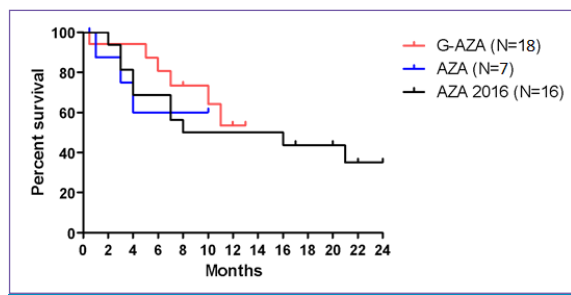
Doba přežití pacientů bez progrese do AML nebo bez jakéhokoli zhoršení klinického stavu, který by splňoval kritéria pro výstup ze studie, byla pro pacienty v rameni AZA průměrně 4,8 měsíce. Pro pacienty v rameni G-AZA činil PFS 7,0 měsíců. Z důvodu krátkého sledování (13 měsíců) není zatím tyto výsledky možné porovnávat retrospektivně s PFS pacientů v konvenční terapii (AZA 2016). Tento parametr bude řešen v následujících interim analýzách.

### Hematologická odpověď ve studii GA-MDS/2013

Ke dni interim analýzy bylo možno zhodnotit efekt terapie pouze u 20 pacientů (z 25), zatímco ostatní pacienti ve studii pokračují v léčbě do vyšetření kostní dřeně po 4 cyklech terapie (trepanobiopsie kostní dřeně s provedením histologického, cytologického a flowcytometrického vyšetření) (tabulka č. 2).

Stav transfúzní nezávislosti všech pacientů byl ve studii hodnocen ke konci prvního roku jejího trvání. V rameni AZA ( $n = 7$ ) bylo transfúzně dependentních 5 pacientů (71 %) a v rameni G-AZA ( $n = 18$ ) jich bylo 11 (61,1 %). Transfúzně nezávislých bylo v rameni G-AZA 7 pacientů a v rameni AZA byli 2. Z recentně koanalyzovaných pacientů léčených AZA v roce 2016 ( $n = 16$ ) bylo transfúzně dependentních 10 (62,5 %) (tabulka č. 3).

**Graf č. 1:** Celkové přežívání pacientů s MDS ve studii GA-MDS/2013 (po prvním roce klinického hodnocení) v porovnání s přežíváním pacientů léčených azacytidinem v roce 2016



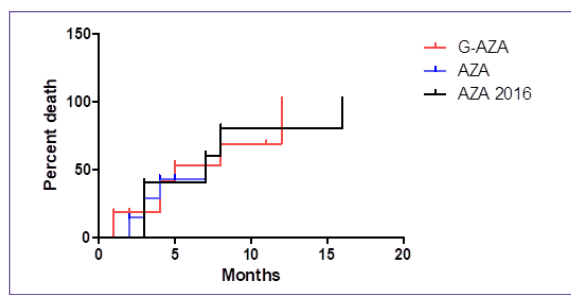
#### Legenda:

G-AZA – rameno studie léčby azacytidinem v kombinaci s G-CSF

AZA – rameno studie léčby azacytidinem

AZA 2016 – recentní data pacientů léčených azacytidinem od roku 2016; pro ilustraci výsledků studie

**Graf č. 2:** Progrese onemocnění (transformace do AML) pacientů s MDS ve studii GA-MDS/2013 (po prvním roce klinického hodnocení)



Za dobu trvání studie došlo pouze u 3 pacientů k dosažení úplné transfuzní nezávislosti, a to u 1 pacienta v rameni AZA a u 2 pacientů v rameni G-AZA. Podrobnější rozbor (co se týče počtu transfuzí, rozdělení podle jejich druhu (erytrocytární × trombocytární)) bude proveden v následující interim analýze.

#### Analýza maturace granulocytů pomocí průtokové cytometrie (FACS)

Pro sledování účinku G-CSF na terapii azacytidinem již bylo 14 pacientů vyšetřeno pomocí průtokové cytometrie periferní krve. Vyšetřeny byly znaky maturace granulocytární řady (grafy č. 3 a 4). Náběry krve probíhaly před zahájením podávání G-CSF a azacytidinu (D -1), kontrolní změření proběhlo v odstupu přibližně jednoho týdne (D +7). Z dat jsme pozorovali nárůst „zralejších“ markerů, jako je CD64+, v období po podání terapie v rameni s G-CSF. Potřebná je však širší analýza dalších pacientů v průběhu studie.

#### Diskuze

Studie GA-MDS/2013 (otevřená, randomizovaná) s účastí pa-

**Tabulka č. 2:** Celkový počet navozených odpovědí na terapii (IWG 2006) pacientů ve studii GA-MDS/2013

	CR	PR	SD	PD	Total
G-AZA	3 (21 %)	4 (29 %)	2 (14%)	5 (36 %)	14
AZA	1 (17 %)	1 (17 %)	0 (0%)	4 (67 %)	6
Total	4 (20 %)	5 (25 %)	2 (10%)	9 (45 %)	20

Zkratky: CR – kompletní remise, PR – partiální remise, SD – stabilní onemocnění (stable disease), PD – progrese onemocnění

**Tabulka č. 3:** Počet pacientů nezávislých na transfuzích ve studii GA-MDS/2013

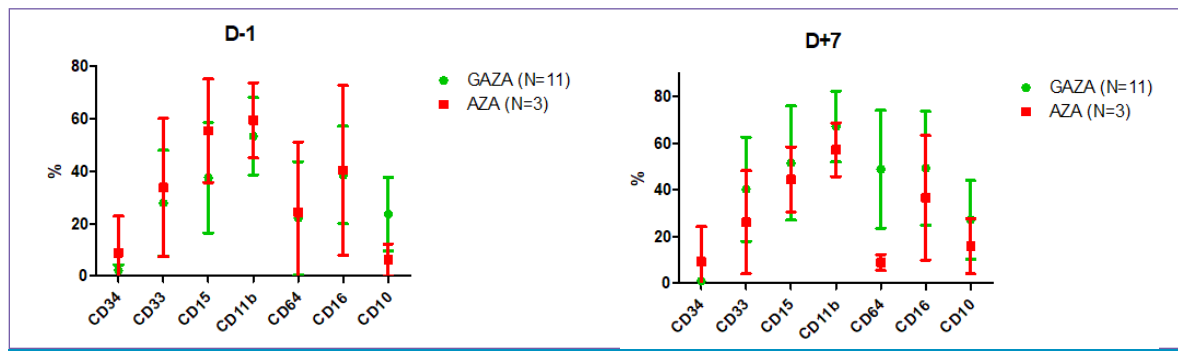
	TRF závislé	TRF nezávislé	Total
G-AZA	11 (61,1 %)	7 (38,9 %)	18
AZA	5 (71 %)	2 (29 %)	7
Total	16	9	25

Zkratky: TRF – transfuzně

cientů s MDS s vysokým rizikem po prvním roce trvání demonstrovala, že podávání G-CSF v kombinaci s azacytidinem je v tuto chvíli a v tomto stadiu hodnocení bezpečné. Rozdíly mezi dobou transformace do AML u pacientů v ramenech G-AZA a AZA bylo prakticky totožné. Ve srovnání s recentními výsledky hodnocení PFS pacientů léčených azacytidinem v roce 2016 je zřejmé, že podání G-CSF nezvyšuje riziko transformace do AML. Toto zjištění se může opřít například o výsledky studie, která hodnotila 972 pacientů po autologní transplantaci s podáním G-CSF v porovnání s 1121 pacienty po transplantaci bez podání G-CSF. Incidence relapsu do AML po 5 letech u skupiny léčené posttransplantačně G-CSF byla 38 % vs. 43 % u pacientů bez G-CSF ( $p = 0,46$ ). Nebyl prokázán žádný vliv použití G-CSF v parametru relapsu do AML (tzv. leukemia-free survival) (11). Při metaanalýze 6 randomizovaných kontrolních studií zahrnujících celkem 414 pacientů nebylo zaznamenáno zvýšení rizika progrese do AML mezi skupinou pacientů léčených růstovými faktory a kontrolní skupinou (12).

U pacientů v rameni G-AZA bylo dosaženo celkově vyššího procenta hematologických odpovědí (CR a PR 50%) než v rameni AZA (CR a PR 34 %). Mechanismus možného ovlivnění růstu, diferenciací či navození buněčné apoptózy leukemických buněk pomocí G-CSF zatím ještě není objasněn (13). Je zde ale možný předpoklad genetické predispozice, kdy pacienti mohou dosáhnout lepší hematologické odpovědi při léčbě s G-CSF (14). Zapojení panelu sekvenování bodových mutací pro všechny pacienty

Grafy č. 3 a 4: Zastoupení granulocytární řady v krvi pacientů ve studii GA-MDS/2013 den před podáním terapie (D -1) a sedm dní po něm (D +7). Na ose y jsou procenta buněk exprimujících daný povrchový antigen.



ve studii G-AZA v tom pomůže a povede k objasnění vyšší odpovědi v rameni G-AZA v následujících interim analýzách.

Dle dosavadních výsledků průtokové cytometrie je ve studii pozorován vliv G-CSF na vyvíjející se progenitory a „zralejší“ granulocytární krevní buňky. Po podání G-CSF viditelně narůstají populace buněk v periferní krvi ve znacích CD64+ a CD16+ (monocytární markery) a dále je patrný i mírný nárůst CD10+ (neutrofilní marker). Je však potřeba širší analýzy dalších pacientů v průběhu studie, a to především v počtu febrilních neutropenií či infekčních komplikací, jež budou hodnoceny v dalších interim analýzách.

Podpora grantovými prostředky: AZV 16-27790A, 16-05649S, UNCE/MED/016, SVV 260374/2017, GAČR 18-01687S, Progres Q26, Q28 a LQ1604.

MUDr. Nina Dusílková  
BIOCEV 1. LF UK, Vestec

I. interní klinika – klinika hematologie VFN  
a 1. LF UK v Praze  
e-mail: [Nina.Dusilkova@lf1.cuni.cz](mailto:Nina.Dusilkova@lf1.cuni.cz)

#### Literatura

- Platzbecker U, Santini V, Mufti GJ, et al. Update on developments in the diagnosis and prognostic evaluation of patients with myelodysplastic syndromes (MDS): consensus statements and report from an expert workshop. *Leuk Res.* 2012;36(3):264–70.
- Raj K, John A, Ho A, et al. CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacitidine. *Leukemia.* 2007;21(9):1937–44.
- Quesnel B, Fenaux P. P15INK4b gene methylation and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 1999;35(5–6):437–43.
- 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):1804–11.

- Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, Zikmund T, Stopka T. Epigenetic control of SP11 gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5. *PLoS One.* 2014;9(2):e87448.
- Steensma DP. Hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol.* 2011;38(5):635–47.
- Casadevall N, Durieux P, Dubois S, et al. Health, economic, and quality-of-life effects of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of myelodysplastic syndromes: a randomized, controlled trial. *Blood.* 2004;104(2):321–7.
- Anderson KL, Smith KA, Perkin H, et al. PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood.* 1999;94(7):2310–8.
- 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):1536–43.
- Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, Pinto A, Beran M, de Witte TM, Stone RM, Mittelman M, Sanz GF, Gore SD, Schiffer CA, Kantarjian H. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood.* 2006 Jul 15;108(2):419–25.
- Czerw T, Labopin M, Gorin NC, Giebel S, Blaise D, Dumas PY, Foa R, Attal M, Schaap N, Michallet M, Bonmati C, Veelken H, Mohty M. Use of G-CSF to hasten neutrophil recovery after auto-SCT for AML is not associated with increased relapse incidence: a report from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Jul;49(7):950–4.
- Gurion R, Gafter-Gvili A, Paul M, et al. Hematopoietic growth factors in aplastic anemia patient treated with immunosuppressive therapy-systematic review and meta-analysis. *Haematologica.* 2009 May;94(5):712–9.
- Picciluga PP, Martinelli G, Malagola M, et al. Complete remission in acute myeloid leukemia with granulocyte-colony stimulating factor without chemotherapy: report of cytogenetic remission of a t(9;11)(p22q23) positive AML patient and review of literature. *Haematologica.* 2003 Aug;88(8):EKR28.
- Beekman R, Touw IP. G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. *Blood.* 2010 Jun 24; 115(25):5131–6.