

PERFILES FARMACOLÓGICOS EX VIVO DE 16 FÁRMACOS EN 23 MUESTRAS DE MEDULA ÓSEA DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Josep Maria Ribera¹, Albert Oriol¹, Joaquín Martínez López², Pau Montesinos³, Mar Tormo⁴, Jose Gonzalez Campos⁵, Carlos Grande², Salut Brunet⁶, Jordi Esteve⁷, Pascual Fernandez⁸, Gabriela Rodriguez⁹, Raimundo García¹⁰, Pere Barba¹¹, María Luz Amigo¹², Arancha Bermúdez¹³, Ataulfo Gonzalez¹⁴, Daniel Primo¹⁵, Pilar Hernández-Campo¹⁵, Julian Gorrochategui¹⁵, Belén Liébana¹⁵, Teresa A. Bennett¹⁵, Joan Ballesteros¹⁵

¹Haematology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, ²Haematology, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, ³Haematology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, ⁴Haematology, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, ⁵Haematology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, ⁶Haematology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, ⁷Haematology, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, Barcelona, ⁸Haematology, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, ⁹Haematology, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid, ¹⁰Haematology, Hospital General de Castellón, Castellón, ¹¹Haematology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, ¹²Haematology, Hospital General Universitario Morales Meseguer, Murcia, ¹³Haematology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Cantabria, ¹⁴Haematology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, ¹⁵Vivia Biotech, Madrid,

ABSTRACT

Fundamento y Objetivo: Vivia Biotech, en colaboración con PETHEMA, ha desarrollado un método automatizado de citometría de flujo para medir en muestras de pacientes, el perfil farmacológico de fármacos empleados en el tratamiento del Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Para ello, se ha utilizado una metodología equivalente a la empleada en el estudio de Leucemia Mieloide Aguda. El objetivo de este estudio es conocer el efecto farmacológico ex vivo de fármacos usados en el tratamiento de LLA frente a la población de células patológicas presentes en muestras de médula ósea (MO) de pacientes con esta enfermedad.

Métodos y pacientes: Se enviaron a Vivia Biotech muestras de MO de 23 pacientes diagnosticados de LLA desde 16 hospitales de toda España. Estas fueron incubadas durante 48h con 8 concentraciones diferentes de cada fármaco, utilizando la muestra total. Tras la incubación, las células fueron analizadas en nuestra plataforma ExviTech®. La actividad de los fármacos se midió por la depleción celular, identificando los blastos patológicos con anticuerpos monoclonales y la viabilidad mediante Anexina V-FITC. Utilizando modelos farmacológicos estándar, se estimó para cada fármaco listado en la tabla la potencia (EC50) expresada como concentración de fármaco y la variabilidad interindividual, determinada por los percentiles 10 y 90.

Resultados: En el tratamiento de la LLA, se utilizan fármacos de muy diversos grupos terapéuticos, siendo los más utilizados las antraciclinas, vincristina, glucocorticoides y L-asparaginasa. Nuestros resultados muestran, que tanto las antraciclinas como la vincristina presentaron la mayor potencia ex vivo, mientras que en el caso de los glucocorticoides, destaca la gran variabilidad en su actividad entre los pacientes. Los análogos de nucleósidos, fludarabina y la catarabina, empleados en recaídas, presentan una potencia ex vivo similar. Se incluye en este estudio el perfil farmacológico de los inhibidores de tirosincinasa, utilizados en LLA Ph+.

METHODS

ExviTech® Platform

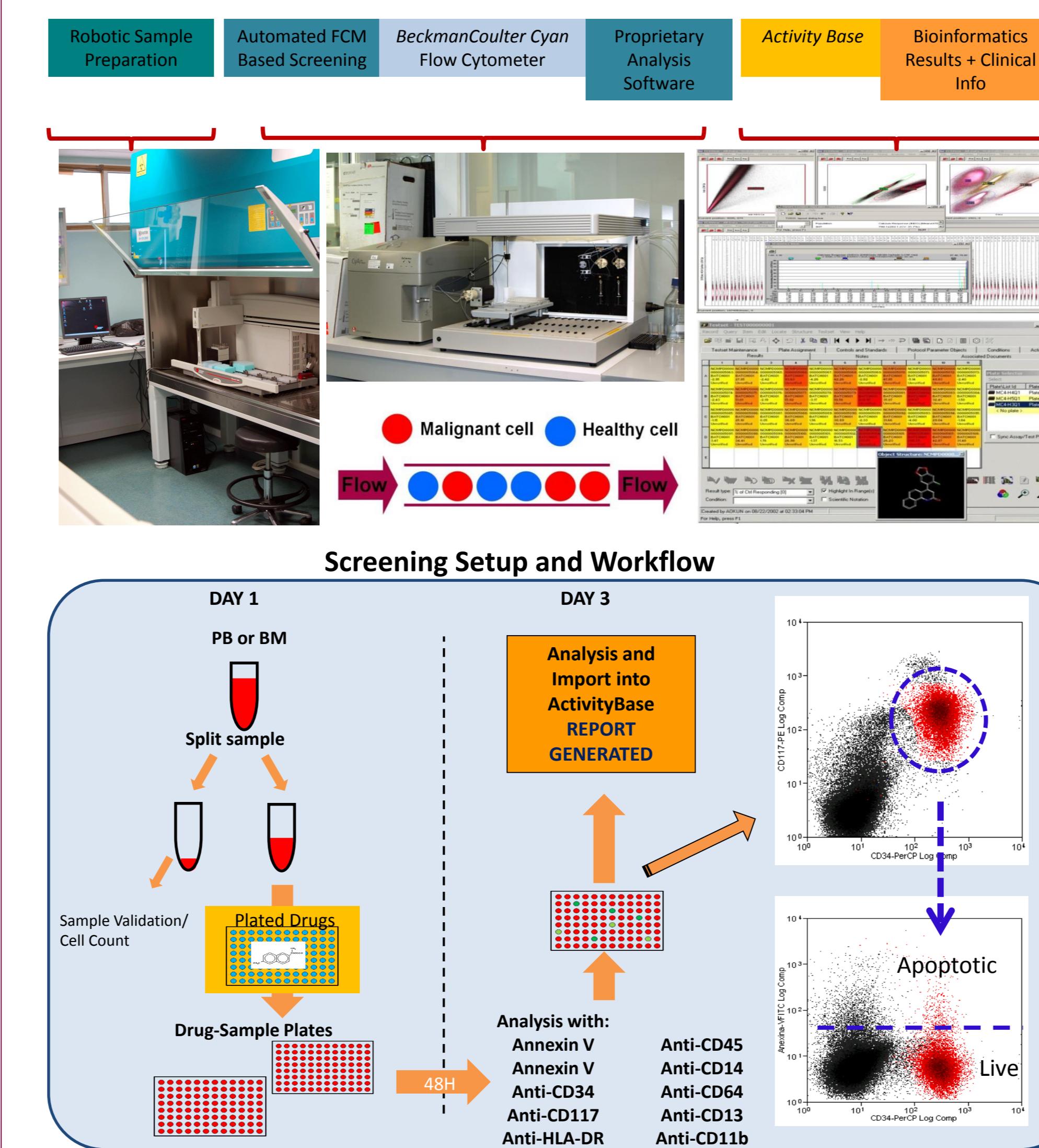
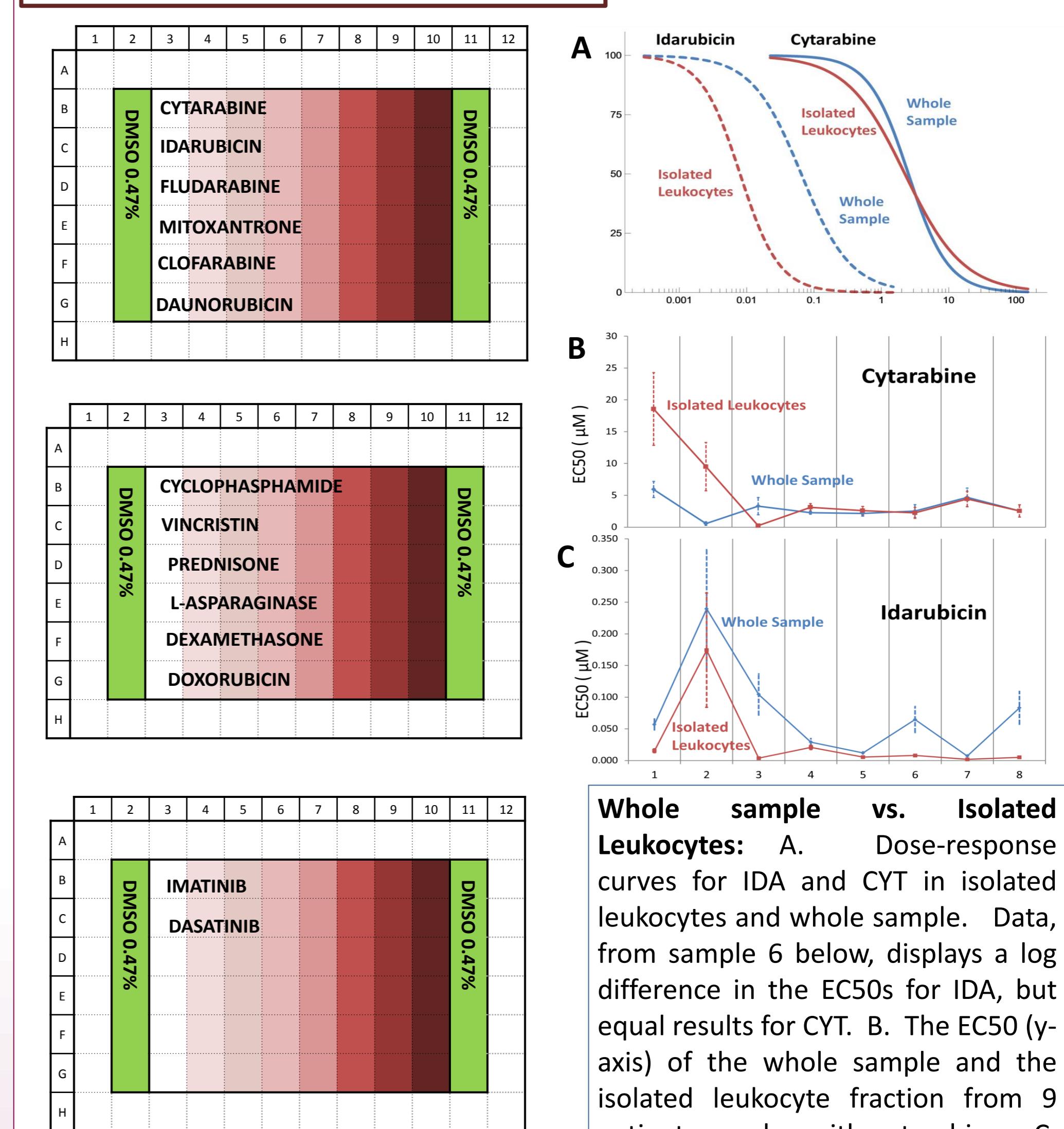


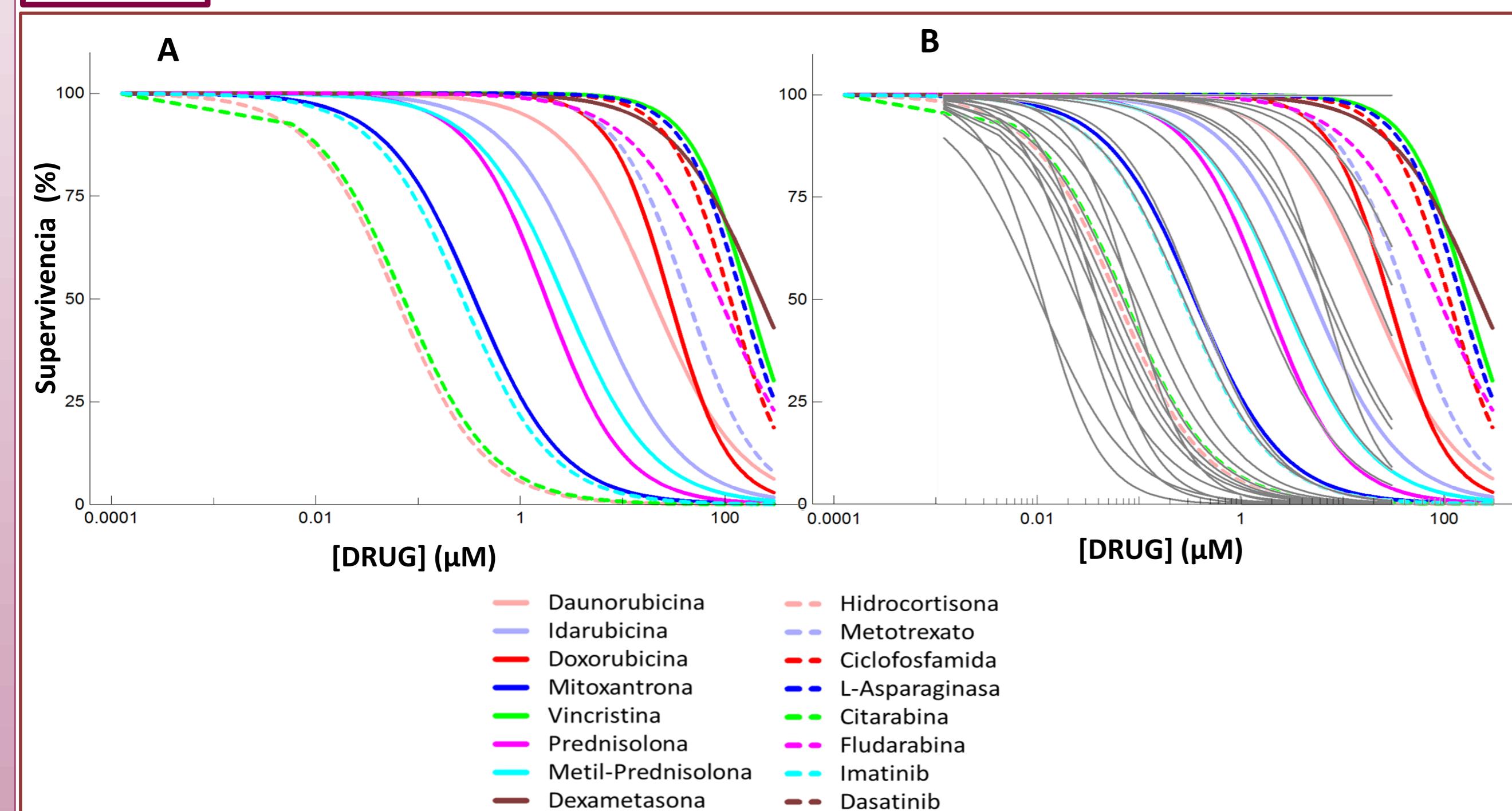
PLATE SETUP

Eight different concentrations of each drug or drug combination is run for the used treatment protocols.



RESULTS

Figure 1 Pharmacologic Profile of ex vivo response to each drug.



A. Median curves from 16 drugs. The Survival Index (y-axis) ranges from 100% to 0 displaying the selective ALL cell depletion calculated with a Sigmoidal Dose-Response Model. B. The curves from A. overlaid on 18 individual dose-response curves to Vincristine.

Figure 2

Dose-response analysis was completed for individual drug in 12-20 ALL patient bone marrow samples. The Survival Index (y-axis) ranges from 100% to 0 displaying the selective ALL cell depletion. The grey lines display each individual response with the average response shown in red.

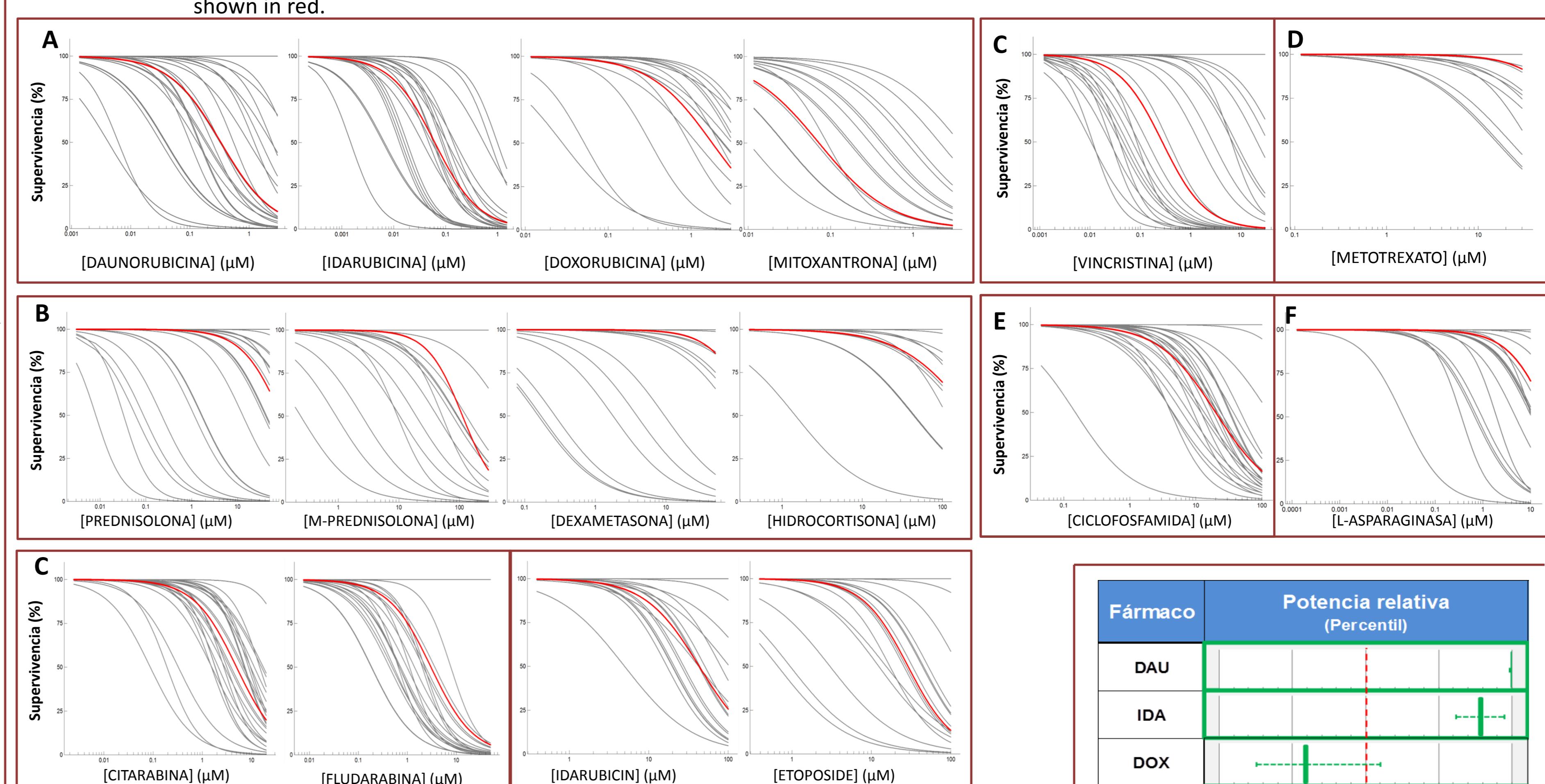


Tabla 1 Drug Potency and their Interpatient Variability

FARMACO	EC50 (μM)			Familia/Mecanismo de acción.	
	N	PERC.10	MEDIANA	PERC.90	
DAUNORUBICINA	19	0.0268	0.1939	4.8186	Antraciclinas
IDARUBICINA	20	0.0122	0.0594	0.5648	
DOXORUBICINA	14	0.5089	2.7867	5.9665	
MITOXANTRONA	15	0.0127	0.1791	1.6942	
VINCRISTINA	18	0.0350	0.1162	25.2148	Alcaloide-Antimitótico
PREDNISOLONA	18	0.1651	41.6642	3.34E+14	Glucocorticoides
METIL-PREDNISOLONA	14	4.5763	64.9463	3.43E+15	
DEXAMETASONA	14	0.7232	228.5377	1.71E+13	
HIDROCORTISONA	12	43.8029	226.9258	1.57E+11	
METOTREXATE	13	20.6498	100.4250	3.33E+15	Antifólato
CICLOFOSFAMIDA	18	5.6725	17.9834	71.3868	Alquilante
L-ASPARAGINASA	18	0.2499	10.9617	2.37E+13	Inh. Síntesis proteinas.
CITARABINA	19	1.5588	6.3963	16.3963	Nucleósidos
FLUDARABINA	19	0.4796	1.4076	1.68E+12	
IMATINIB	14	17.8654	43.2928	318.8014	Inhibidores tirosincinasa
DASATINIB	14	1.5670	30.9244	1.44E+15	

Figure 3 Pharmacologic Profile of ex vivo response to each drug.

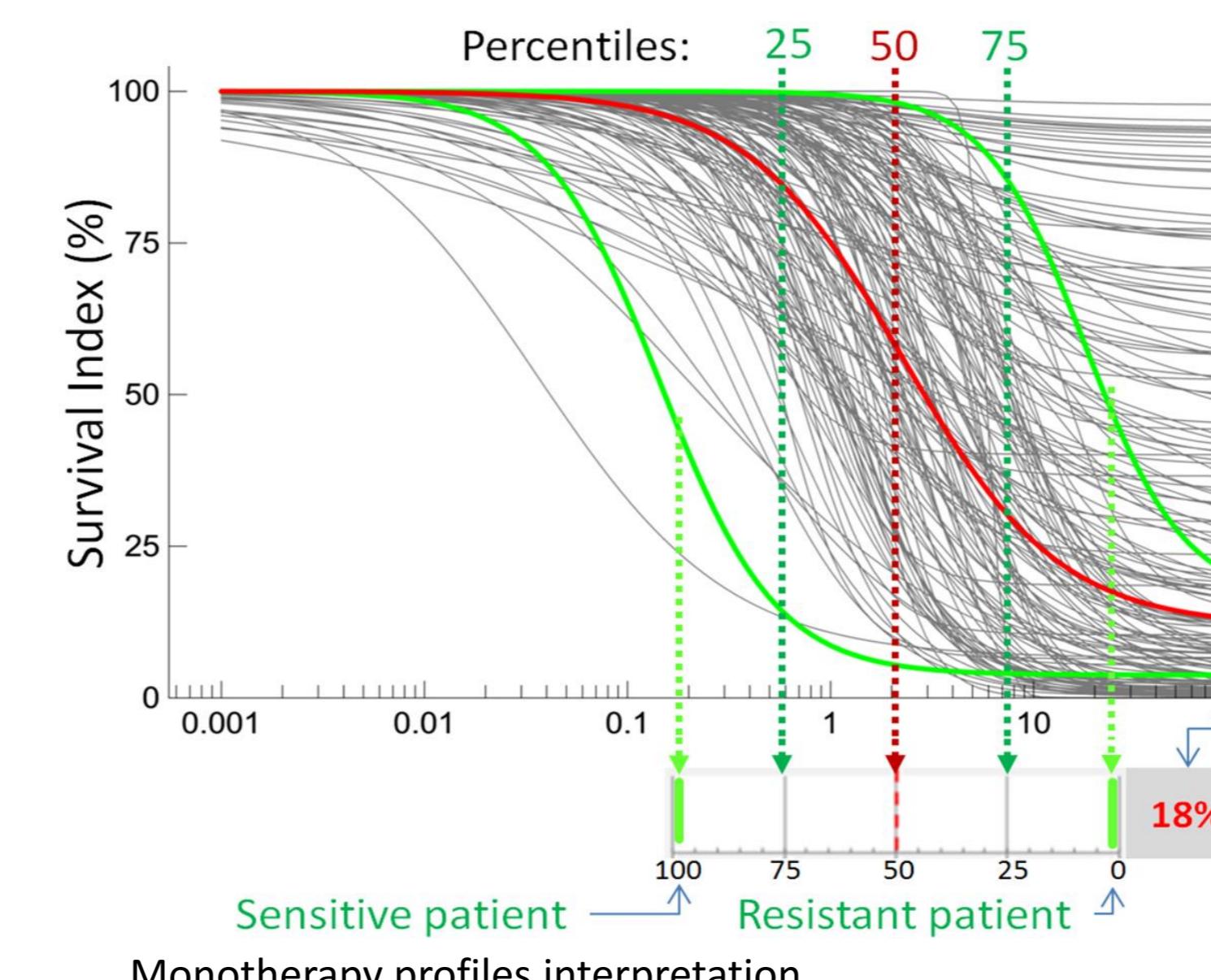
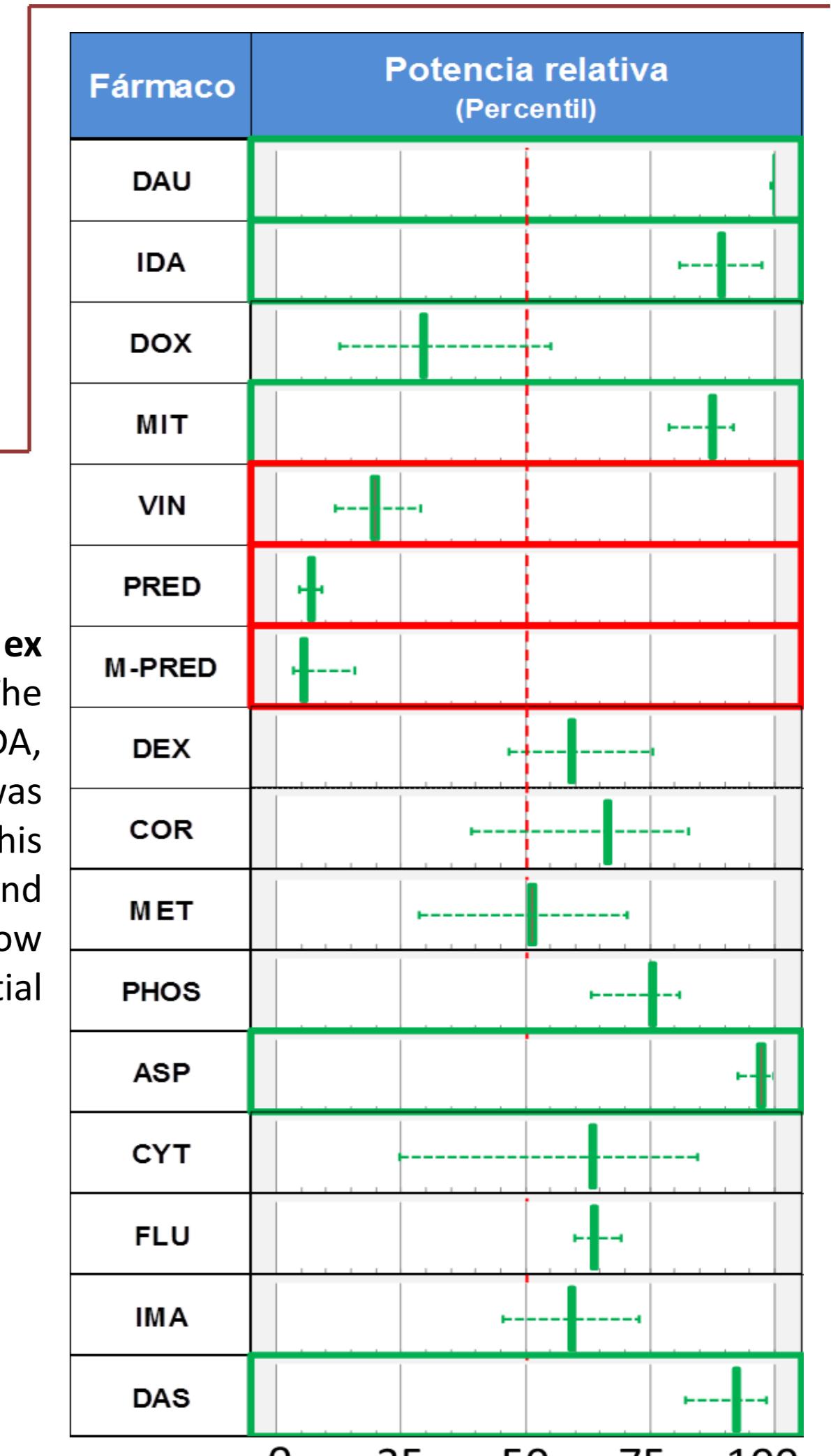


Figure 6

Pharmacological Profiles ex vivo of monotherapy. The relative potency of DAU, IDA, MIT, ASP and DAS, was significantly high in this patient, while VIN, PRE and Me-PRE showed very low potency, limiting their potential therapeutic effect.



CONCLUSIONS

- We have developed an automated system that, in a fast and accurate way, is able to determine the ex vivo sensitivity of ALL samples to many different drugs.
- This approach could be used as a companion diagnostic to identify subsets of patients for which new treatments could be effective because of the high interpatient variability observed.
- The Pharmacological Profiles could be used to personalize treatment for individual patients.
- Correlation of this ex vivo sensitivity with the clinical efficacy is currently being performed in a study under the supervision of the PETHEMA group.

Grants supporting this work:

Programa PRIMER Castilla y Leon (04/09/AS/0028)

ADE Medicina Personalizada 2007 (04/06/SA/0009)

Programa Reindustrialización 2011 MITYC (REI-040000-2011-777)

Programa Torres Quevedo, MICINN

Programa Innorpora, MICINN

ACKNOWLEDGEMENTS

Special Thanks to the Patients and Hospitals for Providing the Samples (listed alphabetically)

- Hospital Clínico San Carlos, MADRID
- Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, BARCELONA
- Hospital Doce de Octubre, MADRID
- Hospital General Universitario de Alicante, ALICANTE
- Hospital Germans Trias i Pujol, BARCELONA
- Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, BARCELONA
- Hospital Vall d'Hebron, BARCELONA
- Hospital Marqués de Valdecilla, CANTABRIA
- Hospital Clínico de Valencia, VALENCIA
- Hospital Universitario Central de Asturias, OVIEDO
- Hospital Universitario de Canarias, TENERIFE
- Hospital Universitario General de Castellón, CASTELLÓN
- Hospital Universitario Gregorio Marañón, MADRID
- Hospital Universitari i Politècnic La Fe, VALENCIA
- Hospital Universitario Virgen Macarena, SEVILLA
- Hospital Universitario Virgen del Rocío, SEVILLA
- Hospital Morales Meseguer, MURCIA
- Hospital Clínico de Salamanca, SALAMANCA
- Hospital Joan XXIII, TARRAGONA