

TEST DE MEDICINA PERSONALIZADA POR FARMACOLOGÍA EX VIVO EN AMBIENTE NATIVO PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

BALLESTEROS JOAN ; MARTÍNEZ LÓPEZ JOAQUÍN ; MARTÍNEZ DAVID ; SERRANO JOSEFINA ; FERNÁNDEZ ABELLÁN PASCUAL ; GARCÍA BOYERO RAIMUNDO ; RODRÍGUEZ GABRIELA ; HERRERA PUENTE PILAR ; VIDRIALES M^a BELÉN ; FERNÁNDEZ M^a ÁNGELES ; PÉREZ SIMÓN JOSÉ ANTONIO ; LLAMAS PILAR ; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ PILAR ; HERNÁNDEZ RIVAS JOSÉ ÁNGEL ; SIERRA GIL JORDI ; PÉREZ DE OTEYZA JAIME ; MONTESINOS FERNÁNDEZ PAU

Centros de trabajo: VIVIA BIOTECH; HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCE DE OCTUBRE; HOSPITAL UNIVERSITARI I POLITÈCNIC LA FE DE VALENCIA; HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA; HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE; HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓN; HOSPITAL GENERAL UNIVER SITARIO GREGORIO MARAÑÓN; HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL; HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SALAMANCA; HOSPITAL XERAL CIES; HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCÍO; HOSPITAL LUCUS AUGUSTI; HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN; HOSPITAL UNIVERSITARIO CLÍNICO SAN CARLOS; HOSPITAL UNIVERSITARIO PRÍNCIPE DE ASTURIAS; HOSPITAL CLÍNICO DE VALENCIA; HOSPITAL UNIVERSITARI GERMANS TRIAS I PUJOL; HOSPITAL UNIVERSITARIO QUIRÓN MADRID; HOSPITAL POVISA; HOSPITAL FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ; HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE; HOSPITAL UNIVERSITARIO INFANTA LEONOR; HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU; HOSPITAL UNIVERITARIO MADRID NORTE SANCHINARRO; HOSPITAL UNIVERSITARI I POLITÈCNIC LA FE DE VALENCIA

ABSTRACT

TEST DE MEDICINA PERSONALIZADA POR FARMACOLOGÍA EX VIVO EN AMBIENTE NATIVO PARA LMA

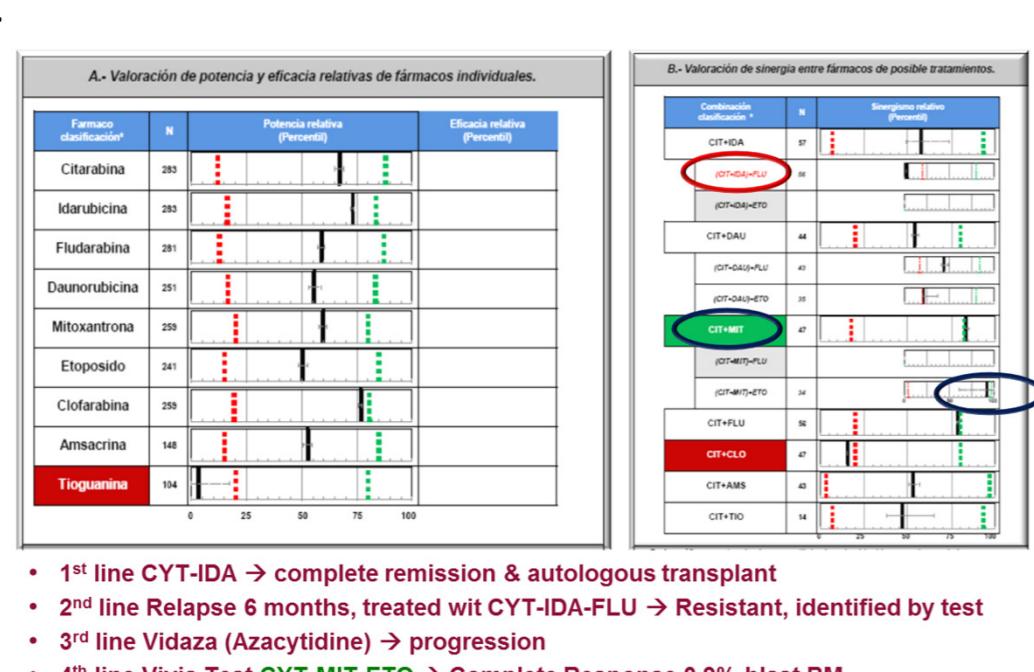
Introducción: Vivia Biotech analiza la actividad de los protocolos de tratamiento para LMA más frecuentes en Europa en muestras de pacientes ex vivo, mediante una plataforma automatizada de citometría de flujo (ExviTech®) preservando el Native Environment, que ha alcanzado alta (>80%) correlación clínica para la 1^a línea Citarabina más idarubicina.

Objetivo: Desarrollar un test de Medicina Personalizada ex vivo que identifique para cada paciente individual los tratamientos más sensibles o más resistentes.

Métodos y pacientes: 283 muestras de pacientes diagnosticados de LMA fueron enviadas a Vivia Biotech desde 43 hospitales españoles del grupo PETHEMA, en menos de 24 horas. La muestra completa fue aliquotada en placas de 96 pícolos con 8 concentraciones de cada fármaco. Tras 48h de incubación, se analizaron mediante la plataforma ExviTech®. El porcentaje de muerte celular de las células leucémicas se determinó marcándolas con anticuerpos monoclonales y Anexina V-FITC. Se calcularon curvas dosis respuesta para los fármacos mostrados en la gráfica. La sinergia se calculó para 13 combinaciones entre estos fármacos que representan los protocolos de tratamiento más utilizados en Europa, mostrados en el gráfico. La representación gráfica del test se muestra al pie de este resumen. La actividad de fármacos individuales se muestra en la columna izquierda como ranking relativo respecto a la población de muestras de pacientes en percentiles. La sinergia de cada combinación se muestra en la columna derecha también como un ranking poblacional. Se indica en una barra vertical la sensibilidad de la muestra del paciente individual a cada fármaco o combinación, incluyendo una barra horizontal del error asociado. Se enfatizan los fármacos individuales o combinaciones especialmente sensibles (verde) o resistentes (rojo), definidas como el 20% de máxima o mínima sensibilidad poblacional, respectivamente.

Resultados: Para identificar el mejor tratamiento, el hematólogo debe conjugar, a su criterio, la actividad de los fármacos individuales con la sinergia de su combinación. En el ejemplo mostrado en la gráfica, una paciente en 4^a línea de 36 años fue especialmente resistente (rojo) a Tioguanina y poseía sinergia a las combinaciones CIT-IDR-FLU y CIT-CLO. Paciente especialmente sensible (verde) por sinergia a CIT-MIT, y también a CIT-MIT-ETO aunque con mayor error asociado. La sinergia de CIT-MIT-ETO se ve apoyada por las actividades de los fármacos monoterapia que son normales, por lo que se recomienda CIT-MIT-ETO. Paciente en recaída había recibido CIT-IDR-FLU siendo resistente, consistente con la predicción, recibió azacitidina progresando, y en 4^a línea se le administró la recomendación del test CIT-MIT-ETO. Paciente alcanzó remisión completa en el primer ciclo, consistente con el test. Desafortunadamente, paciente murió de una infección.

Conclusión: El test de Medicina Personalizada ex vivo en Ambiente Nativo desarrollado para LMA podría ser útil para individualizar los tratamientos. Se está preparando un ensayo clínico en 2^a línea con PETHEMA para validar la eficacia clínica del test.



* 1^a line CYT-IDR → complete remission & autologous transplant
• 2^a line Relapse 9 months, treated with CYT-IDR-FLU → Resistant, identified by test
• 3^a line Vidaza (Azacitidine) → progression
• 4^a line Vivia Test CIT-MIT-ETO → Complete Response 0.9% blast BM

METHODS

ExviTech® Platform

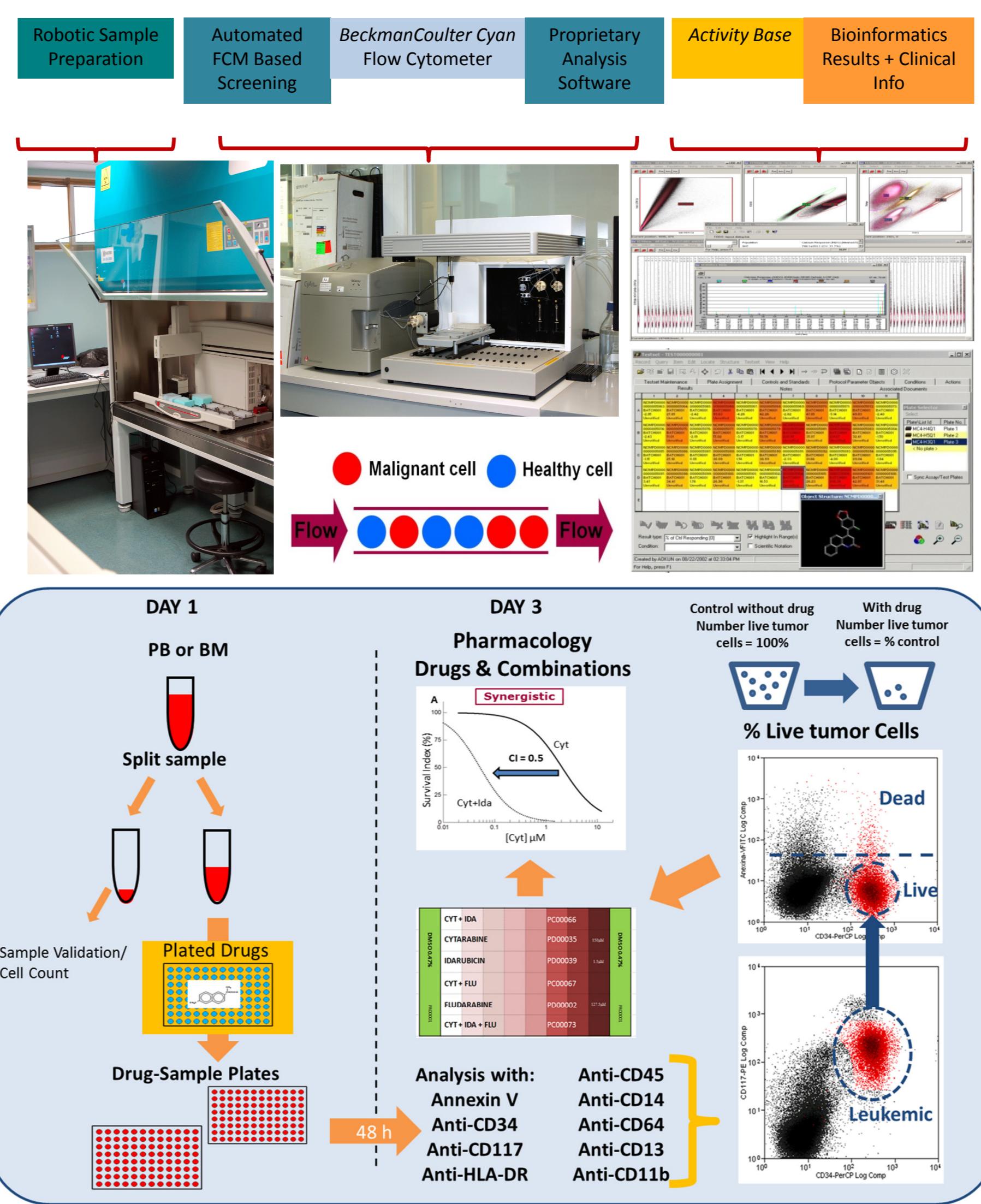


Figure 1

Plate setup. Eight different concentrations of each drug or drug combination is run for the used treatment protocols. The max concentration used is listed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
CYTARABINE	150µM											
IDARUBICIN	1.5µM											
FLUDARABINE	127.5µM											
MITOXANTRONE	10µM											
CLOFARABINE	74.8µM											
DAUNORUBICIN	30µM											
DMSO 0.4%	100%											
B												
AMSACRINE	3µM											
ETOPOSIDE	22.5µM											
6-THIOGUANINE	49.5µM											
DMSO 0.4%	100%											

Whole sample vs. Isolated Leukocytes: A. Correlation pairs showing differences among EC50 values from the same samples tested either as isolated leukocytes or whole sample. Error bars show the CI's of the estimated parameter. B. Dose-response curves for IDA and Cyta for the selected samples in both conditions, showing similar results for Cytarabine but very different for Idarubicin.

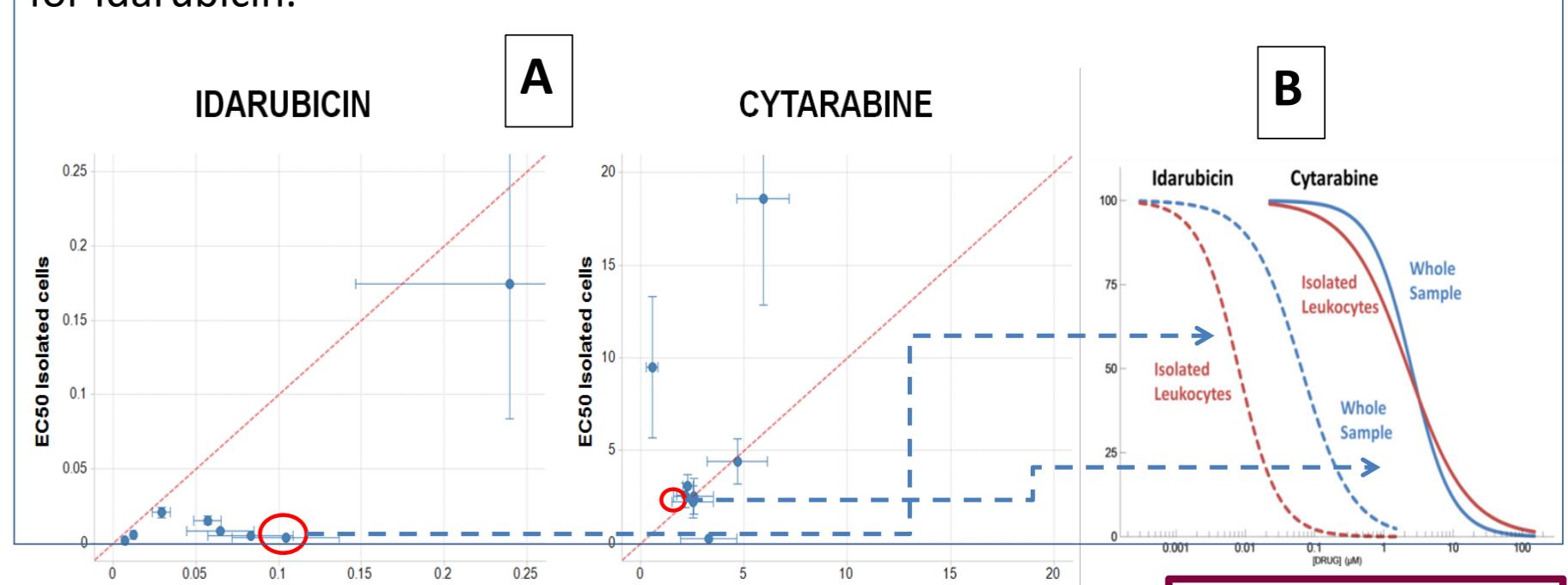
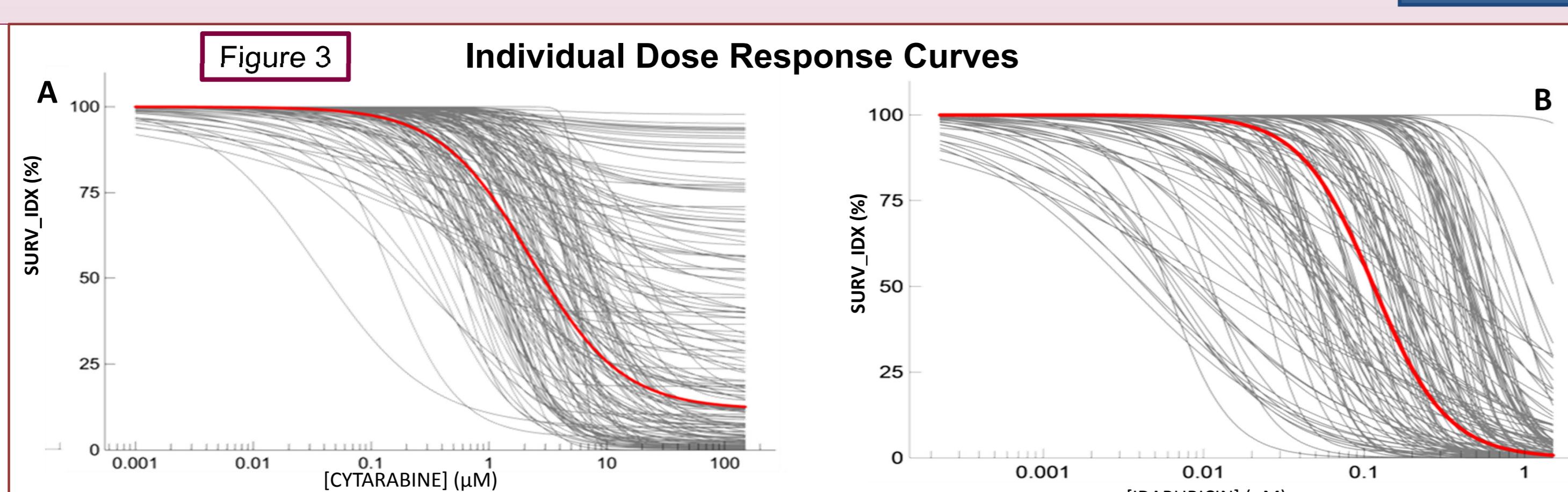


Figure 2

Data Analysis: performed using the population approach using NONMEM 7.2:

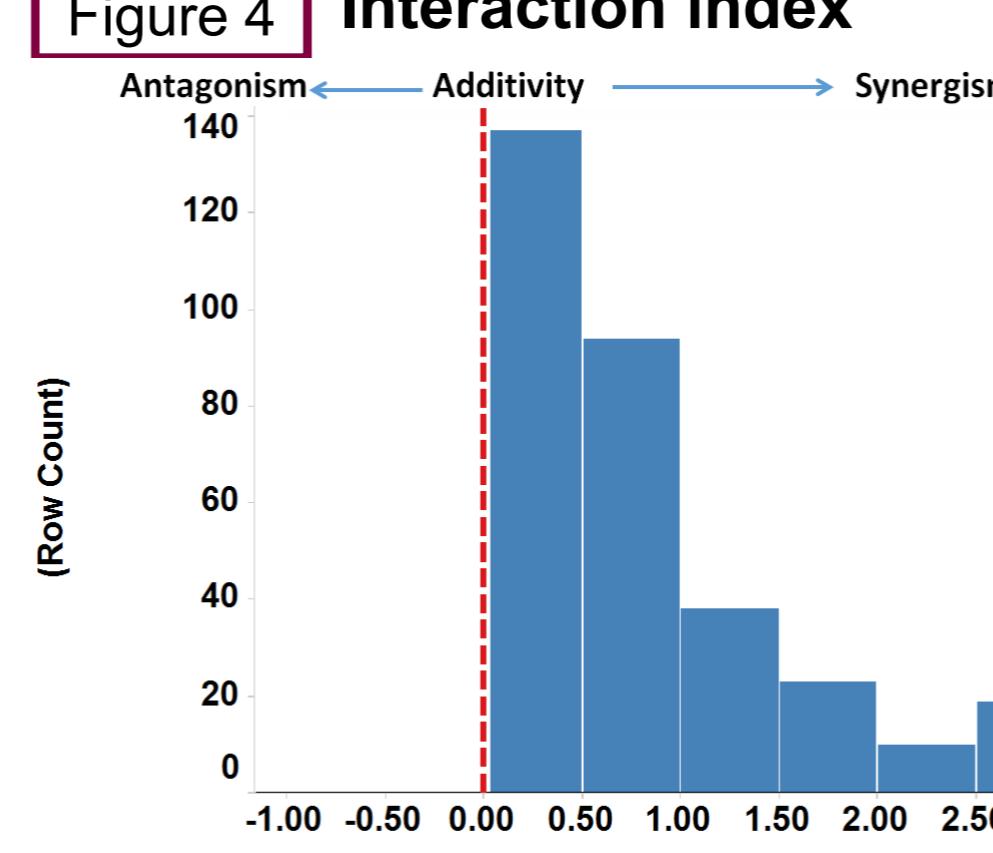
- population PB Hill-based modelling of the ex vivo response vs concentration data in monotherapy (fig.2), 95% confidence interval of estimated parameters determined by bootstrapping over 1000 simulations.
- Surface interaction modelling and simulations to estimate the interaction parameter (α) as well as the corresponding confidence interval. α parameter is a measurement of synergism (>0), additivity (0) or antagonism (<0). Greco et al. 1995. Pharmacol Rev June 1995 47:331-385

RESULTS



Dose-responses from 377 patient samples to Cytarabine (A) and Idarubicin (B). The Survival Index (y-axis) ranges from 100% to 0 displaying the selective AML cell depletion. Median response shown in red. For CYT 40% patient samples have resistant cells left alive at 48 h. IDA eliminates all cells within this timeframe.

Interaction index



Distribution of the interaction index calculated for the samples in the study. The central tendency was towards an additive or weak synergistic behavior although clear synergy occurred in many cases.

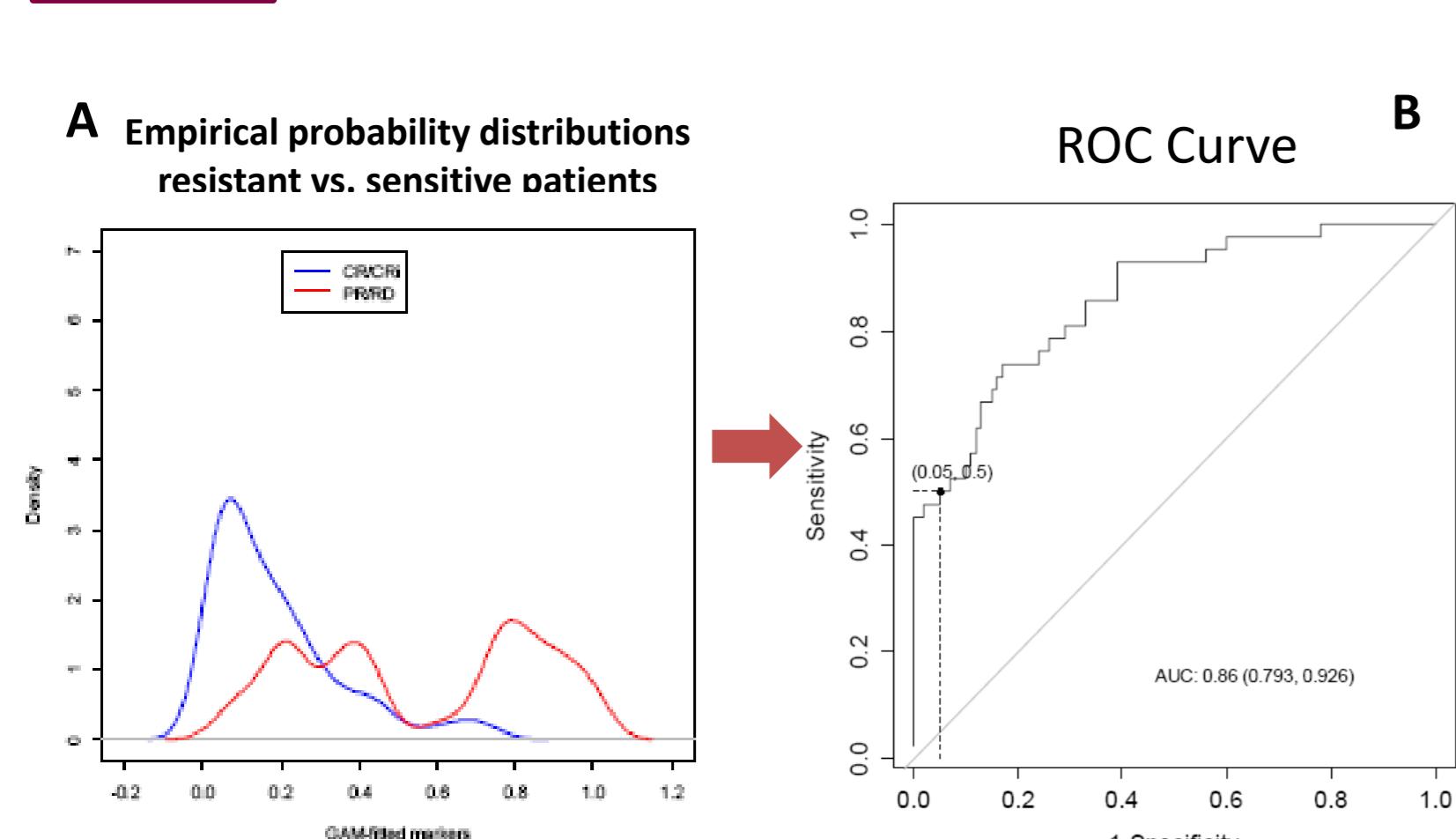
Pharmacological Population Parameters

SINGLE DRUG ex vivo PHARMACOLOGY					
DRUG	N	Efficacy (E _{max}) % Survival	Potency (EC ₅₀) µM	IPV-E _{max} %	IPV-EC ₅₀ %
CYT	377	8.5 1.3	2.87 8.1	645 9.1	161 8.4
IDA	377	0 -	0.032 9.4	ne	207 8.4

Individual drug typical and relative standard error values. Inter-patient variability (IPV) expressed as CV(%); ne, not estimated

CORRELATION WITHOUT CYTOGENETICS

Figure 6 Logistic additive model of ex vivo CYT-IDA vs Clinical Outcome



- A generalized binary logistic additive model was used to explore nonparametric relationships between either the fitted pharmacologic parameters and processed response values and the dichotomized clinical response (resistant patient [PR or PD after induction] vs. sensitive patient [CR or CRi after induction]).
- Both linear dependence and nonlinear dependence structures were evaluated for available PD parameters (cytarabine E₀, EC₅₀, I_{max} and sigmoidicity, idarubicin E₀, EC₅₀ and sigmoidicity, and the interaction parameter (α)) as well as integrated terms given by the calculation of the area under the curve (AUC) for both cytarabine and idarubicin and the volume under the surface (VUS) from the interaction analysis from the combination.
- All linear terms were non-significant. Results using individual parameters were improved by the AUCs of the modelled effect-concentration curves of both, idarubicin and, particularly, Cytarabine which showed good predictive properties. In a lower magnitude, No significance though was observed for the interaction parameter.
- Using a criterion based on equalizing the predictive values (PV+ and PV-) to set the cut point which defines positive and negative test results is a reasonable approach to prioritize specificity over sensitivity in an objective and reproducible fashion.

Figure 7 Correlation results summary

Clinical outcome		Subtotal		Key clinical indicators: overall prediction 81.7% & NPV 81.9%
RESISTANT	SENSITIVE	26	18.3%	
21	5	26	18.3%	
14.8%	3.5%			
21	95	116	81.7%	
14.8%	66.9%			
Sensitivity %	Specificity %			
50.00	95.00	81.69		
42	100	N	142	
29.6%	70.4%		100.0%	

CONCLUSIONS

- Good predictive capabilities were identified for dose-effect area under the curve variables.
- No statistical significance with the clinical outcome was found for the interaction index from the drugs combination analysis.
- This novel test alone, without any clinical information, is able to predict the clinical response to Ida+Ara-C induction with 82% correlation with clinical outcome in 142 patient samples, significantly higher than the current clinical response rate of 70%. The test did not properly identify 21/142 that were clinically resistant and the test predicted as sensitive. This mismatched subgroup mimics the problems from molecular markers where a resistant clone present in a minority of leukemic cells cannot be detected yet drives the patient response. However, this group mismatch does not prevent a good correlation with the test predicted outcomes.
- This novel test including cytogenetic risk profiles for each patient is able to predict the clinical response to Ida+Ara-C induction with 90% correlation with clinical outcome. Cytogenetic information enables correct identification of resistant patients predicted sensitive by the ex vivo results (from 21/42 to 32/32 resistant patients).
- This PM test could improve substantially AML 1st line treatment outcomes.
- We are preparing an interventional clinical trial with PETHEMA.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

- Complejo Hospitalario de Jaén, JAEN
- Hospital Ramón y Cajal, MADRID
- Complejo Hospitalario Xeral Cies de Vigo, VIGO
- Hospital Universitario Central de Asturias, OVIEDO
- Hospital Carlos Haya, MÁLAGA
- Hospital Universitario de Canarias, TENERIFE
- Hospital Universitario San Cecilio, GRANADA
- Hospital Universitario General de Castellón, CASTELLÓN
- Hospital Universitario Gregorio Marañón, MADRID
- Hospital Universitari i Politècnic La Fe, VALENCIA
- Hospital Universitario Infanta Leonor, MADRID
- Hospital Universitario Lucas Augusti, LUGO
- Hospital Universitario Príncipe de Asturias, MADRID
- Hospital Universitario Reina Sofía, CÓRDOBA
- Hospital Universitario Virgen Macarena, SEVILLA