

### VÝZNAM CYTOGENETICKÝCH ZMĚN U RELABUJÍCÍCH PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM LÉČENÝCH NOVÝMI TYPY LÉKŮ

#### THE IMPACT OF CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN RELAPSED MULTIPLE MYELOMA PATIENTS TREATED WITH NEW DRUGS

ZAORALOVÁ R.<sup>1,2</sup>, KUGLÍK P.<sup>2</sup>, VRÁNOVÁ V.<sup>2</sup>, OLTOVÁ A.<sup>3</sup>, POUR L.<sup>1,5</sup>, KŘIVANOVÁ A.<sup>4</sup>, KREJČÍ M.<sup>4</sup>, ADAM Z.<sup>4</sup>, HÁJEK R.<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>2</sup> ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE, PŘF MU BRNO

<sup>3</sup> ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN BRNO, PDM

<sup>4</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>5</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

#### Souhrn

V této práci uvádíme příklad detekce specifických chromozómových aberací (delece 13q14, delece genu p53, translokace t(4;14) a zisk chromozómového materiálu v oblasti 1q21) pomocí imunofluorescenčního značení nádorových plazmatických buněk a techniky interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace s následným sledováním vlivu genetických aberací na úspěšnost léčby pacientů s mnohočetným myelomem (MM) léčených novými typy léků. Ve skupině 74 pacientů léčených terapií s bortezomibem (Velcade) nebo thalidomidem (Myrin) jsme pozorovali statisticky významně horší čas do progresu pouze u pacientů léčených thalidomidem, u kterých byl nalezen zisk 1q21 ( $p=0,015$ ). Tyto výsledky naznačují, že nové léky překonávají vliv cytogenetických negativních prognostických markerů s výjimkou zisku 1q21 u pacientů léčených thalidomidem.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom, cytogenetika, FISH, Velcade, bortezomib, thalidomid.

#### Summary

In this paper we show an example of use the detection of chromosomal abnormalities using modified fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and following searching for the impact of chromosomal abnormalities to successful treatment of multiple myeloma patients. In our group of 74 patients treated either by thalidomide (Myrin) or by bortezomib (Velcade) was only observed statistically significantly worse TTP in patients treated by thalidomide and having gain of CKS1B. According to our data the new drugs overcome the impact of negative cytogenetic prognostic markers with exception of patients with gain 1q21 treated by thalidomide.

**Keywords:** Multiple myeloma, cytogenetics, FISH, Velcade, bortezomib, thalidomide.

#### Úvod

Myelomové buňky se vyznačují výraznou genetickou nestabilitou. Zhodnocení prognostických faktorů při diagnóze mnohočetného myelomu (MM) je nezbytné pro stanovení prognózy, nově pak i pro výběr typu a intenzity léčebné strategie. Stanovení chromozómových aberací má zásadní prognostický význam u nemocných léčených konvenčními a myeloablativními režimy (2). Zcela nejasná je situace při použití nových léčebných strategií.

V této studii jsme se zaměřili na čtyři nejvýznamnější chromozómové aberace studované u MM: del(13)(q14) (gen RB-1), t(4;14), del(17)(p13) (gen p53), a gain(1)(q21) (gen CKS1B).

Cílem studie bylo zjistit, zda tyto chromozómové aberace působí jako negativní prognostické faktory u pacientů léčených bortezomibem nebo thalidomidem v kombinované terapii s dalšími látkami (alkylační cy-

tostatika, antracykliny, kortikoidy). Zaměřili jsme se na sledování vlivu uvedených cytogenetických změn na léčebnou odpověď pacientů s relapsem MM.

#### Soubor pacientů a metodika

Celkem jsme analyzovali 74 nemocných, 40 léčených bortezomibem a 34 léčených thalidomidem. Medián doby sledování pacientů od zahájení léčby byl ke dni zpracování analýzy 12,8 měsíců (95% IS = 12,6 - 17,1). Soubor nemocných měl následující popisné parametry: průměrný věk pacientů byl 64,9±9,6 let, 50% (37/74) pacientů byli muži. Celkem 65% (48/74) pacientů mělo klinické stádium III podle Durie Salmona a 82% (61/74) pacientů mělo stádium A (bez poškození ledvin). Pacienti léčení kombinací léků s bortezomibem byli více předléčení (medián počtu předchozích linií = 2, rozsah 0-3) než pacienti podstupující léčbu s thalidomidem (medián počtu předchozích linií = 1, rozsah 0-4).

## příklady využití

Cytogenetické změny byly studovány metodou interfázní FISH (I-FISH) prováděnou na myelomových buňkách separovaných pomocí imunomagnetické separace (MACS). U vzorků, u kterých nebylo možné provést separaci, byla využívána technika cIg-FISH založená na imunofluorescenčním značení lehkých řetězců cytoplazmatických imunoglobulinů (7). Při našich studiích byly používány DNA sondy firmy Abbot-Vysis™ [LSI IGH/FGFR3 t(4;14)(p16;q32), LSI p53 (17p13.1) + CEP 17, LSI 13 (RB-1 locus, 13q14) + LSI 13q34] pro detekci translokace t(4;14), delece p53 a delece RB-1 a sonda vlastní výroby pro chromozómovou oblast 1q21 (gen CKS1B).

Jednotlivé preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX61 vybaveného digitální kamerou Vosskuhler 1300D a systémem analýzy obrazu LUCIA-KARYO/FISH/CGH (Laboratory Imaging, s. r. o., Praha). Na každém preparátu bylo hodnoceno minimálně 100 myelomových buněk. Jako aberantní byl hodnocen preparát s přítomností chromozómové abnormality u více než 20% hodnocených buněk.

Léčebná odpověď a léčebné intervaly byly hodnoceny dle doporučení IMWG (3). Vyhodnoceny byly korelace celkové léčebné odpovědi (ORR), celkové doby přežití (OS), času do progresu (PFS, TTP) a trvání léčebné odpovědi (DOR) s přítomností sledovaných cytogenetických změn i společný výskyt těchto změn mezi sebou. Pro hodnocení parametrů délky trvání odpovědi jsme použili Kaplan-Mayerovu analýzu křivek přežívání.

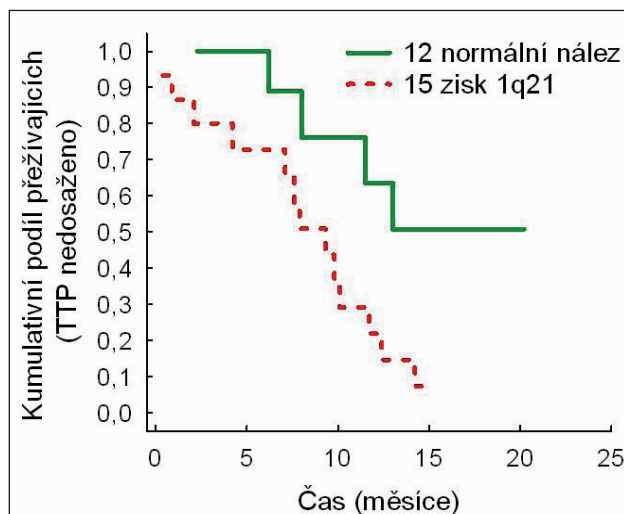
### Výsledky

*Výskyt cytogenetických abnormalit u souboru pacientů s relapsem MM léčených novými typy léků:*

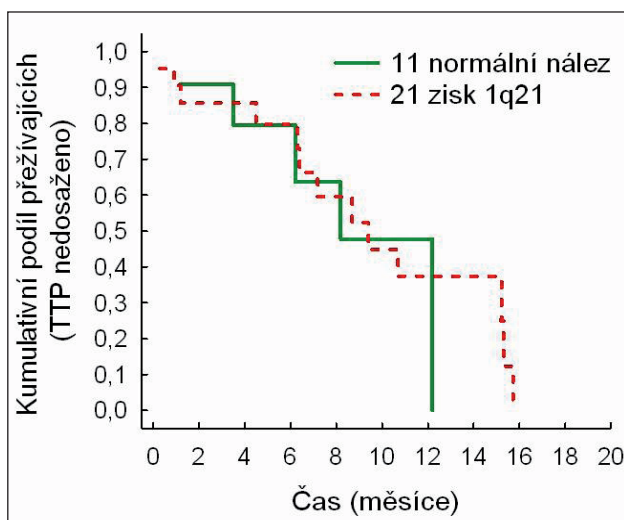
V celé skupině pacientů se delece 13q14/monozomie 13 vyskytovala u 55% (45/74) pacientů, delece genu p 53 u 16% (11/68) pacientů, translokace t(4;14) byla nalezena v 37% (22/60) případů a zisk chromozómového materiálu v oblasti 1q21 mělo 61% (36/59) pacientů. Delece genu p53 se často vyskytovala současně s delecí 13q14 ( $p=0,002$ ), u pacientů se ziskem v oblasti 1q21 jsme zachytili častěji i translokaci t(4;14) ( $p=0,053$ ).

*Vliv cytogenetických změn na úspěšnost léčby novými léky:*

Celková léčebná odpověď (ORR) byla dosažena u 61% (45/74) případů. Při hodnocení dosažené léčebné odpovědi jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl u žádné z provedených analýz. U celé skupiny všech pacientů léčených novými léky jsme statisticky významně prokázali kratší dobu do progresu (TTP) u pacientů se ziskem 1q21 (medián přežití 11,9 měsíců vs. 9 měsíců,  $p=0,033$ , Obrázek č.1). Pacienti podstupující léčbu s thalidomidem měli při přítomnosti zisku 1q21 kratší TTP i PFS (medián nedosažen vs. 8,1 měsíců,  $p=0,015$ , Obrázek č.2). U pacientů léčených bortezomibem jsme nepozorovali vliv zisku chromozómového materiálu v oblasti 1q21 na délku sledovaných intervalů a neprokázali jsme ani vliv ostatních sledovaných změn.



Obrázek č. 1: Vliv přítomnosti zisku chromozómového materiálu v oblasti 1q21 na čas do progresu (TTP) u pacientů léčených thalidomidem



Obrázek č. 2: Vliv přítomnosti zisku chromozómového materiálu v oblasti 1q21 na čas do progresu (TTP) u pacientů léčených bortezomibem

### Diskuze

Zhodnotili jsme přítomnost cytogenetických abnormalit u 74 pacientů léčených bortezomibem nebo thalidomidem. Pozorované četnosti chromozómových aberací se shodují s údaji v literatuře (4, 2, 6) s výjimkou vyššího zachytu t(4;14) u obou skupin.

Podle získaných výsledků žádná ze sledovaných aberací nemá vliv na úroveň léčebné odpovědi. Ve sledované skupině 74 pacientů jsme pozorovali rozdíl v délce TTP mezi pacienty léčenými terapií založenou na bortezomibu vs. thalidomidu, pokud byli rozděleni do dvou skupin podle přítomnosti zisku v oblasti 1q21 (gen CKS1B). U pacientů léčených thalidomidem se tato změna jevila jako negativní prognostický faktor, u pacientů léčených bortezomibem vliv změny nebyl pozorován. Vliv kombinované terapie s bortezomibem na překonání vlivu cytogenetických negativních prognostických faktorů pozorovala např. Mateos et al. (8).

Prokázání vlivu zisku 1q21 na prognózu již u malě-

## příklady využití

ho počtu pacientů léčených thalidomidem ukazuje, že velikost souboru je dostatečná pro zachycení silného negativního prognostického faktoru. Získaná data naznačují, že kombinovaná terapie s bortezomibem nebo thalidomidem překonává potenciální negativní vliv většiny sledovaných cytogenetických aberací. V případě thalidomidu se tento výsledek neshoduje s publikací Attal *et al.* 2006 (1), který pozoroval výrazně horší EFS u pacientů s delecí v oblasti chromozómu 13. Tento rozdíl v pozorování může být způsoben buď malým vzorkem v našem experimentu, nebo odlišným nastavením léčebné strategie.

Při analýze společného výskytu aberací jsme statisticky významně neprokázali rozdíl mezi současným výskytem aberací u pacientů léčených bortezomibem a thalidomidem: můžeme tedy předpokládat, že v našem souboru nedošlo ke kumulaci vlivu zisku 1q21 a další změny.

Přímé srovnání vlivu bortezomibu a thalidomidu na léčbu pacientů nelze na základě našeho souboru dat provést, protože pacienti léčení bortezomibem jsou více předlčení než pacienti léčení thalidomidem, tedy

u nich lze předpokládat horší léčebné výsledky než u thalidomidu. Toto omezení se nevztahuje na předchozí porovnání pacientů uvnitř těchto skupin.

### Závěr

Ve většině analýz, které jsme provedli, jsme nepozorovali rozdíl v reakci na léčbu u pacientů s přítomností sledované chromozómové změny a bez ní. Vzhledem k tomu, že jsme sledovali cytogenetické změny prokázané jako negativní prognostické faktory při konvenční léčbě - t(4;14), delecí p53, zisk 1q21 - lze říci, že bortezomib a thalidomid překonávají potenciální negativní vliv těchto cytogenetických změn s výjimkou zisku 1q21, který je překonáván pouze kombinovanými režimy s bortezomibem. Potvrzení takového výsledku randomizovanou klinickou studií nebo analýzou randomizované klinické studie by přineslo zásadní potvrzení tohoto nálezu.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a MSM0021622415 a IGA NR9317.

### Literatura

1. Attal, M., Harrouseau, JL, Leyvraz, S. et al: Maintenance therapy with thalidomide improves survival on patients with multiple myeloma. *Blood*, Nov 15;108(10):3289-94. Epub 2006 Jul 27.
2. Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P et al.: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007; 109: 3489-95
3. Durie, BG, Harousseau, JL, Miguel, JS et al.: International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, Sep;20(9):1467-73. 2006.
4. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al.: Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. *Cancer Research* 64: 1546-1558, 2004
5. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, et al.: Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 21: 143-150, 2007.
6. Hanamura, I., Stewart, J.P., Huang, et al.: Frequent gain of chromozóme band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 108: 1724-32, 2006.
7. Kuglík P, Filková H, Vranová V, et al.: Detection of chromozóme 13 abnormalities and 14q32 translocations in multiple myeloma using simultaneous immunofluorescent labelling of malignant plasma cells and FISH. *Europ.J. Hum. Genet. (suppl.)*, 12: 170, 2004.
8. Mateos, MW, Hernández, JM, Hernández MT et al.: Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: updated time-to-events results and prognostic factors for time to progression. *Haematologica*. Apr;93(4):560-5. 2008. Epub 2008 Mar 5.
9. Wullemme S, Robillard N, Lode L, et al.: Ploidy, as detected fluorescence in situ hybridization defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia* 19: 275-278, 2005