Uniklinikum Würzburg

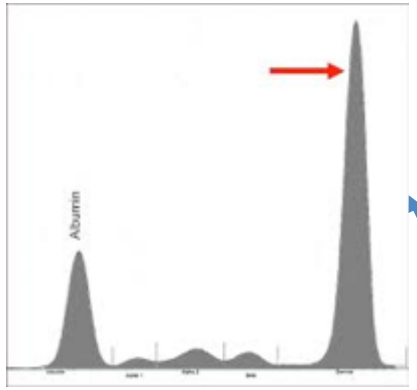
Myelom-Gruppe RHEIN-MAIN
Knochenmarkpunktion beim Multiplen Myelom

Prof. Dr. Martin Kortüm

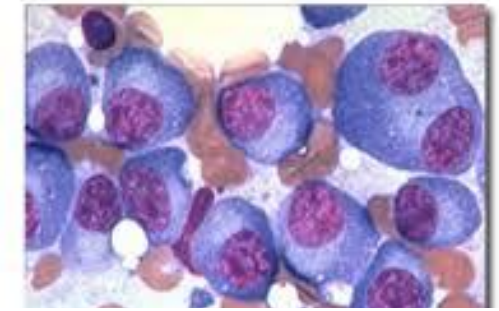
Uniklinikum Würzburg

- Diagnosestellung
- Remissionsbestimmung
- Experimentelle Diagnostik

Das Multiple Myelom ist die zweithäufigste hämatologische Neoplasie

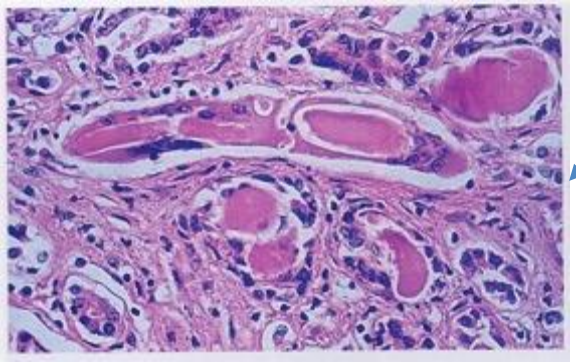


Paraprotein -
Hyperviskosität



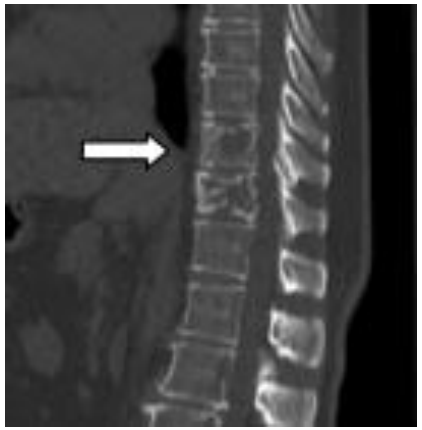
Knochenmarkinfiltration
Anämie, Thrombopenie,
Sek. Immunglobulin Mangel,

Klinik



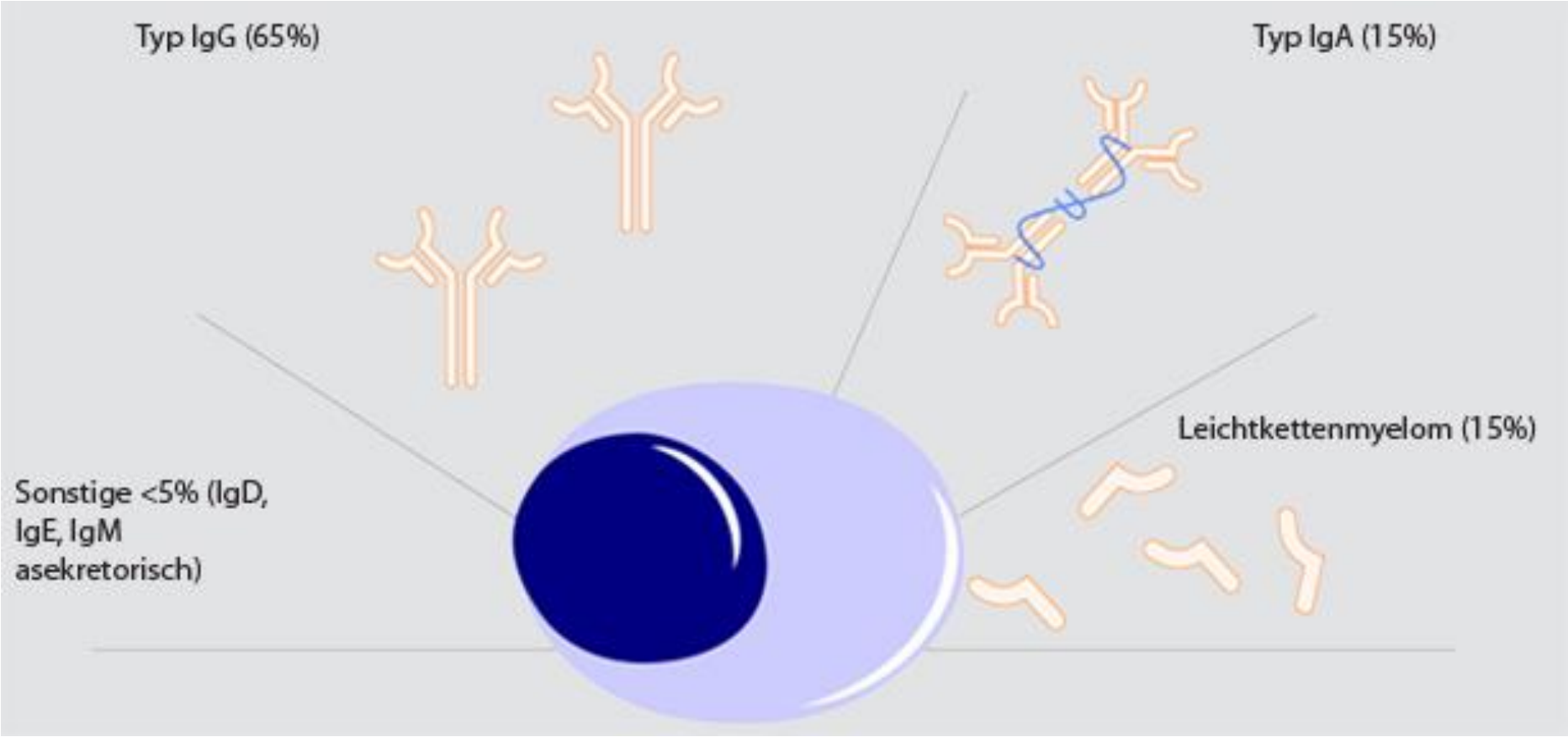
Niere
Cast Nephropathie,
Light Chain Deposition
Disease

Skelettsystem
Osteolysen
Hyperkalzämie

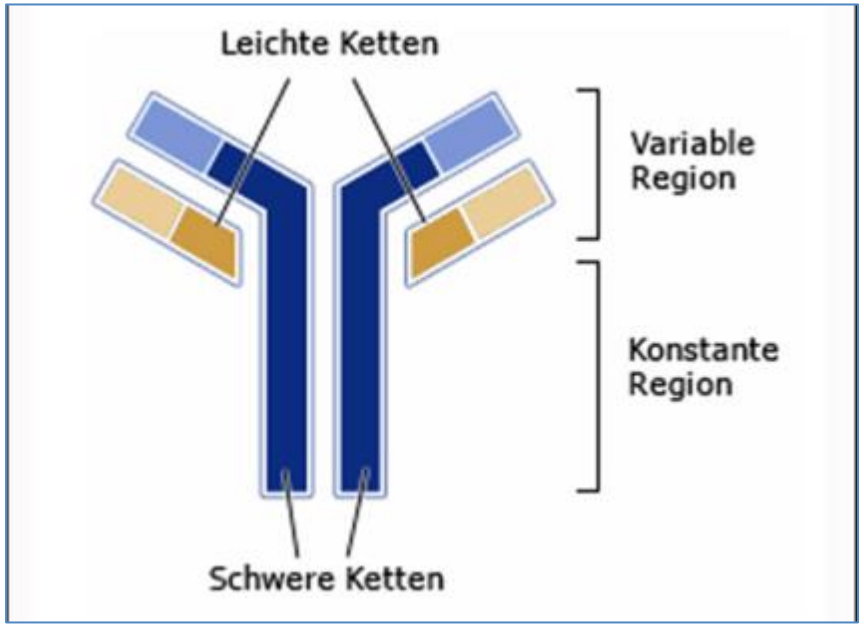


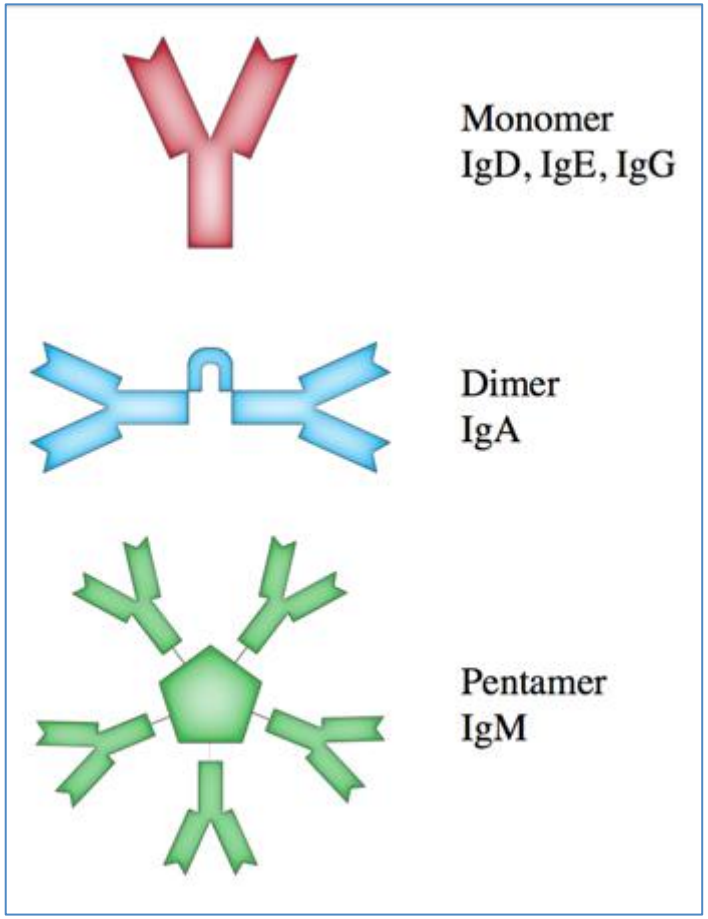
Infektion als häufigste
Todesursache

Plasmazellen sind antikörperbildende Zellen des Immunsystems

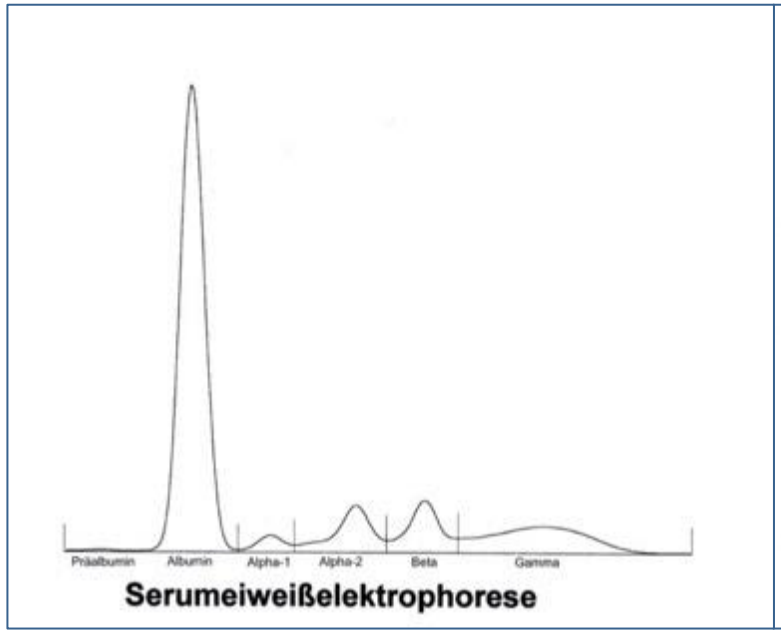


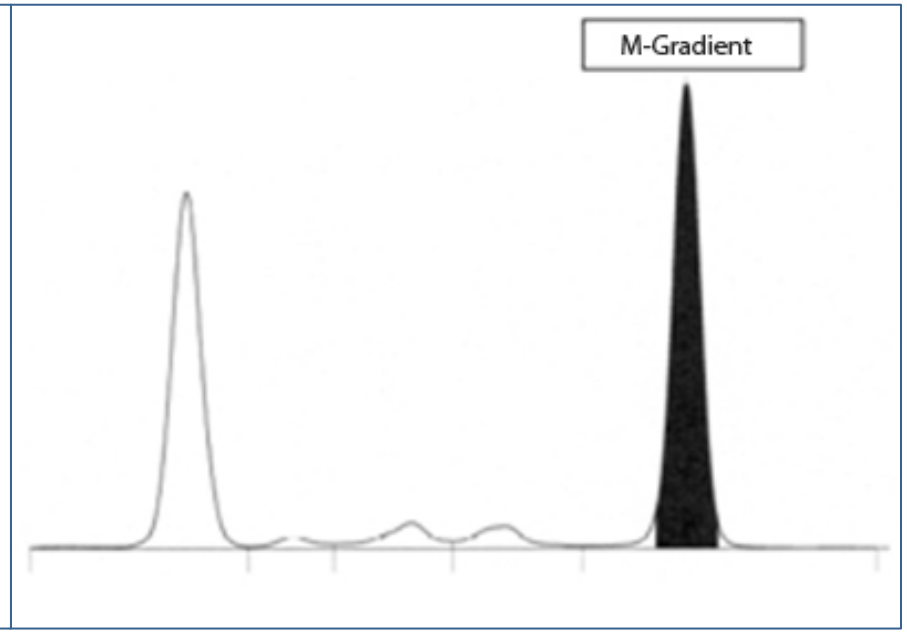
Antikörper


Leichte Ketten
Variable Region
Konstante Region
Schwere Ketten


Monomer
IgD, IgE, IgG
Dimer
IgA
Pentamer
IgM

Das monoklonale Protein wird sichtbar in der Elektrophorese



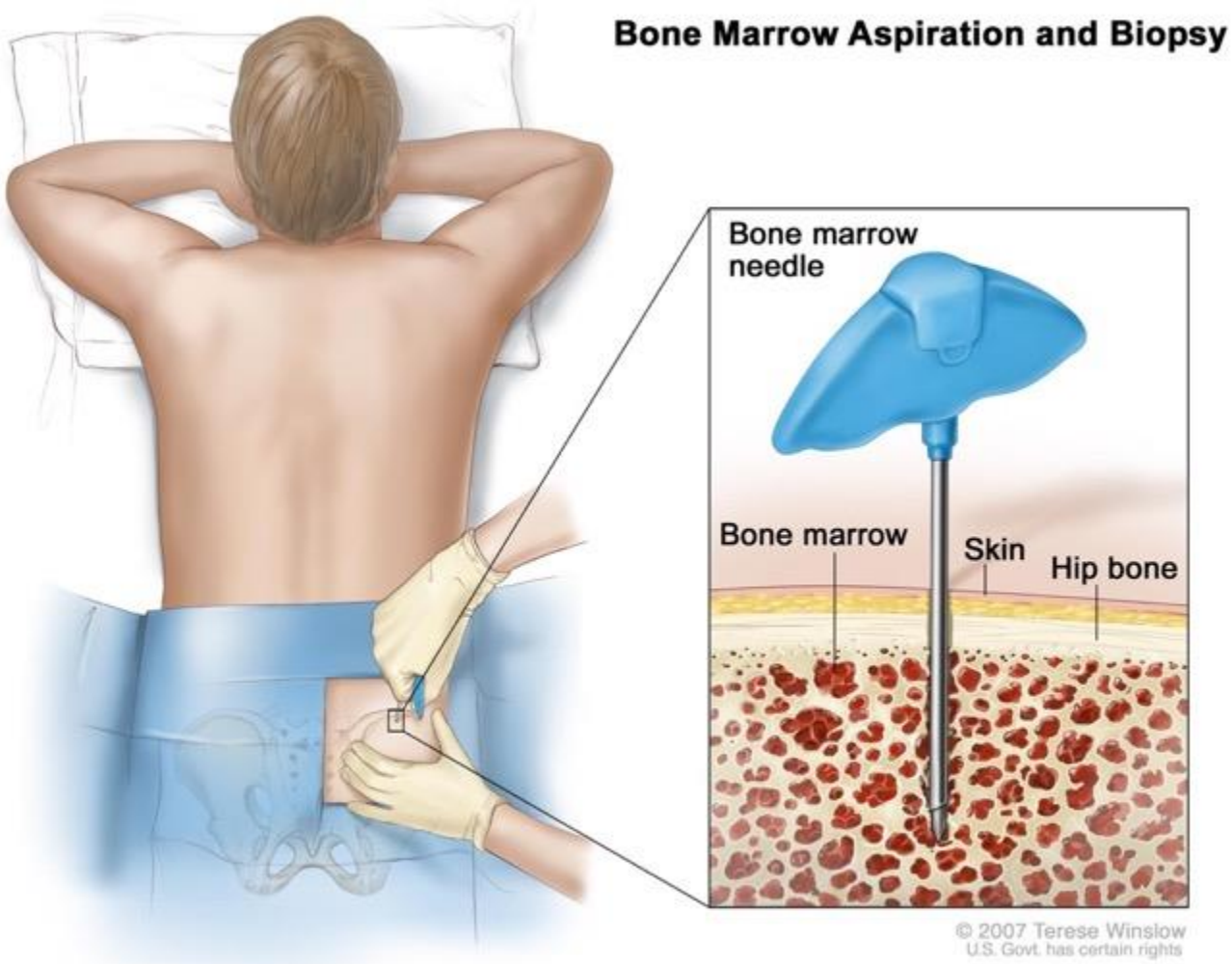


Normalbefund

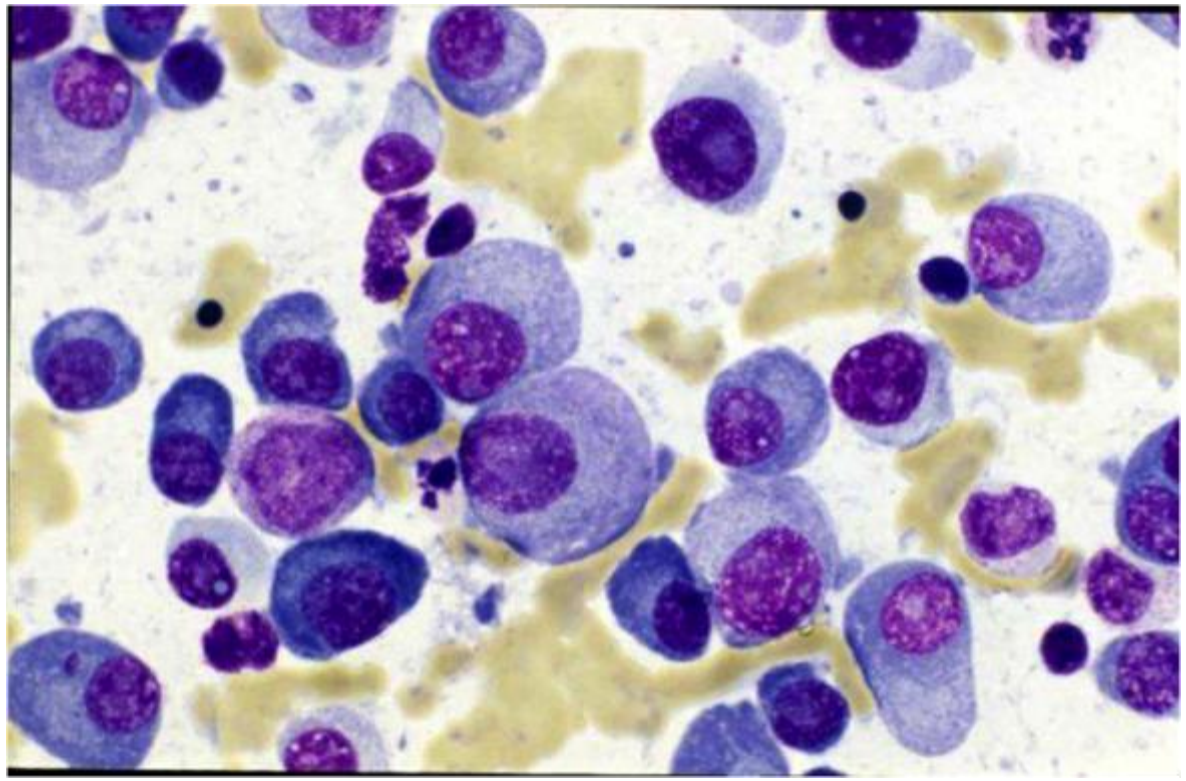
Monoklonale Gammopathie

- Knochenmarkpunktion zur Diagnosestellung

Knochenmarkpunktion



Diagnostik: Mikroskopie



Mehr als 10% monoklonale Plasmazellen = Multiples Myelom

Uniklinikum Würzburg

- Knochenmarkpunktion mit dem Ziel der Remissionsbeurteilung

Remissionsbeurteilung

Uniklinikum Würzburg

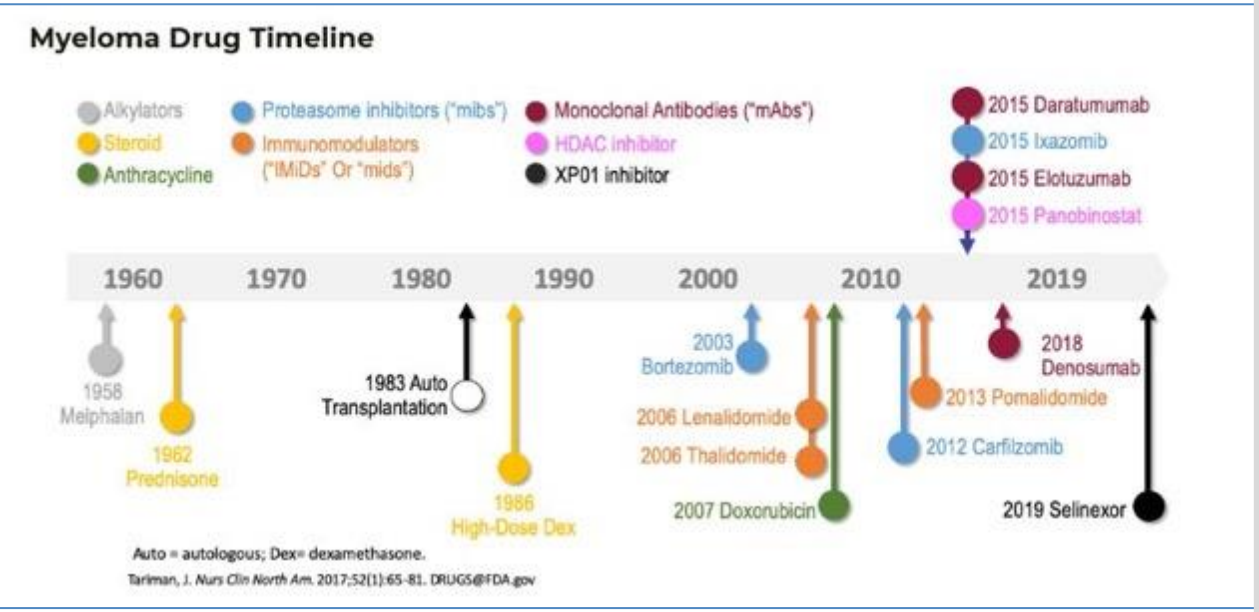
Tabelle 3: Responsekriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) [35, 36]

Kriterien Status	M Protein Elektrophorese	M Protein Immunfixation	Freie Leichtketten (FLC-Quotient[1])	Weichteil-Manifestation	Plasmazellen im Knochenmark
sCR[2] (alle Kriterien sind erfüllt)		nicht nachweisbar in Serum und Urin	normalisiert	nicht nachweisbar	≤ 5 %; keine klonalen Plasmazellen nachweisbar (Immunhistochemie)
CR[3] (alle Kriterien sind erfüllt)		nicht nachweisbar in Serum und Urin		nicht nachweisbar	≤ 5 %
VGPR[4] (alle Kriterien sind erfüllt)	≥ 90% Reduktion im Serum und < 100 mg/24h im Urin oder kein M Protein in Serum und Urin nachweisbar	nachweisbar			
PR[5]	≥ 50% Reduktion im Serum und ≥ 90% Reduktion im Urin oder < 200 mg/24h im Urin		> 50 % Reduktion der Differenz, falls M-Protein nicht bestimmbar	> 50 % Reduktion (obligates Kriterium)	> 50 % Reduktion der Infiltration, falls Anteil vor Therapie > 30% und falls M-Protein und FLC Quotient nicht bestimmbar
SD[6]	weder Kriterien von sCR, CR, VGPR, PR noch PD erfüllt				
PD[7] (mindestens ein Kriterium ist erfüllt, oder neue Symptome[8])	≥ 25% Anstieg im Serum und absolut ≥ 0,5 g/dl und/oder ≥ 25% Anstieg im Urin oder absolut ≥ 200 mg/24h		≥ 25% Anstieg der Differenz der freien Leichtketten (dFLC) im Serum, absolut um mindestens 100mg	Neuauftreten oder Progress	> 25 % Anstieg in Bezug auf den niedrigsten erreichten Infiltrationsgrad und absolut ≥ 10%
Refraktärität (Ergänzung)	Fortschreiten der Erkrankung unter Therapie oder innerhalb von 60 Tagen nach Therapieende				

Uniklinikum Würzburg

- Wie beeinflusst die KMP die Wahl der Therapie?
  - Bestimmung individueller Risikofaktoren mittels genetischer Diagnostik

Immer mehr Substanzen sind für die Behandlung des Myeloms zugelassen



INTERNATIONAL MYELOMA FOUNDATION

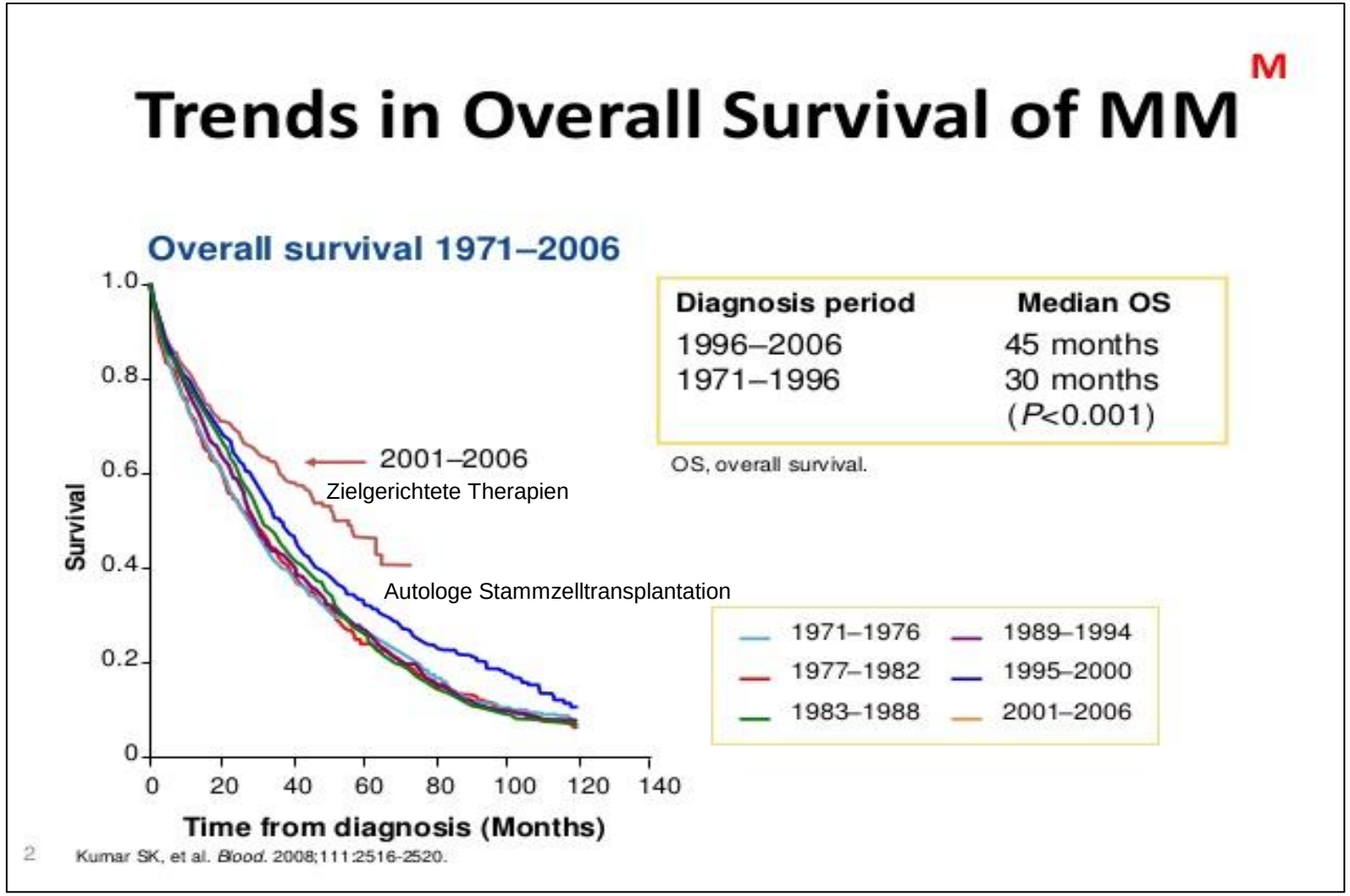
Erstlinien-Behandlung

- VD
- TD
- BD
- CD
- Rd/RD
- MP
- VTD
- MPT
- MPT-T
- VCD
- TAD
- PAD
- RAD
- VMP
- VMPT-VT
- VTP
- CTD
- CRF
- CPR
- MPR
- MPR-R
- VRd
- KRd
- CRD
- VRCD
- D-VMP
- D-VTD
- D-Rd
- ...

Rückfall

- KRD
- Dara-Len-dex
- Dara-Carf-dex
- Dara-Vd
- Dara-Pd
- Isa-Pd
- Isa-Kd
- Elo-Vd
- Elo-Rd
- Elo-Pd
- Panobinostat-Vd
- Selinexor-Vd
- PVd
- Ird
- CRd
- VCD
- Vd
- Kd
- Rd
- Belantamab
- …

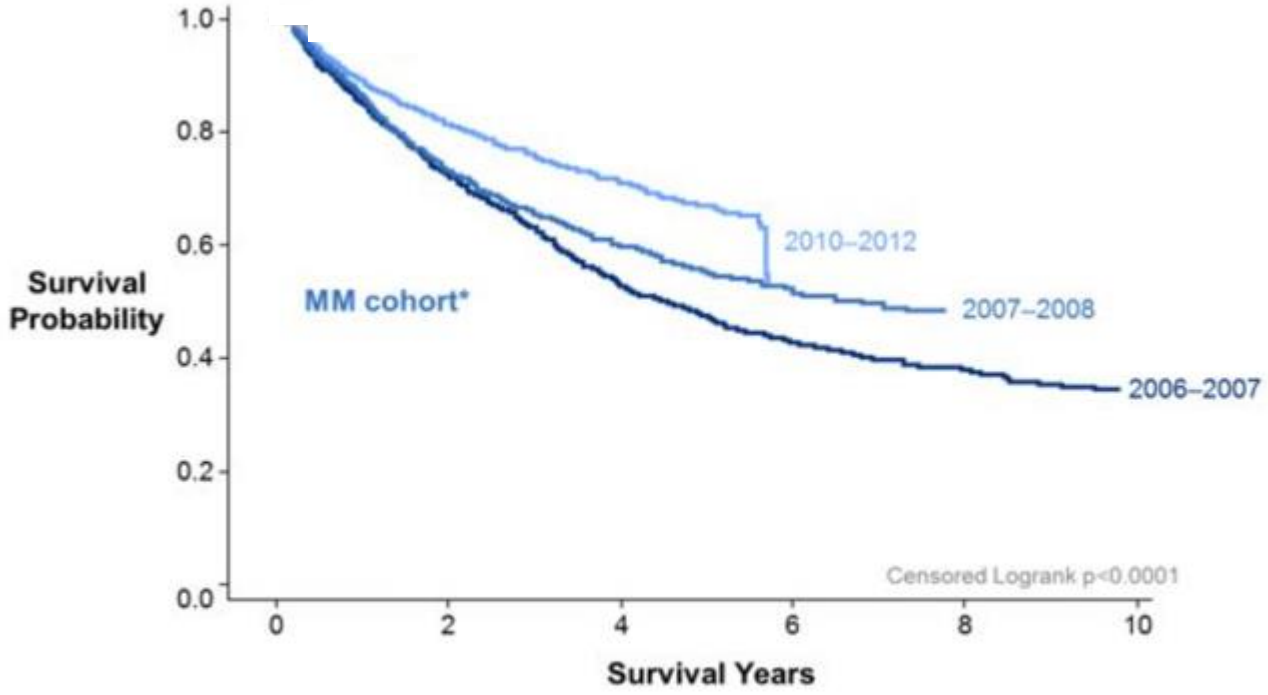
Über Jahrzehnte wurden keine Überlebensvorteile in der Behandlung des MM erreicht



Modifiziert nach Kumar et al. Blood 2008.

Kontinuierliche Verbesserungen im Überleben durch neue Substanzen

Figure 2: Survival Estimates of Matched MM Patients and Controls, by Year of Diagnosis



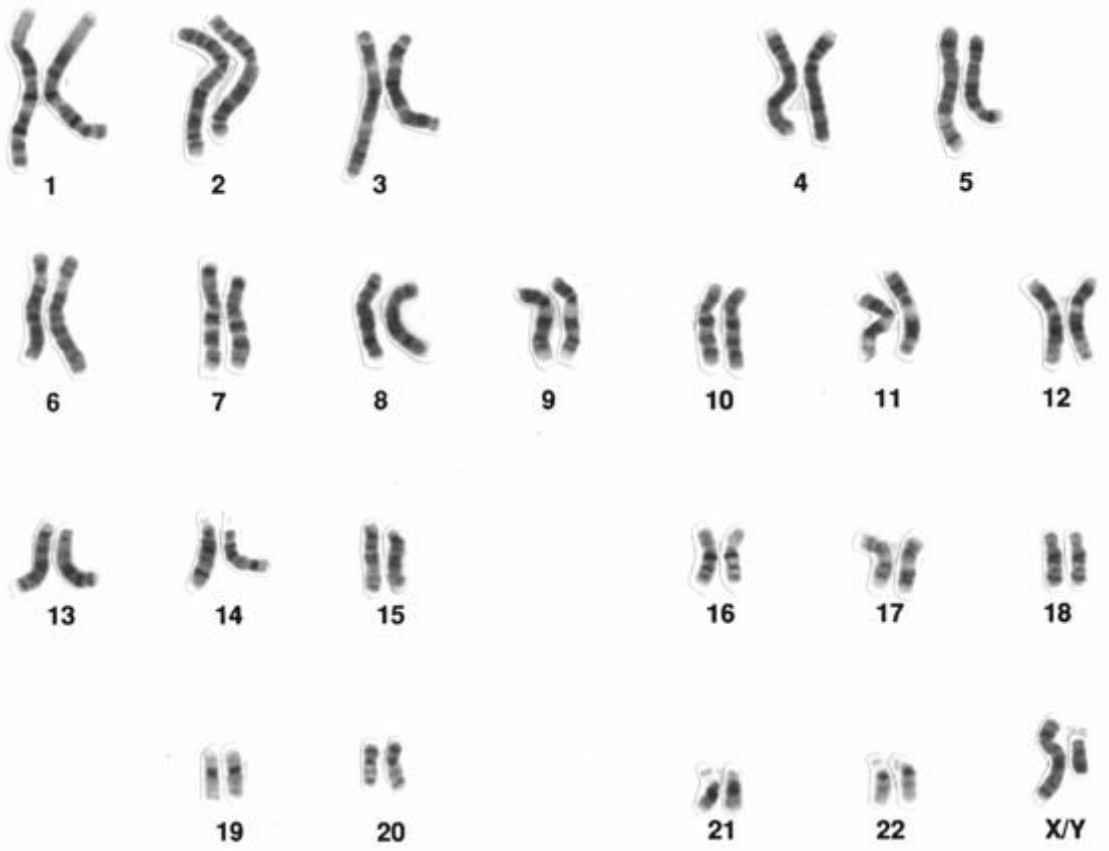
Note: By linking to the SSA Master Death File, survival was measured as time from diagnosis date to the date of death obtained from the SSA, time from diagnosis date to the date of inpatient death, or time from diagnosis date to September 30, 2015; Survival estimates were presented for multiple myeloma patients diagnosed and treated during 2006-2012 (n=9,521).

Nach Fonseca et al. Abstract 3558, ASH 2016

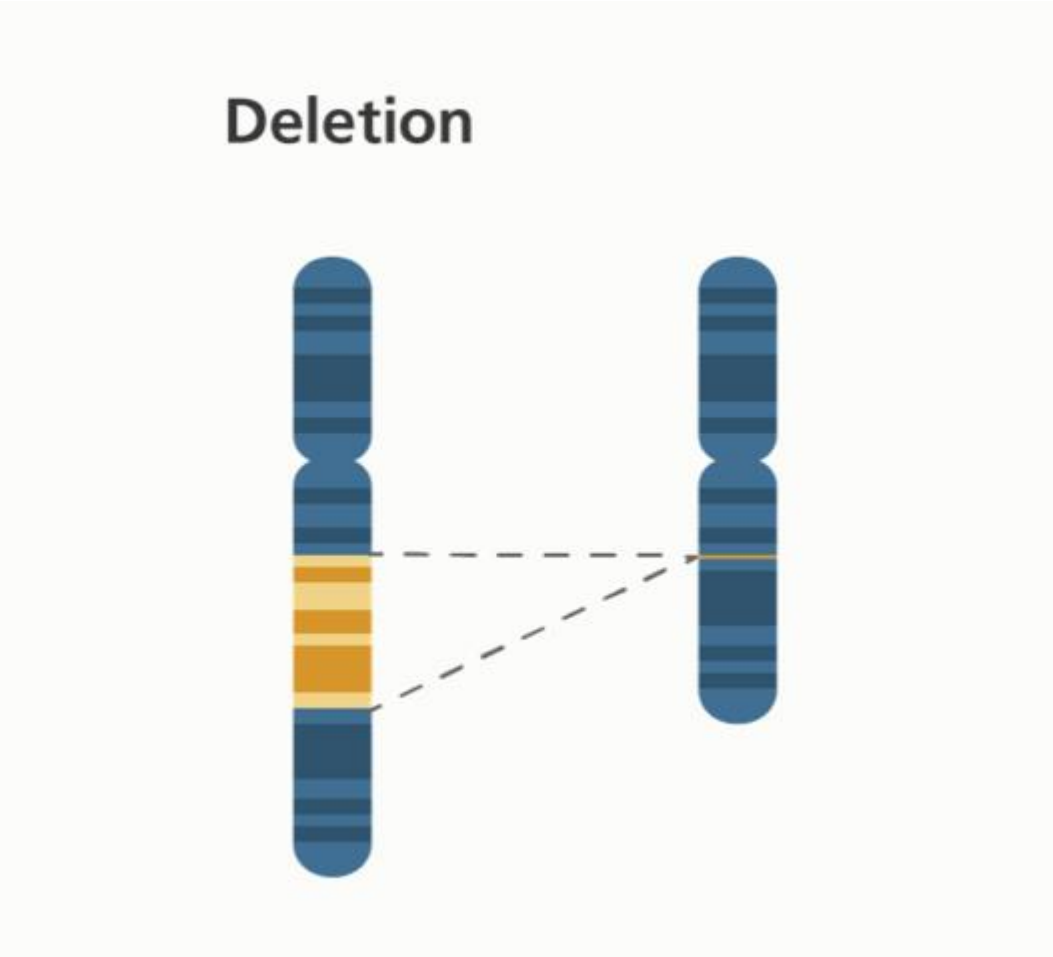
Prognosestellung: ISS und r-ISS Score

R-ISS-Klassifikation	
I	ISS-Stadium I; Keine Hochrisiko-Zytogenetik; normwertige LDH
II	Weder R-ISS I noch III
III	ISS Stadium III; Hochrisiko-Zytogenetik oder erhöhte LDH
Ursprüngliche ISS-Klassifikation	
I	Serum-β_2-Mikroglobulin < 3,5 mg/l; Albumin ≥ 35 g/l
II	Weder ISS I noch III
III	Serum-β_2-Mikroglobulin ≥ 5,5 mg/l

Der Mensch hat 46 Chromosomen

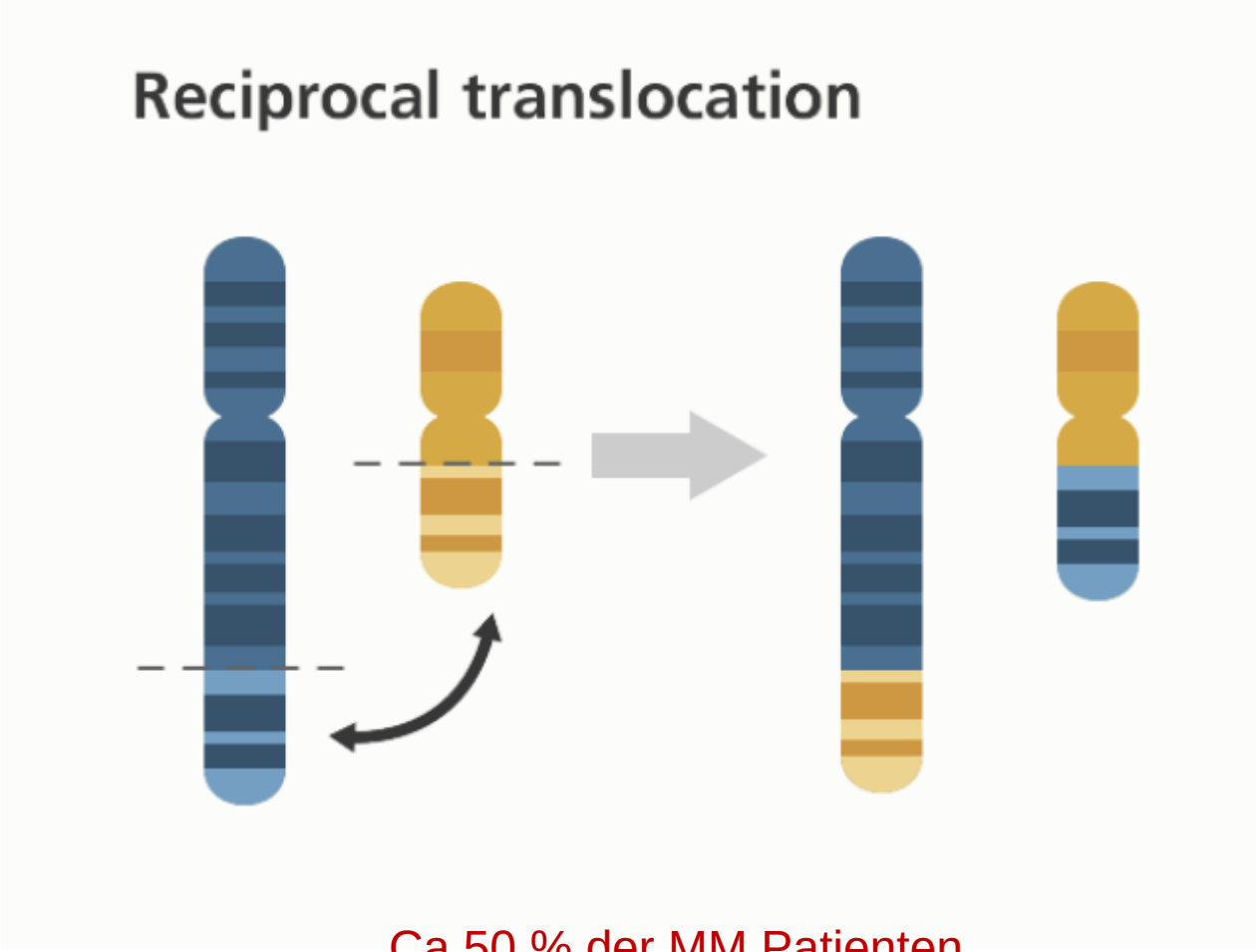


Chromosomale Aberrrationen beim MM



Del17p – prognostisch ungünstig

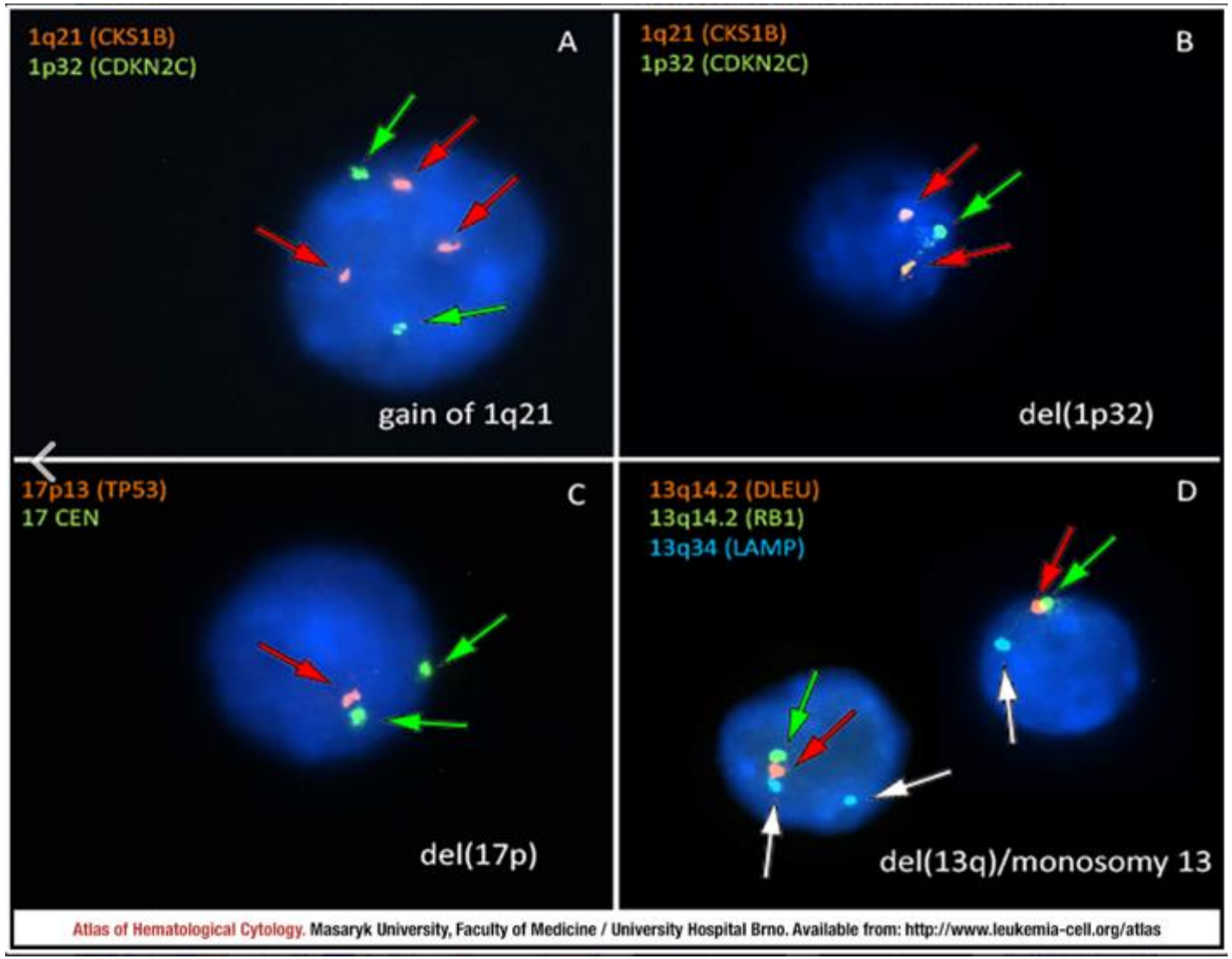
Chromosomale Translokationen



t(11;14)
t(4;14)
t(14;16)
t(14:20)

Ca 50 % der MM Patienten

Nachweis mittels Fluoreszenz in situ hybridisation (FISH)

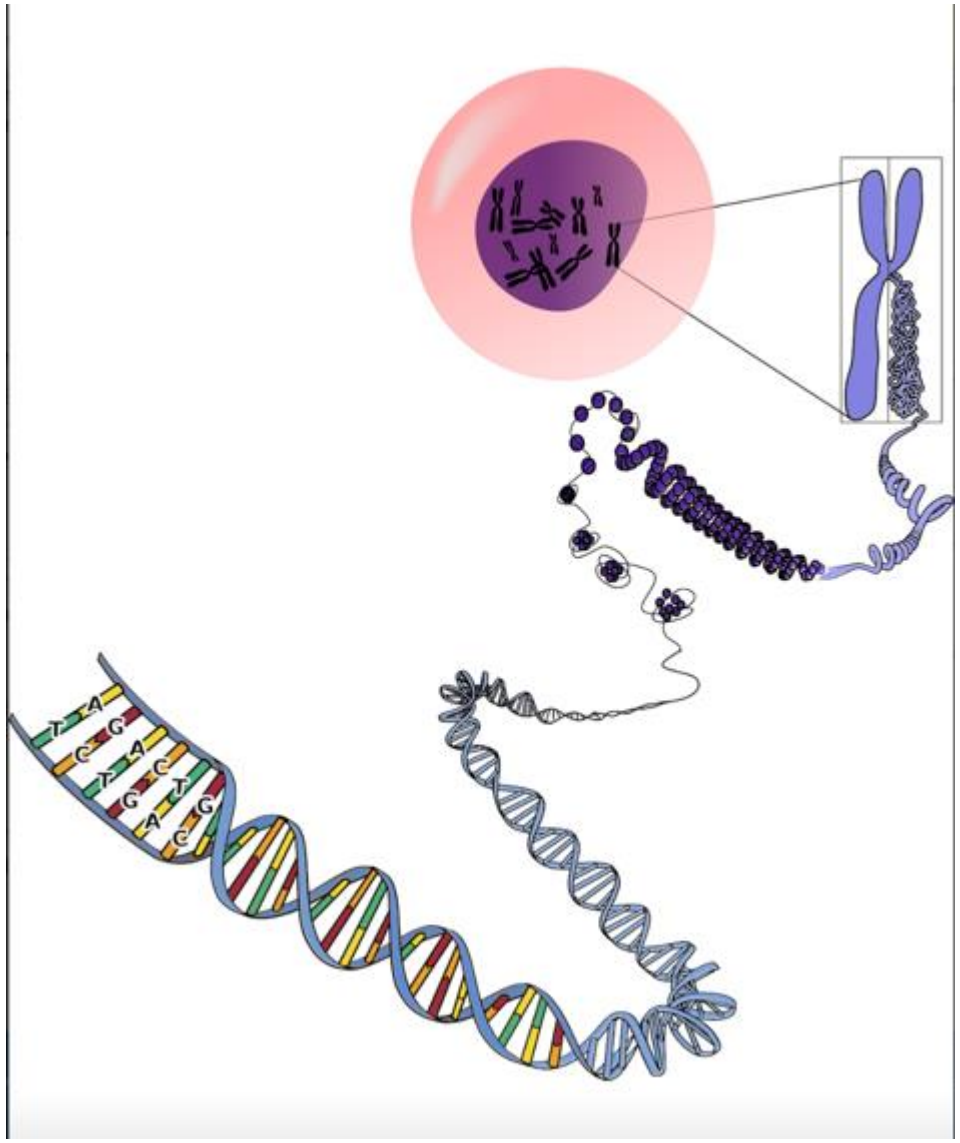


Als Hochrisiko-Zytogenetik werden hier das Vorhandensein einer Deletion 17p13, Translokation (4;14) oder Translokation (14;16) gewertet

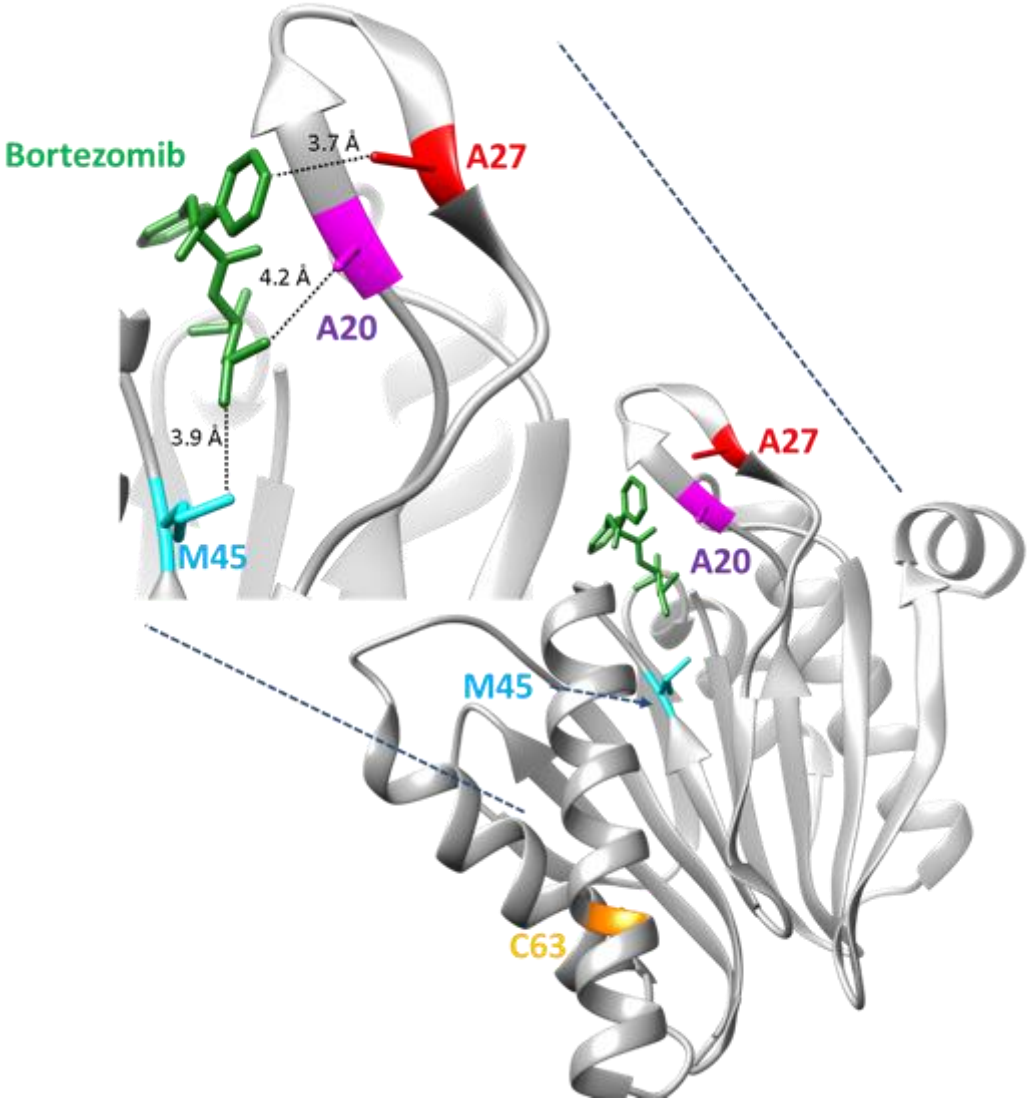
Uniklinikum Würzburg

- Zusätzliche, experimentelle Diagnostik
  - Experimentelles Mutationsscreening zum Erkennen von Medikamentenresistenz und zur Ermöglichung zusätzlicher Therapieoptionen

Der genetische Code



Resistenzvermittelnde Mutationen

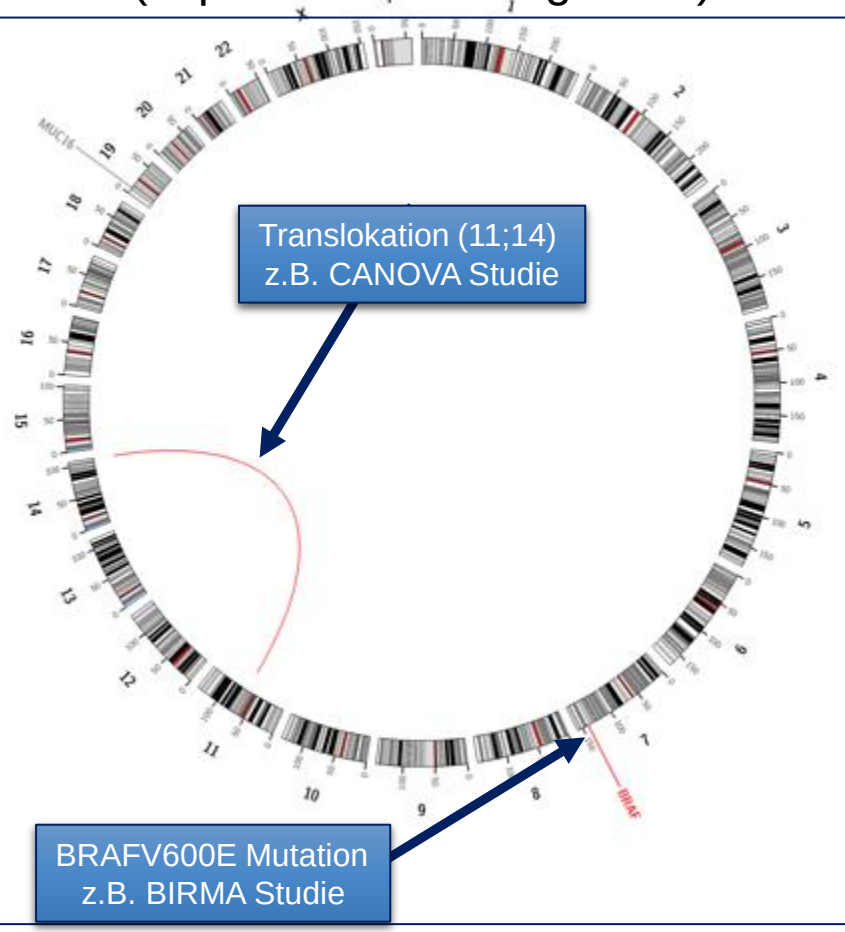


Actionable Mutations in MM

Gene	Tumor Fraction (%)	Patients No.	Patients %	Example	Phase (cancer)
KRAS	32.3	98	21.17	MEK inhibitor	III
NRAS	33.6	90	19.44	MEK inhibitor	III
BRAF	25.2	31	6.70	Vemurafenib	III
CCND1	41.7	10	2.16	Pablociclib	I
FGFR3	37.1	10	2.16	Masitinib	II
MLL	29.1	8	1.73	EPZ-5676	I
ROS1	41.3	8	1.73	Foretinib	II
RET	33.4	6	1.30	Cabozantinib	II
ERBB4	42.3	5	1.08	Lapatinib	II
FLT3	44.0	5	1.08	Sunitinib	III
ERBB2	11.9	3	0.65	Herceptin	III
FGFR2	66.7	3	0.65	Masitinib	II
KIT	40.9	3	0.65	Ponatinib	III
MAP2K1	14.9	3	0.65	MEK inhibitor	III
ABL1	53.3	2	0.43	Gleevec	III
BRCA2	52.2	2	0.43	PARP inhibitor (BMN673)	I
DNMT3A	39.2	2	0.43	5-Azacytidin	III
EGFR	21.7	2	0.43	Erlotinib	III
EPHB2	37.8	2	0.43	Herceptin	III
PDGFRA	17.4	2	0.43	Pazopanib	I
BRCA1	6.4	1	0.22	PARP inhibitor (BMN673)	I
DDR2	58.3	1	0.22	Dasatinib	III
FGFR4	28.6	1	0.22	Masitinib	II
HIF1A	13.5	1	0.22	PX-478	I
IDH2	17.9	1	0.22	AG-221	I
KIF5B	5.9	1	0.22	Cabozantinib	II
MET	39.8	1	0.22	MSC2156119J	I
MPL	51.9	1	0.22	Eltrombopag	III
PIK3CA	45.1	1	0.22	GDC-0941	I
RARA	10.2	1	0.22	ATRA	III

NOTE. Average tumor fractions and percentage of mutations are presented in this table, with an example of agent and the phase of development that may be used. Abbreviations: ATRA, all-*trans*-retinoic acid; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase.

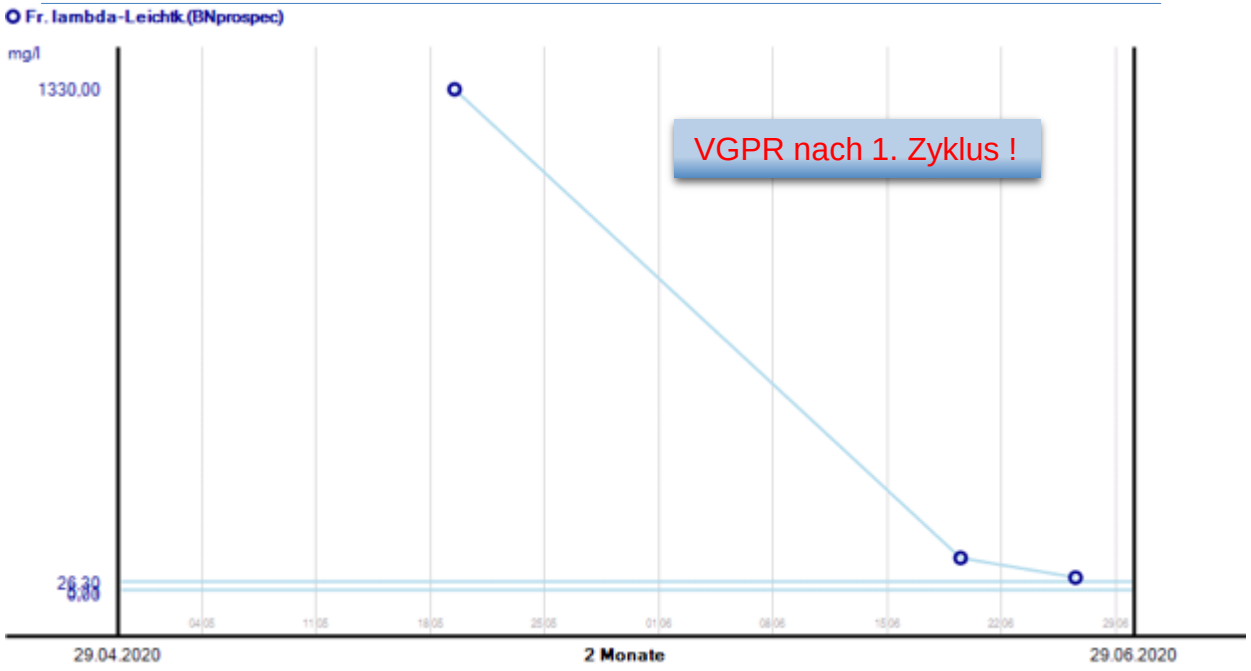
‚Circos Plot' einer Ganzgenom Sequenzierung (experimentelle Diagnostik)



Walker B et al JCO 2015; Andrulis M et al, Cancer Discov. 2013

Phase III „Canova“ Studie: In Würzburg jetzt offen zur Rekrutierung für Patienten mit t(11;14)

- **Translokation (11;14)**
- mindestens 2 Therapielinien
- Progredient unter Lenalidomid aber noch kein Pomalidomid
- Aktive Erkrankung



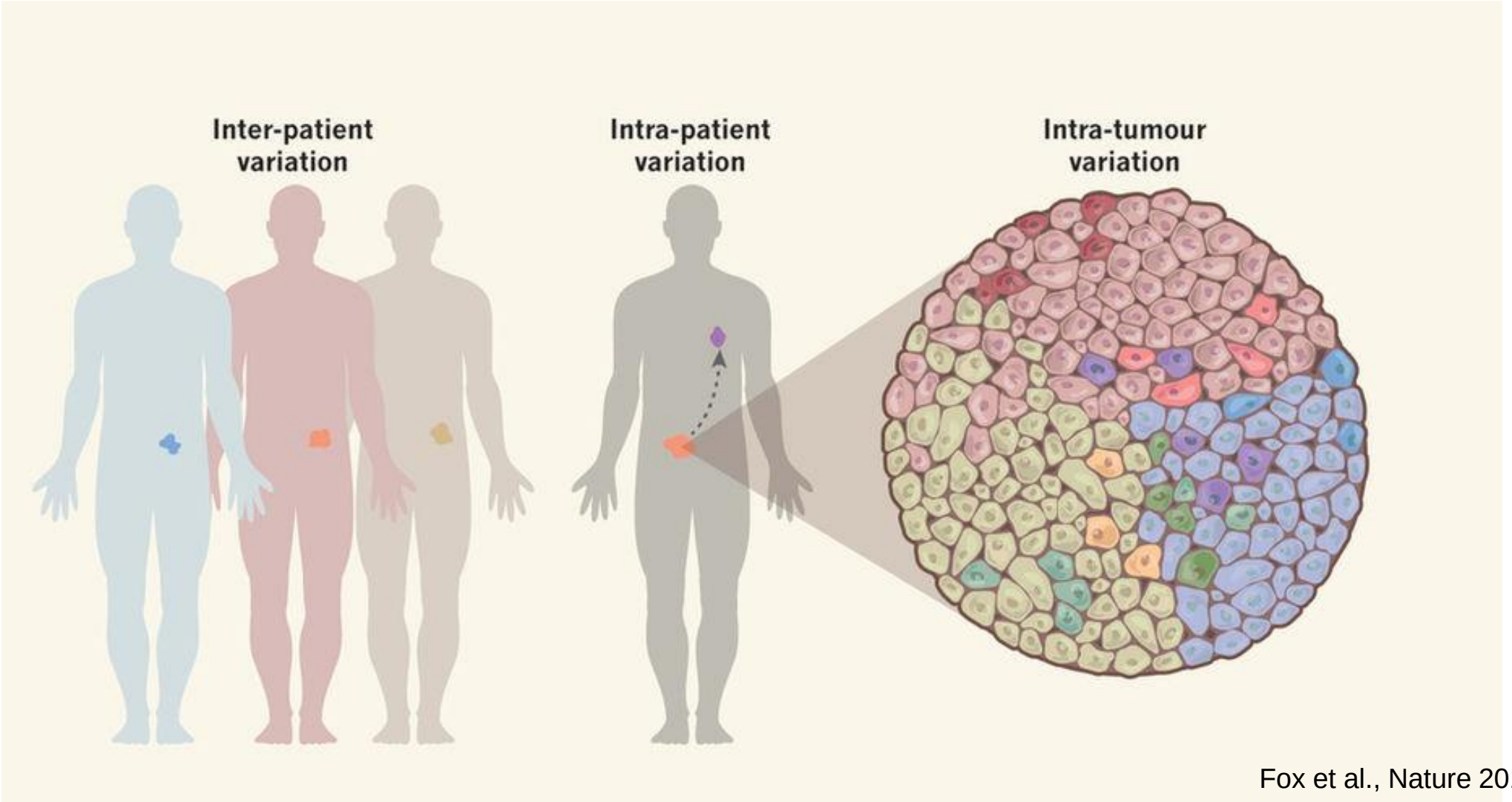
Orale Therapie !!!

Kontakt Frau Scheder: Scheder_A@ukw.de

Remission zerebraler Myelommanifestation durch experimentelle BRAF gerichtete Therapie mit Dabrafenib und Trametinib

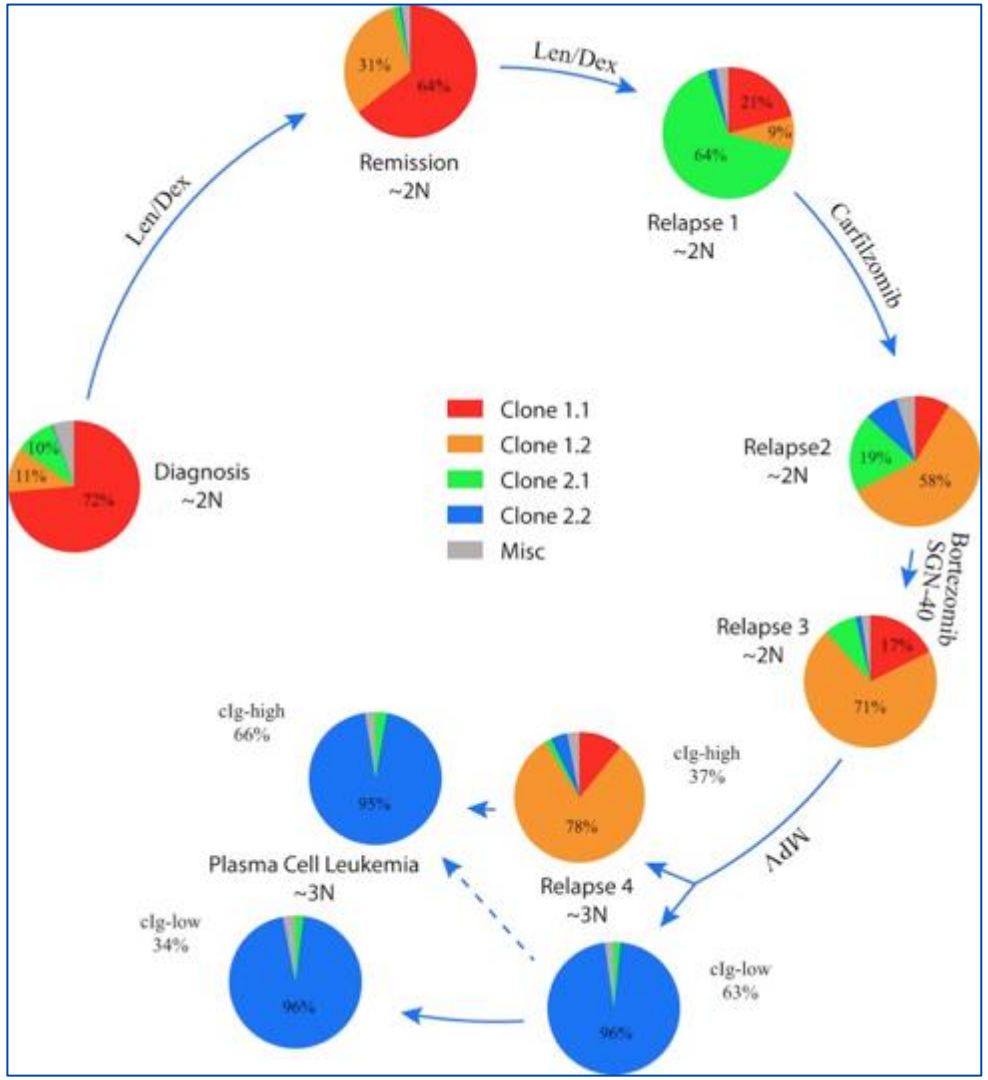
Da Via and Kortüm Oncologist. 2019

Inter-Patienten Heterogenität vs. Intra-Tumor Heterogenität

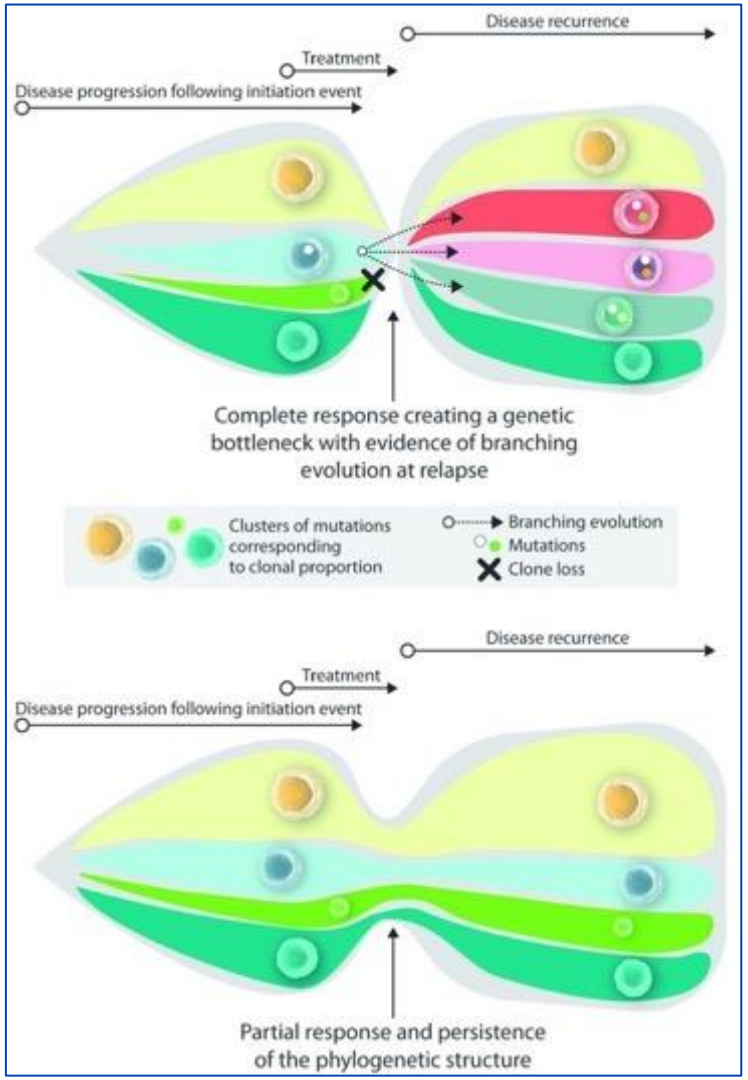


Fox et al., Nature 2014

Die klonale Evolution wird ganz wesentlich durch die Therapie beeinflusst



Keats JJ et al. Blood 2012



Cornelius C. Miething Haematologica 2019;104:1292-1293

Multiple Myelome

MENU

nature REVIEWS CLINICAL ONCOLOGY

Review Article | Published: 23 April 2018

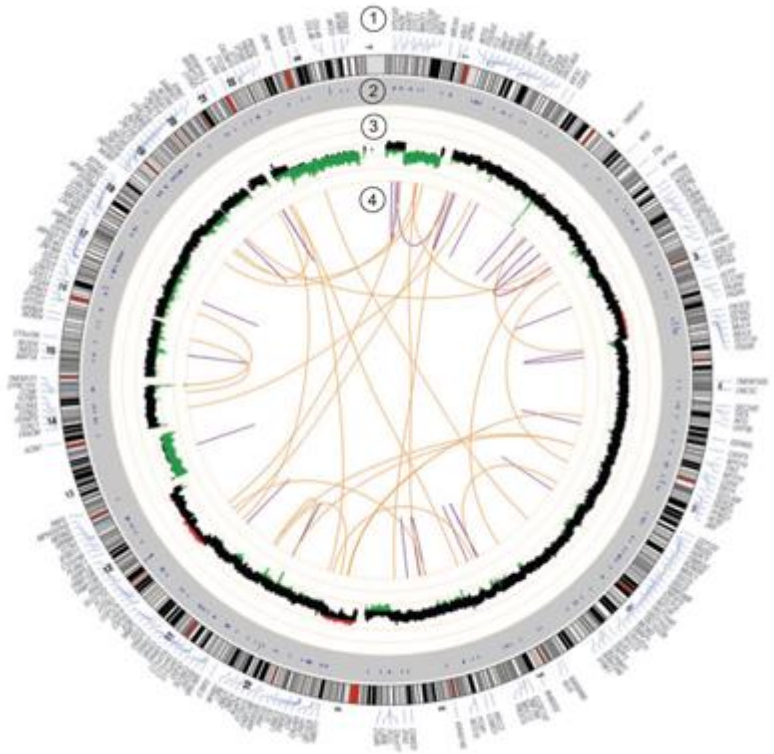
The multiple myelomas — current concepts in cytogenetic classification and therapy

Shaji K. Kumar & S. Vincent Rajkumar

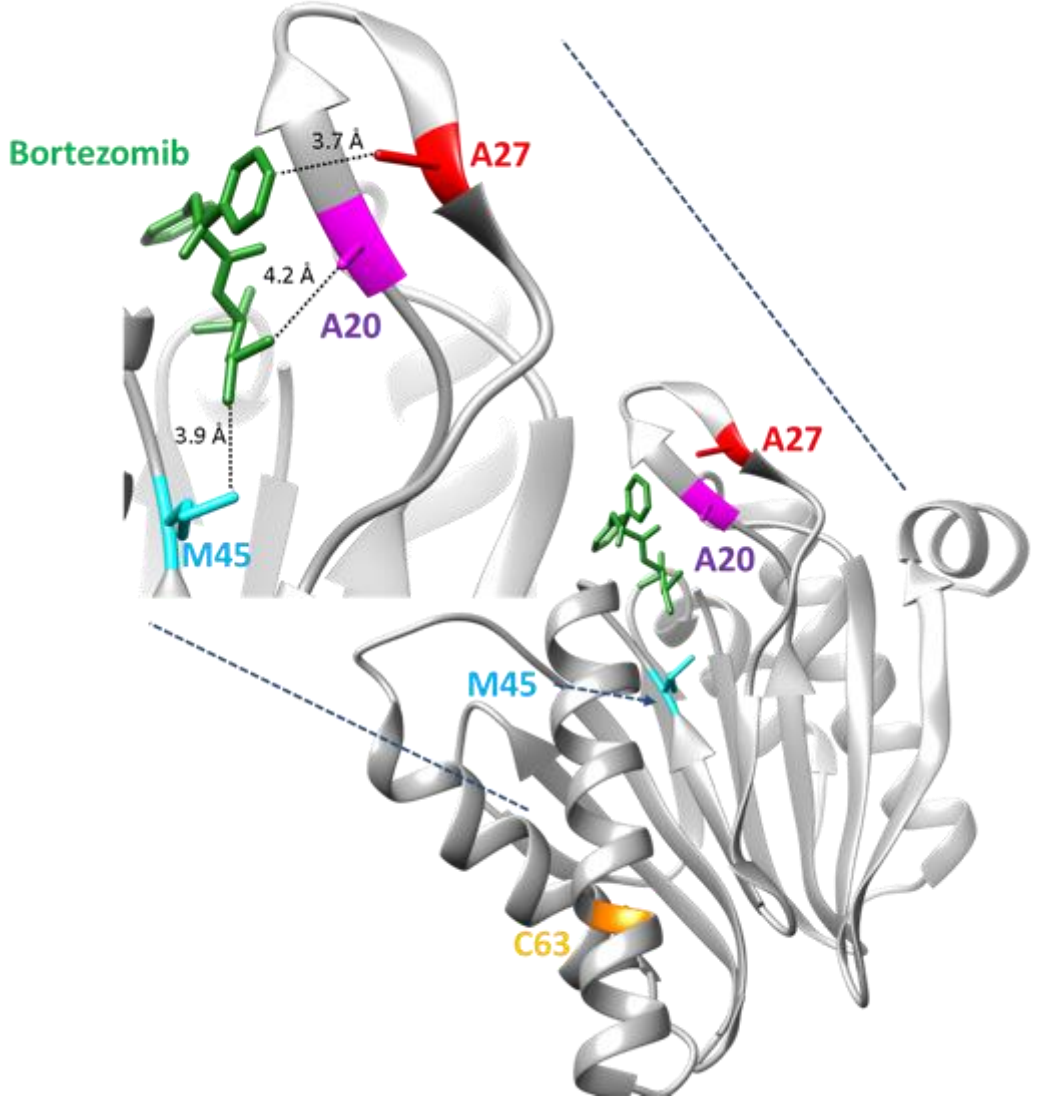
Nature Reviews Clinical Oncology **15**, 409–421 (2018) | Download Citation

2037 Accesses | **22** Citations | **139** Altmetric | Metrics

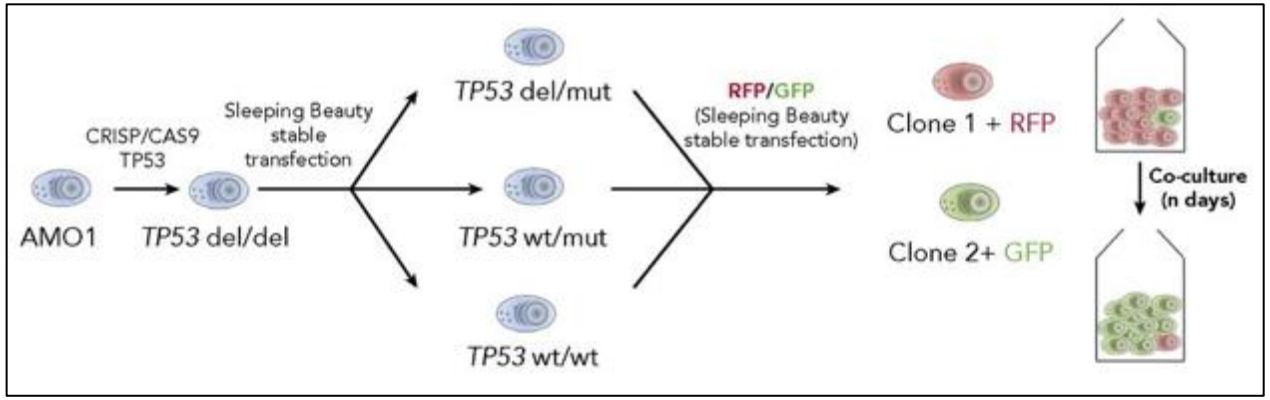
Erstbeschreibung von resistenzvermittelnden Mutationen

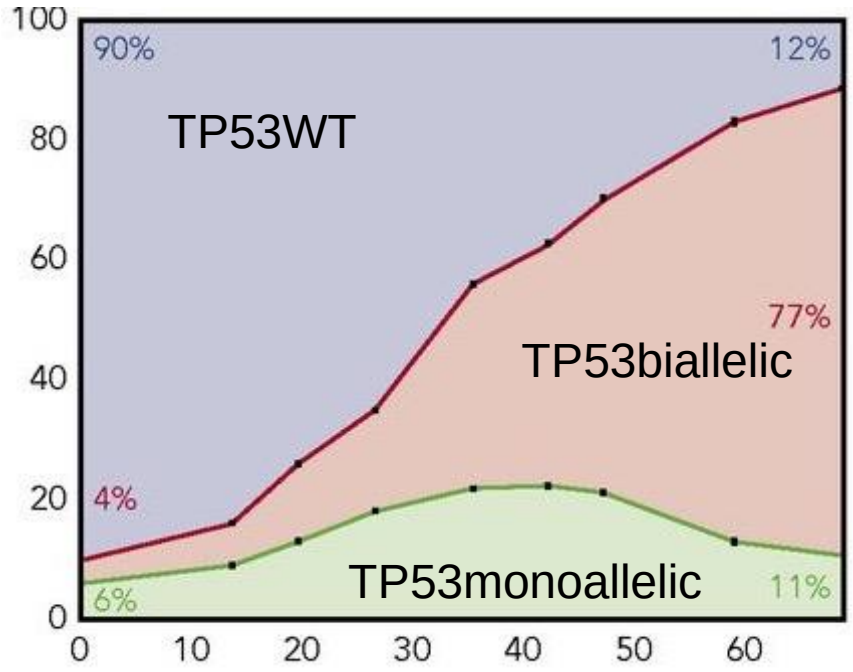


Chr	hg19 position	SNV	Gene	SIFT	Polyphen2	Effect
3	3195747	C>T	*CRBN*	Tolerated	Benign	Nonsynonymous coding
3	3215822	G>A	*CRBN*	Not predicted	Not predicted	STOP gained
3	178936082	G>A	*PIK3CA*	Tolerated	Damaging	Nonsynonymous coding
5	142779299	C>G	*NR3C1*	Tolerated	Damaging	Nonsynonymous coding
10	104160420	C>T	*NFKB2*	Damaging	Damaging	Nonsynonymous coding
11	108183173	C>T	*ATM*	Tolerated	Damaging	Nonsynonymous coding
12	25398285	C>A	*KRAS*	Damaging	Damaging	Nonsynonymous coding
17	29588752	G>A	*NF1*	Tolerated	Damaging	Nonsynonymous coding
18	12720612	G>A	*PSMG2*	Tolerated	Benign	Nonsynonymous coding



Funktioneller Mutationstest in vitro - der *clonal competition assay*





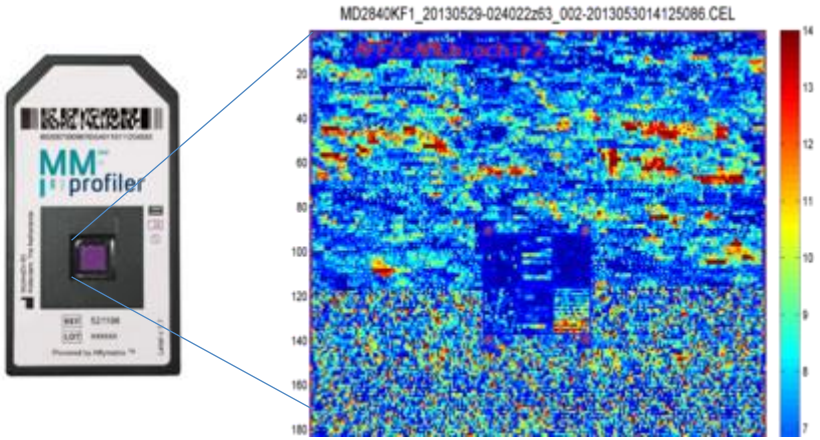
Days in co-culture

Zusätzliche, experimentelle Diagnostik

– Gene expression profiling um Hochrisikoerkrankungen zu erkennen

Neu: Prognosestellung mittels GEP

- Individuelle Prognosestellung auf Basis des Tumor – Genexpressionsprofils

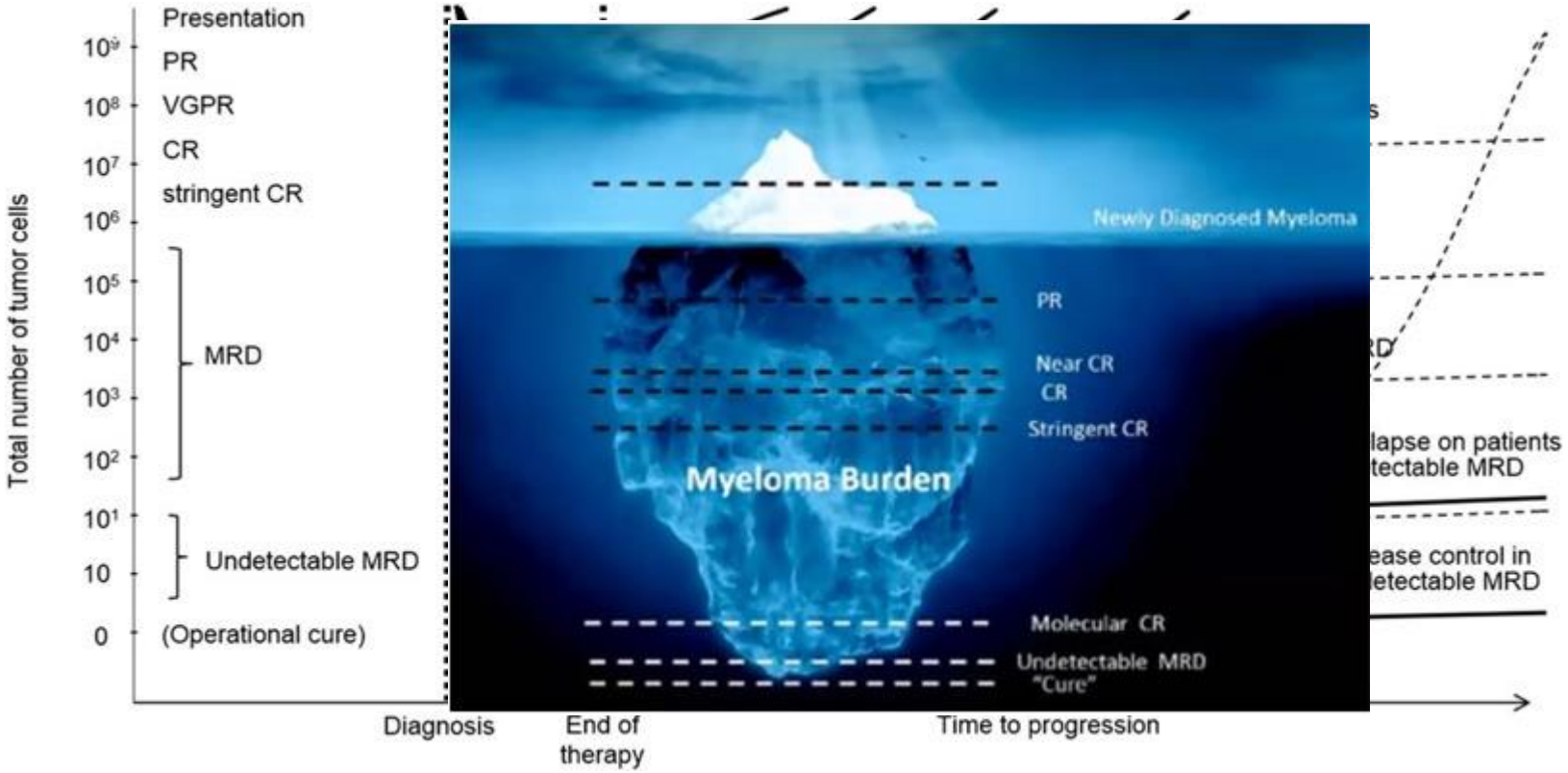


AG Kortüm

Genauere Bestimmung des Therapieerfolgs
-experimentelle minimale Resterkrankungsdiagnostik

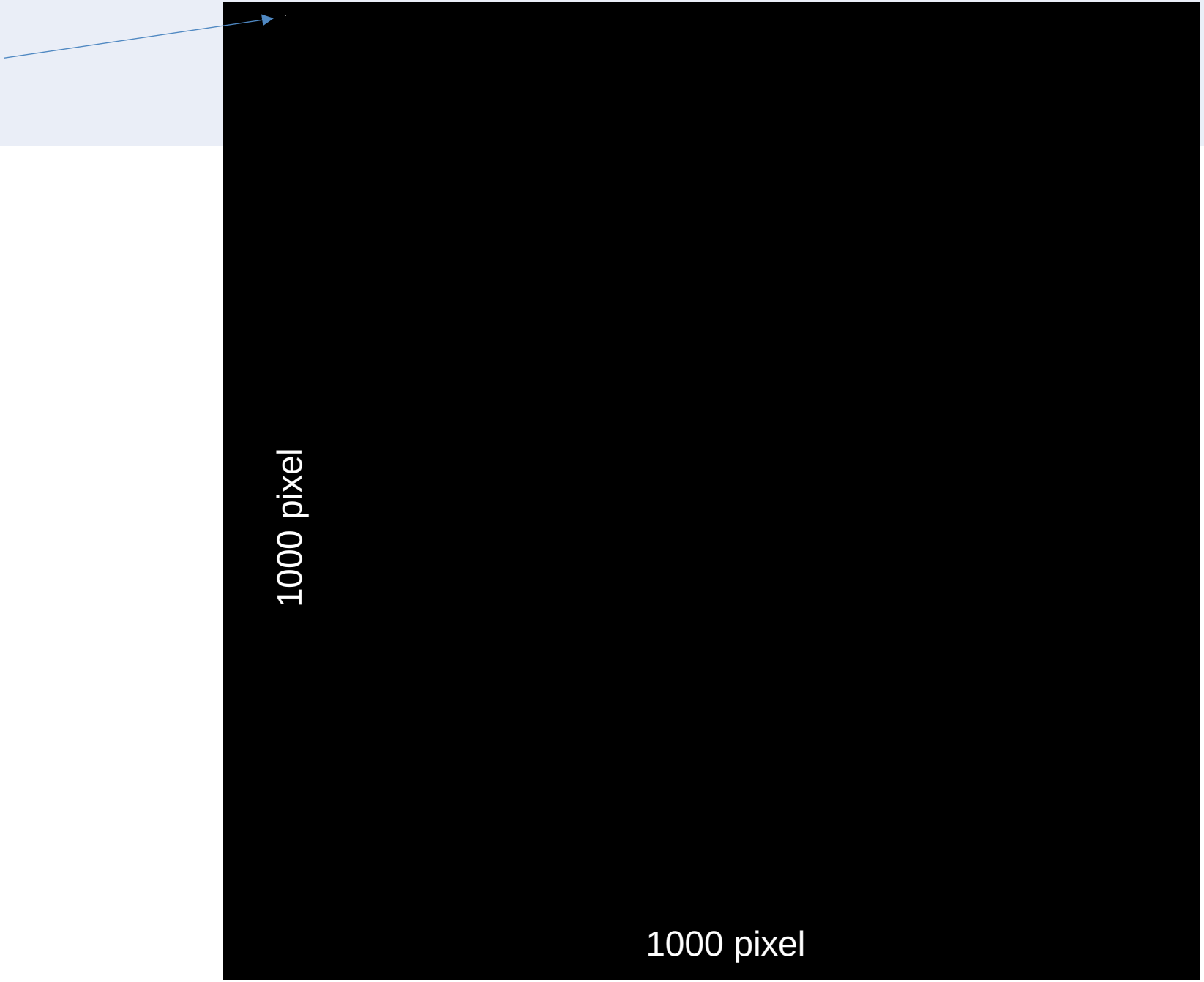
Experimentelle Resterkrankungsdiagnostik

Therapieziel



Bruno Paiva et al. Blood 2015;125:3059-3068

blood


1000 pixel
1000 pixel

Sensitivität von 10^{-6} bedeutet
1 Krebszelle unter 1 Millionen Knochenmarkzellen zu finden

Experimentelle MRD Bestimmung

Uniklinikum Würzburg

B-CELL TRACKING (MRD) REPORT

clonoSEQ

For *In Vitro* Diagnostic Use. Rx Only.

PATIENT NAME	DATE OF BIRTH	MEDICAL RECORD	GENDER	REPORT DATE	ORDER #
Jane Doe	**01/02/2014**	**256493216**	**Female**	**10/23/2018**	**D-925327**

SPECIMEN TYPE / SPECIMEN SOURCE	COLLECTION DATE	DATE RECEIVED	SAMPLE ID
Bone Marrow Aspirate Slides	10/15/2017	10/16/2017	SP-237584

ICD CODE
C91.00 Acute lymphoblastic leukemia not having achieved remission

ORDERING PHYSICIAN	INSTITUTION
Alexander Smith	University Cancer Hospital

ASSAY DESCRIPTION

The clonoSEQ® Assay is an *in vitro* diagnostic that uses multiplex polymerase chain reaction (PCR) and next-generation sequencing (NGS) to identify and quantify rearranged IgH (VDJ), IgH(DJ), IgK, and IgL receptor gene sequences, as well as translocated BCL1/IgH(J) and BCL2/IgH(J) sequences in DNA extracted from bone marrow from patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) or multiple myeloma (MM).

SAMPLE-LEVEL MRD RESULT

No Residual Sequences Detected

ESTIMATED MRD VALUE:

0 residual clonal cells (Range: 0 - 2) **

Sequence determining MRD result: IGH Sequence A

The MRD range presented above represents the 95% confidence interval for the measured number of residual clonal sequences per million nucleated cells. Details for each identified dominant sequence from this sample are provided on subsequent pages of this report.

RESULTS SUMMARY

- Genomic DNA was extracted from a bone marrow aspirate slide sample.
- The 3 dominant sequences identified in a diagnostic sample from this patient were not detected in this current sample.

** The sensitivity of this assay is directly related to the total number of cells (or cellular equivalents of genomic DNA) analyzed. There were 1,331,826 total nucleated cells evaluated from this sample.

► **The results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history, and other findings.**

SAMPLE-LEVEL MRD TRACKING *(shows only the sequence determining the MRD results for each time point)*

3

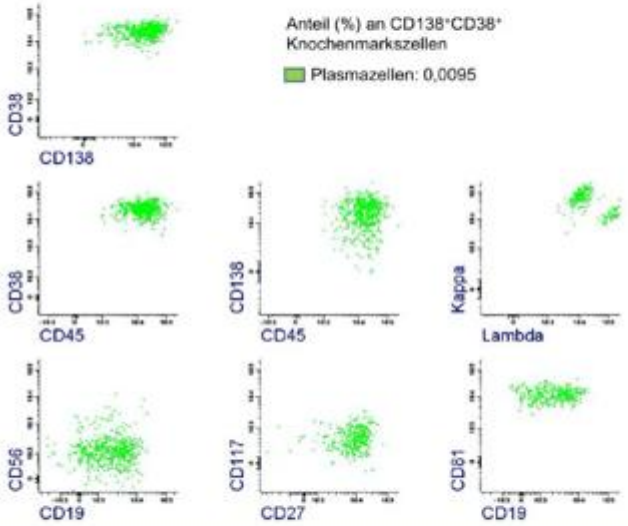
Universitätsklinikum Würzburg
Klinikum der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Direktor: Prof. Dr. H. Einsele

Medizinische Klinik & Poliklinik II
Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Hermann Einsele
Analyse: Dr. Paula Tabares
Labor: Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack
Befundung: PT&AB

Gemessene Zellen: 1 x 10^7

Anteil (%) an CD138⁺CD38⁺ Knochenmarkszellen

Plasmazellen: 0,0095



Befund:
Die durchflusszytometrische Analyse von Knochenmarksplasmazellen zeigt eine **CD138, CD38-Expression von 0,0095% aller mononukleären Knochenmarkszellen**. Die Analyse der CD138⁺CD38⁺ Plasmazellen ergibt einen **CD56⁻CD45⁺CD19^{het}CD27⁺CD81⁺ CD117⁻ Phänotyp**.

Minimale Resterkrankung (MRD): **Negativ,** kein Nachweis einer aberranten/Leichtketten-restringierten Plasmazellpopulation

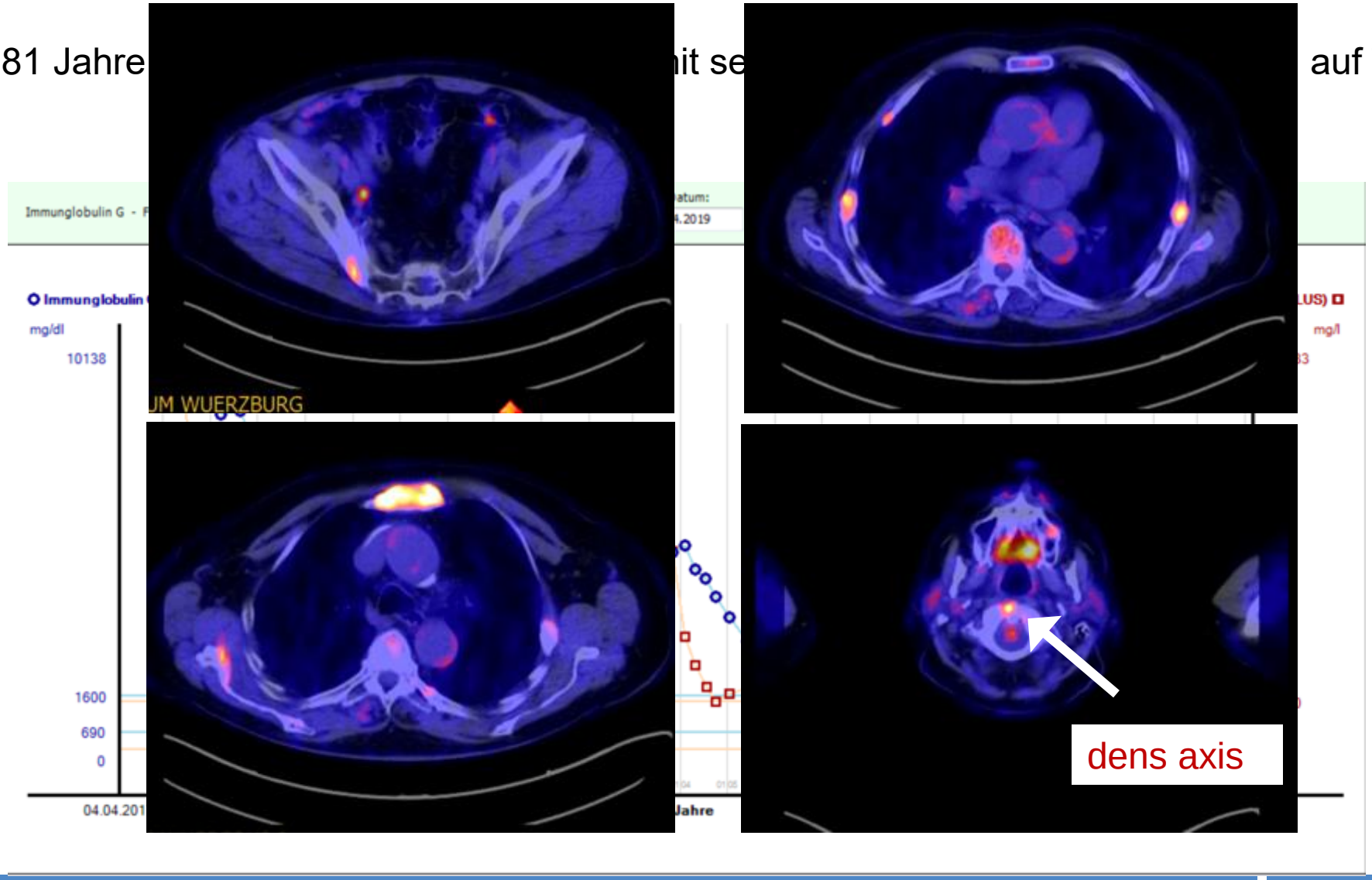
Detektionsgrenze (LOD): 0,0002

Die Feststellung einer minimalen Resterkrankung (MRD) basiert auf einer experimentellen Diagnostik. Da bislang der Stellenwert für klinische Entscheidungen aufgrund von MRD-Befunden nicht definiert wurde, liegt die Bewertung im Ermessensspielraum des behandelnden Arztes.

Clonoseq.com

Können wir uns auf die Blutwerte verlassen? Die Rolle funktioneller Bildgebung in der Remissionsbeurteilung

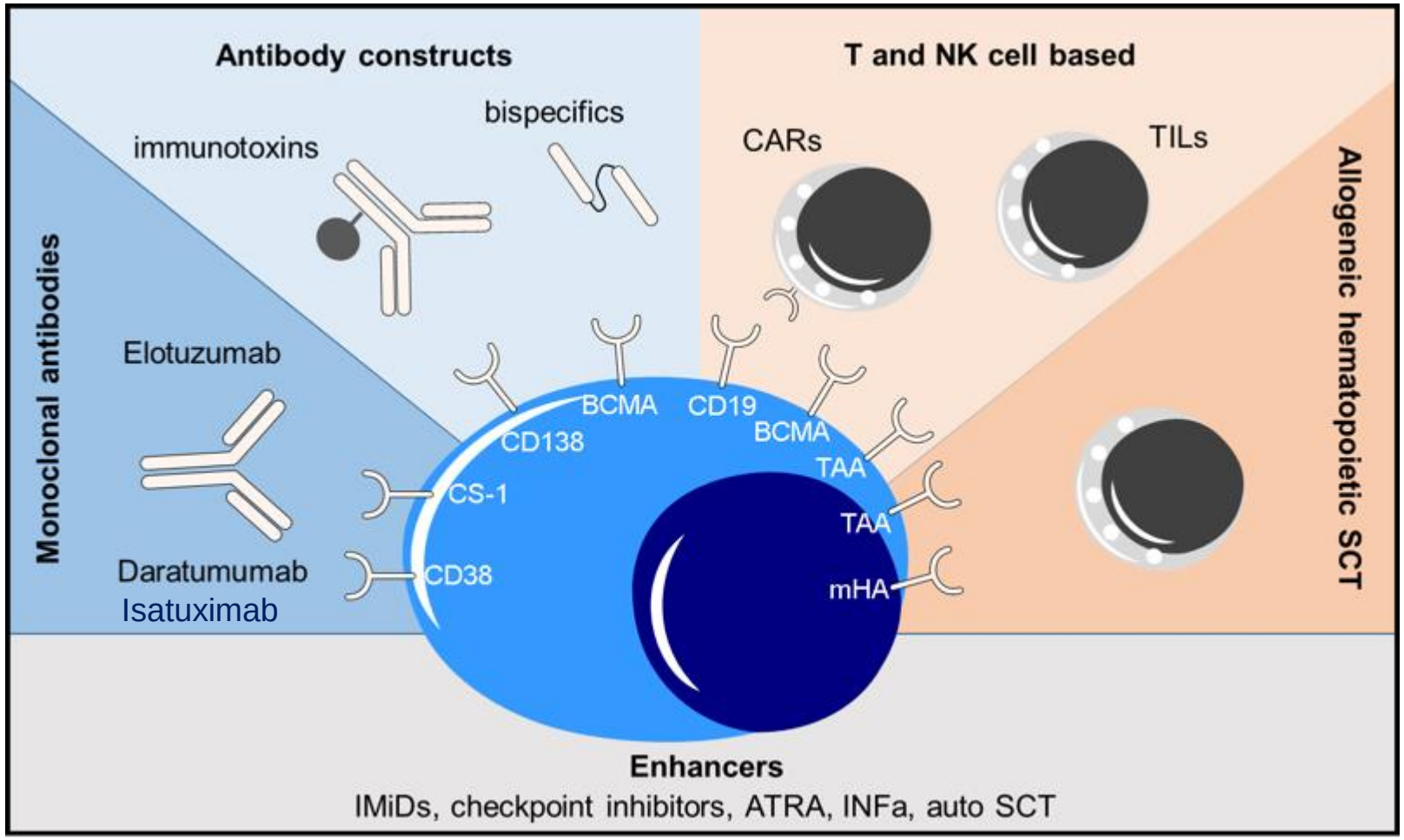
Fitter 81 Jahre mit se auf Therapie



Uniklinikum Würzburg

- Zukünftig / Gegenstand aktueller Forschung:
  - Sind genauere Vorhersagen über die Effektivität von Behandlung möglich?

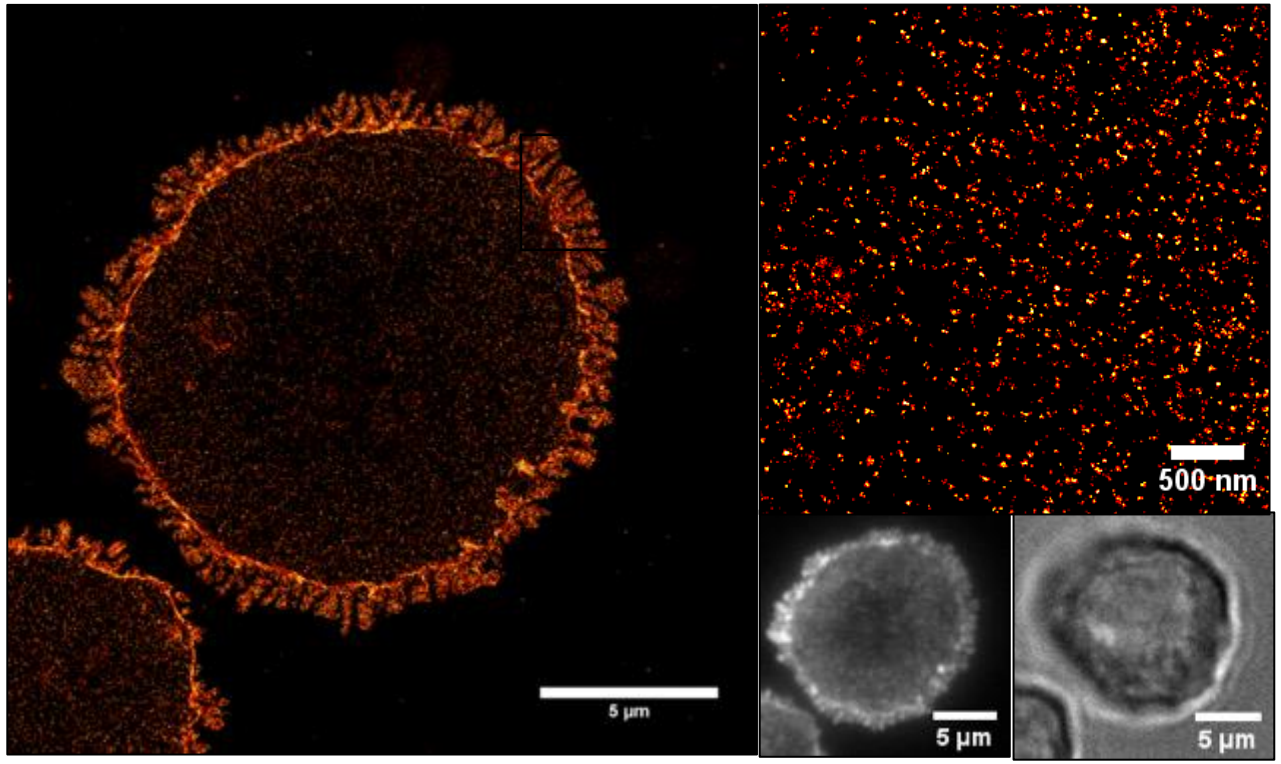
Zukünftig: Oberflächenanalysen um das Arsenal der Immuntherapie wirkungsvoll einzusetzen



Leo Rasche

Experimentell: “dSTORM” - Single Cell Super High Resolution Mikroskopie (Beispiel CD38 oder BCMA)

- Zur sensitiven Erfassung von Antigenmodulation (Rezeptordichte, Glycocalyx,…)
- Zur Erfassung möglicher Mechanismus der Immunevasion



Kortüm und Sauer, unpubliziert

Zusammenfassung

Uniklinikum Würzburg

Die Knochenmarkpunktion wird genutzt:

- Zur Diagnosestellung
- Zur genaueren Remissionsbeurteilung
- Zur Ermittlung des genetischen Risikoprofils
- Zur besseren Verständnis von Resistenzentwicklung
- Zur Ermöglichung neuer Therapien /Einschluss in Studien
- UND: zur Unterstützung von Forschung mit dem Ziel die Behandlung des MM weiter zu verbessern

Uniklinikum Würzburg

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!