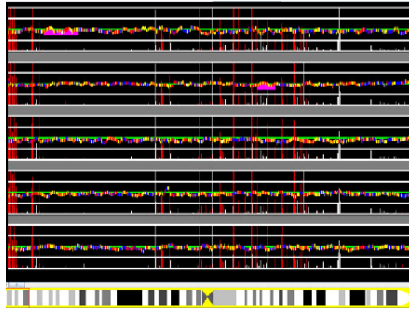
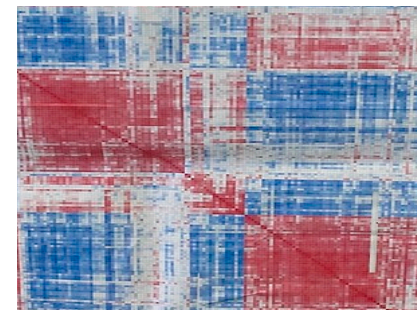
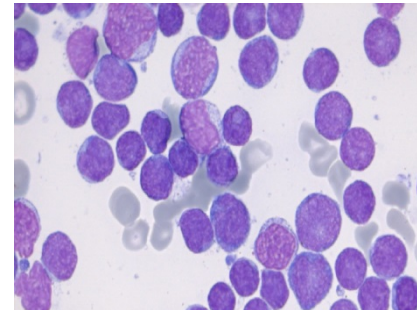


Moleculaire Minimale Restziekte Detectie in Acute Myeloïde Leukemie



Peter J.M. Valk

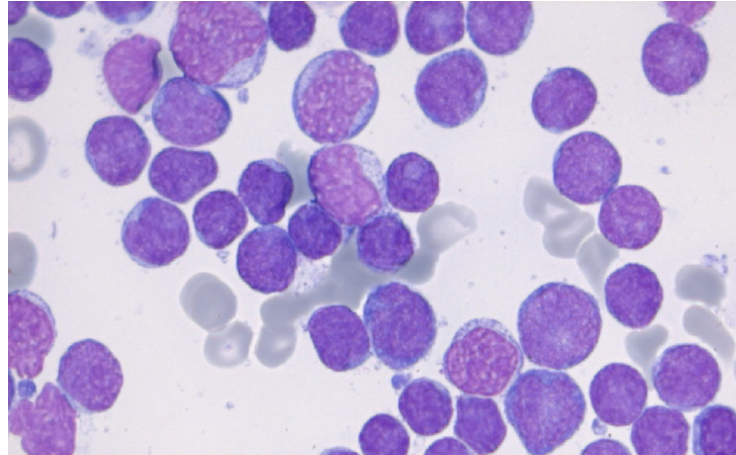
Afdeling Hematologie
Erasmus Universiteit MC Rotterdam
Nederland



Nederlandse Vereniging voor Cytometrie en SKML sectie IMCD

22 november 2018 - Zwolle

Acute Myeloïde Leukemie



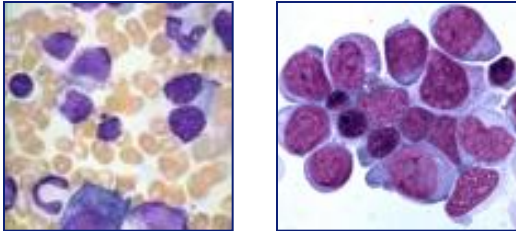
AML

Heterogene Klonale Ziekte

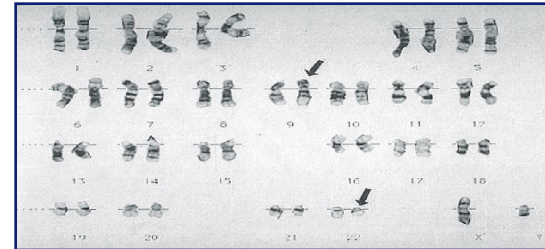
Morfologie
Immunofenotype
Cytogenetica
Moleculair Genetische Afwijkingen
Respons op therapie
Therapie uitkomst

Geïntegreerde diagnostiek van hematologische maligniteiten

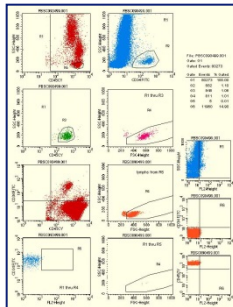
Morfologie



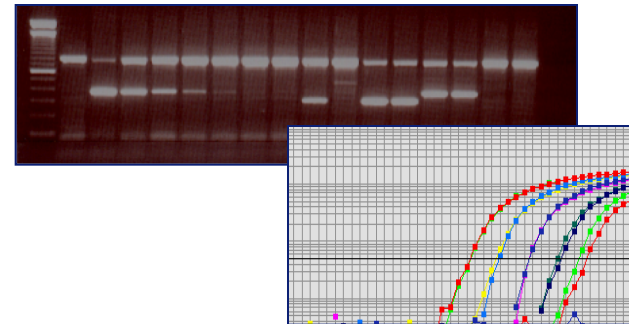
Cytogenetica



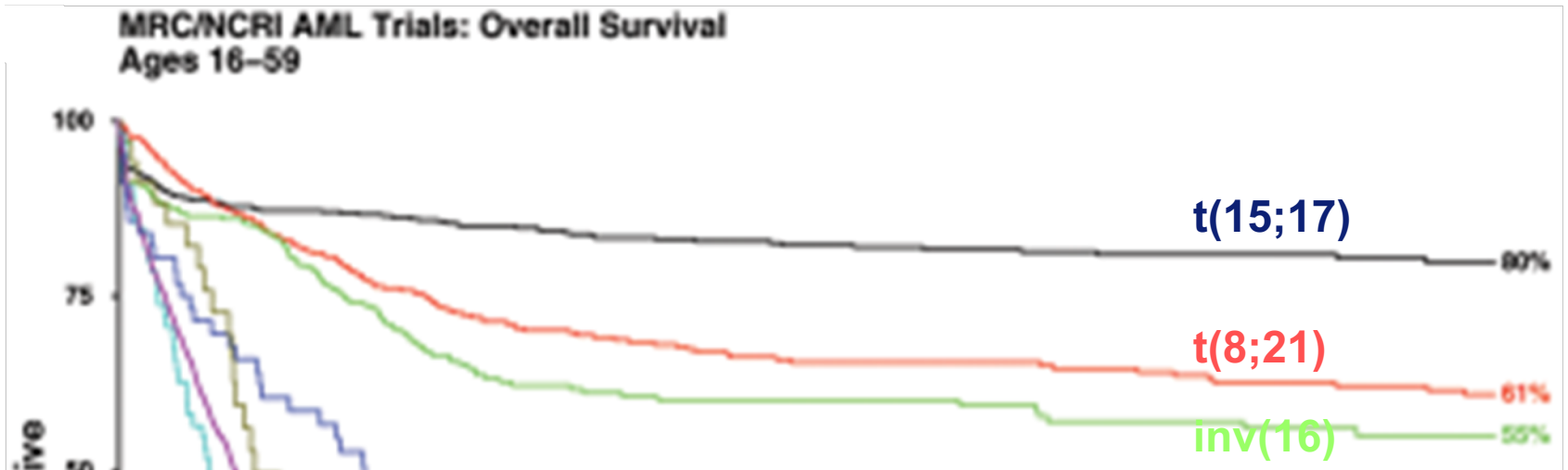
Immunofenotypering



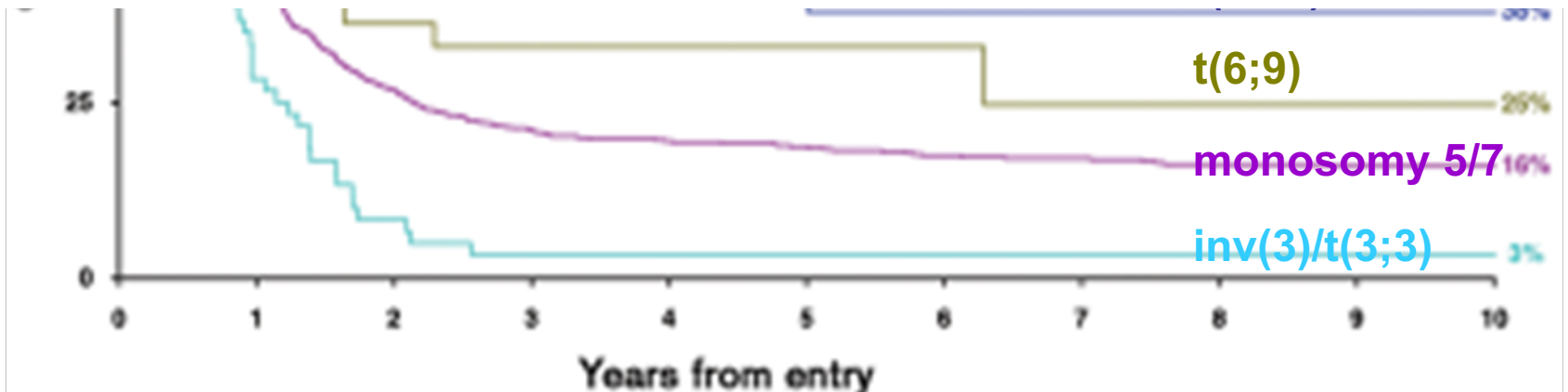
Moleculaire diagnostiek



AML overleving en cytogenetica



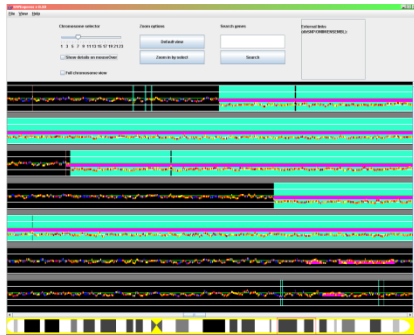
Ongeveer 50% van alle AML patiënten heeft een normaal karyotype



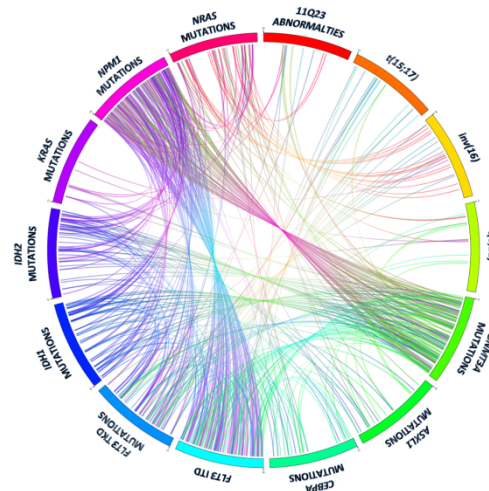
Grimwade en Hills, 2009

Genoom-brede technologieën om nieuwe genetische afwijkingen te ontdekken om de behandeling van AML te verbeteren

Copy number analyses

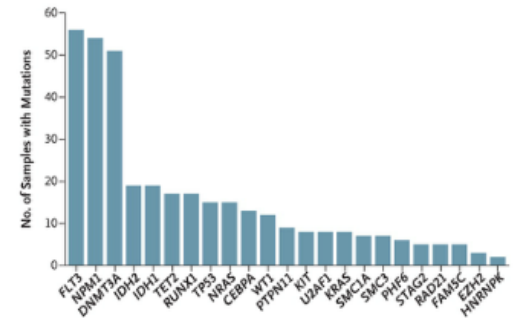


Sanders et al., 2008



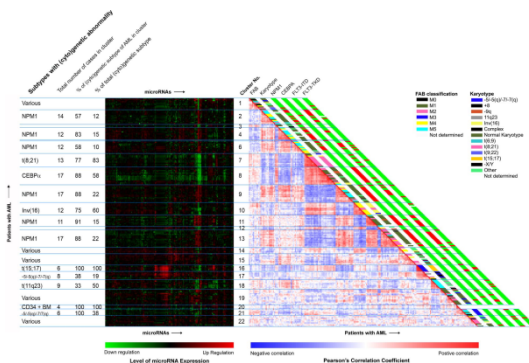
Sanders et al., 2013

Next generation sequencing



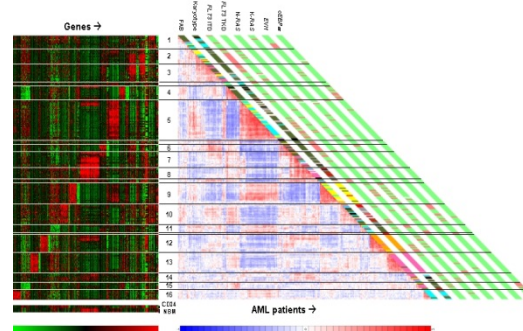
TCGA, NEJM, 2013

MicroRNA profiling



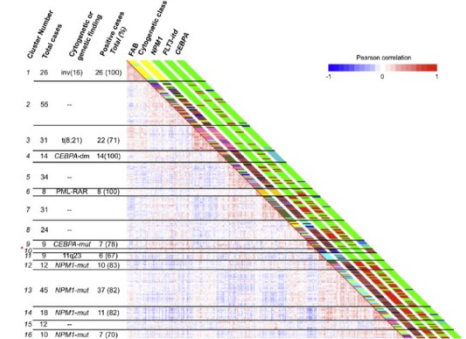
Jongen et al, Blood, 2008

Gene expression profiling



Valk et al, NEJM, 2004

Methylation profiling



Figuroa et al, Cancer Cell, 2010

Risico indeling AML: ELN2017

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i>-ITD or with <i>FLT3</i>-ITD^{low}† Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i>-ITD^{high}† Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i>-ITD or with <i>FLT3</i>-ITD^{low}† (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> −5 or del(5q); −7; −17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i>-ITD^{high}† Mutated <i>RUNX1</i>¶ Mutated <i>ASXL1</i>¶ Mutated <i>TP53</i>#

Acute myeloïde leukemie (AML)

- De meerderheid (>80%) van de patiënten met AML bereiken een complete morfologische remissie CR na hoge dosis inductie chemotherapie.
- Echter, veel AML patiënten recidiveren.
- Kunnen we het voorspellen van een opkomend recidief verbeteren door moleculaire restziekte detectie met next generation sequencing?

Molecular Minimale Restziekte Detectie in AML

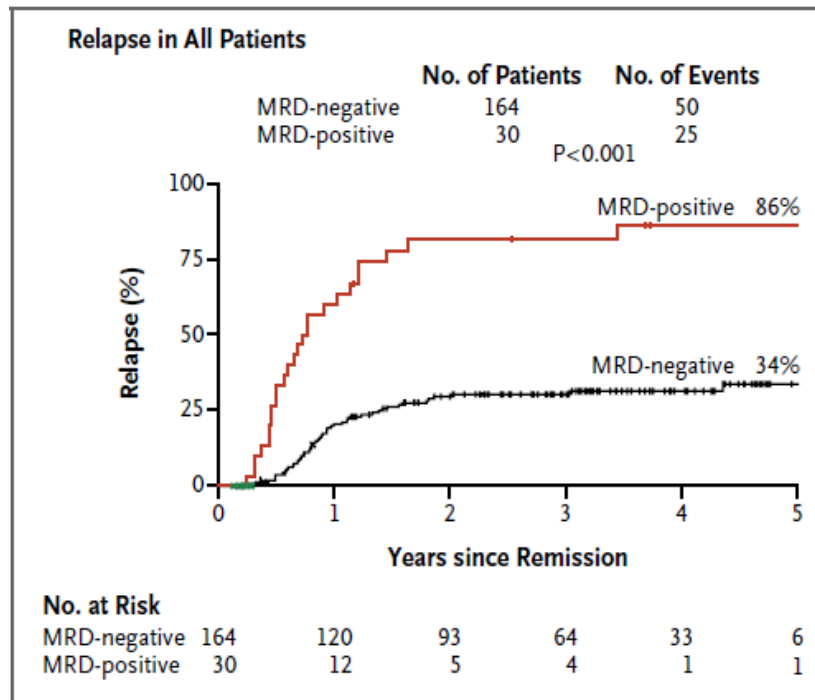
Acute Promyelocyttaire Leukemie (APL)

PML-RARA : Verandering van niet detecteerbare naar detecteerbare ziekte met RT-PCR is heel sterk geassocieerd met een opkomend recidief.

Core-binding factor leukemias (AML)

RUNX1-RUNX1T1
CBFB-MYH11 : Patiënten waarbij de restziekte met RT-PCR niet meer detecteerbaar is hebben een lagere kans op een recidief

MRD monitoring in mutant *NPM1* AML met RQ-PCR

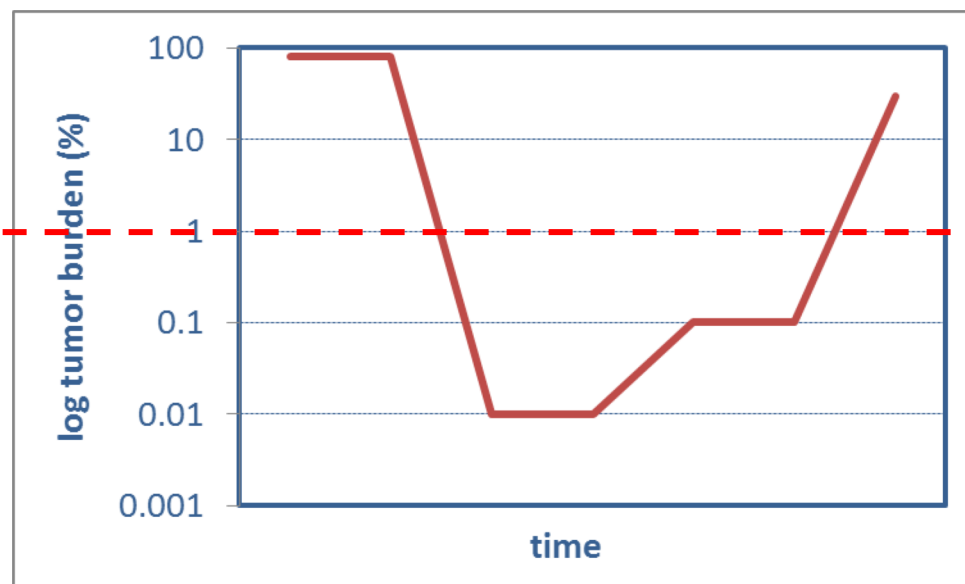


Chou et al., Leukemia 2007
Schnittger et al., Blood 2009
Krönke C et al., JCO 2011
Shayegi et al., Blood 2013
Hubmann et al., 2014
Jain et al., 2014
Ivey et al., NEJM 2016

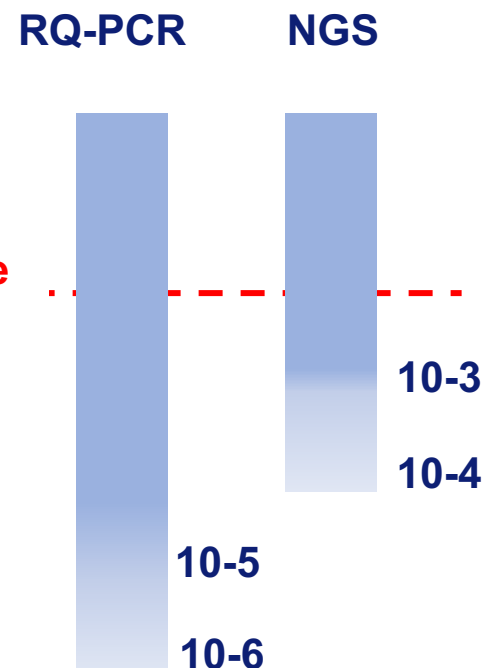
Ivey et al., 2016

De aanwezigheid van minimale restziekte gedefinieerd door mutant *NPM1* transcripten is een stabiele, betrouwbare en onafhankelijke prognostische factor voor recidief en overleving.

Kunnen we het voorspellen van een opkomend recidief verbeteren door moleculaire restziekte detectie met NGS?



Hematologische remissie



Meerdere (vaak patient-specifieke) moleculaire markers

Targeted next-generation sequencing (NGS) bij diagnose en in CR

mutatie detectie
bij diagnose

ABL1	DNMT3A	KDM6A	RAD21
ASXL1	ETV6/TEL	KIT	RUNX1
ATRX	EZH2	KRAS	SETBP1
BCOR	FBXWF	MLL	SF3B1
BCORL1	FLT3	MPL	SMC1A
BRAF	GATA1	MYD88	SMC3
CALR	GATA2	NOTCH1	SRSF2
CBL	GNAS	NPM1	STAG2
CBLB	IDH1	NRAS	TET2
CDKN2A	IDH2	PDGFRA	TP53
CEBPA	IKZF1	PHF6	U2AF1
CSF3R	JAK2	PTEN	WT1
CUX1	JAK3	PTPN11	ZRSR2

**Illumina
TruSight
Myeloid
panel**

Mean coverage:
~3500x

mutatie detectie
in CR

ABL1	DNMT3A	KDM6A	RAD21
ASXL1	ETV6/TEL	KIT	RUNX1
ATRX	EZH2	KRAS	SETBP1
BCOR	FBXWF	MLL	SF3B1
BCORL1	FLT3	MPL	SMC1A
BRAF	GATA1	MYD88	SMC3
CALR	GATA2	NOTCH1	SRSF2
CBL	GNAS	NPM1	STAG2
CBLB	IDH1	NRAS	TET2
CDKN2A	IDH2	PDGFRA	TP53
CEBPA	IKZF1	PHF6	U2AF1
CSF3R	JAK2	PTEN	WT1
CUX1	JAK3	PTPN11	ZRSR2

**AML
n=430**



inductie therapie



consolidatie



Patiënt karakteristieken AML studiecohort (n=430)

Age (years)

Median	51
Range	18-66

WBC at diagnoses ($10^9/L$)

≤ 100	387	90%
> 100	43	10%

ELN 2017 risk classification

Favorable	204	48%
Intermediate	113	26%
Adverse	113	26%

Number of cycles to CR

One cycle	360	84%
Two cycles	70	16%

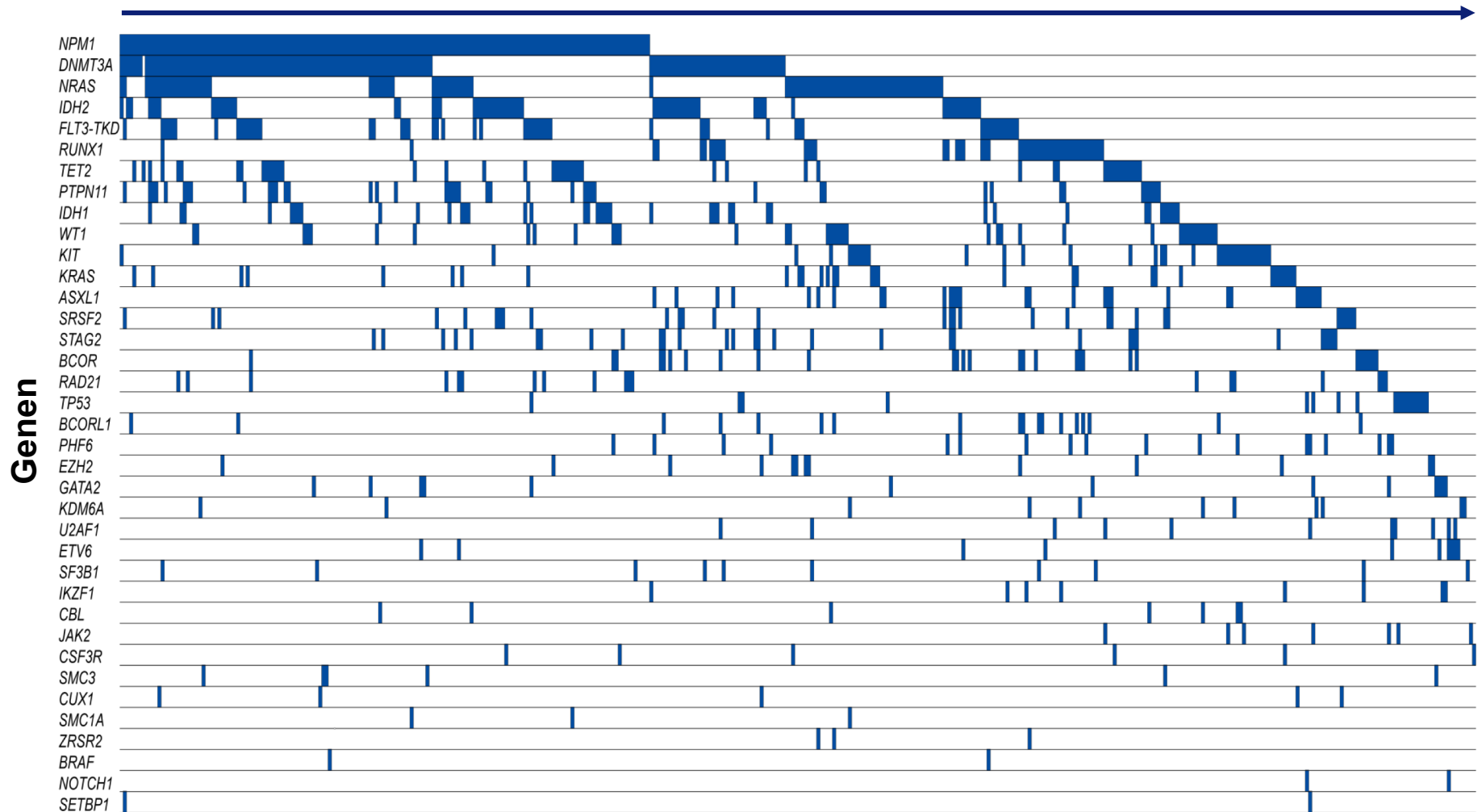
Consolidation therapy

None	46	11%
Chemotherapy	117	27%
Autologous HSCT	78	18%
Allogeneic HSCT	189	44%

Mutaties in AML bij diagnosis

Tenminste 1 potentiële marker aanwezig in ~90% van de AML patienten (2.9 mutaties gemiddeld)

430 AML patiënten



Methoden

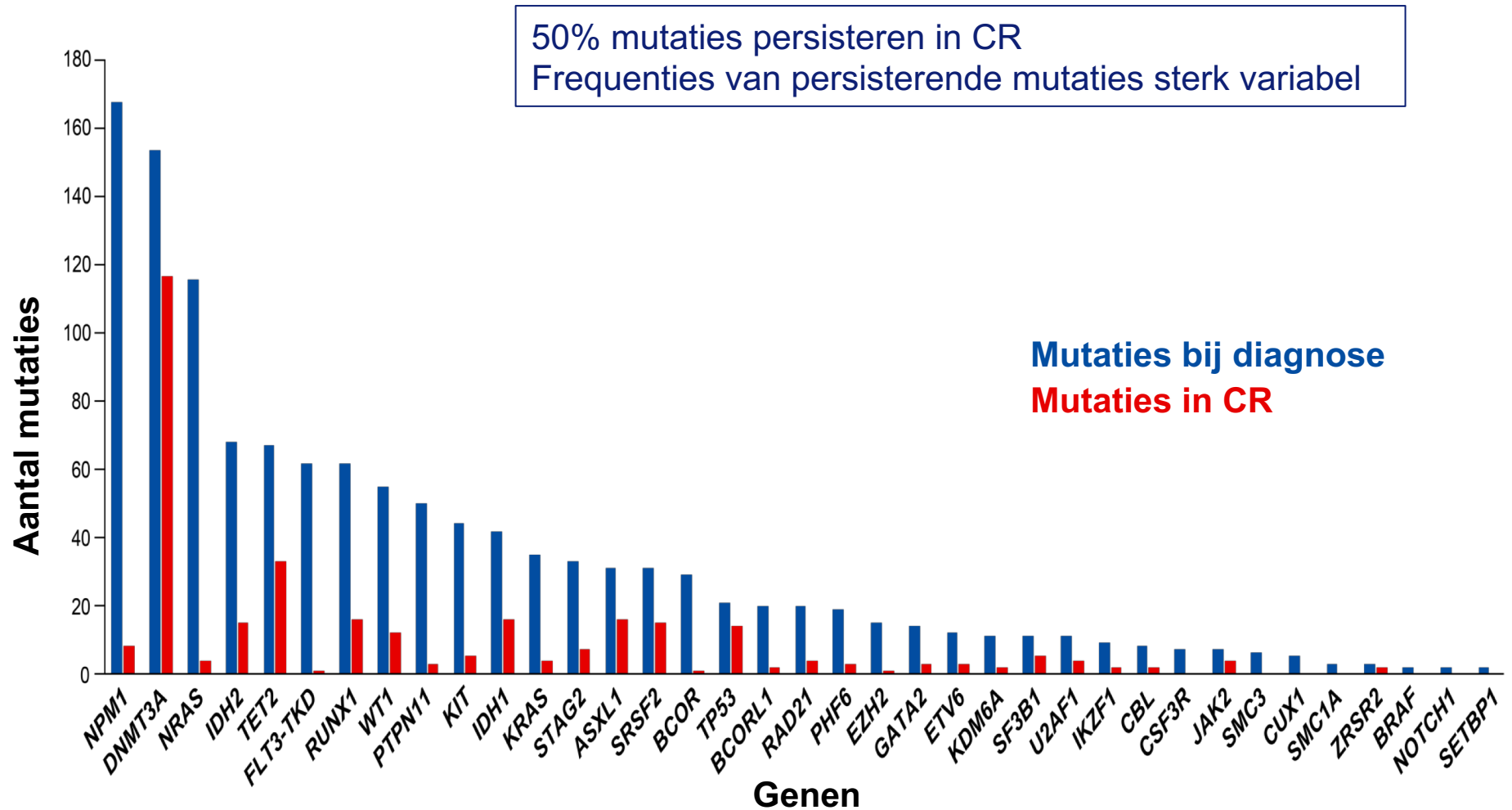
Samples in CR werden genomen tenminste 21 dagen na start 2de chemotherapie cyclus en het meest recente monster voor de start van de consolidatie therapie.

Geen consolidatie therapie: laatste sample binnen een 4 maand interval na de start van de 2de chemotherapie cyclus.

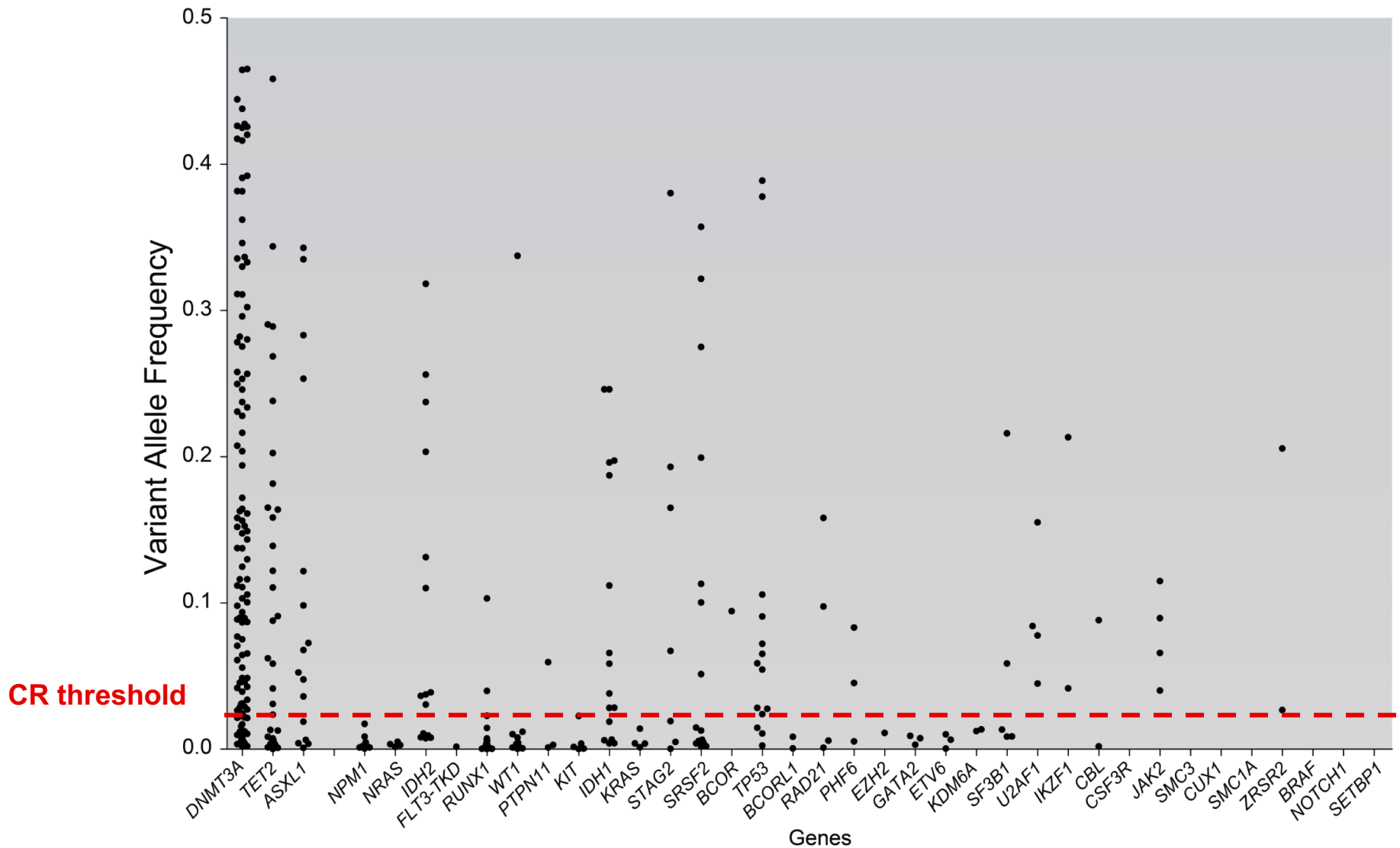
Bepaling van de verdeling van de VAFs in elke basepaar in alle monsters na inductie therapie (zonder die patienten met een mutatie in het desbetreffende basepaar).

Statistische test (Thompson-Tau) om te bepalen of een mutatie bij diagnose aanwezig is in CR boven de achtergrond ($p\text{-value} < 0.01$, statistical outlier).

Mutaties aanwezig bij AML diagnose en in CR (n=430)

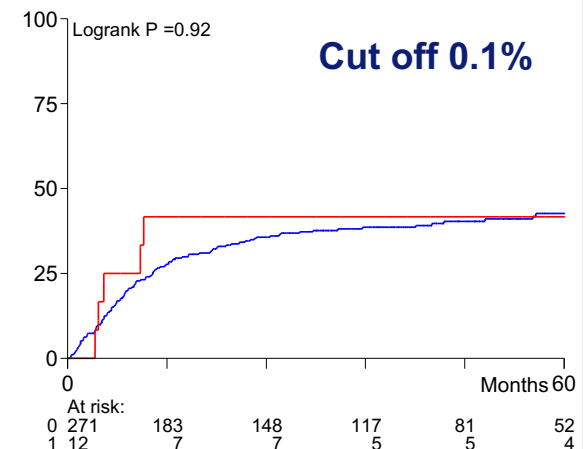
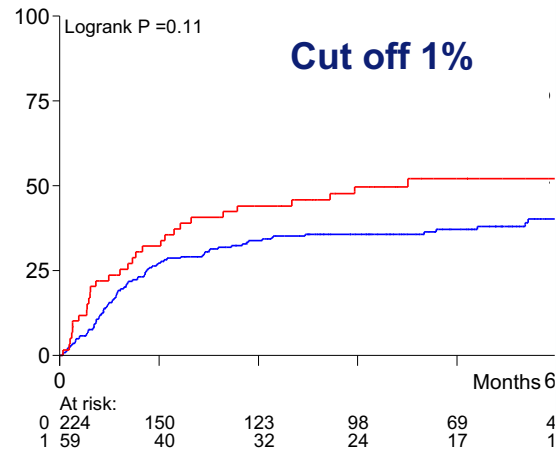
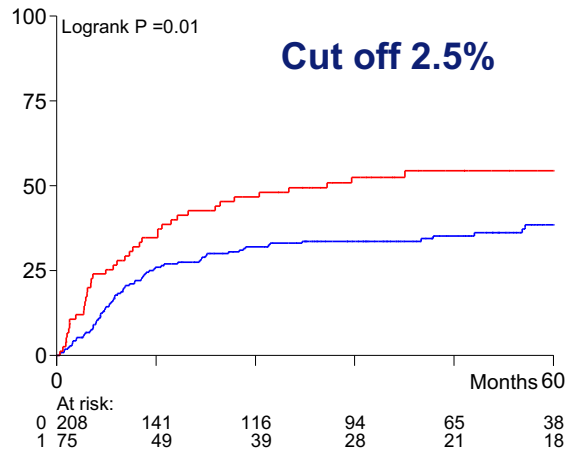
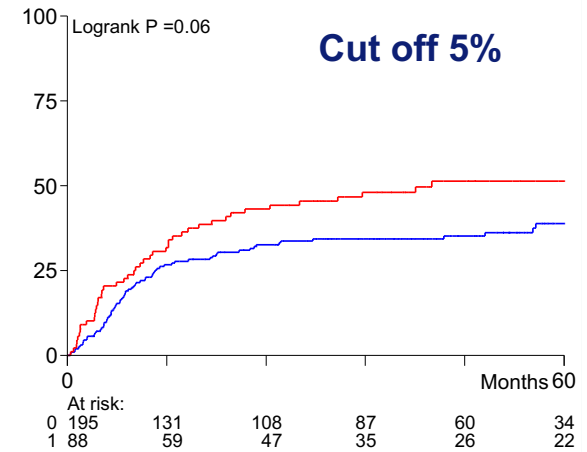
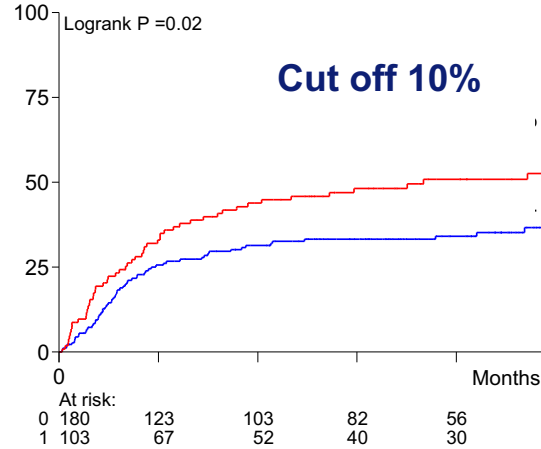
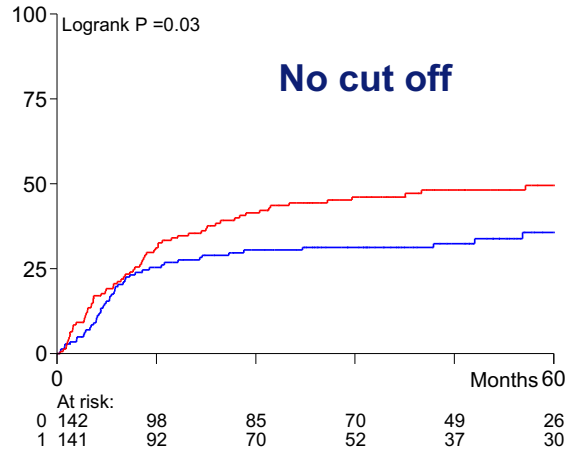


Mutaties persisteren frequent met hoge variant allel frequentie (VAF 0.02% - 47%)



Recidief incidentie (alle persisterende mutaties in CR)

Verwijderen van persisterende mutaties (verschillende VAF) verbeterd associatie niet: training set



aanwezig in CR

afwezig in CR

Klonale hematopoïese

Een leeftijdsgebonden fenomeen waarbij hematopoïetische stamcellen (HSC) of voorlopercellen een genetische subpopulatie vormen in gezonde individuen (zonder hematologische maligniteit)

De klonale subpopulatie is het resultaat van een competitief voordeel dat de HSC/voorlopercel krijgt door het verwerven van somatische mutaties.

Klonale hematopoiese

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes

Siddhartha Jaiswal, M.D., Ph.D., Pierre Fontanillas, Ph.D., Jason Flannick, Ph.D., Alisa Manning, Ph.D., Peter V. Grauman, B.A., Brenton G. Mar, M.D., Ph.D., R. Coleman Lindsley, M.D., Ph.D., Craig H. Mermel, M.D., Ph.D., Noel Burt, B.S., Alejandro Chavez, M.D., Ph.D., John M. Higgins, M.D., Vladislav Moltchanov, Ph.D., Frank C. Kuo, M.D., Ph.D., Michael J. Kluk, M.D., Ph.D., Brian Henderson, M.D., Leena Kinnunen M.Sc., Heikki A. Koistinen, M.D., Ph.D., Claes Ladenvall, Ph.D., Gad Getz, Ph.D., Adolfo Correa, M.D., Ph.D., Benjamin F. Banahan, Ph.D., Stacey Gabriel, Ph.D., Sekar Kathiresan, M.D., Heather M. Stringham, Ph.D., Mark I. McCarthy, M.D.,* Michael Boehnke, Ph.D.,* Jaakko Tuomilehto, M.D., Ph.D., Christopher Haiman, Sc.D., Leif Groop, M.D., Ph.D., Gil Atzmon, Ph.D., James G. Wilson, M.D., Donna Neuberg, Sc.D., David Altshuler, M.D., Ph.D.,* and Benjamin L. Ebert, M.D., Ph.D.†

Jaiswal, 2014

17,182 gezonde individuen

Clonal hematopoiesis of Indeterminate potential
Age-related clonal hematopoiesis

Definitie CHIP kloon: VAF > 2%

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence

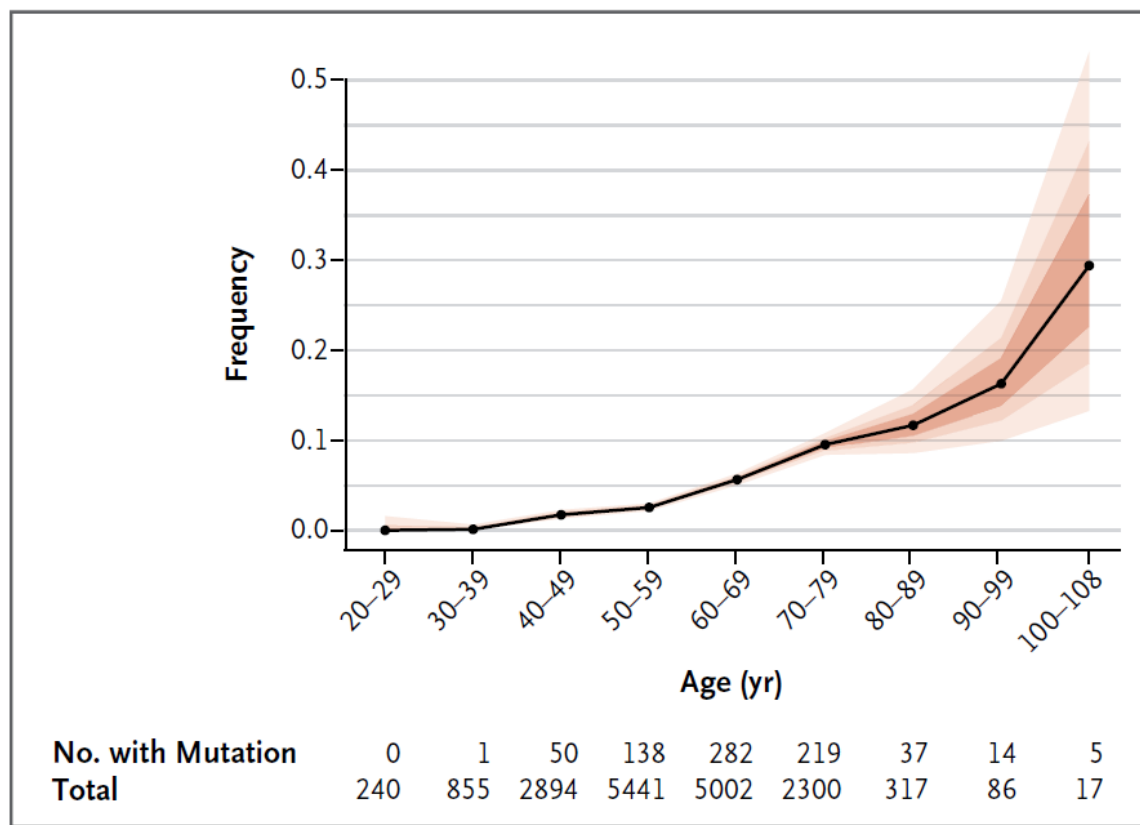
Giulio Genovese, Ph.D., Anna K. Kähler, Ph.D., Robert E. Handsaker, B.S., Johan Lindberg, Ph.D., Samuel A. Rose, B.S., Samuel F. Bakhoun, M.D., Ph.D., Kimberly Chambert, M.S., Eran Mick, B.S., Benjamin M. Neale, Ph.D., Menachem Fromer, Ph.D., Shaun M. Purcell, Ph.D., Oscar Svantesson, M.S., Mikael Landén, Ph.D., Martin Höglund, M.D., Ph.D., Sören Lehmann, M.D., Ph.D., Stacey B. Gabriel, Ph.D., Jennifer L. Moran, Ph.D., Eric S. Lander, Ph.D., Patrick F. Sullivan, M.D., Pamela Sklar, M.D., Ph.D., Henrik Grönberg, M.D., Ph.D., Christina M. Hultman, Ph.D., and Steven A. McCarroll, Ph.D.

Genovese, 2014

12,380 gezonde individuen

(CHIP)
(ARCH)

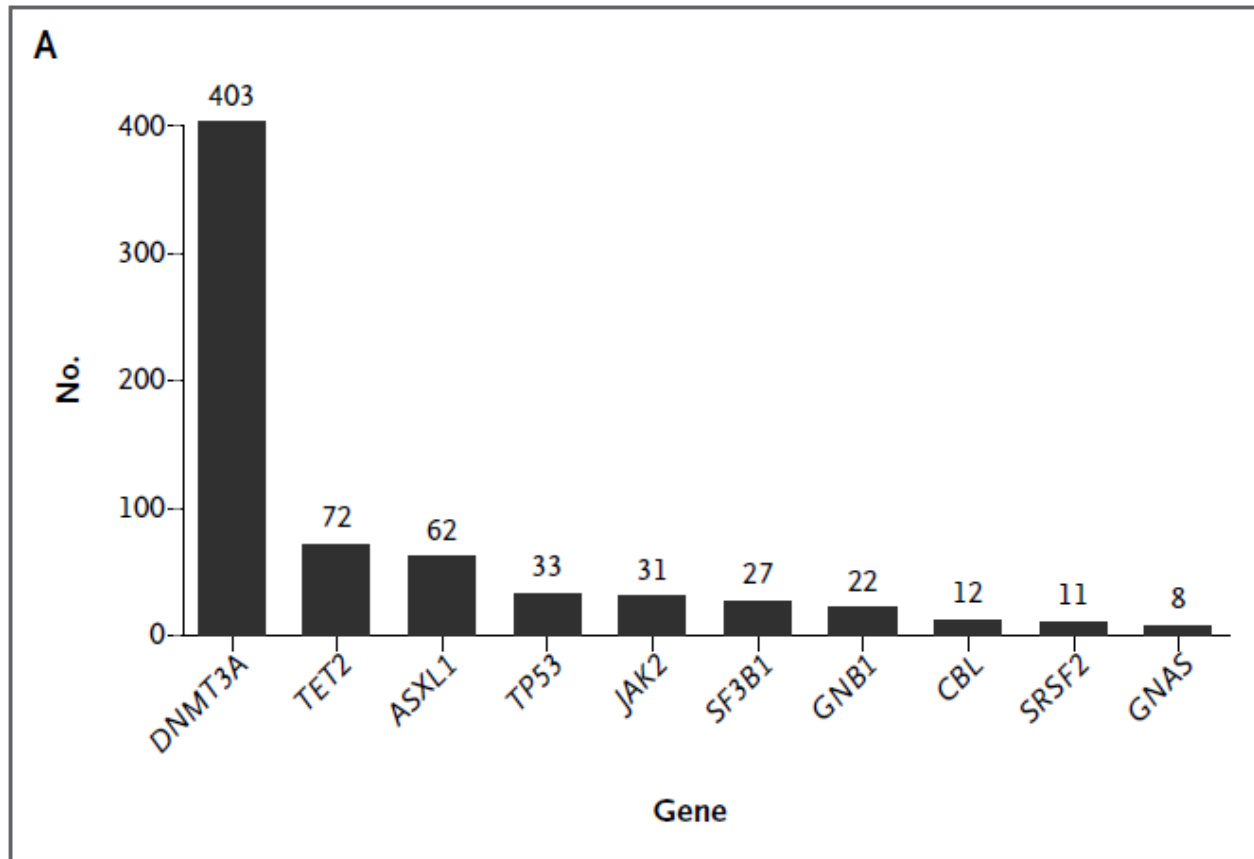
Leeftijdsgebonden klonale hematopoïese



Jaiswal, 2014

CHIP VAF 0.03% in tegenstelling tot 2%: klonale hematopoïese (frequent mutaties in *DNMT3A* en *TET2*, in 95% van de individuen [gezond 50-60 jaar] (Young et al. 2016)

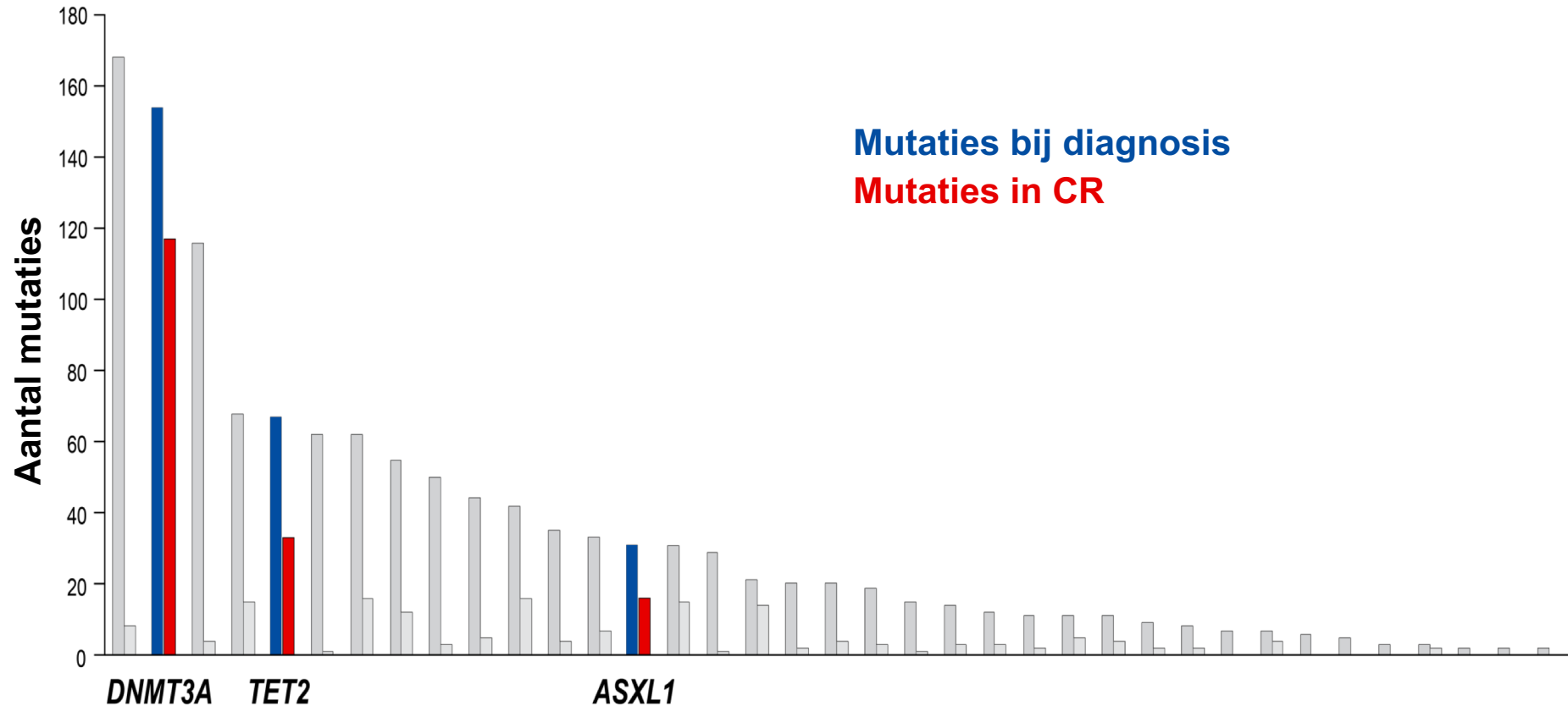
***DNMT3A*, *TET2* en *ASXL1* zijn de meest frequent gemuteerde genen in CHIP/ARCH**



Jaiswal, 2014

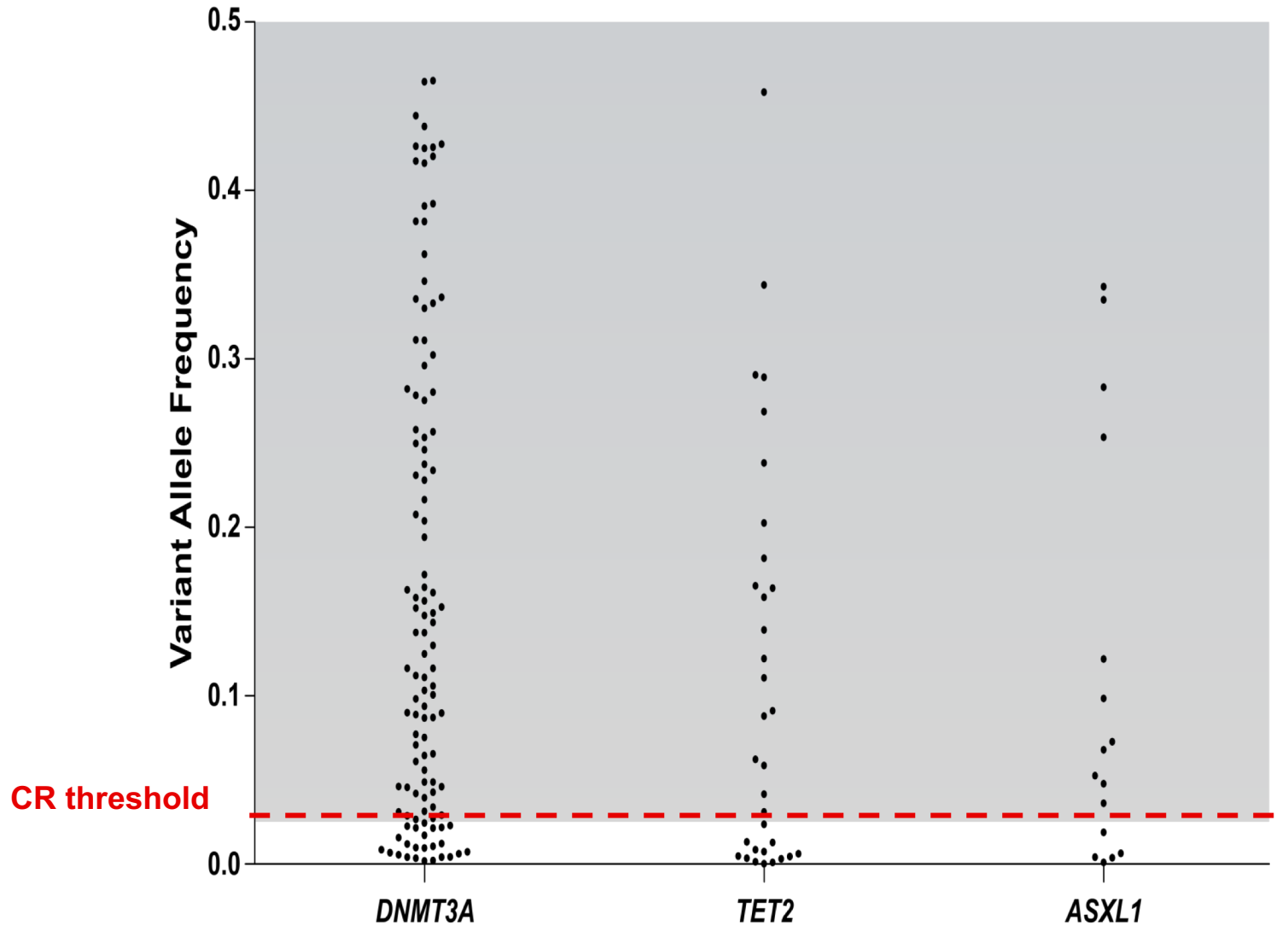
Frequentie van *DNMT3A*, *TET2* and *ASXL1* mutaties in CR

DTA mutaties persisteren heel frequent

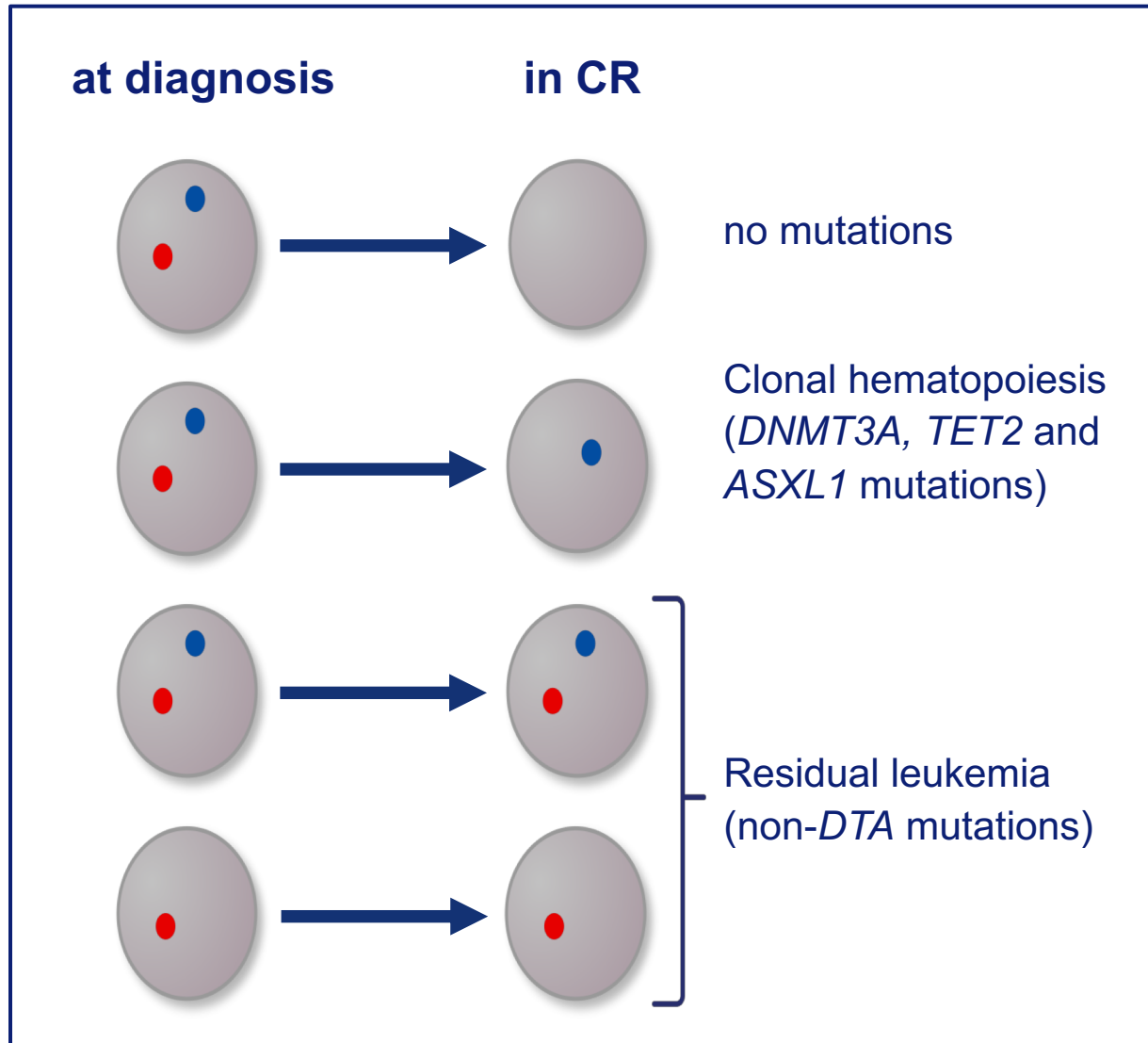


Variant allele frequenties van *DNMT3A*, *TET2* en *ASXL1* mutaties in CR

DTA mutaties persisteren met hoge variant allele frequentie

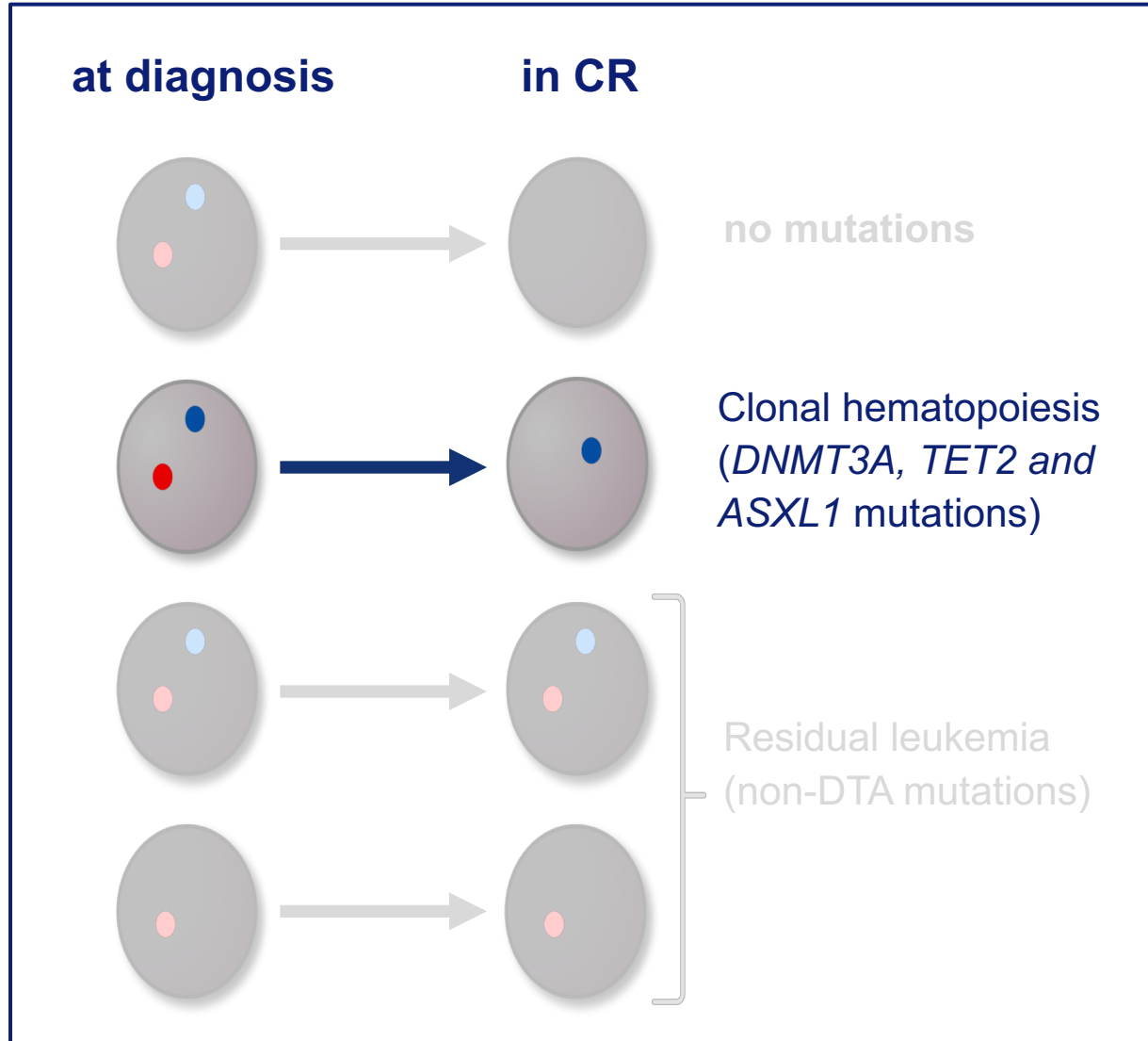


Moleculaire scenario's in CR na inductie therapie



Hoe zijn deze
moleculaire
scenario's
gerelateerd aan
relapse?

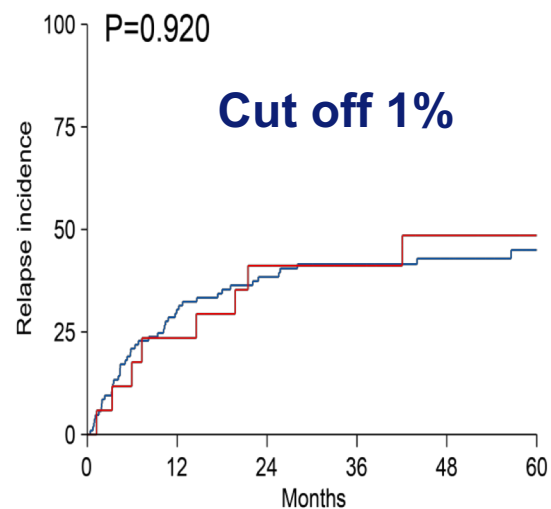
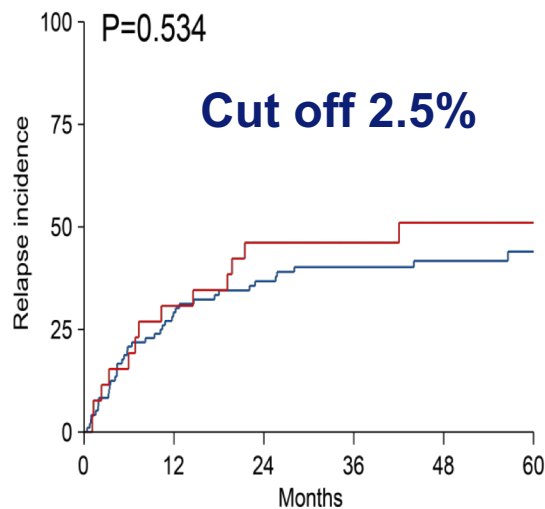
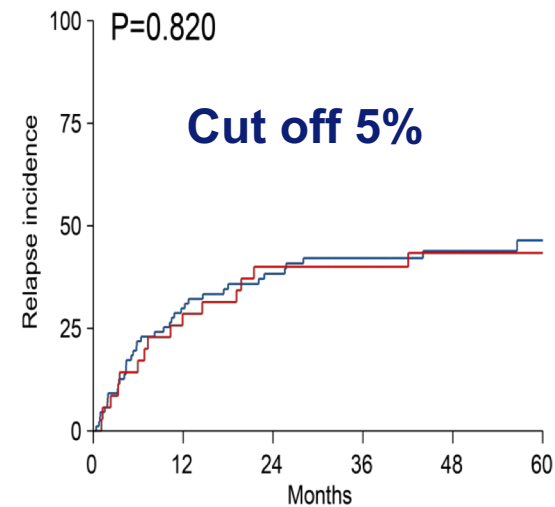
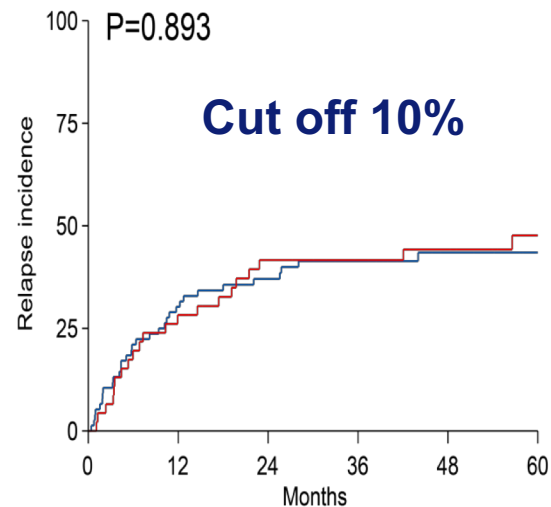
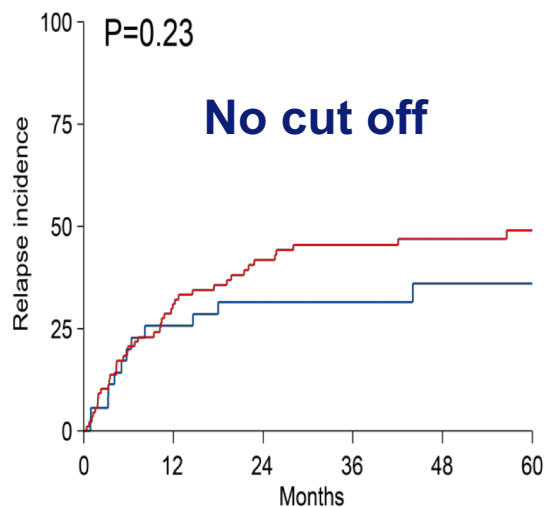
Zijn persisterende mutaties die geassocieerd zijn met klonale hematopoïese in CR gerelateerd aan kans op een recidief?



**Training set
n=283**

Recidief incidentie van *DNMT3A*, *TET2* en *ASXL1* mutaties in CR

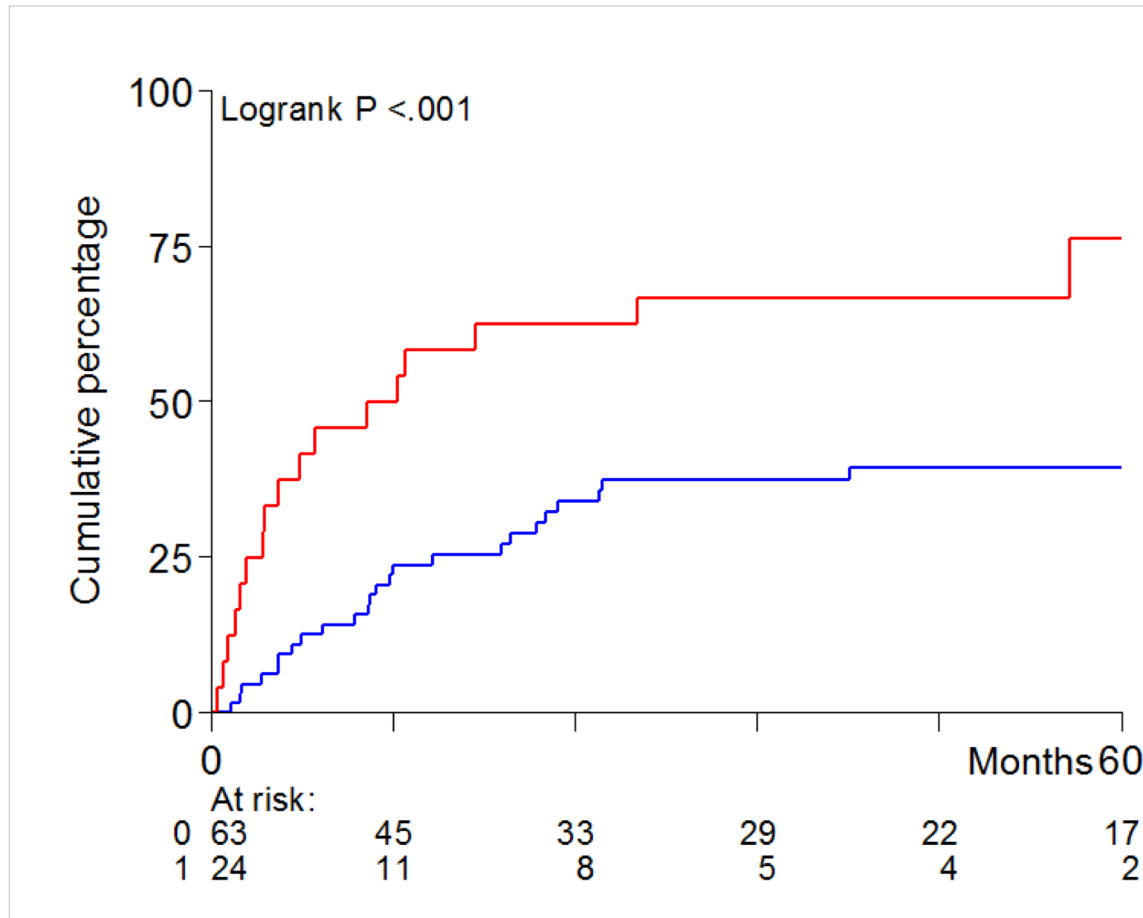
DTA mutaties zijn niet gerelateerd aan recidief (verschillende VAF): training set



aanwezig in CR
afwezig in CR

Recidief incidentie van non-*DTA* mutaties in CR in AML met persisterende *DTA* mutaties

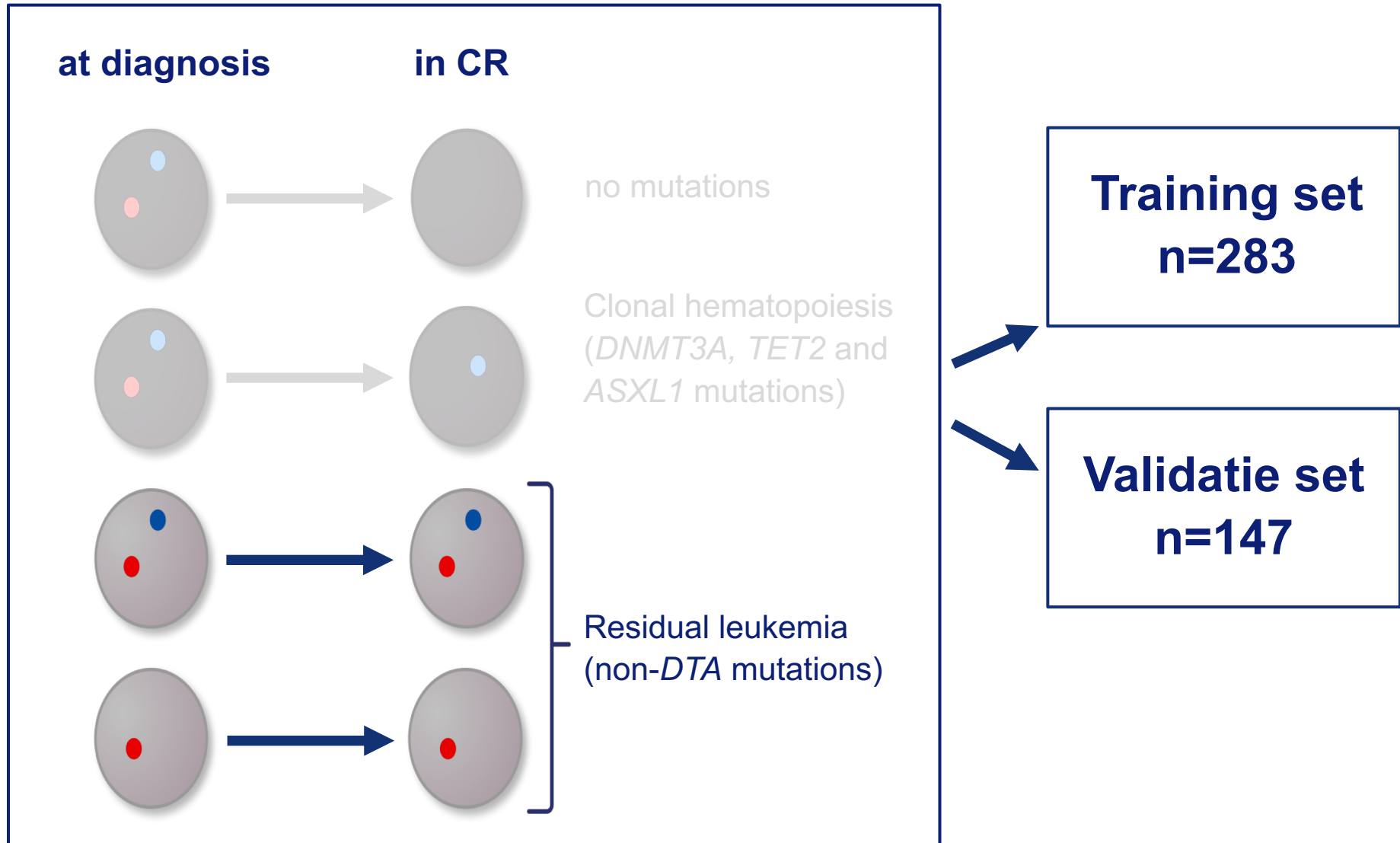
Non-*DTA* mutaties zijn sterk geassocieerd met kans op een recidief in AML: training set



aanwezig in CR

afwezig in CR

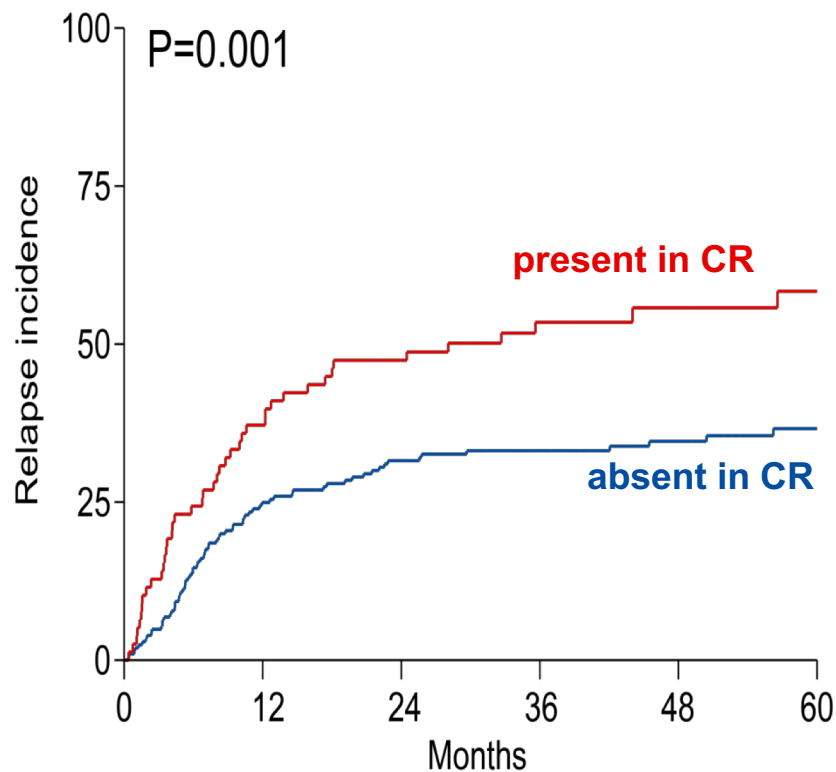
Is restziekte gedefinieerd door non-*DTA* mutaties in CR gerelateerd aan kans op een recidief?



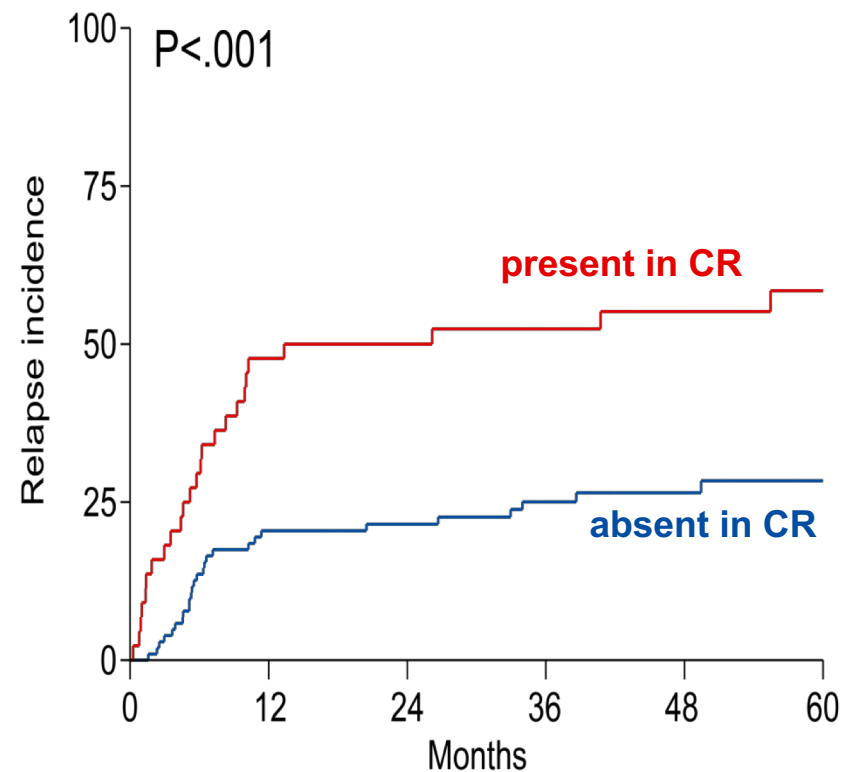
Recidief incidentie van restziekte

non-*DTA* mutaties in CR significante associatie met recidief in AML

Training set



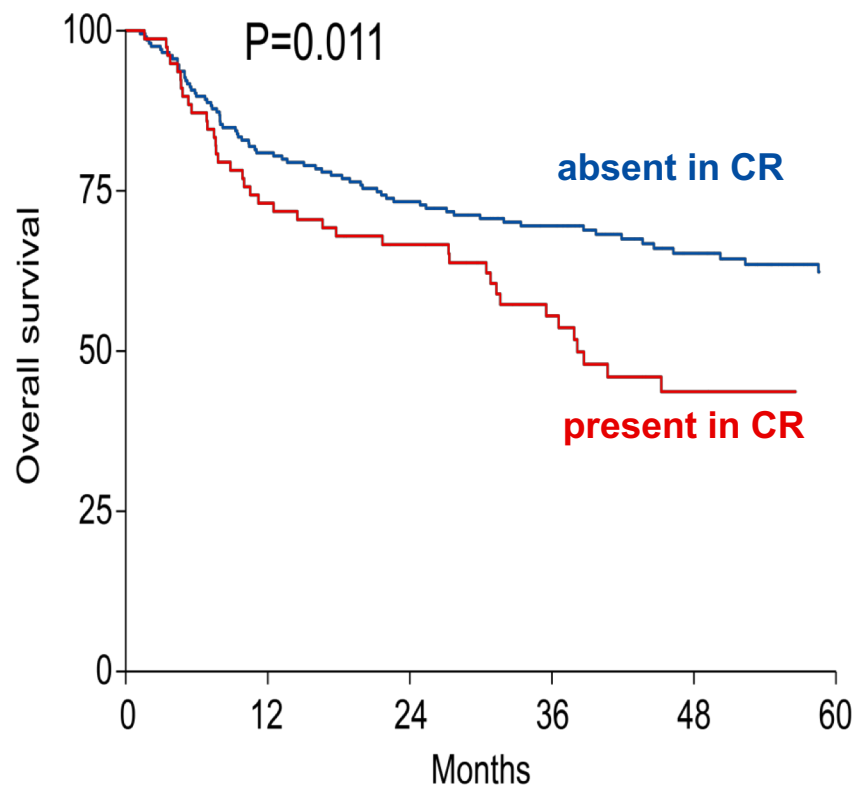
Validation set



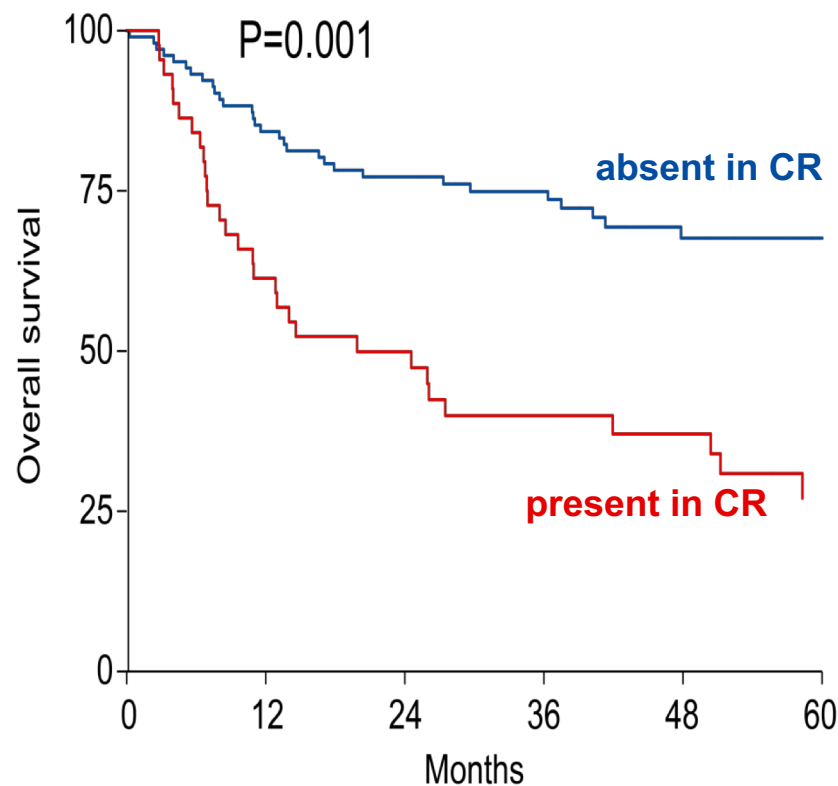
Overall survival of residual leukemia

non-*DTA* mutations in CR significantly associate with overall survival in AML

Training set



Validation set



Multivariable analysis including residual leukemia

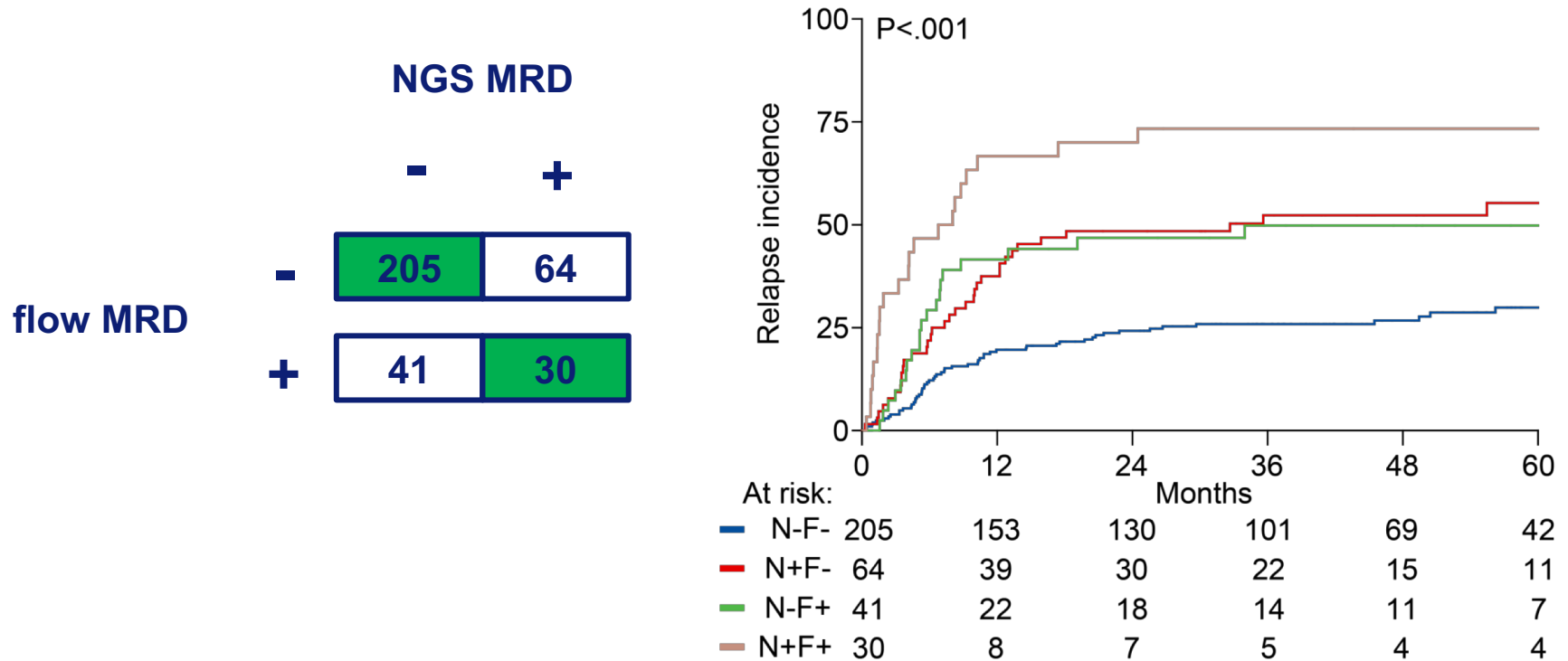
non-*DTA* mutations in CR independently carry prognostic value in AML

Table S3. Multivariable analysis with time-dependent correction for allogeneic HSCT

	Relapse incidence			Relapse-free survival			Survival		
	SHR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
Molecular residual disease (Present vs. Absent)	1.88	1.34-2.64	<0.001	1.64	1.22-2.21	0.001	1.64	1.18-2.27	0.003
Age per year	1.00	0.99-1.02	0,556	1.02	1.00-1.03	0.024	1.03	1.01-1.04	0.001
WBC at diagnosis (x10⁹/l) (>100 vs. ≤100)	2.20	1.34-3.63	0,002	2.04	1.35-3.10	0.001	2.02	1.27-3.20	0.003
ELN2017 risk classification									
Intermediate vs. Favorable	2.31	1.52-3.51	0.001	2.28	1.58-3.28	<0.001	2.56	1.70-3.84	<0.001
Adverse vs. Favorable	2.44	1.64-3.62	0.001	2.51	1.75-3.59	<0.001	2.71	1.81-4.04	<0.001
Number of cycles to CR (2 cycles vs. 1 cycle)	2.07	1.42-3.03	<0.001	2.39	1.72-3.33	<0.001	2.95	2.08-4.20	<0.001
Post-remission therapy (Allo vs. no Allo)	0.45	0.31-0.65	<0.001	0.73	0.54-0.99	0.043	0.97	0.70-1.34	0.848

Relapse incidence of residual leukemia

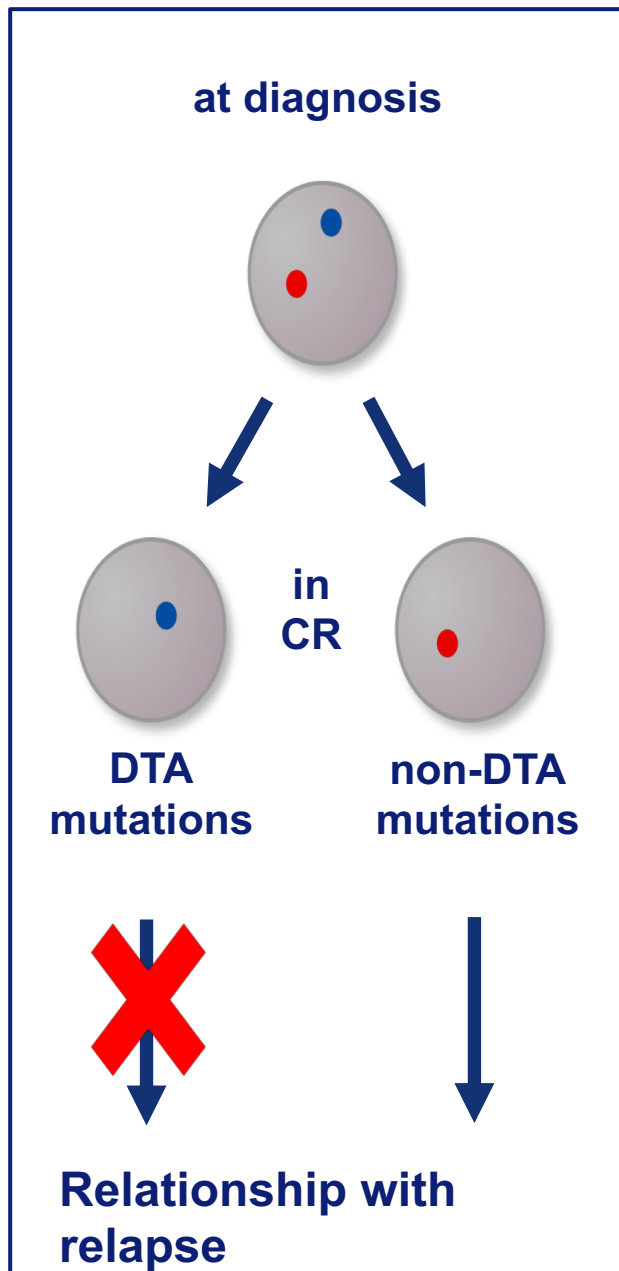
NGS MRD and multiparameter flow MRD both show significant associate with relapse in AML



Multivariable analysis including residual leukemia

non-*DTA* mutations in CR independently carry prognostic value in AML

	Relapse incidence			Relapse-free survival			Survival		
	SHR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
NGS vs. Flow									
NGS pos/Flow neg vs. double neg	2.23	1.43-3.49	<0.001	1.79	1.21-2.67	0.004	1.82	1.19-2.80	0.006
NGS neg/Flow pos vs. double neg	2.23	1.35-3.68	0.002	1.79	1.11-2.88	0.017	1.63	0.96-2.77	0.069
NGS pos/Flow pos vs. double neg	3.92	2.31-6.67	<0.001	3.22	1.99-5.22	<0.001	2.38	1.41-4.02	0.001
Age per year									
	1.01	0.99-1.03	0.173	1.02	1.00-1.03	0.013	1.03	1.01-1.04	0.002
WBC at diagnosis (x10⁹/l) (>100 vs. ≤100)									
	2.62	1.66-4.13	<0.001	2.23	1.42-3.51	0.001	1.94	1.17-3.21	0.010
ELN2017 risk classification									
Intermediate vs. Favorable	1.61	1.04-2.49	0.034	1.91	1.29-2.82	0.001	2.42	1.57-3.73	<0.001
Adverse vs. Favorable	1.81	1.19-2.76	0.005	2.07	1.41-3.03	<0.001	2.52	1.64-3.87	<0.001
Number of cycles to CR (2 cycles vs. 1 cycle)									
	2.29	1.52-3.45	<0.001	2.43	1.66-3.55	<0.001	3.19	2.14-4.76	<0.001



Conclusies

Het bepalen van persisterende mutaties in CR met NGS is toepasbaar voor de meerderheid van volwassen AML patiënten

Mutaties geassocieerd met klonale hematopoiese in CR hebben geen impact op een vroeg recidief (mediane FU 39 maanden) (Jongen et al., NEJM 2018)

Targeted NGS van residuale ziekte gedefinieerd door non-*DTA* mutaties in CR is een onafhankelijke prognostische factor voor recidief en overleving (Jongen et al., NEJM 2018)

> Morita et al., JCO 2018 and Thol et al., Blood 2018

Residuale restziekte detectie met targeted NGS en multi-parameter flowcytometrie hebben onafhankelijke additieve waarde



Acknowledgements

Erasmus University Medical Center

Mojca Jongen-Lavrencic

Bob Löwenberg

Peter Valk

Mathijs Sanders

François Kavelaars

Claudia Erpelinck

Annelieke Zeilemaker

Adil al Hinai

HOVON Data Center

Patrycja Gradowska

Rosa Meijer

Yvette van Norden

VU Medical Center

Diana Hanekamp

Jacqueline Cloos

Gert Ossenkoppele

Gerrit-Jan Schuurhuis

HOVON/SAKK

Our patients who participated in
HOVON/SAKK clinical trials

