

MRD als prognostische merker in CLL

Jan Philippé

Behandelingsstrategieën bij CLL

Table 3 | Treatment principles in CLL patients based on physical fitness, comorbidity and life expectancy

Physical fitness	Comorbidity	Life expectancy	Principle of action	Therapeutic goal and treatment options
Functionally independent	None or mild	Normal (reduced by malignant disease only)	'Go go'	Therapy aimed at prolonging survival, such as FCR
Reduced physical fitness	≥1 comorbidity	Intermediate (impaired by malignancy, comorbidity and/or unfit state of health)	'Slow go'	Therapy aimed at achieving optimal symptom control, such as monotherapies (chlorambucil or bendamustine) or dose-reduced combinations
Severely handicapped	Multiple or severe comorbidities	Short (severely reduced by comorbidities and/or frail state of health)	'No go'	Best supportive palliative care

Abbreviation: FCR, fludarabine, cyclophosphamide and rituximab.

Cramer & Hallek
 Nat Rev Clin Oncol 2010

Hoe kan men CLL opvolgen?

- ➔ ‘Watch and wait’ → celtelling volstaat
- ➔ Bij de “go-go”
 - ➔ Combinatiechemotherapie (bijv. FCR)
CR/molRem wordt beoogd → MRD analyses
 - ➔ MRD kan aansluitend op de therapie
 - ➔ Eerste 3 maanden in BM, later in bloed (*Hallek et al. Blood2008*)
 - ➔ Allotransplant (ook RICtransplant)
CR/molRem is het doel (dankzij GvL !)
 - ➔ MRD kinetiek ~ GvL activiteit (DLI)
 - ➔ Belangrijkste meetpunt na 12 maanden

Wat is de ideale MRD assay?

- CLL-specifiek
- Zeer gevoelig, ook in aanwezigheid van veel normale B cellen
- Eenvoudig
- Mogelijkheid tot kwantificatie

Moleculaire methoden gebruikt voor follow-up in CLL

Consensus PCR

Consensus primers tegen de framework regio's en de J_H regio

nadelen: beperkte gevoeligheid (1%)
niet kwantificeerbaar

Kloon-specifieke PCR (nested)

1^e stap consensus IgH PCR

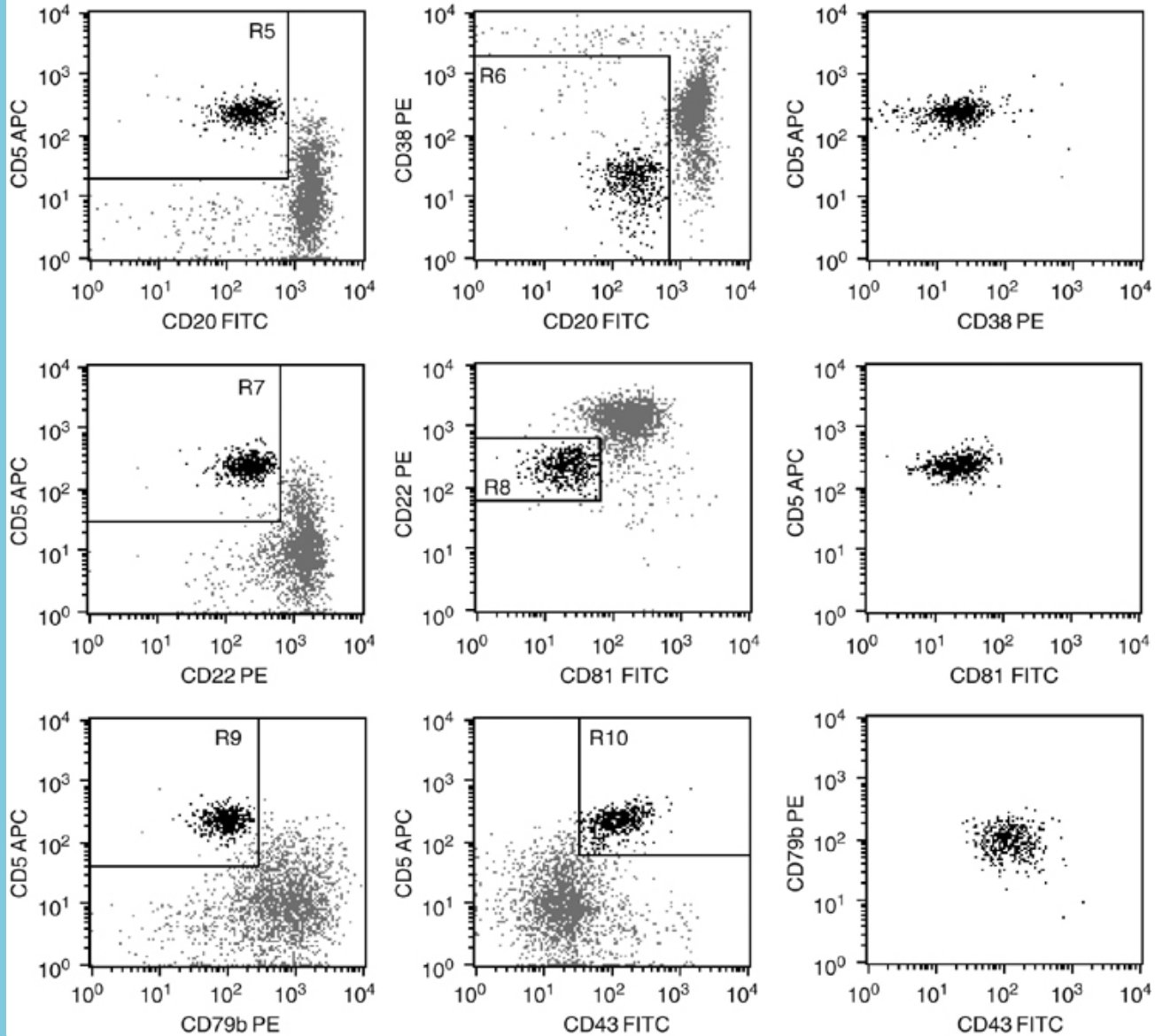
2^e stap met 1 of 2 allel-specifieke primers (CDR2 en CDR3)

voordeel: zeer gevoelig (10⁻⁶)
nadelen: noodzaak voor individuele sequencing
niet kwantitatief

Kloon-specifieke real-time kwantitatieve PCR (RQ-PCR)

Combinatie van patient-specifieke primers (CDR2 en CDR3)
en een consensus probe (FR3)

voordeel: kwantitatief
nadelen: bewerkelijk (sequencing, primer-probe test)
verminderde gevoeligheid (10⁻⁴)



Rawstron et al.
Leukemia 2007

International standardized approach for FC Residual disease monitoring in CLL *(A. Rawstron et al. Leukemia 2007)*

- ➔ **3 4-kleurencombinaties bleken een lage inter-laboratoriumvariabiliteit te hebben en lage vals+ resultaten**
 - ➔ FITC / PE / PerCP / APC
 - ➔ CD20 / CD38 / CD19 / CD5
 - ➔ CD81 / CD22 / CD19 / CD5
 - ➔ CD43 / CD79b/ CD19 / CD5

Standardized MRD flow and ASO IgH RQ-PCR for MRD quantification in CLL (*S Böttcher et al, Leukemia 2009*)

➔ Protocol based upon previous papers

- ➔ 200 µL of whole blood (2×10^6 cells) are washed
- ➔ Incubation with rabbit serum
- ➔ Stained with 4 colors
- ➔ + FACSLyse & 2 washings
- ➔ Use of isotype controls

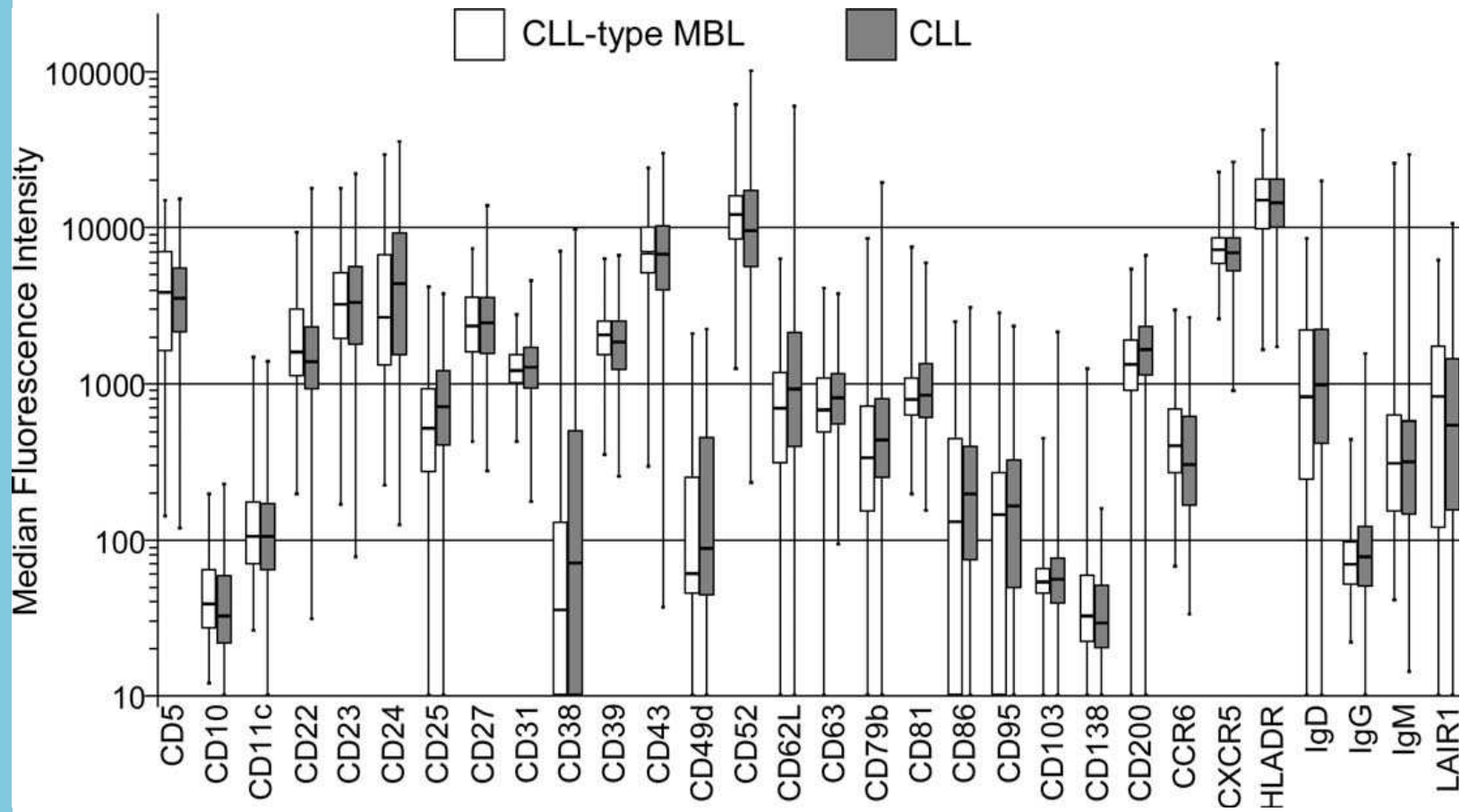
➔ FITC / PE / PerCP / APC

➔ CD20 / CD5 / CD19 / CD43

➔ CD81 / CD22 / CD19 / CD5

➔ CD79b / CD20 / CD19 / CD5

➔ K / λ / CD19 / CD5



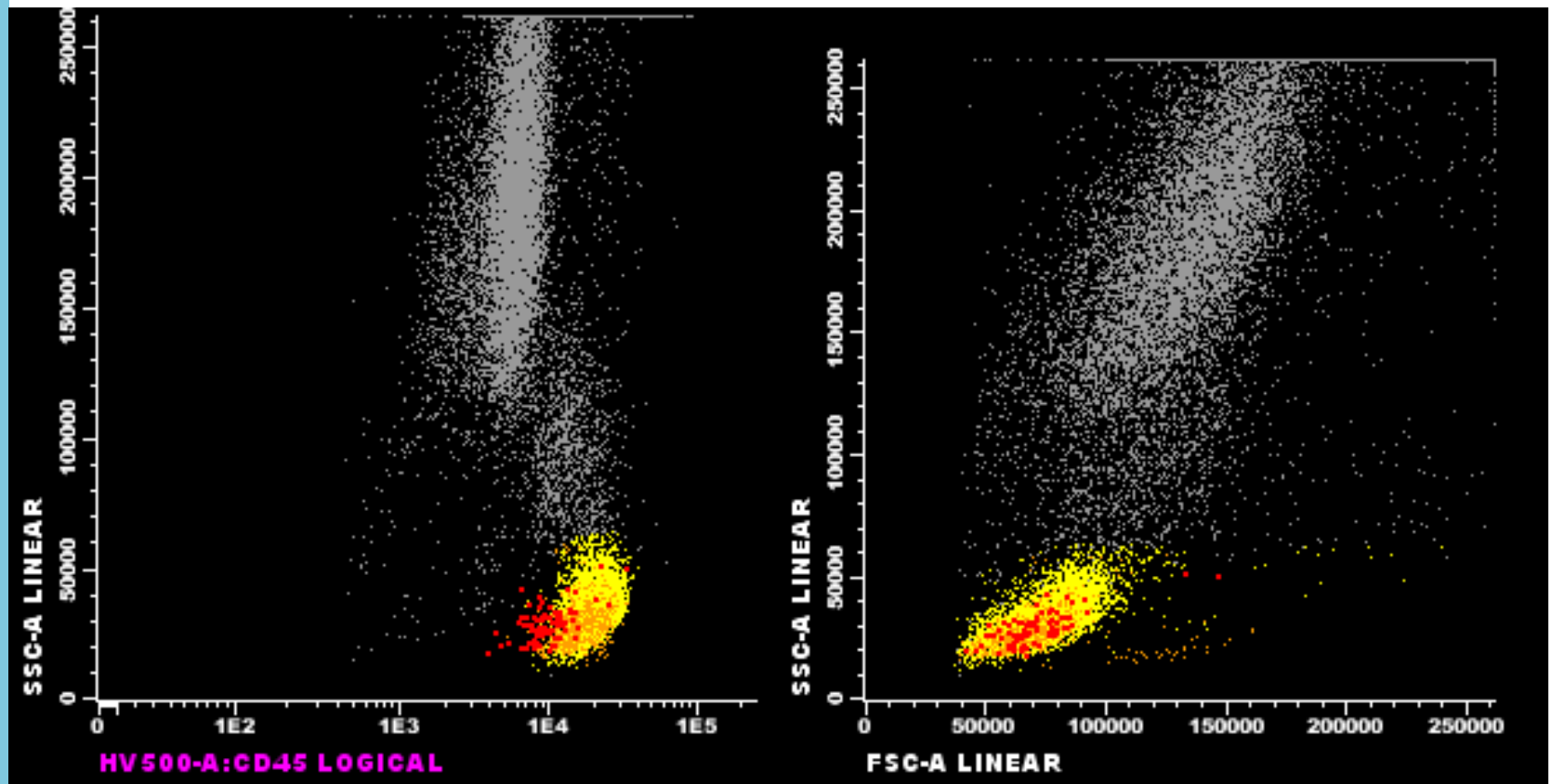
EUROFLOW CLPD

fluorochroom	Buis1	Buis2
FITC	CD8 en lambda	CD23
PE	CD56 en kappa	CD10
PerCP-Cy5.5	CD5	CD79b
PE-Cy7	CD19	CD19
APC	CD3	CD200
APC-H7	CD38	CD43
V450	CD20 en CD4	CD20 en CD4
V500	CD45	CD45

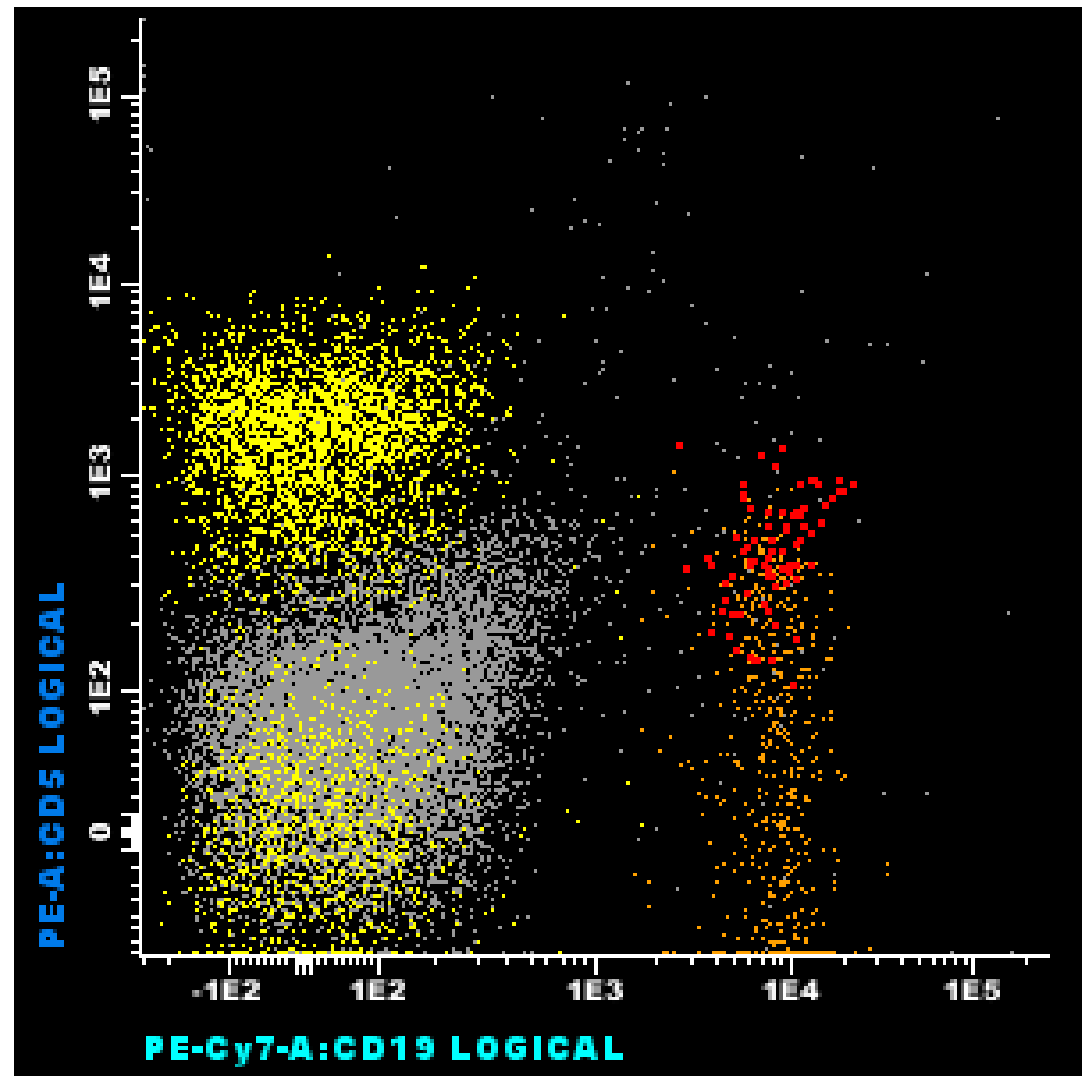
Nieuwe merkers

- ➔ **CD200:** CD200 is een transmembranair eiwit dat op veel celtypes aanwezig is waarbij immunoregulatorische signalen via receptoren (CD200R) geëxprimeerd op monocytën/myeloïede cellen en T cellen worden gegenereerd. Overexpressie van CD200 werd vooral gevonden bij CLL en kankerstemcellen.
- ➔ MCL heeft typisch een zwakke expressie van CD200.
- ➔ CD200 heeft een prima differentiaal diagnostische waarde, waarde als MRDmerker?

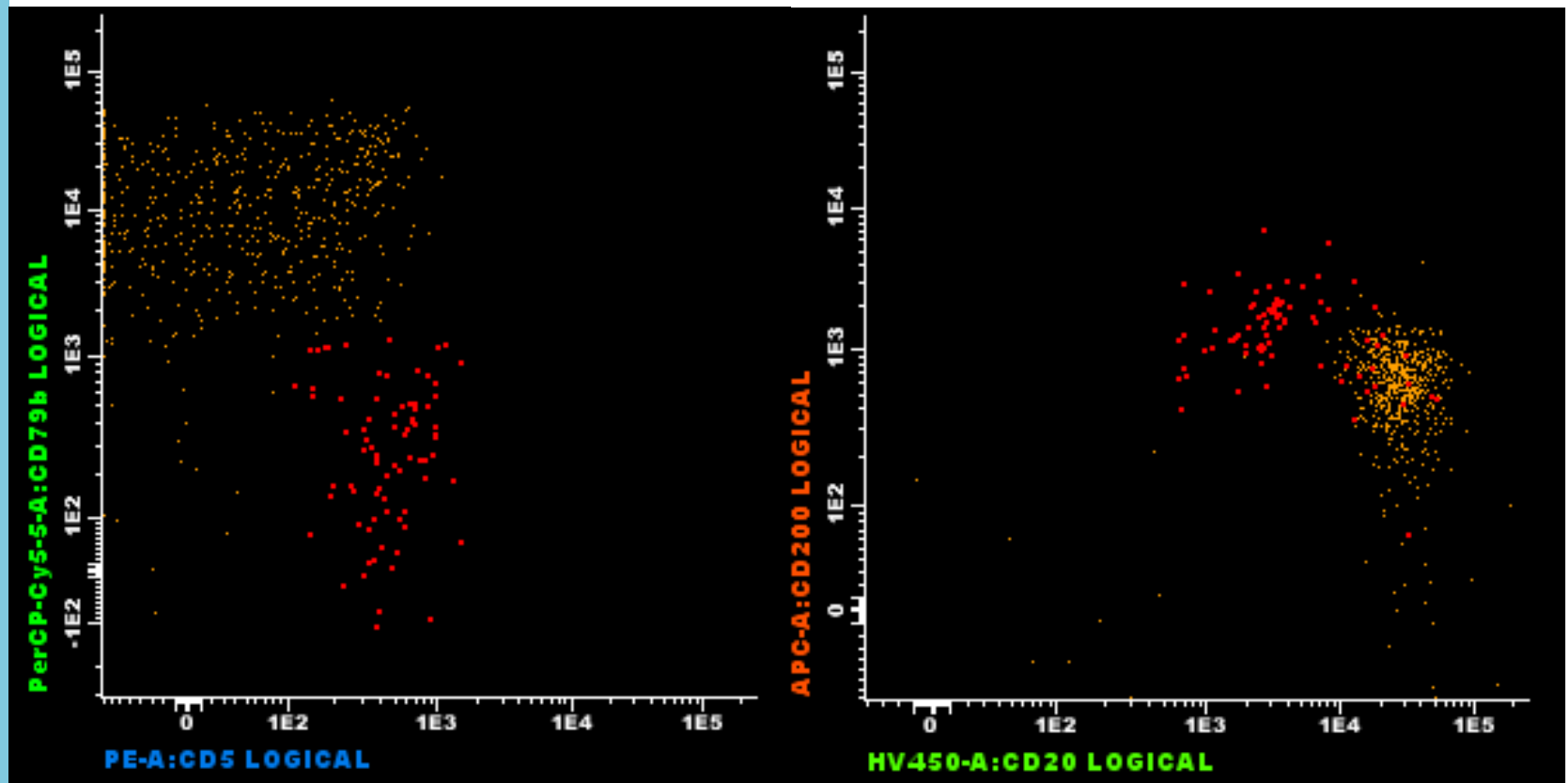
Follow-up staal van een patiënt, 1 jaar post allotransplant



Follow-up staal van een patiënt, 1 jaar post allotransplant



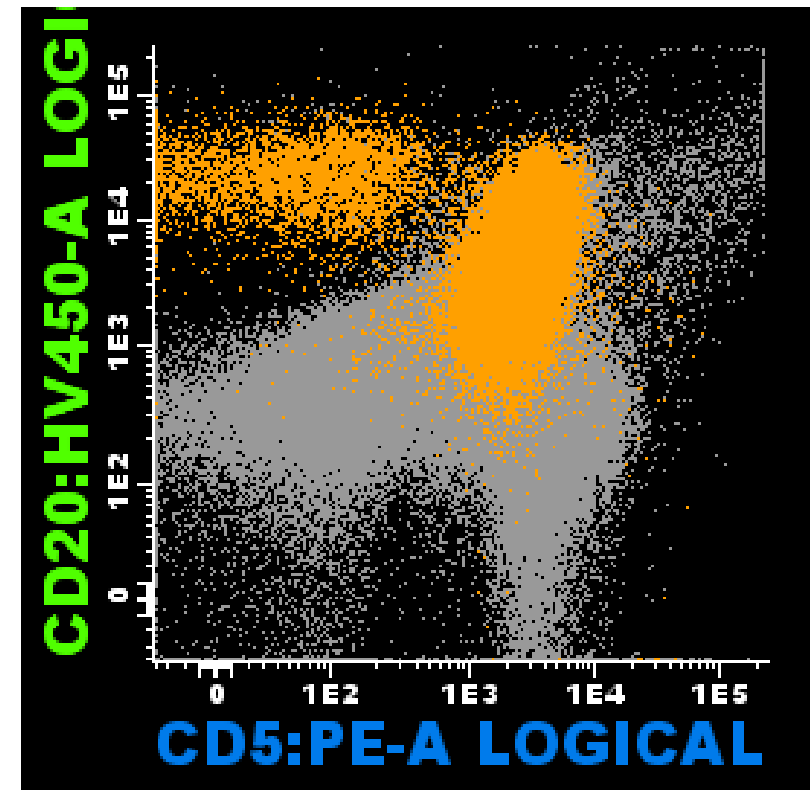
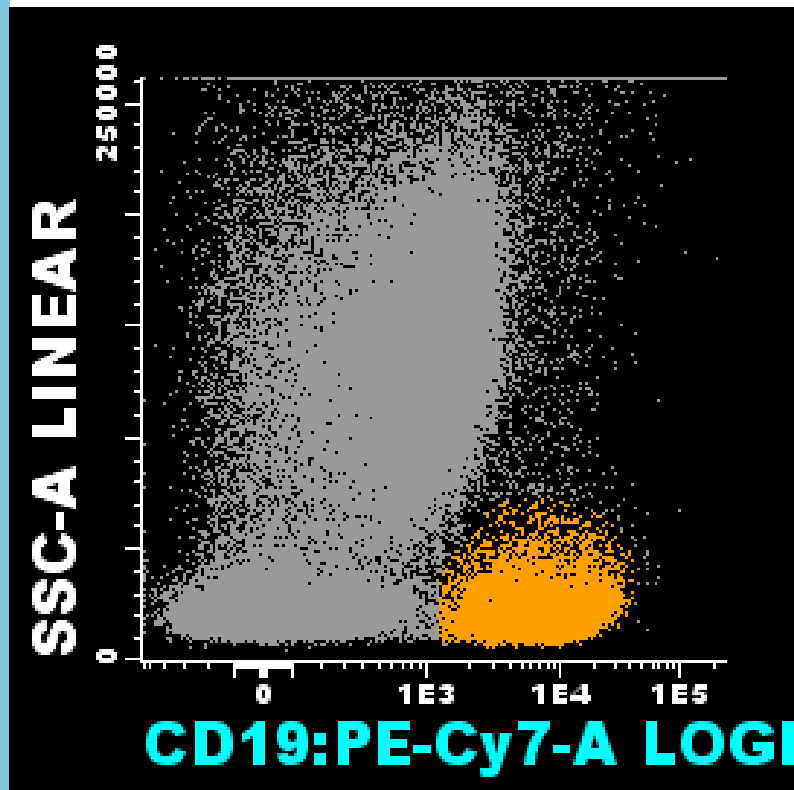
Follow-up staal van een patiënt, 1 jaar post allotransplant



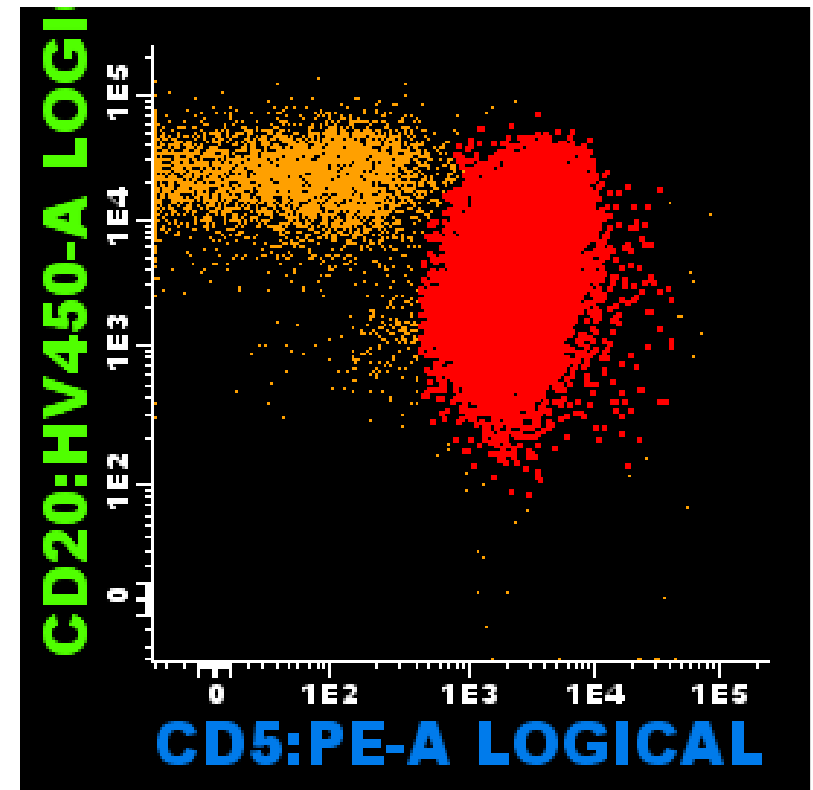
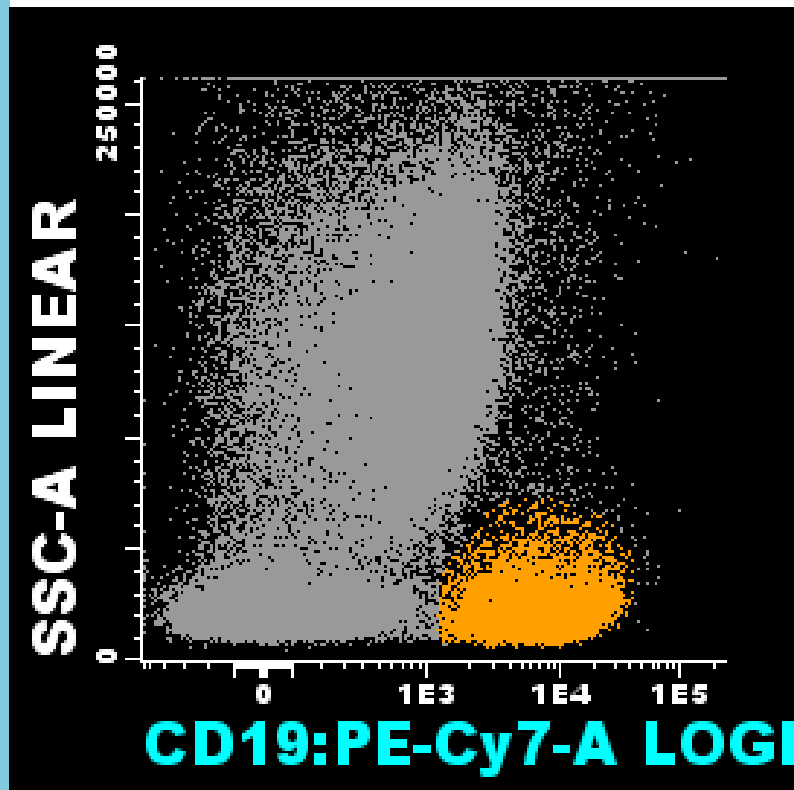
8-kleuren MRDvoor CLL

fluorochroom	
FITC	IgM
PE	CD10
PerCP-Cy5.5	CD79b
PE-Cy7	CD19
APC	CD5
APC-H7	CD43
V450	CD20
V500	CD45

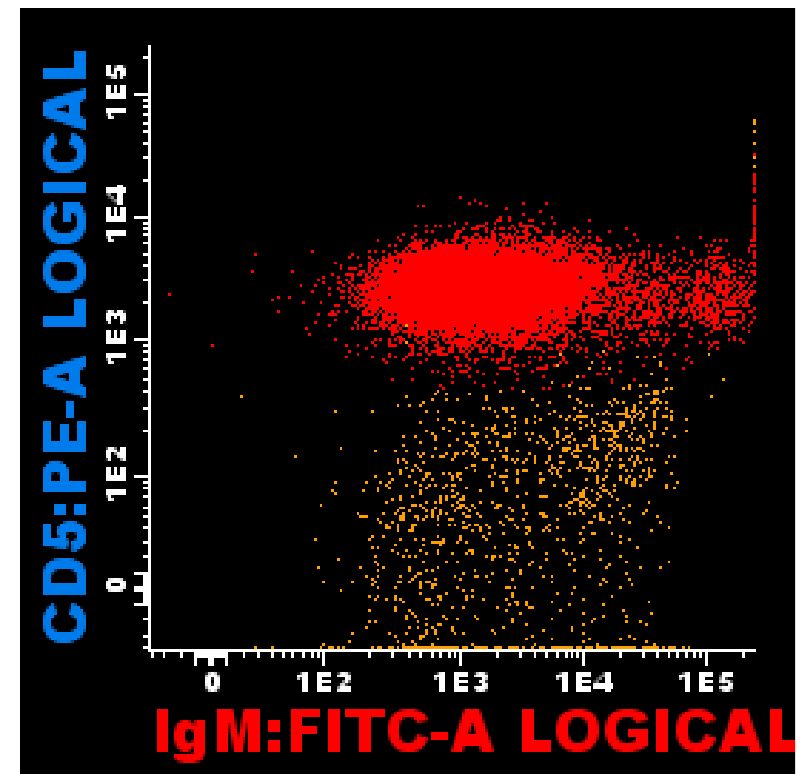
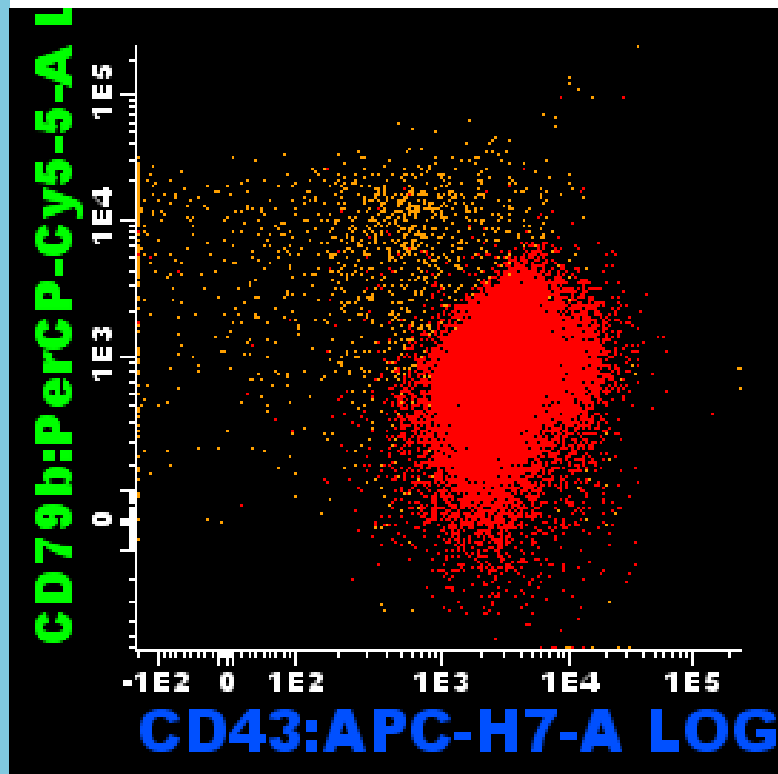
Perifeer bloed met 20% CLL cellen



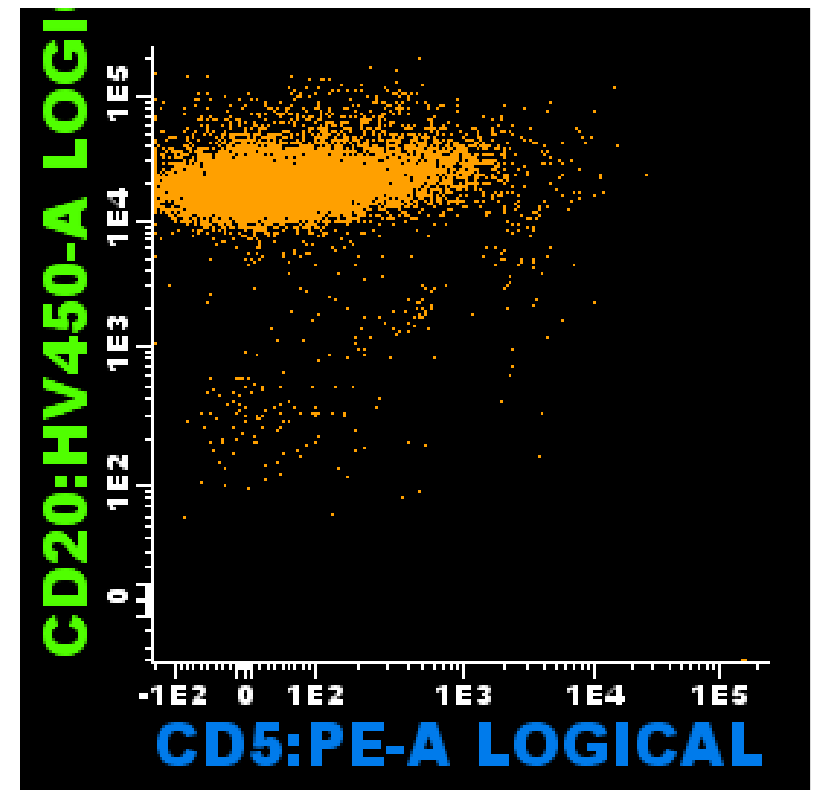
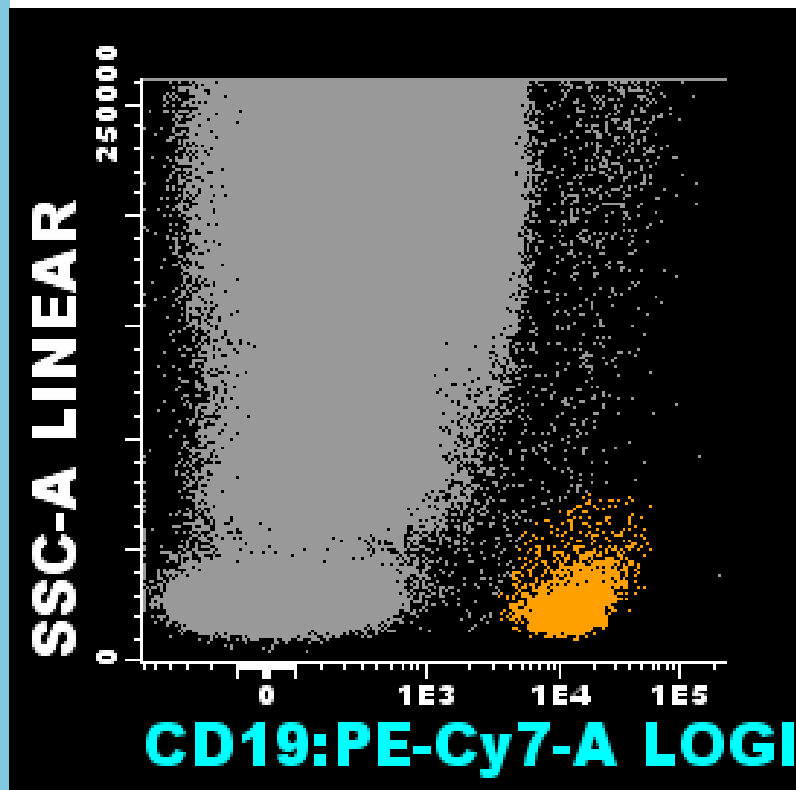
Perifeer bloed met 20% CLL cellen



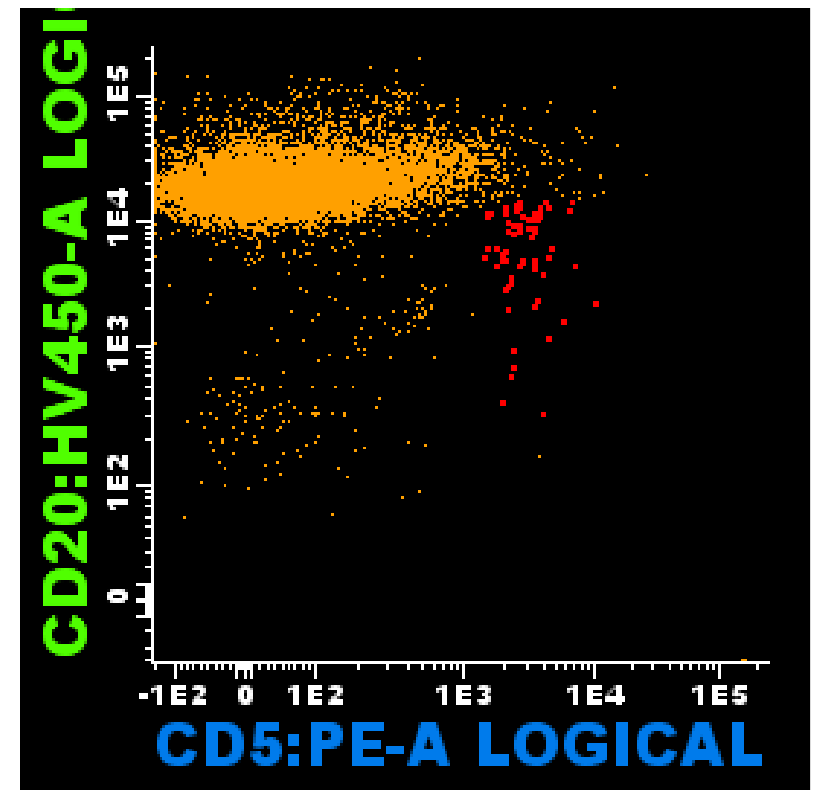
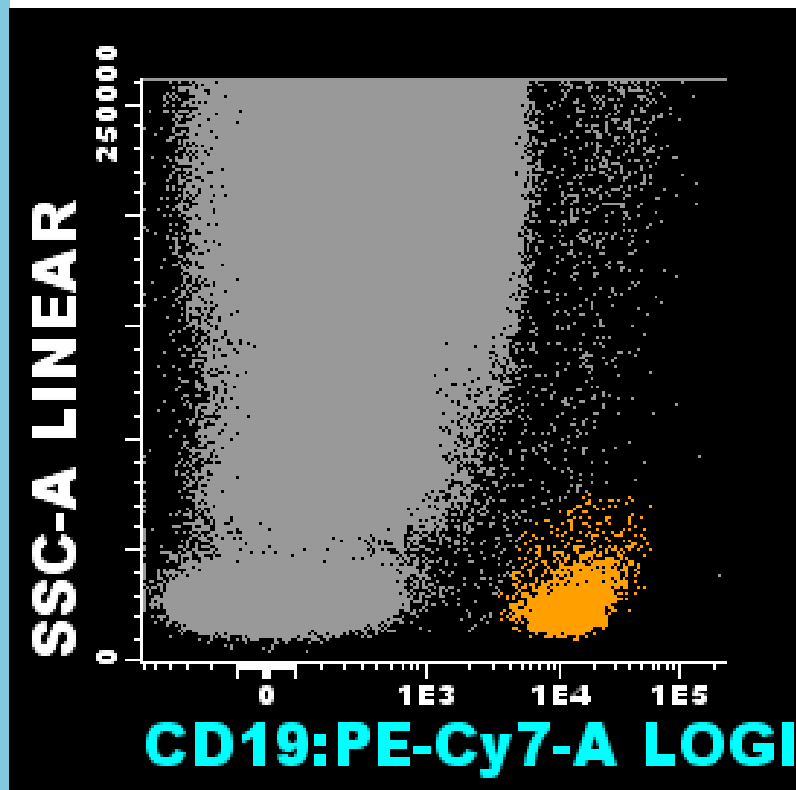
Perifeer bloed met 20% CLL cellen



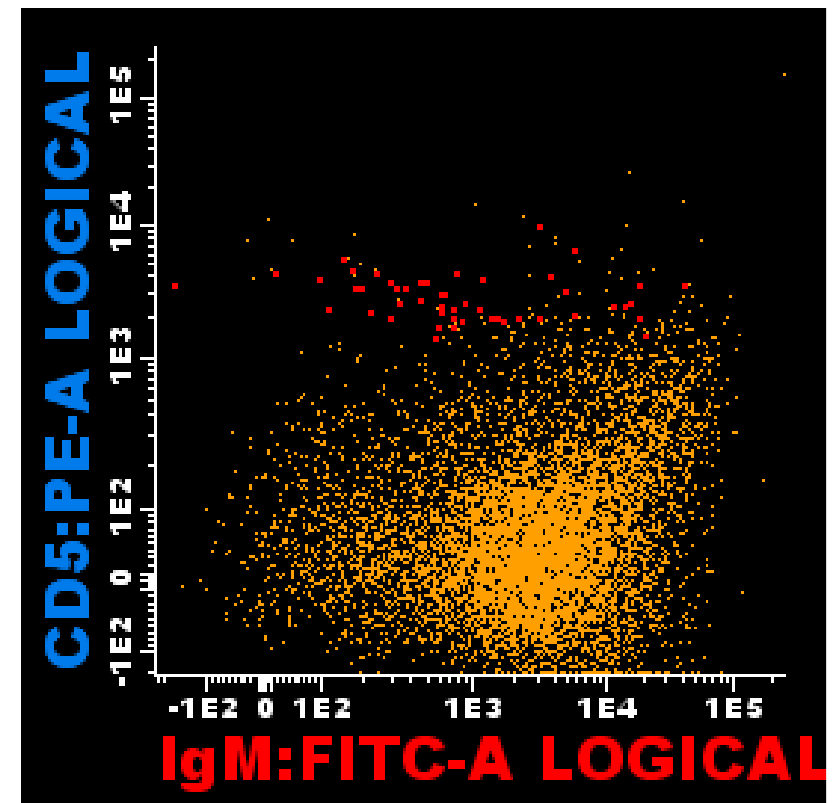
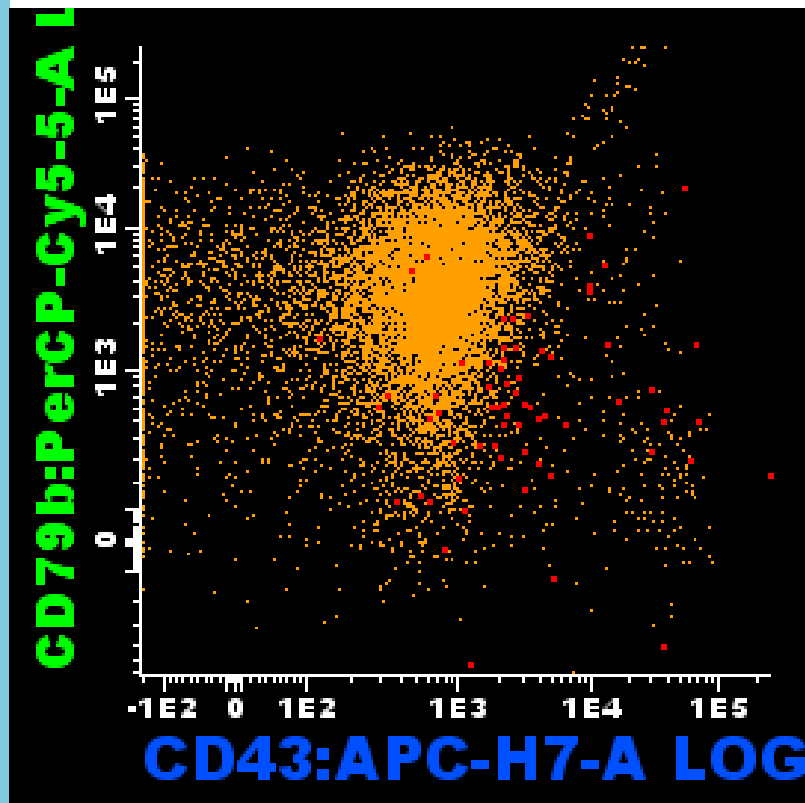
Perifeer bloed met 1/10.000 CLL cellen



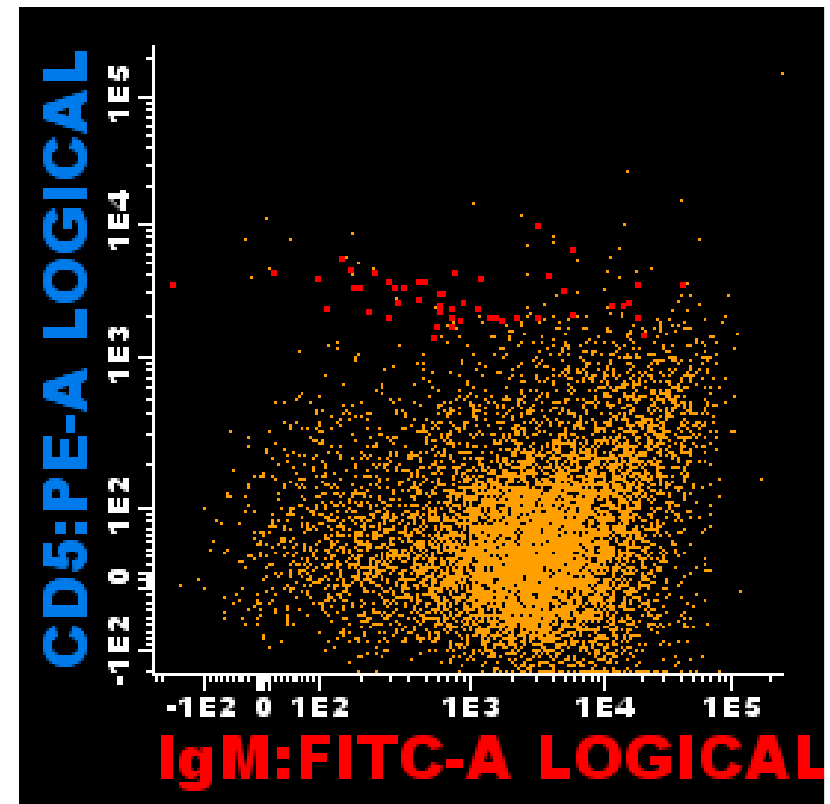
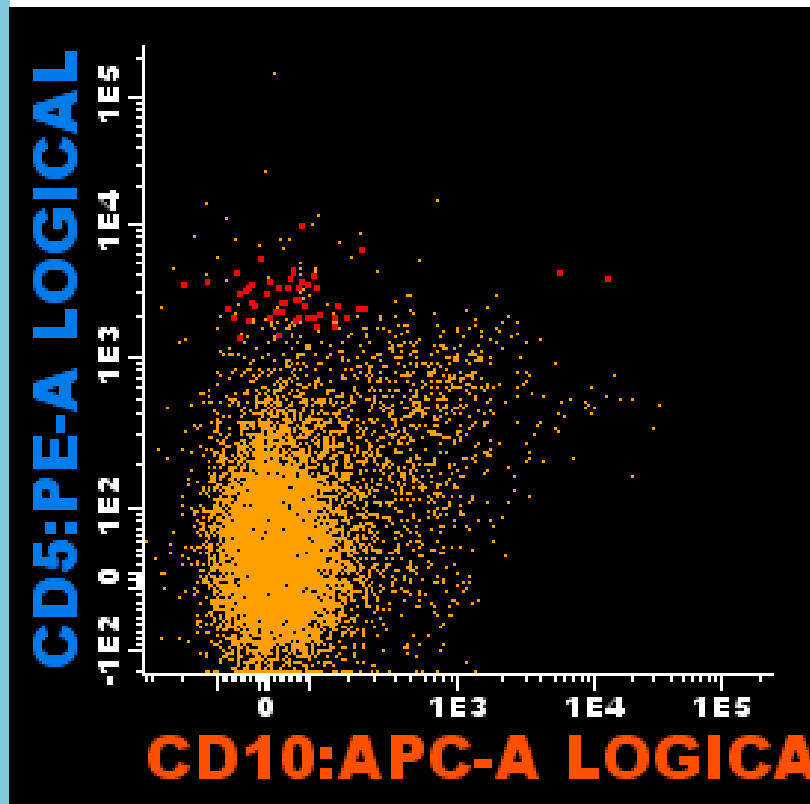
Perifeer bloed met 1/10.000 CLL cellen



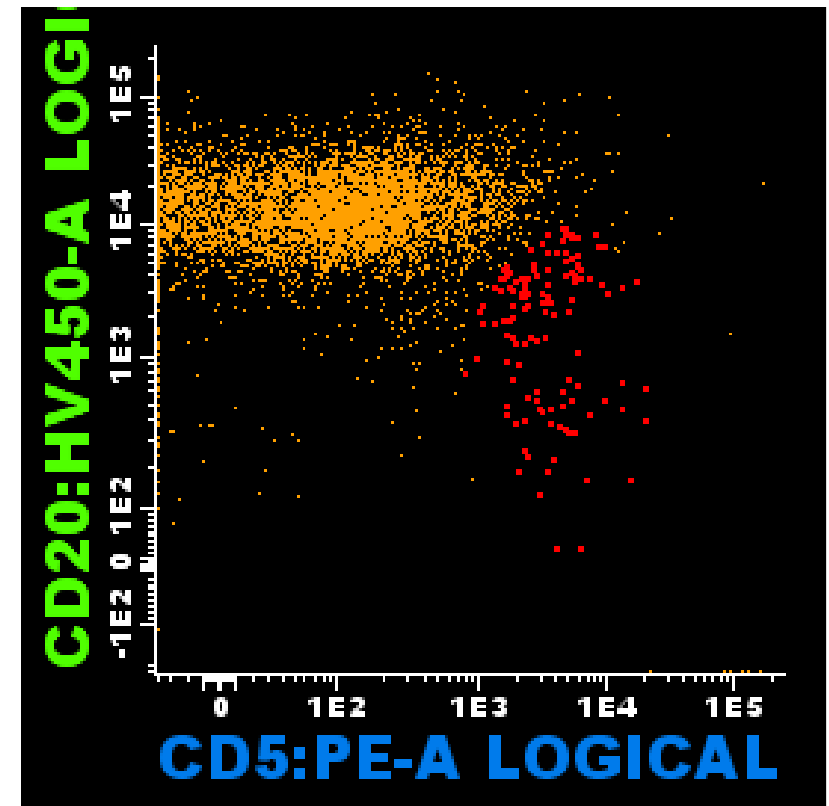
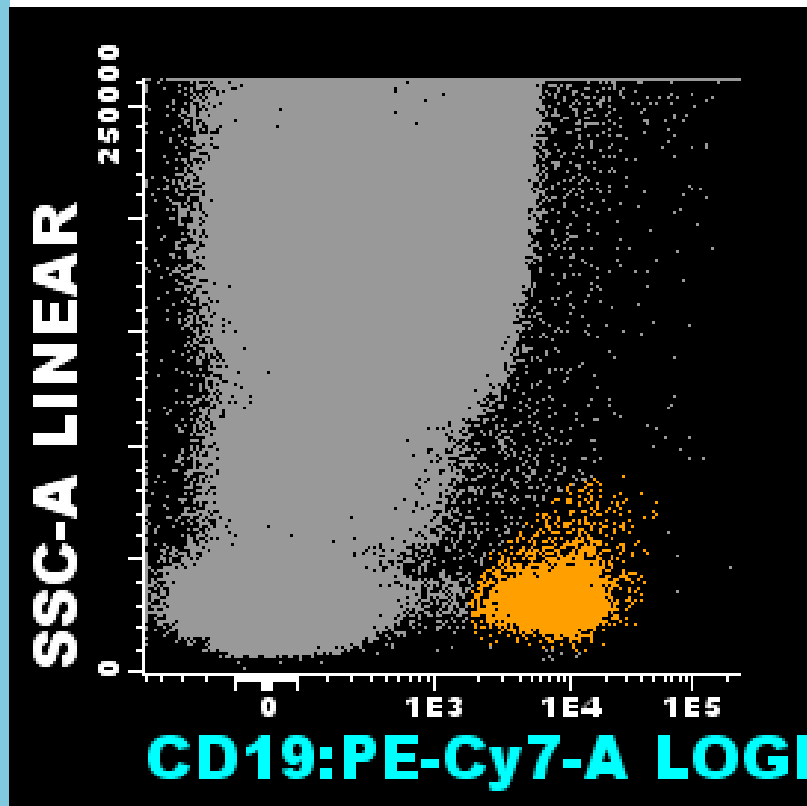
Perifeer bloed met 1/10.000 CLL cellen



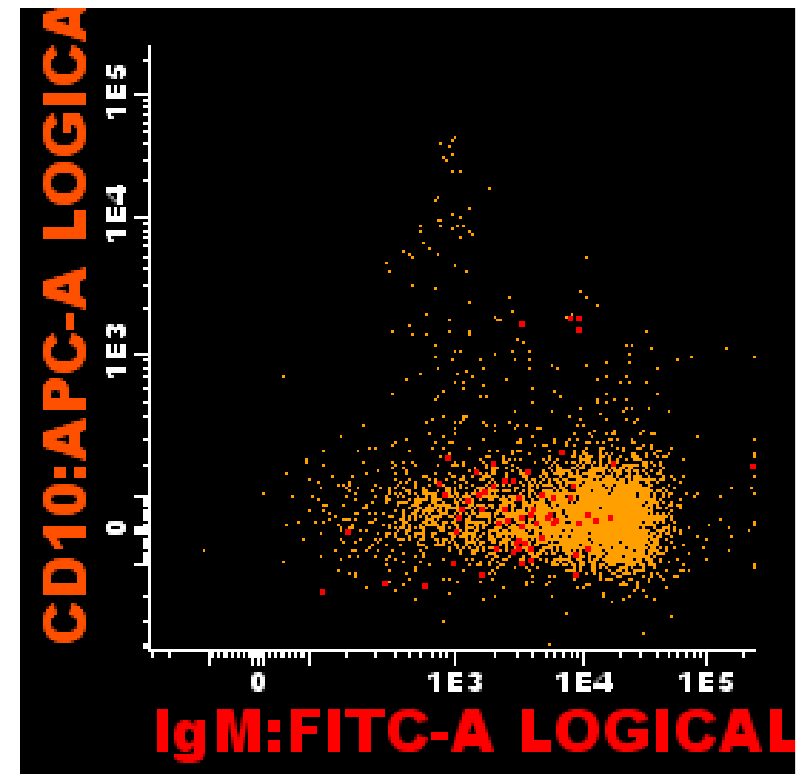
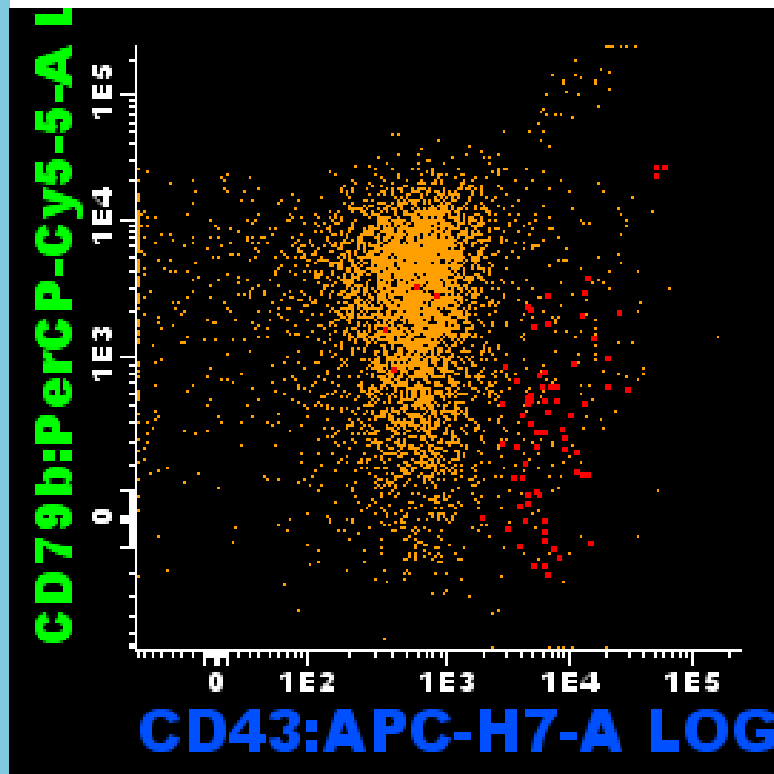
Perifeer bloed met 1/10.000 CLL cellen



Perifeer bloed van een controle

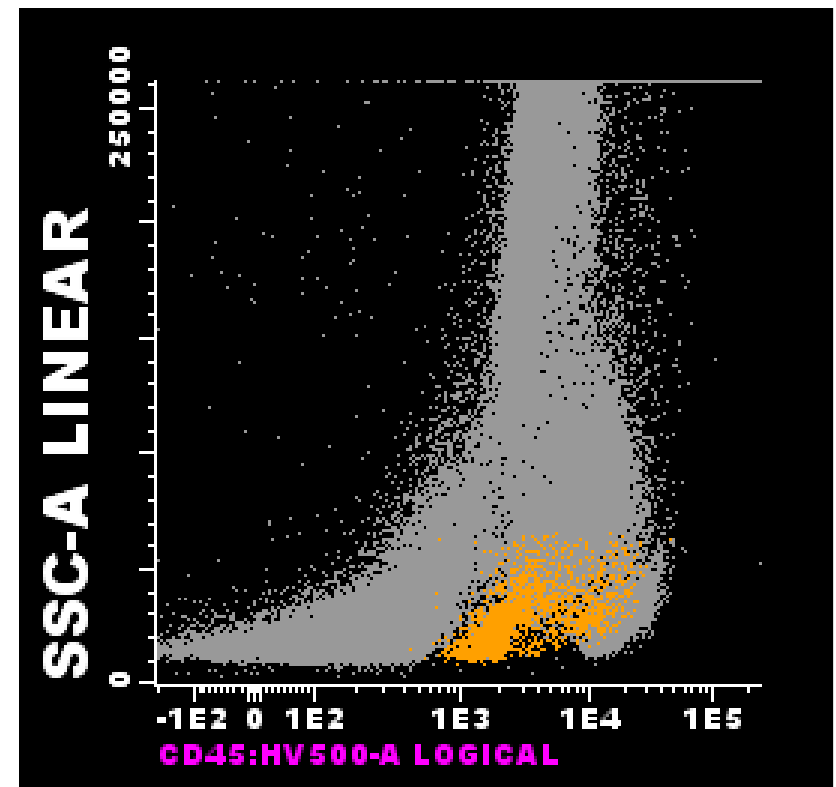
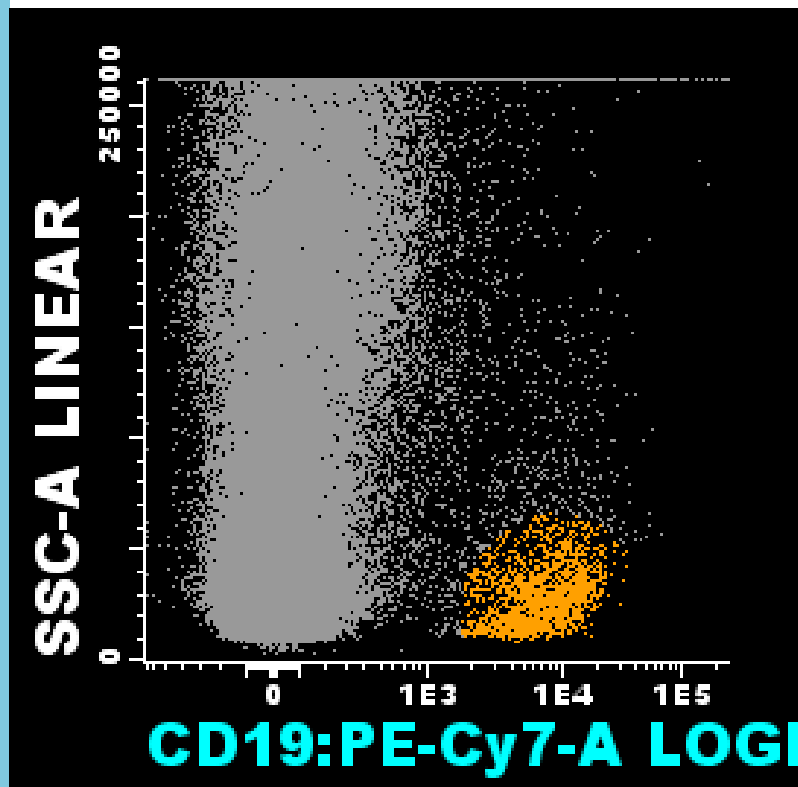


Perifeer bloed van een controle

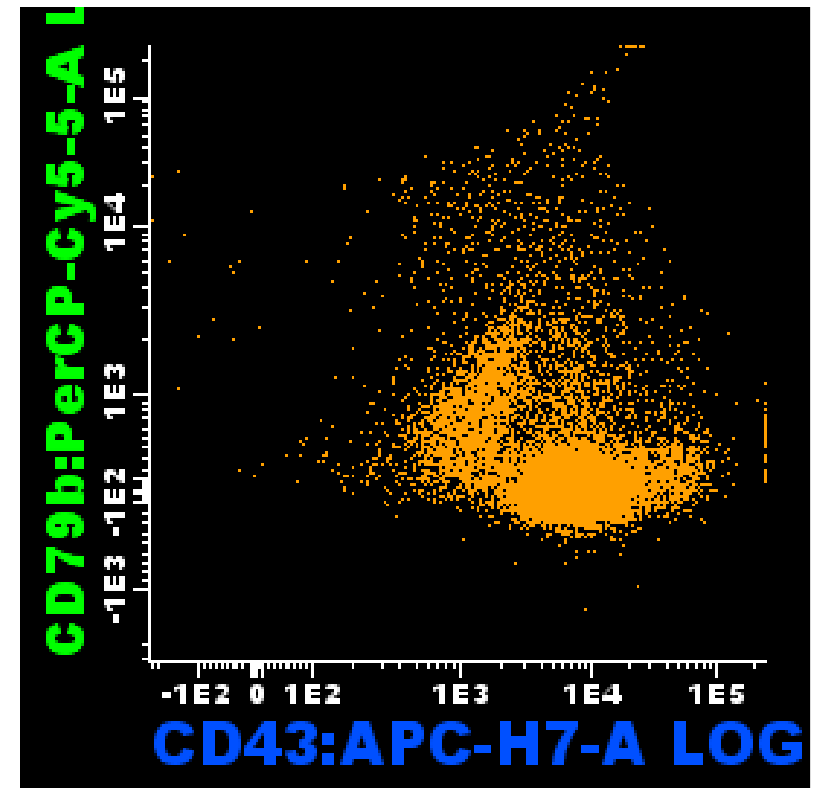
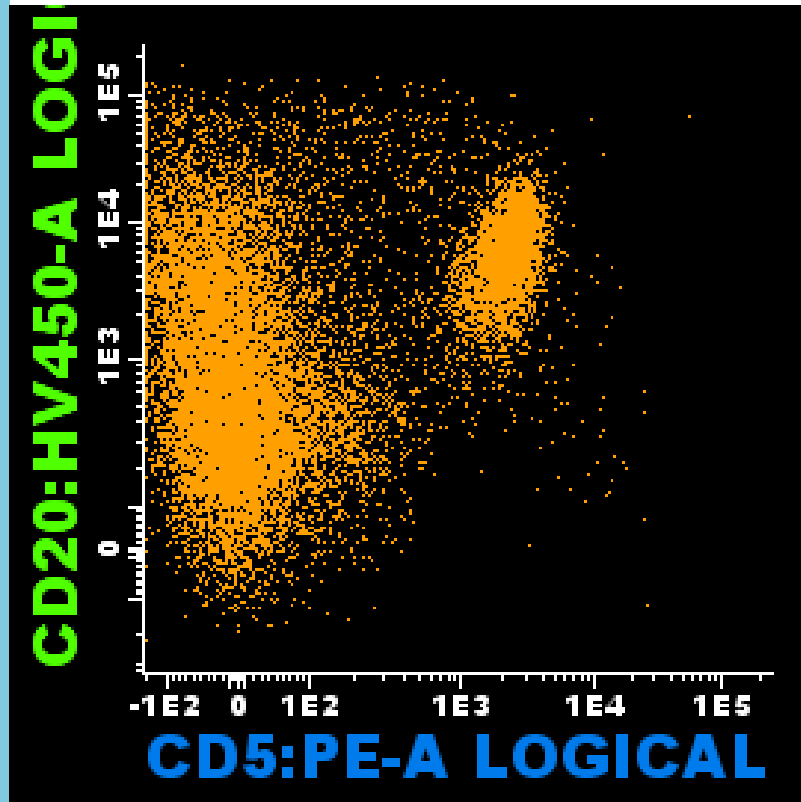


Beeld passend bij een MBL, 0.04%, 4/ μ L
Patiënt van 64 jaar oud

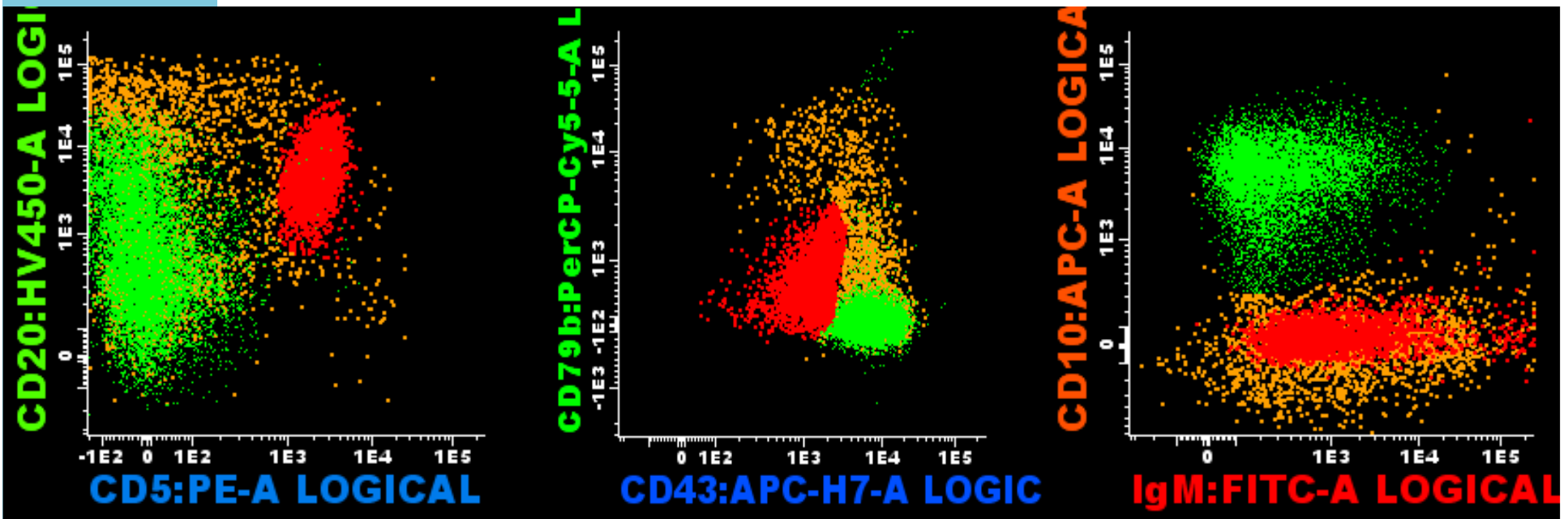
Beenmerg kind gemengd met 2% CLL cellen



Beenmerg kind gemengd met 2% CLL cellen

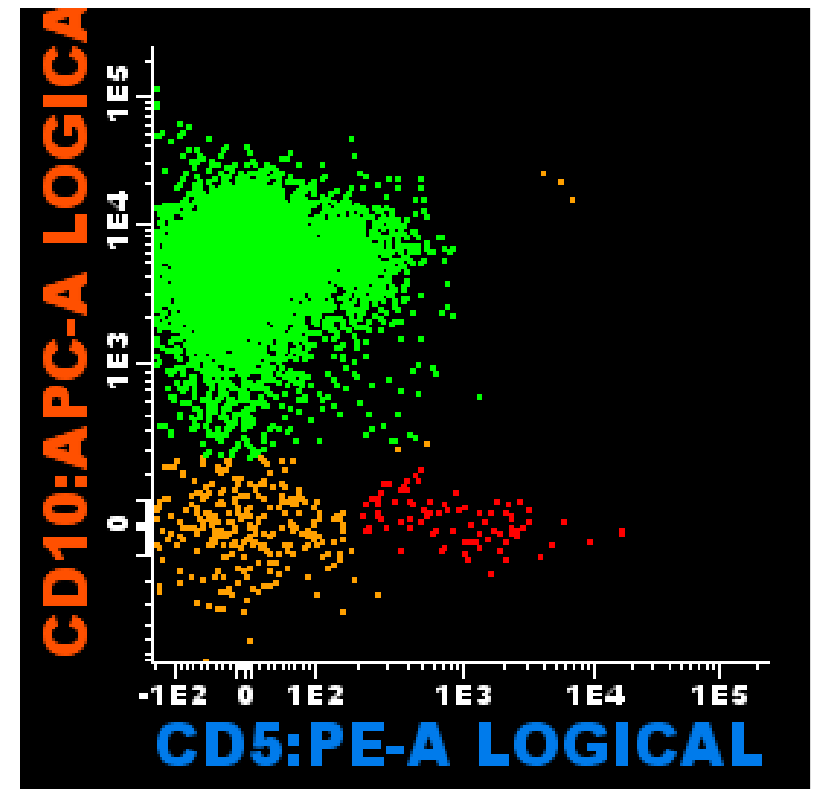
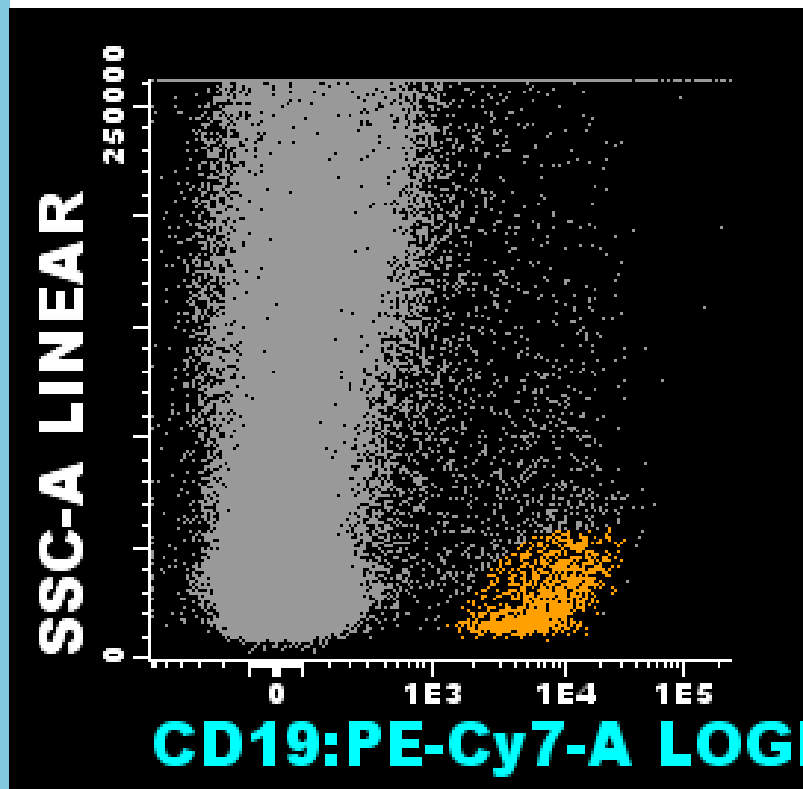


Beenmerg kind gemengd met 2% CLL cellen



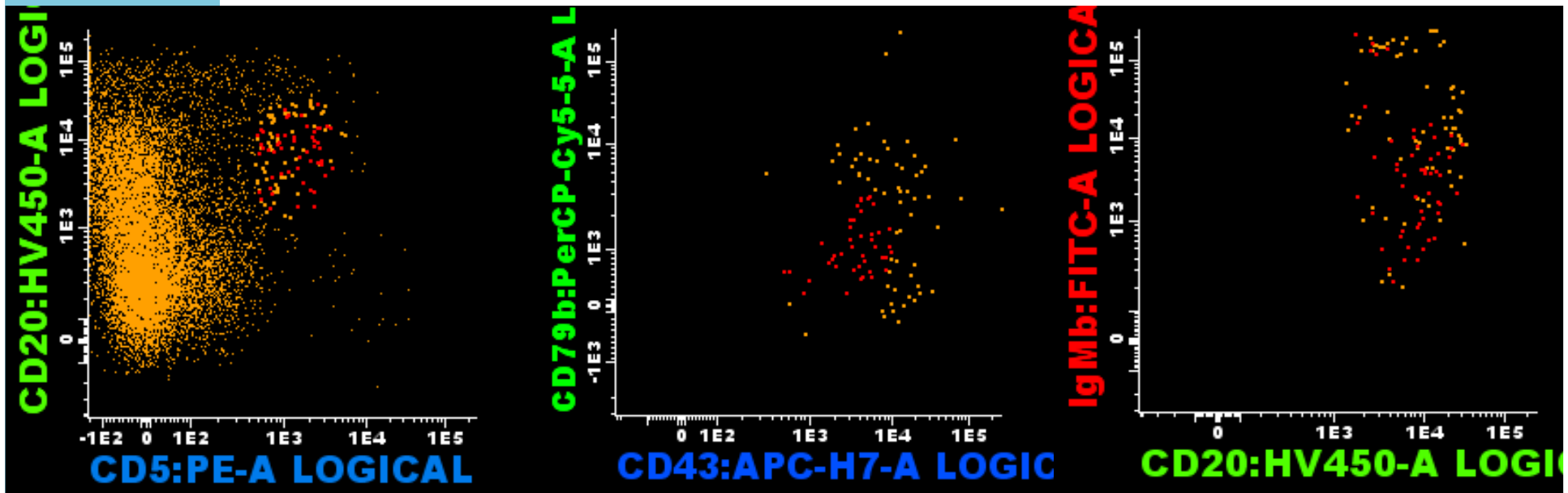
Rijpe B
CLL cellen
hematogonen

Beenmerg kind gemengd met 1/10.000 CLL cellen



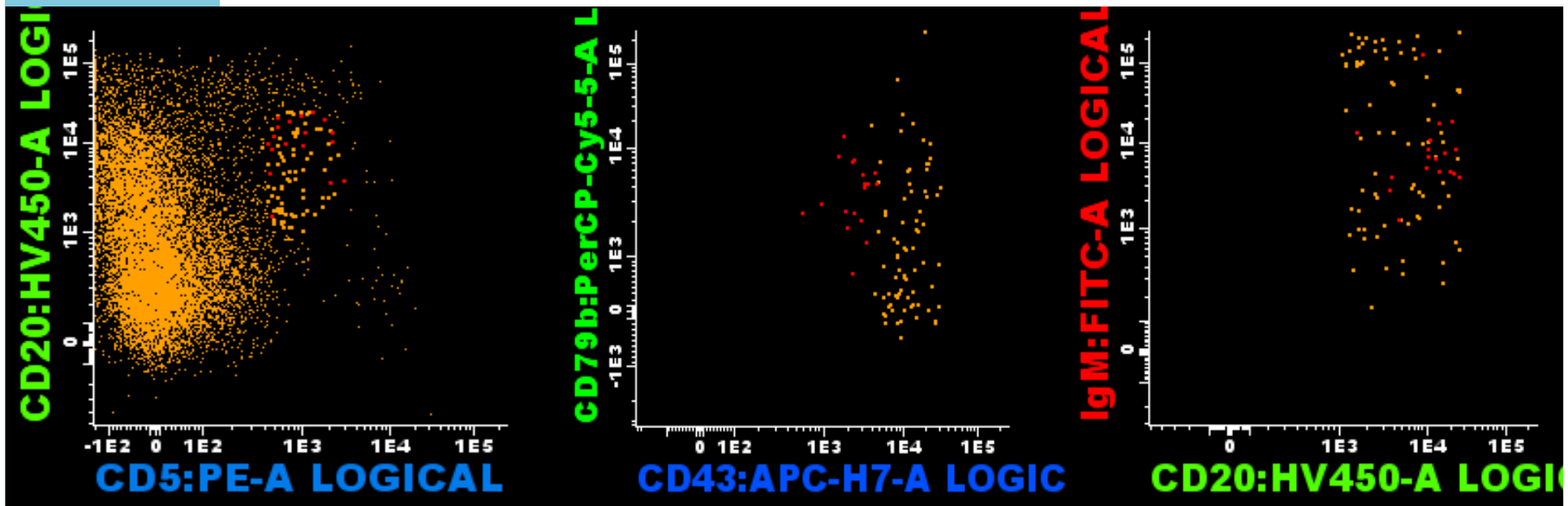
Een andere gatingstrategie toepassen, startend met CD10 vs CD5

Beenmerg kind gemengd met 1/10.000 CLL cellen



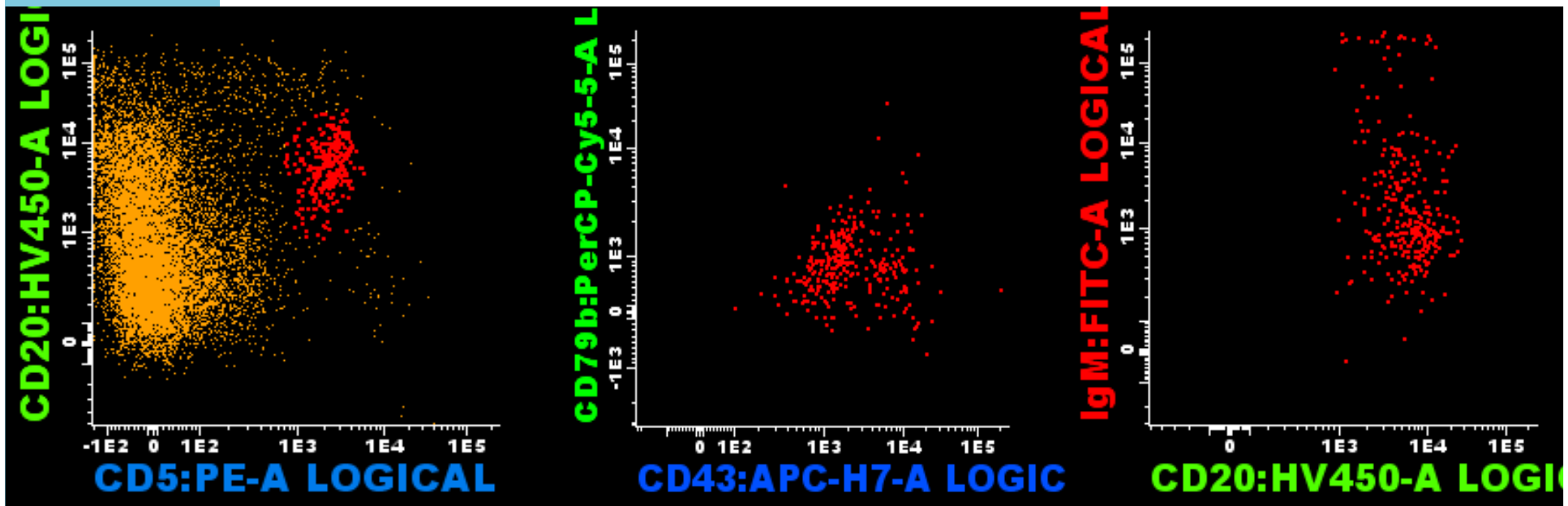
47 events / 840.000 = 6/100.000

controlebeenmerg



18 events / 860.000 = 2/100.000

Beenmerg kind gemengd met 1/1000 CLL cellen



390 events / 805.000 = 5/10.000

Besluit

- ➔ **MRD met FC in CLL moet zowel op BM (eerste 3 maanden) als bloed (later) worden uitgevoerd**
- ➔ **In bloed kan een gevoeligheid van 1/10.000 gehaald worden**
- ➔ **In BM is dat moeilijker omdat een aantal discriminerende parameters minder performant zijn (CD43, IgM, CD79b, CD20)**
- ➔ **Een gevoeligheid in BM van 1/5000 lijkt nog goed haalbaar.**