# Роль электрофореза в диагностике и мониторинге больных с множественной миеломой. Международные рекомендации 2016г

Панасюк Яна Алексеевна, к.б.н.



## Множественная миелома (MM) —

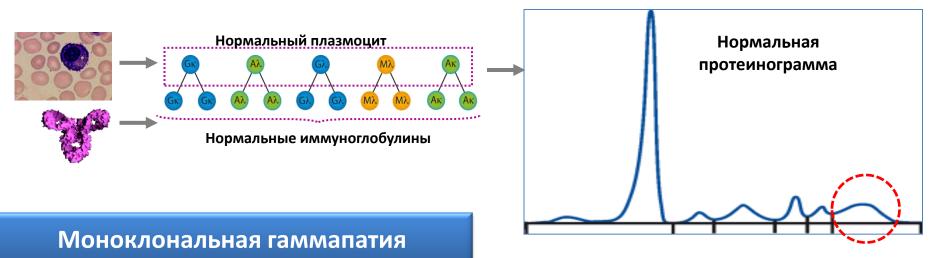
опухолевое заболевание, характеризующееся неконтролируемой *пролиферацией плазматических клеток*. Как правило плазматические клетки сохраняют способность синтезировать антитела, однако все они являются *абсолютной копией*, поскольку синтезируются клетками одного клона. *Моноклональность* иммуноглобулинов может быть определена с помощью электрофореза



#### Нормальная секреция иммуноглобулинов

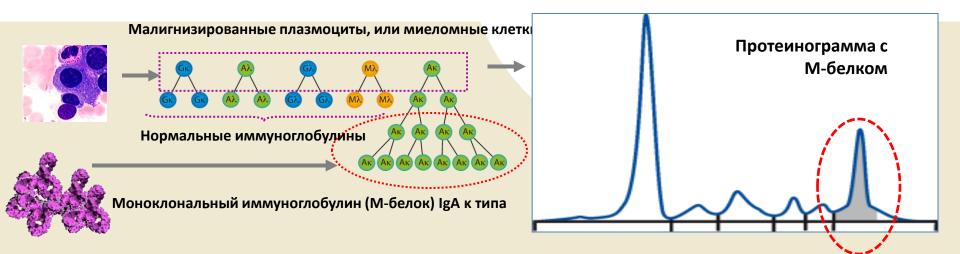
В норме В-клетки продуцируют большое количество различных иммуноглобулинов:

В результате на ЭФ профиле гамма-зона имеет вид нормального распределения:



Повышенная активность/пролиферация одного клона приводит к повышению концентрации одного из множества иммуноглобулинов сыворотки (или его фрагментов) — возникновению моноклональной гаммапатии:

В результате на ЭФ профиле появляется изолированный пик М-белка:



- •ММ составляет около 15% среди гематологических опухолей и 1.8% среди всех онкологических заболеваний
- •ММ наиболее частый диагноз у пациентов в возрасте 65-75 лет с медианой 69 лет. В возрасте <40 лет ММ встречается редко (не чаще 40 случаев на 1 млн)
- •Мировая статистика последнего десятилетия показывает, что процент впервые выявленных случае ММ увеличивается каждый год на 0.8%



- •Заболеваемость ММ в России составляет ≈ 1,7 случая на 100 тыс населения. Ежегодно заболевает около 2 000 человек и столько же умирает (С.С. Бессмельцев 2013г клиническая Онкогематология Т6, №3)
- Заболеваемость ММ в США составляет ≈6.1 случаев на 100 тыс населения. В 2015г было зарегистрировано 26 850 новых случаев заболевании и 11 240 смерти 30 330 и 12 650 соответственно в 2016г. (NCCN guidelines Multiple Myeloma v.3.2016, v.1.2017)
- Американское сообщество объясняет увеличение выживаемости пациентов с ММ за счет использования новых и более эффективных протоколов лечения.





NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®)

### **Multiple Myeloma**

Version 3.2017 — November 28, 2016

**NCCN.org** 

NCCN Guidelines for Patients® available at www.nccn.org/patients

The National Comprehensive Cancer Network® (NCCN®) = альянс 27 онкологических центров мирового уровня. Все актуальные практические рекомендации доступны на сайте организации <a href="https://www.nccn.org">https://www.nccn.org</a> ( в свободном доступе после регистрации).



International Myeloma Working Group (IMWG) \_ Международная рабочая группа по миеломе. Основанная в 1995 как Научно-Консультативный Совет по миеломе. Начиная с 2000 года, научные лидеры IMF встречались каждые два года для обмена идеями и разработке общих международных подходов <a href="http://imwg.myeloma.org/">http://imwg.myeloma.org/</a>

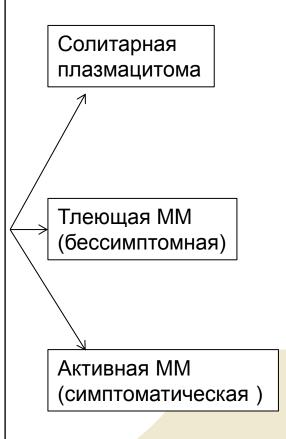
#### Первичная диагностика ММ

- Анамнез и осмотр пациента
- Клинический анализ крови,
   лейкоформула, подсчет тромбоцитов
- Мочевая кислота, креатинин, электролиты, ЛДГ,
- β-2 микроглобулин
- Кальций/Альбумин
- Свободные легкие цепи иммуноглобулинов в сыворотке
- Количественный анализ иммуноглобулинов сыворотки
- Электрофорез белковых фракций сыворотки, Иммунофиксация сыворотки
- Общий белок суточной мочи
- Электрофорез белковых фракций мочи, Иммунофиксация мочи
- Исследование скелета
- Унилатеральная пункция костного мозга
- + биопсия, включающая иммуногистохимию и/или проточную цитометрию костного мозга
- Цитогенетический анализ
- Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) (del 13, del 17p13, t(4;14), t(11;14), t(14;16), амплификация 1q21)

## Полезные в некоторых ситуациях исследования

- МРТ и/или ПЭТ-КТ
- Вязкость сыворотки
- Денситометрия костней
- Биопсия тканей для диагностики солитарной костной или экстрамедуллярной плазмоцитомы
- Окрашивание на амилоид костного мозга и жировой ткани
- Индекс метки плазматических клеток
- HLA-типирование

#### Клинические проявления





#### Первичная диагностика ММ

- Анамнез и осмотр пациента
- Клинический анализ крови, лейкоформула, подсчет тромбоцитов
- Мочевая кислота, креатинин, электролиты, ЛДГ,
- β-2 микроглобулин
- Кальций/Альбумин
- Свободные легкие цепи иммуноглобулинов в сыворотке
- Количественный анализ иммуноглобулинов сыворотки
- Электрофорез белковых фракций сыворотки, Иммунофиксация сыворотки
- Общий белок суточной мочи
- Электрофорез белковых фракций мочи, Иммунофиксация мочи
- Исследование скелета
- Унилатеральная пункция костного мозга
- + биопсия, включающая иммуногистохимию и/или проточную цитометрию костного мозга
- Цитогенетический анализ
- Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) (del 13, del 17p13, t(4;14), t(11;14), t(14;16), амплификация 1q21)

## проявления

Полезные в некоторых ситуациях исследования

- МРТ и/или ПЭТ-КТ
- Вязкость сыворотки

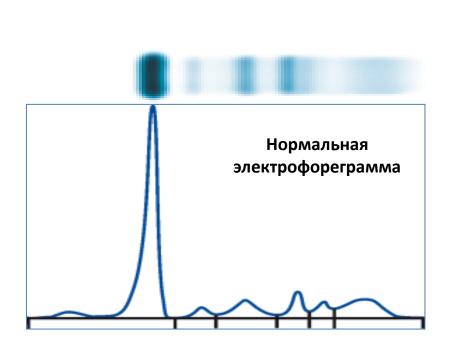
Солитарная плазмацитома

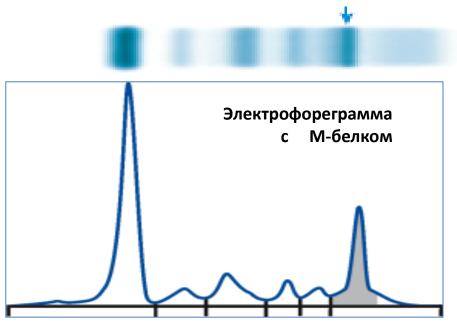
Клинические

4 Теста для оценки иммунного профиля пациентов

> Активная ічііч (симптоматическая)







«Лишний» пик, присутствующий на электрофореграмме, должен рассматриваться *как возможный* Моноклональный белок (М-пик, М-градиент, парапротеин и др)

Моноклональный белок может мигрировать (детектироваться) *в любой* из фракций от альфа2 до гамма



И

Иммунофиксация белков сыворотки

Частый вопрос: Всегда ли «лишний пик» на электрофореграмме являются Мбелком

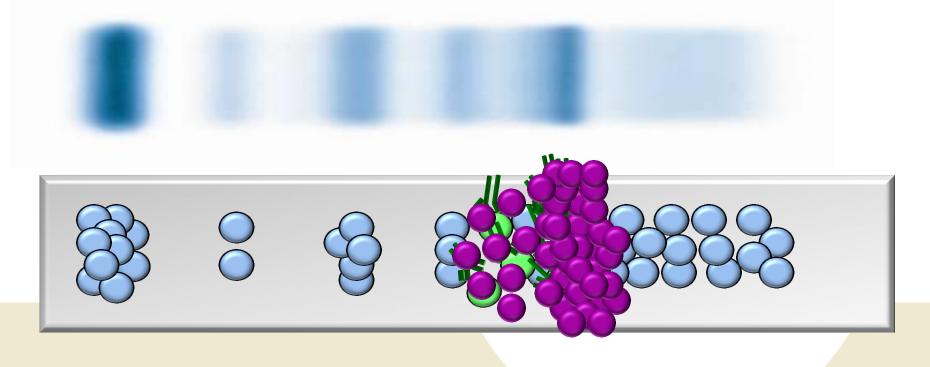
- •HET . Фибриноген, свободный гемоглобин, С-реактивный белок также будут давать дополнительный пик на электрофореграмме.
- •Для подтверждения иммуноглобулиновой природы пика необходимо проводить иммунофиксацию (иммунотипирование) белков

Частый вопрос: Отсутствие «лишнего пика» на электрофореграмме являются ли достаточным доказательством отсутствия М- белком в пробе

- •HET . Моноклональный белок в низкой концентрации может быть «скрыт» за другими белками пробы.
- •Для подтверждения отсутствия моноклонального белка необходимо проводить иммунофиксацию (иммунотипирование)

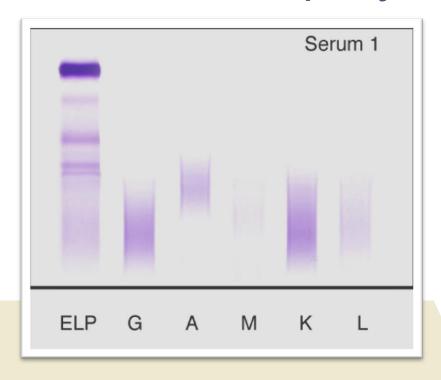


## Иммунофиксация в геле Принцип метода

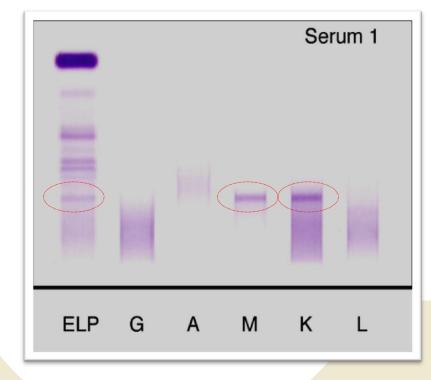




## Иммунофиксация в геле результаты



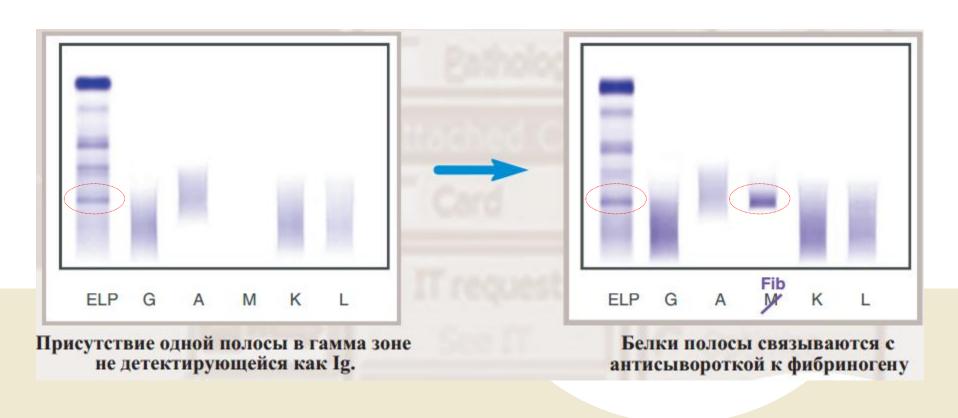
Нормальный образец



Моноклональный белок = IgM каппа

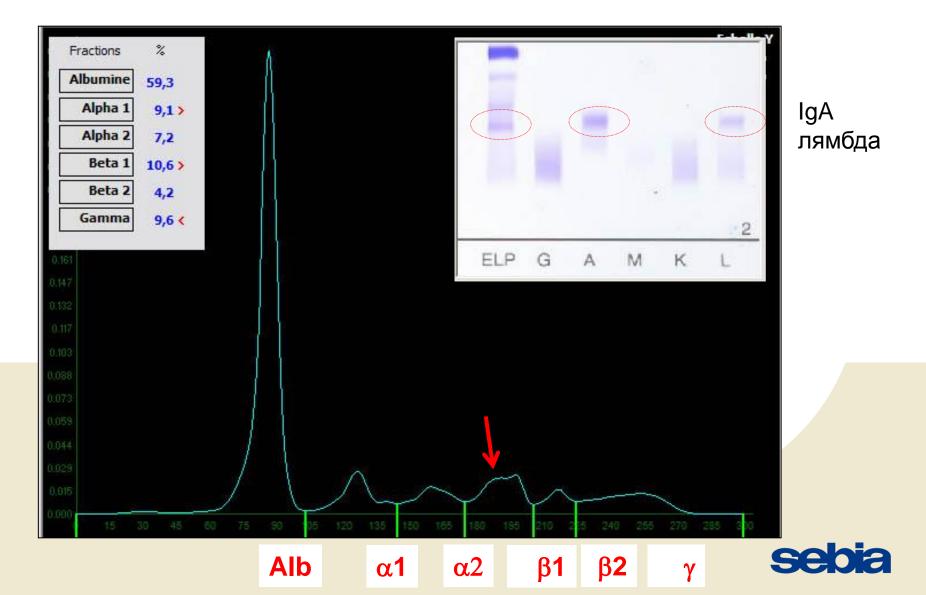


# Иммунофиксация в присутствии фибриногена

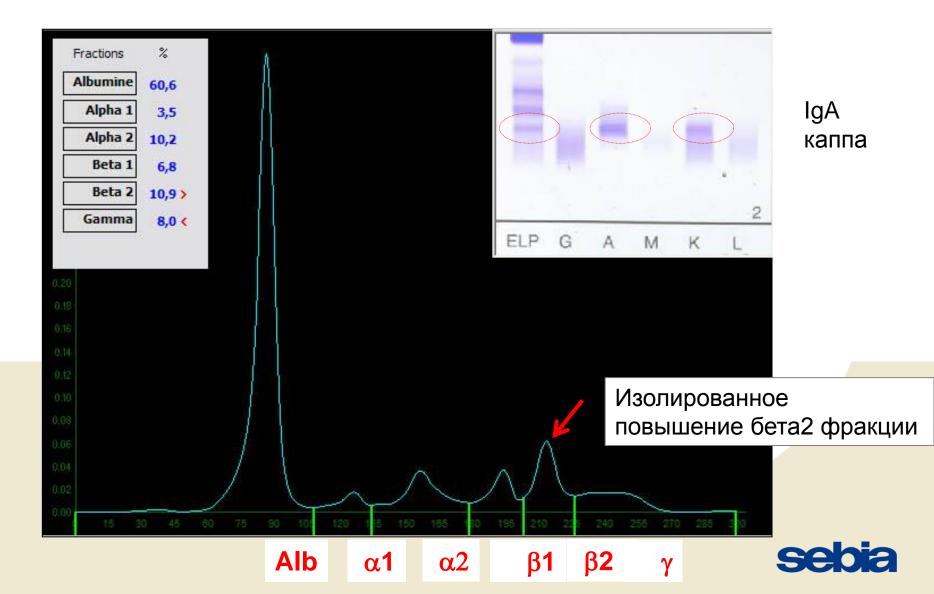




## Иммунофиксация в присутствии небольшого М-белка вне гамма зоны



## Иммунофиксация в присутствии небольшого М-белка вне гамма зоны





#### Иммунофиксация белков СЫВОРОТКИ

- •Чувствительность метода 0.27 г/л в зависимости от типа Ig и точки миграции
- «подозрение» на присутствие М-белка (при первичной диагностике требуется подтверждение методом иммунофиксации)
- •Недорогое исследование
- •Есть возможность количественного определения М-белка (% и г\л). Необходимо для мониторинга состояния пациента

- •Чувствительность метода 0.06-0.12 г/л в зависимости от типа Ig и точки миграции
- •Высокоспецифичен. Выявляет только иммуноглобулины

- •Достаточно дорогое исследование
- •Методика качественная.
- •Определяет тип тяжелых и легких цепей Ig, составляющих М-белок



И

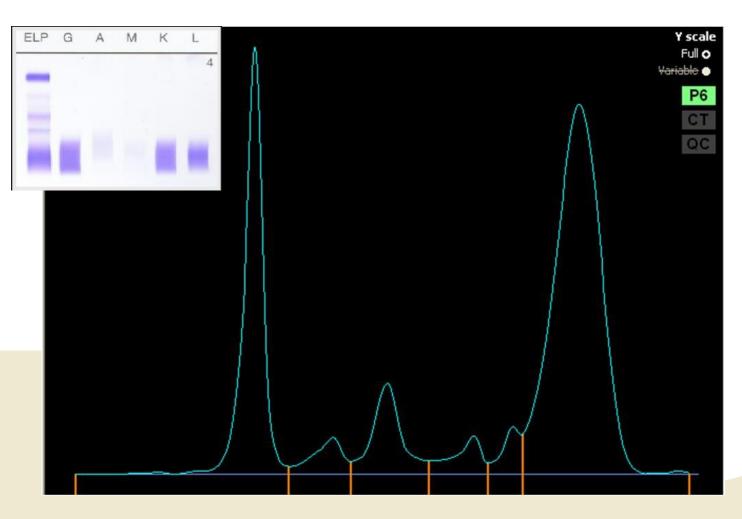
Количественное определение иммуноглобулинов сыворотки

Частый вопрос: Можно ли не выполнять электрофорез белковых фракций, а обойтись измерением только количественным измерением классов иммуноглобулинов

•HET . Количественное определение Ig не дает информации о моноклональности белка. Небольшие но клинически значимые М-белки могут не сопровождаться выходом концентрации Ig за пределы нормы



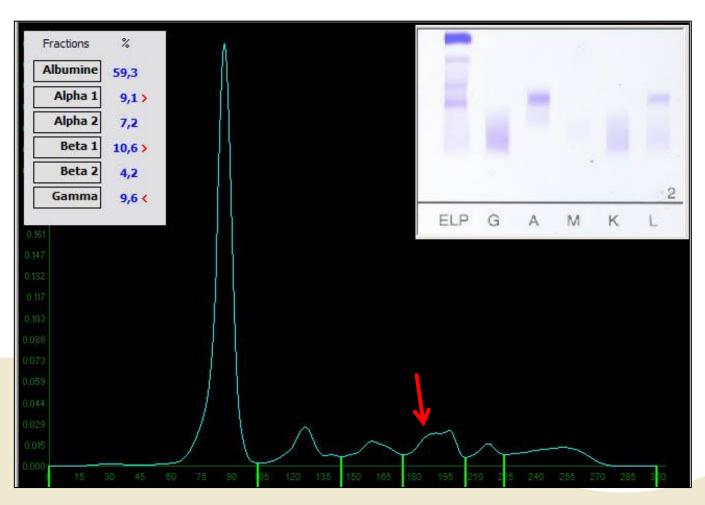
## Гипергаммаглобулинемия



IgG >> IgA>> Моноклонально сть отсутствует



## небольшого М-белка на фоне Гипогаммы



IgG < IgA в пределах норме

M-белок IgA лямбда

**Alb** 

 $\alpha 1$ 

 $\alpha 2$ 

β1

**β2** 

sebia



Количественное определение иммуноглобулинов сыворотки

• Позволяет выделить и измерить величину М-белка среди общих Ig.

•Дает только общую количественную оценку классов Ig

• Полуколичественный метод. Точность такого метода не позволяет точной оценки иммунного статуса пациента

•Точный количественный метод.

•Основной метод оценки «моноклональности» белка •Дополнительная информация позволяющая заподозрить присутствие моноклонального белка



И

## Свободные легкие цепи (СЛЦ) иммуноглобулинов в сыворотке

Plasma cell

normal antibodies

M-proteins

free light chains

heavy chain

Illustration Copyright © 2016 Nucleus Medical Media, All rights reserved. www.nucleusinc.com Моноклональные плазматические клетки продуцируют легкие цепи «своего» типа в избытке.

Что приводит к изменению соотношения k/l свободных леких цепей в сыворотке. И может служить количественной оценкой выраженности заболевания.

СЛЦ обладают токсическим эффектом на почки, являются причиной хронической почечной недостаточности



И

Свободные легкие цепи (СЛЦ) иммуноглобулинов в сыворотке

По данным разных исследований, выявляемость множественной миеломы при исследовании электрофореза белковых фракций (+иммунофиксации) или СЛЦ разная (≈70 – 80%).

Авторы сходятся в том, что *сочетание обоих этих тестов* увеличивает выявляемость MM

• Служит для оценки заболевания при измеряемом уровне М-белка

•Служит для оценки заболевания при несекретирующей или олигосекретирующей миеломе. Около 3% больных ММ не обнаруживается моноклональный белок ни в сыворотке ни в моче, имеют несекретирующую ММ



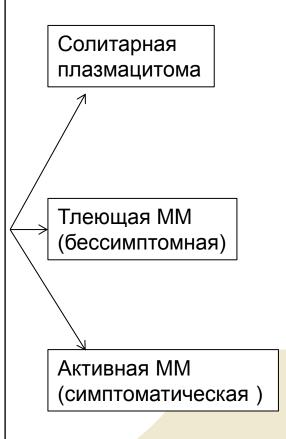
#### Первичная диагностика ММ

- Анамнез и осмотр пациента
- Клинический анализ крови,
   лейкоформула, подсчет тромбоцитов
- Мочевая кислота, креатинин, электролиты, ЛДГ,
- β-2 микроглобулин
- Кальций/Альбумин
- Свободные легкие цепи иммуноглобулинов в сыворотке
- Количественный анализ иммуноглобулинов сыворотки
- Электрофорез белковых фракций сыворотки, Иммунофиксация сыворотки
- Общий белок суточной мочи
- Электрофорез белковых фракций мочи, Иммунофиксация мочи
- Исследование скелета
- Унилатеральная пункция костного мозга
- + биопсия, включающая иммуногистохимию и/или проточную цитометрию костного мозга
- Цитогенетический анализ
- Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) (del 13, del 17p13, t(4;14), t(11;14), t(14;16), амплификация 1q21)

## Полезные в некоторых ситуациях исследования

- МРТ и/или ПЭТ-КТ
- Вязкость сыворотки
- Денситометрия костней
- Биопсия тканей для диагностики солитарной костной или экстрамедуллярной плазмоцитомы
- Окрашивание на амилоид костного мозга и жировой ткани
- Индекс метки плазматических клеток
- HLA-типирование

#### Клинические проявления





Международная группа по миеломе IMWG в недавнем времени пересмотрела критерии определения множественной миеломы, включив в них лабораторные биомаркеры, помимо CRAB критериев

**C** (Calcium) — гиперкальциемия (кальций > 2,75 ммоль/л или на 0,25 ммоль/л выше верхней границы нормы);

R (Renal) — нарушение функции почек (креатинин в сыворотке > 2 мг/дл, или > 173 ммоль/л);

А (Anaemia) — нормохромная, нормоцитарная анемия (гемоглобин < 100 г/л или на 20 г/л меньше нижней границы нормы);

В (Bone) — поражение костей скелета (очаги лизиса, тяжелая остеопения, патологические переломы, компрессия тел позвонков с уменьшением их высоты).



Тлеющая (бессимптомная) миелома	<ul> <li>Сывороточный моноклональный белок IgG или IgA ≥ 30 г/л;</li> <li>Или</li> <li>Белок Бенс-Джонса ≥ 500 мг/24ч и/или</li> <li>Клональные плазматические клетки костного мозга 10%-60%</li> <li>Отсутствие CRAB критериев или амилоидоза</li> </ul>
Активная (симптоматическая) миелома	Клональные плазматические клетки в костном мозге ≥ 10% или наличие плазмоцитомы (костной или экстрамедуллярной)
	<ul> <li>И наличие одного или несколько из следующих критериев:</li> <li>Гиперкальцимия.</li> <li>Почечная недостаточность</li> <li>Анемия</li> </ul>
	<ul> <li>Одно или более остеолитических поражений костей при радиографии, КТ или ПЭТ-КТ</li> <li>Клональные плазматические клетки костного мозга ≥ 60%</li> </ul>
	<ul> <li>Атипичное соотношение СЛЦ сыворотки ≥ 100 (в случае вовлеченности каппа) или &lt; 0,01 (в случае вовлеченности лямбда)</li> <li>&gt; 1 очагового поражения на MPT &gt; 5 мм</li> </ul>



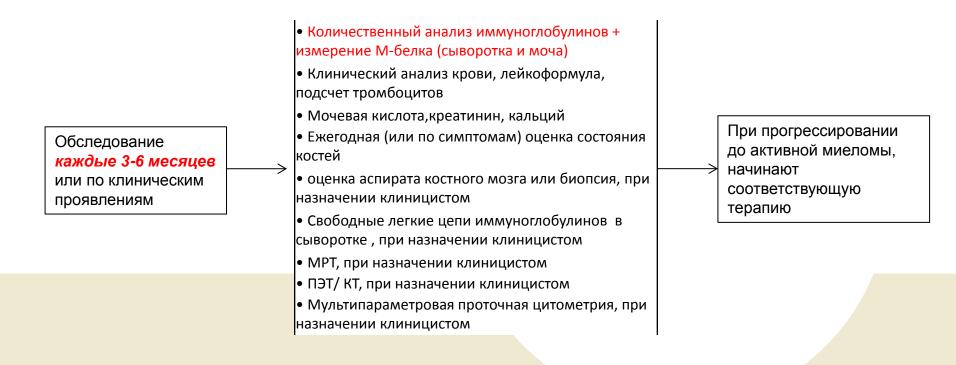
При отсутствии у пациентов показателей, удовлетворяющих критериям Тлеющей или Активной миеломы, такой тип гаммапатий относят к MGUS - Моноклональные гаммапатии неопределенного значения

#### Моноклональные гаммапатии неопределенного значения — MGUS

- Сывороточный моноклональный белок < 30 г/л
- Клональные плазматические клетки в костном мозге < 10 %
- Отсутствие органных повреждений (CRAB гиперкальциемии, дисфункции почек, анемии, костных деструкций или, в случае IgM MGUS, нет анемии, конституциональных симптомов, гипервязкости, лимфаденопатии или гепатоспленомегалии)

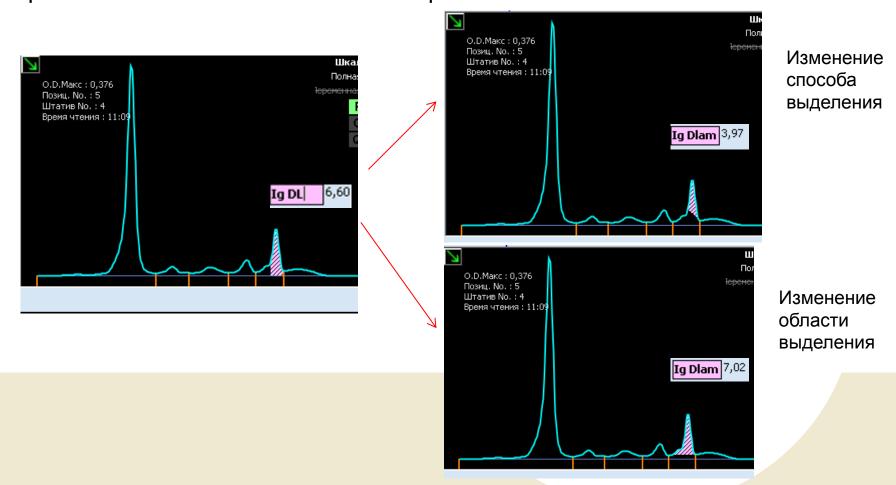


Биологически случаи тлеющей (асимптоматической) миеломы сходны с MGUS. Специфическое лечение таким больным не показано, они подлежат наблюдению вплоть до прогрессирования.



Однако вероятность прогрессирования в активную миелому в пациентов с тлеющей миеломой гораздо выше, чем с MGUS. В связи с чем и эти пациенты и были выделены в отдельную группу. Своевременное определение начала прогресса заболевания позволяет вовремя начать терапию, повысив ее эффективность

Важно: Единожды выбранный тип измерения М-белка должен быть использован и при последующих его измерениях, чтобы обеспечить правильный количественный мониторинг

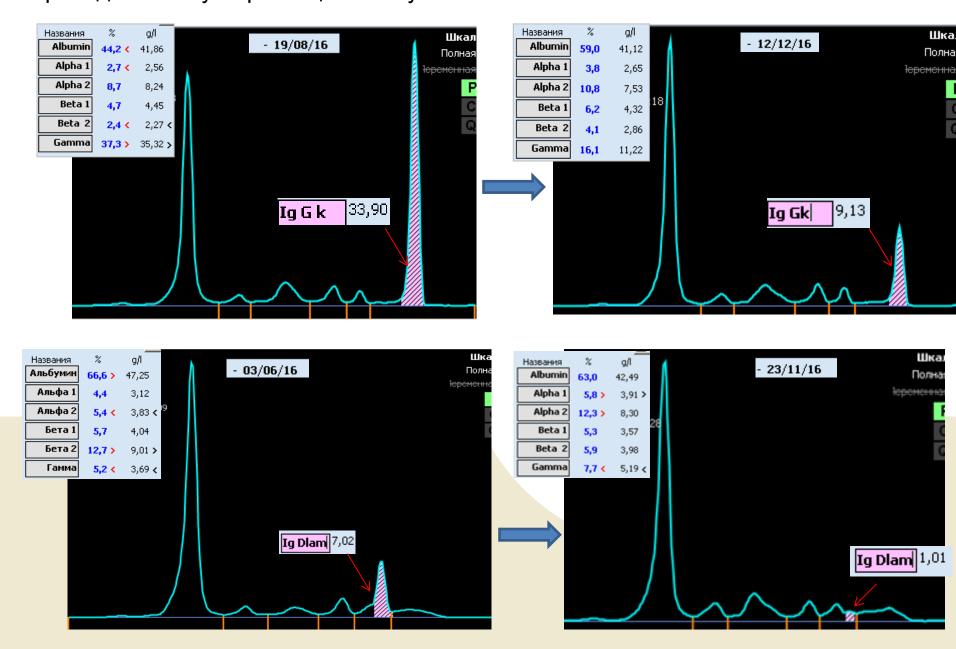


+ Изменение методики электрофореза может дать изменение величины и даже позиции миграции пика, поскольку все производители используют разные параметры миграции и способы оценки белка

## IMWG разработала **единые международные критерии оценки результатов** противоопухолевой терапии.

Категории ответа	Критерии ответа
Минимальный ответ	снижение уровня М-белка в сыворотке ≥ 25% но ≤ 49% и снижение М-белка в суточной моче на 50% - 89%.
при рецидивирующей	В дополнение, уменьшение на 25-49% плазмацитомы мягких тканей, если она присутствовала изначально
трудноизлечимой	Отсутствие увеличения в размере или количестве литических поражения костей (развитие компрессионного перелома не
миеломе (MR)	исключает ответ)
Частичный ответ (PR)	снижение уровня М-белка в сыворотке ≥ 50%, снижение М-белка в суточной моче на ≥ 90%, при этом абсолютное
	количество М-белка в моче должно быть менее 200 мг/сут.
	если М-компонент сыворотки и мочи невозможно определить, вместо критерия М-белка используется критерий -
	снижении ≥ 50% в разнице уровней между вовлеченными и не вовлеченными СЛЦ
	если невозможно определить ни М-белок сыворотки и мочи, ни СЛЦ сыворотки - а свободных легких цепей так же не
	определена, снижение ≥ 50% плазматических клеток, при сохранении базового уровня плазматических клеток в костном
	мозге ≥ 30%.
	В дополнение, уменьшение на 50% и более размера плазмацитомы мягких тканей, если она присутствовала изначально
	Все показатели оцениваются в 2-х последовательных измерениях; не было доказательств прогрессирования или появления
	новых очагов повреждения костей, если были выполнены радиографические исследования.
Очень хороший	М-белок сыворотки и мочи определять с помощью иммунофиксации, но не определяется при электрофорезе белковых
частичный ответ (VGPR)	фракций или снижение ≥ 90% M-белка сыворотки + M-белок мочи < 100 мг/24ч
	если М-компонент сыворотки и мочи невозможно определить - снижении ≥ 90% в разнице уровней между вовлеченными
	и не вовлеченными СЛЦ в дополнение к критериям VGPR
	Все показатели оцениваются в 2-х последовательных измерениях
Полный ответ (CR)	Отсутствие М-белка при иммунофиксации в сыворотке и моче, отсутствие плазмоцитомы мягких тканей, < 5%
	плазматических клеток в костном мозге;
	для пациентов у которых может быть измерены только СЛЦ — нормальное соотношение k/l (от 0,26 до 1,65) в дополнение к
	критериям CR;
	все показатели оцениваются в 2-х последовательных измерениях
Строгий полный ответ	определяется у пациентов с полным ответом + нормальным соотношением СЛЦ и отсутствие клональных плазматических
(sCR)	клеток в костном мозге по данным иммуногистохимического или 2-х, 4-х цветной проточной цитометрии.
	все показатели оцениваются в 2-х последовательных измерениях
Иммунофенотипический,	Критерии строгого полного ответа как определено выше + отсутствие фенотипически аберрантных плазматических клеток
полный ответ	(клональных) в костном мозге при анализе минимум 1 млн клеток костного мозга с помощью многопараметровой
	проточной цитометрии (> 4 цветов)
Молекулярный полный	Критерии полного ответа как определено выше + отрицательная аллель-специфичная олигонуклеотидная ПЦР
ответ	(чувствительность 10-5)

## Пока на электрофореграмме четко определяется М-белок, дополнительно проводить иммунофиксацию не нужно



## **Единые международные критерии оценки результатов** \_ отсутствие положительного ответа и рецидивы

Устойчивое	Не соответствие критерия Частичного, Хорошего частичного или Полного ответов так же как и отсутствие признаков
заболевание (SD)	прогрессирования заболевания; нет доказательств прогрессирования или нового повреждения костей, если были
	выполнены радиографические исследования.
Прогрессирующее	Рост от 25% от самого низкого уровня значений в любом из следующих исследований:
заболевание (PD)	М-белок сыворотки с абсолютным увеличением ≥ 5г/л; увеличение М-белка сыворотки ≥ 10 г/л достаточно для
	определения рецидива если начальный М-компонент ≥ 50 г/л;
	М-белка в моче (абсолютное увеличение должно быть ≥ 200 мг/24ч);
	Для пациентов с неизмеряемым уровнем М-белка сыворотки и мочи: разницы между вовлеченными и не
	вовлеченными уровнями свободных легких цепей (абсолютное увеличение должно быть > 0,1 г/л);
	Для пациентов с неизмеряемым уровнем М-белка сыворотки и мочи и СЛЦ: процент клеток плазмы костного мозга
	(абсолютный процент должен быть ≥ 10%)
	Появление новых или увеличения в размере существующих повреждений костей или плазмоцитомы мягких тканей
	Развитие гиперкальциемии, что может быть отличительной чертой только лимфопролиферативных заболеваний
	Все показатели оцениваются в 2-х последовательных измерениях
Клинический рецидив	Клинические рецидивы требуют одного или более:
	Прямой показатель прогрессирования заболевания и/или дисфункции органов (CRAB критерии) (Для
	прогрессирующего ответа увеличение М-белка сыворотки ≥ 10 г/л достаточно для определения рецидива если
	начальный М-компонент ≥ 50 г/л). Это не используется в расчете времени до прогрессирования или выживаемости
	без рецедива, но данный перечень может репортироваться опционально или для использования в клинической
	практике.
	Развитие новых плазмоцитомы мягких тканей или повреждения костей
	<del>Четко-выраженное увеличение в размере с</del> уществующей плазмоцитомы или повреждения костей. Четко-выраженное
	определялось как 50% увеличение (и хотя бы 1 см) при серийном измерении поперечных диаметров.
	Гиперкальциемия (> 11,5 мг/дл) (2,85 ммоль/л)
	Снижение гемоглобина ≥ 20 г/л (1,25 ммоль/л)
	Повышение креатинина сыворотки 2 мг/дл или более (177 мкмоль/л или более)
Рецидив после полного	Любой один или несколько из следующих критериев:
ответа	Повторное возникновение М-белка сыворотки или мочи определяемые методом иммунофиксации или
	электрофореза
	Появление ≥ 5% клеток плазмы в костном мозге
	Появление любых других признаков прогрессирования (т.е. новая плазмоцитома, литическое поражение кости,
	гиперкальциемия)

#### Динамические наблюдения \_временные характеристики исследований

В процессе проводимой химиотерапии электрофорез белков сыворотки крови и мочи следует выполнять каждые 2 мес,

при отсутствии М-протеина необходима иммунофиксация белков сыворотки крови и мочи.

У больных олиго- или несекретирующей миеломой следует проводить исследование свободных легких цепей.

После окончания лечения иммунохимические исследования крови и мочи выполняют каждые 3 мес.

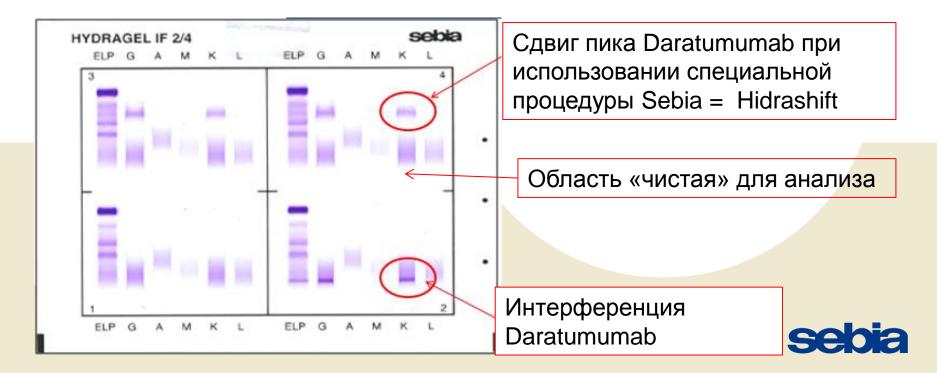
Исследование костного мозга рекомендуется только для подтверждения полной ремиссии и оценки эффективности лечения при несекретирующей миеломе. Рентгенография костей выполняется по клиническим показаниям.



## Новые препараты и возможная интерференция при электрофорезе

На международном рынке стали появляться современные перспективные препараты для лечения ММ, которые по природе своей являются моноклональными иммуноглобулинами. Так же как и собственные патологические М-белки при ММ данные препарату будут проявляться на результатах электрофореза и иммунофиксации.

Daratumumab - моноклональный Ig G kappa



#### Haбop Hydrashift\* был представлен в 2016г на американском съезде онкологов при участии IFM.

OVERCOMING THE INTERFERENCE OF DARATUMUMAB WITH IMMUNOFIXATION ELECTROPHORESIS (IFE) USING AN INDUSTRY-DEVELOPED DIRA TEST:



#### **HYDRASHIFT 2/4 DARATUMUMAB**

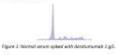
A. Irimia<sup>1</sup>, T. Dejoie<sup>1</sup>, J.S. Simon<sup>2</sup>, A. Axel<sup>3</sup>, A.K. Sasser<sup>3</sup>, M.J. Scullion<sup>1</sup>, T. Ligneel<sup>4</sup>, G. Nouadie<sup>4</sup>, P. Moreau<sup>5</sup> and H. Caillon<sup>1</sup>



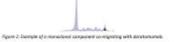
#### BACKGROUND

According to International Myeloma Working Group (IMWS) criteria, detection and quantification of monoclonal component (M-spike) by serum protein electrophoresis (SPE) and immunofixation electrophoresis (IFE) are essential for response evaluation in multiple myeloma [MM]2.

Recent clinical trials of daratumumab, an IgG kappa anti-CD38 monoclonal antibody, have shown impressive results with deep responses2. However, daratumumab may be detected on SPE and IFE assays that are used for monitoring disease monoclonal immunoglobulins (M protein).



This can lead to false-positive SPE and IFE assay results for patients with IgG kappa myeloma protein, which may impact initial assessment of complete responses (CRs) by IMWG criteria. Differentiating therapeutic monoclonal antibodies, such as daratumumab, from endogenous M protein can be challenging when both molecules co-migrate or migrate closely on electrophoresis.



The availability of a specific anti-daratumumab antibody has provided the apportunity to avercome this interference and to correctly assess biochemical response. Indeed, McCudden et al. in collaboration with Janssen, developed a technique, the Daratumumab Interference Reflex Assay (DIRA) test, that has been utilized in daratumumab clinical trials<sup>3</sup>. Given the need for a commercially available automated and standardized test, we evaluated the new commercial DIRA kit test that is under development by Sebia (Usses, France): the Hydrashift 2/4 Daratumumab.

#### OBJECTIVE

The aim of this study was to evaluate the Hydrashift 2/4 Daratumumab in comparison with our laboratory developed DIRA test for the displacement of daratumumab on IFE.

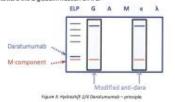
Registrate SV and al. Conserves recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Mivelonia, Workshop Consensus Panel 1. Blood 2011/017-8691-6 Redumer St. Kyle KA. Progress in Myelome - A Monecloral Breekthrough. M Engl J Med.

2018 Det 6:375/140-1390-1382 McCadder, C and al. Moritaring multiple reyelers patients treated with disables unabteasing out monoclonal antibody interference. Clin Chem Lab Med. 2015 Jun 1:54023:085-

American lociety of Hematology

#### PATIENTS AND METHODS

The Hydrashift 2/4 Daratumumab assay was prepared by Sebia using the anti-daratumumab antibody produced by Janssen and modified to allow a migration of daratumumab/anti-daratumumab complexes toward the a globulin fraction on IFE.



IFE technical procedures, migration, and staining programs were performed according to the manufacturer instructions, and run on the standard Sebia, Hydrasys platform, with the HYDRAGEL 4 IF kit. In addition to the regular procedure, an additional applicator to apply the anti-daratumumab antibody was used.

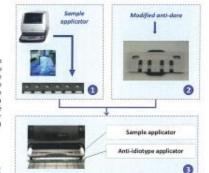


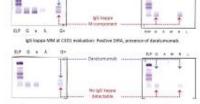
Figure 4: Histopoli 81 3/9 Donatursumph - technical atems

Analytical performances, including sensitivity, specificity, and comparisons with the original DIRA test, were assessed on 99 samples from ongoing daratumumab clinical trials.

#### RESULTS

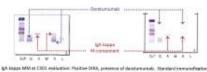
#### COMPARISON WITH THE ORIGINAL DIRA

The Hydrashift 2/4 Daratumumab assay showed excellent concordance (100%) with the laboratory developed test on the 51 samples tested (ie, 28 negative DIRA, 14 positive DIRA and 9 doubtful DIRA).



IgS lappa MM at CADDB evaluation: Negative DRA, presence of devaluations and





(left Figure) is sufficient to essess response (no shifting required).

Figure 5: Exemples of comparison tests between original DRNs and Hydrashift 3/d (boratum-sele-

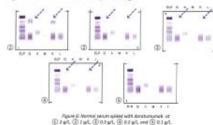
#### > WHEN IS DIRA REQUIRED?

Only for patients with an IgS kepps MM or kepps LOVM with a co-ingrating M-companies



#### > SENSITIVITY

Daratumumab/anti-daratumumab complexes were detected in the a-globulin fraction with a sensitivity of 200 mg/L



Daratumumab/anti-daratumumab complex was difficult to visualize when daratumumab concentrations were less than 200 mg/L, but daratumumab was shown to be completely removed from the gamma globulin fraction with no trace left for all concentrations tested.

#### > SPECIFICITY

For 48 samples tested on diagnosis, the anti-daratumumab antibody specifically shifted daratumumab with no effect on the patients' M-spike (100% specificity).



Figure 7: Server somplex (ESA G. of one's servers somplex spiked with one'-doughunumph (GA, ev). Fair each text, a positive control was performed with a normal sexum swited with denorum-week and teared with certi-density marrieds.

#### HYDRASHIFT 2/4 DARATUMUMAB VERSUS ORIGINAL DIRA:



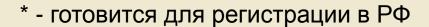
Standardized and automated test

. Excellent concordance with original DIRA:

· Manetton of complexes were from the earnes alobulin fraction



With the proving application of monoclonal antibodies, such as daratumumab, in the treatment of MM, the development of widely available, validated assays to overcome antibody interference will become increasingly important. The Hydrashift 2/4 Daratumumab test provides the opportunity to standardize and automate the displacement of daratumumab interference and help with the correct interpretation of IFE results for clinical outcome measures.





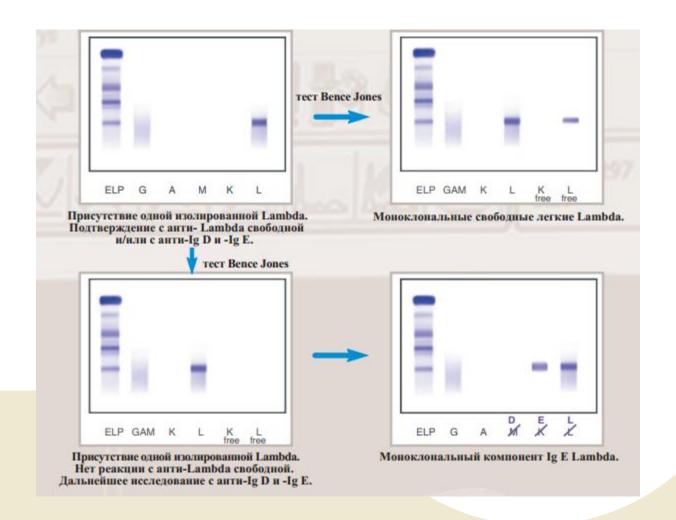
## Британский Форум по миеломе (UKMF) и Исследовательская группа по миеломе скандинавских стран (NMSG):

« Мы подчеркиваем критическую необходимость повышения качества диагностики миеломы и прочих лимфопролиферативных состояний в медицинских учреждениях общего и специализированного профилей и, в первую очередь, потому, что уровень заболеваемости данными видами гаммапатий имеет тенденцию к существенному росту по всему миру.»

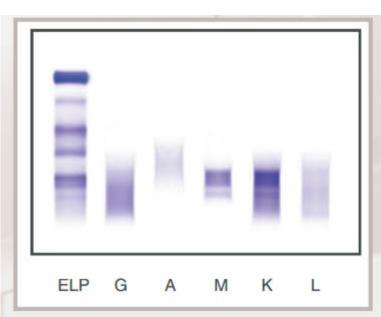


## СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

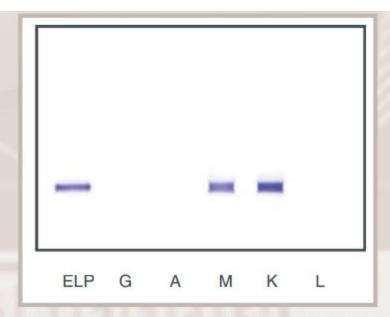








Ig M Карра моноклональный компонент в различных полимеризованных формах. Помутнение сыворотки при 4 °C. возможно наличие криоглобулинов.



После отмывки криоглобулинов с последующей обработкой BME/FLUIDIL: Ig M Карра криоглобулин (тип 1).

