

HEVYLITE™ – CO NOVÉHO Z HLEDISKA POTENCIONÁLNÍHO PŘÍNOSU PRO KLINICKOU PRAXI ?

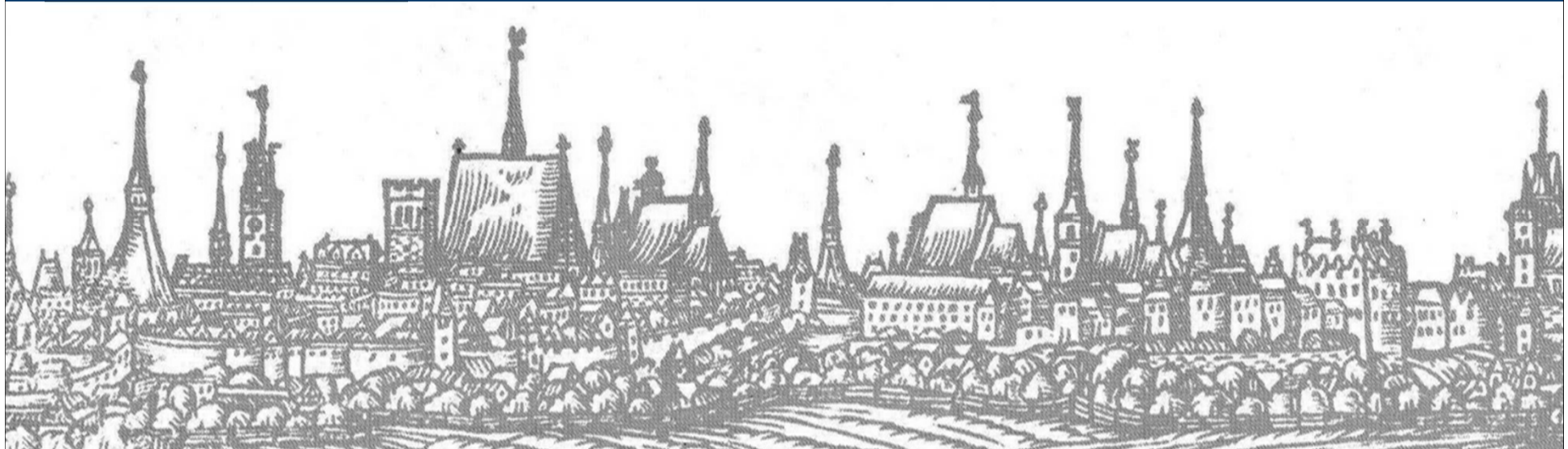
Ščudla V.¹, Pika T.¹, Lochman P.²

¹ III. interní klinika – NRE (Centrum pro diagnostiku a léčbu MG)

² Oddělení klinické biochemie
LF UP a FN Olomouc



Mikulov, 26. - 27. 4. 2013



Hevylite™ – zdrojové informace

■ **Bradwell A.R.**

*Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevylite),
5th Edition, 2008, The Binding Site. Birmingham*

- **Chapter 32 „Analysis of immunoglobulin heavy chain/light chain pairs (Hevylite™)
p. 275-295**

□ **Bradwell A.R.**

*Assessment of Monoclonal gammopathies by
Nephelometric Measurement of Individual
Immunoglobulin κ/λ ratios.*

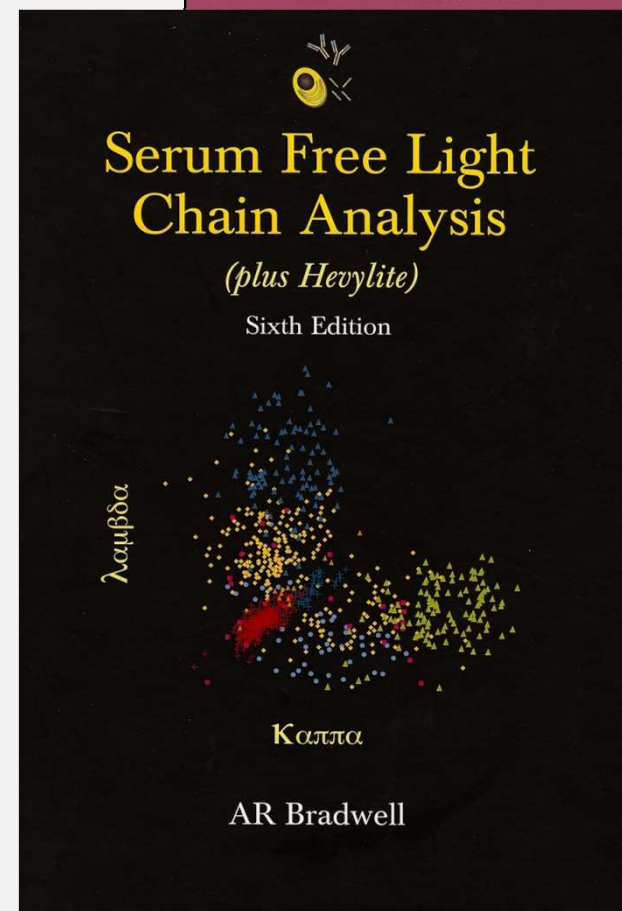
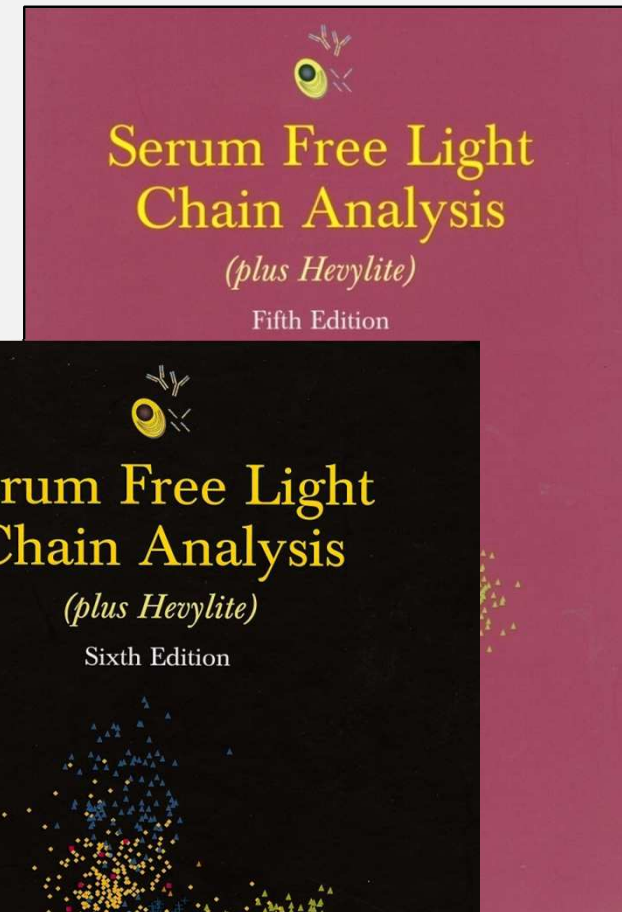
Clin Chemistry 2009; 55(9): 1646-1655

□ **Keren D.F.**

*Heavy/Light – Chain Analysis of Monoclonal
Gammopathies*

Clin Chemistry 2009; 55(9):1606-1608

- **15th EHA**, Barcelona VI/2010 (2 posterů)
- **13th IMW**, Paříž VI/2011 (12 posterů)
- **54th ASH**, Atlanta XII/2012 (6 posterů)
- **14th IMW**, Kyoto VI/2013 (7 posterů)
- **16 publikací „Hevylite“** (2010-2013)



Hevylite™ – východiska metody

❑ **LIMITACE – STANDARDNÍCH ANALYTICKÝCH METOD**

➤ **S-ELFO**

- **Nedostatečná citlivost u nízké koncentrace Mlg (1-3 g/l) – „fenomén překrytí“**
 - **ELFO IgA** - migrační pozice interferuje např. s transferinem, haptoglobinem a C₃
 - **IgM** – sklon k autoagregaci

➤ **IFE** - „zlatý standard“

- **Vysoká citlivost v detekci a určení izotypu M-proteinu, ale bez kvantifikace**

➤ **ANALÝZA sVLŘ – Freelite™** (nefelometrie, turbidimetrie)

- **Zejména velký přínos poměru κ/λ**
 - **kvantitativní hodnocení klonality VLŘ**
 - **zohlednění suprese „netumorózního VLŘ“**
 - **zohlednění variabilního renálního metabolismu a změn krevního objemu**

➤ **CÍL – Hevylite (HLC) → „heavy/light chain“**
⇒ **dosažení podobného analytického přínosu jako u vyšetření VLŘ**

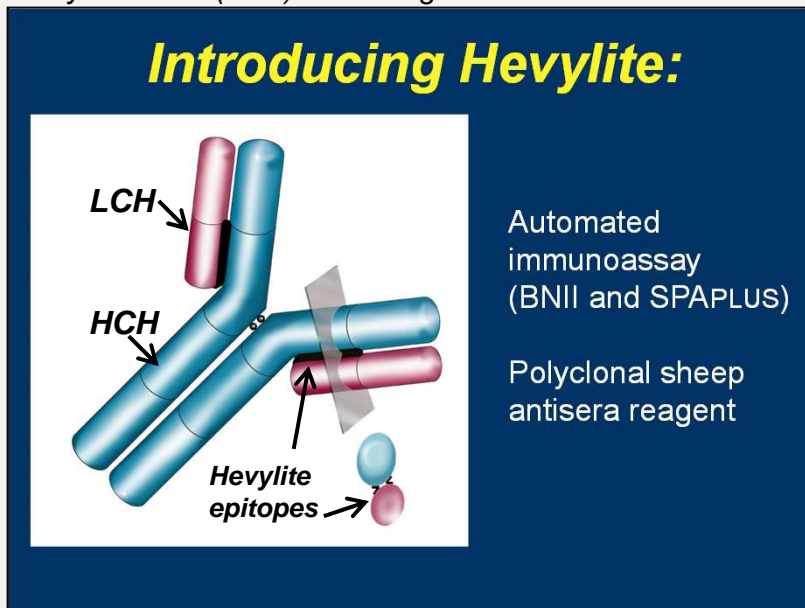
HEVYLITE – příprava HLC polyklonálních protilátek

➤ INTAKTNÍ MOLEKULY IMUNOGLOBULINU

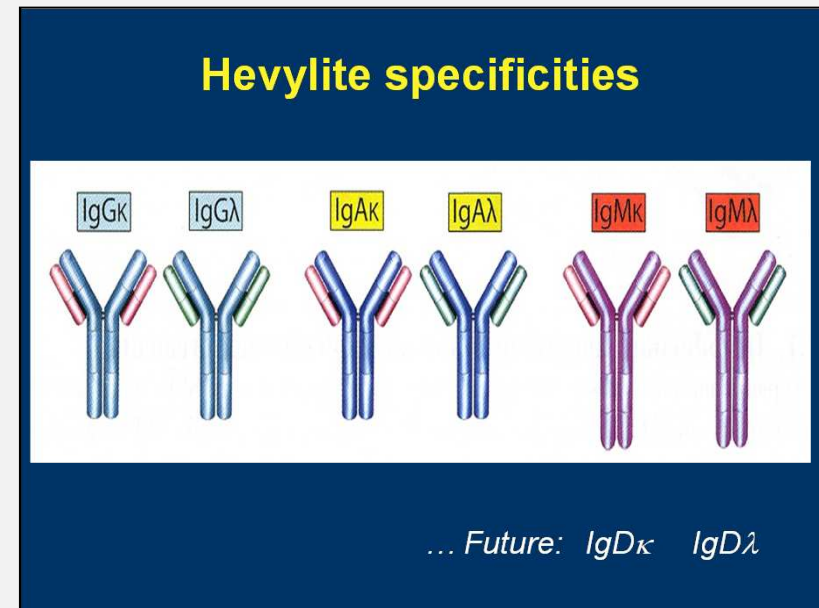
- unikátní junkční epitopy mezi konstantními doménami „LCH a HCH“
- tyto junkční epitopy jsou terčem Hevylite (HLC) protilátek ⇒ separátní identifikace rozdílných typů LŘ jednotlivých tříd Ig: IgG-κ a IgG-λ, IgA-κ a IgA-λ, IgM-κ a IgM-λ
- hodnocení „v párech“, např. IgG-κ/IgG-λ s určením poměru hladiny „postižených/nepostižených Ig“

Terčové epitopy (černé) pro Hevylite protilátky jsou v konstantních oblastech (CH1 a CL) mezi těžkými (HCH) a lehkými řetězci (LCH) molekul Ig.

„Heavy/light chain“ páry molekul IgG, IgA a IgM s černě vyznačenými terčovými epitopy pro Hevylite immunoesej.



Bradwell, R. A., 2008
Hobbs, J., 2009



Bradwell, R. A., 2008
Hobbs, J., 2009

HEVYLITE – příprava HLC antisér

□ ZAJIŠTĚNÍ SPECIFICITY HLC imunoeseje

- „ovčí“ polyklonální protilátka - vyloučení zkřížené reaktivity (imunizační, adsorpční a purifikační techniky)
- 6 vysoce specifických a silně reaktivních homogenních IgG, IgA a IgM/HLC antisér, vhodných pro nefelometrii a turbidimetrii
- rozpoznání různých lehkých řetězců v každé třídě Ig

□ NORMÁLNÍ HODNOTY HLC imunoglobulinů a HLC poměru

- Koncentrace intaktního Ig a jejich HLC κ a λ „subsetů“ je udržována v úzkém rozmezí

IMUNOGLOBULIN	x	(rozmezí)
IgG κ (mg/L)	7231	(3608 – 11655)
IgG λ	4203	(2023 – 9158)
IgG κ/λ poměr	1.8	(1.15 – 2.70)
IgA κ (mg/L)	1280	(300 – 2440)
IgA λ	936	(312 – 2300)
IgA κ/λ poměr	1.47	(0.479 – 3.26)
IgM κ	837.6	(267 – 1960)
IgM λ	563.5	(185 – 1320)
IgM κ/λ poměr	1.6	(0.71 – 2.61)

* nutné další studie k upřesnění HLC rozmezí

Bradwell, R. A., 2008

Hevylite™ – klinický přínos u MG

- ❑ **HLC (Hevylite TM) – nejpřesnější kvantifikace Mlg** (lépe než konvenční SPE)
 - vysoká senzitivita v detekci IgA-MG (95.6%, SPE pouze 50%)
 - srovnatelnost s IFE u IgG, IgA a IgM
(u 3/68 pac. negativita HLC/pozitivita IFE)
 - IFE-stále „zlatý standard“ v detekci Mlg (+IgD, IgE, biklonální MG)
 - HLC ale kvantitativní výsledky i při nízké hodnotě Mlg, resp. při pouze IFE pozitivě!

- ❑ **HLCr – poměr HLC K/L** (detekce monoklonality i při nízkém Mlg)
 - poměr výše produkce dominantního, nádorového Mlg/stupně suprese nenádorového, polyklonálního Ig („imunoparéza“)
 - oproti SPE není zkreslení: změna objemu krve, HMK a variabilita metabolismu Mlg

- ❑ **V ČR** – standardizace, mezilaboratorní unifikace (analyzátor SPA Plus)

- ❑ **HCL (Hevylite™)**
– nenahrazuje IFE, jde o vysoce senzitivní technika, vzájemná komplementarita

Hevylite™ – klinický význam v diagnostice MM

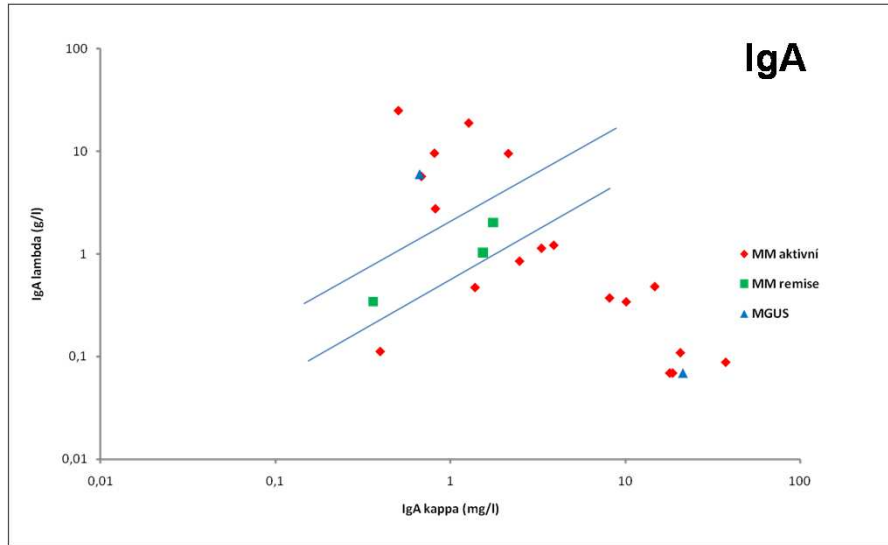
□ MM – abnormální koncentrace HLC-K, HLC-L a abnormální poměr HLCr (dg. 100% ev. 98%)

- nový spolehlivý parametr pro Dg. a monitorování především oligosekrečního typu MM (Mlg ≤ 10 g/) a s velmi nízkou hodnotou Mlg
- u HLC - IgG prokázán vztah: Hb, sFLC, BMPC (%)
- u HLCr - IgG prokázán vztah:
 - k rozsahu nádorové masy (Hb, sFLC, BPPC (%) a B_2M)
 - k aktivitě MM
- HLCr - citlivější nežli SEP, nikoliv ale IFE

- Hodnoty HLC a HLCr korelují s koncentrací Mlg vzhledem k odlišné kinetice lépe než FLC

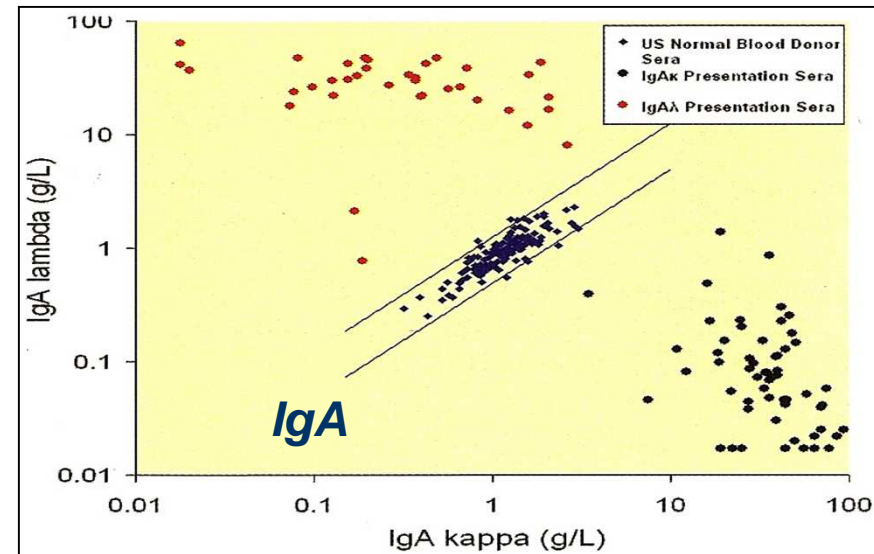
Hevylite™ – prvotní klinické zkušenosti

MM



T. Pika, Olomouc, 2010

IgA Hevylite vyšetření v souboru 25 MG třídy IgA



Avet-Loiseau, H, 2010

IgA Hevylite vyšetření v souboru 146 normálních sér a 94 nemocných s MM třídy IgA vyšetřených při diagnóze 60 IgA-K (černá) a 34 IgA-λ (červená)

Hevylite™ – klinický význam pro monitorování léčby MM

□ MM terapie

- **Poměr HLC K/L (HLCr)** – dynamická informace o míře selektivního zániku *My-bb.* vs. *netumorózních bb.* – vyhodnocení stupně selektivního zničení nádorových *bb.* → tedy efektivity léčby

□ LÉČEBNÁ ODEZVA

- **Normalizace HLCr ve 44%** (*sCR, CR, nCR*)
- **Persistence patol. HLCr** → **nedosažení CR** (*rezistence k terapii*) přes *neg. SEP* a *IFE* a *normální FLC index K/L*
- **Nepostradatelná technika k hodnocení hloubky CR** při *neg. SPE* a *IFE*
- **MRD** – HLCr je citlivější nežli *SEP, FLC, HLC*, u *IFE* rozporné nálezy (?)
- **Po terapii/ASCT je nejcitlivější M-FC (100%), IFE (80%), HLC (70%)**
- **HLCr hodnota – vztah k TTT a PFS:** lépe než *B₂-M*, *albumin* a nežli *FISH* (del 13, t 4;14, del 17p13(p53)?)

□ MONITOROVÁNÍ HLCr

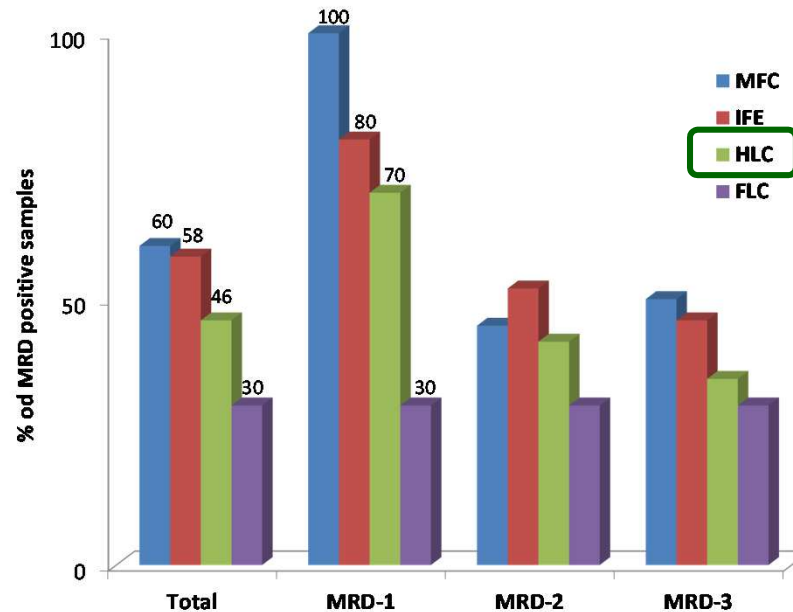
- **Konverze norm. na patol. – časná detekce „evolving“ relapsu,** dříve nežli *IFE* a *SEP*
- **Při pozitivě IFE – kvantitativní vyhodnocení změny Mlg** (*funkční aktivity Pb v KD*)

□ CAVE

- **ojedinele HLCr normální u pozitivy IFE, nCR a VGPR!** (*nízký Mlg/vysoký Plg?*)

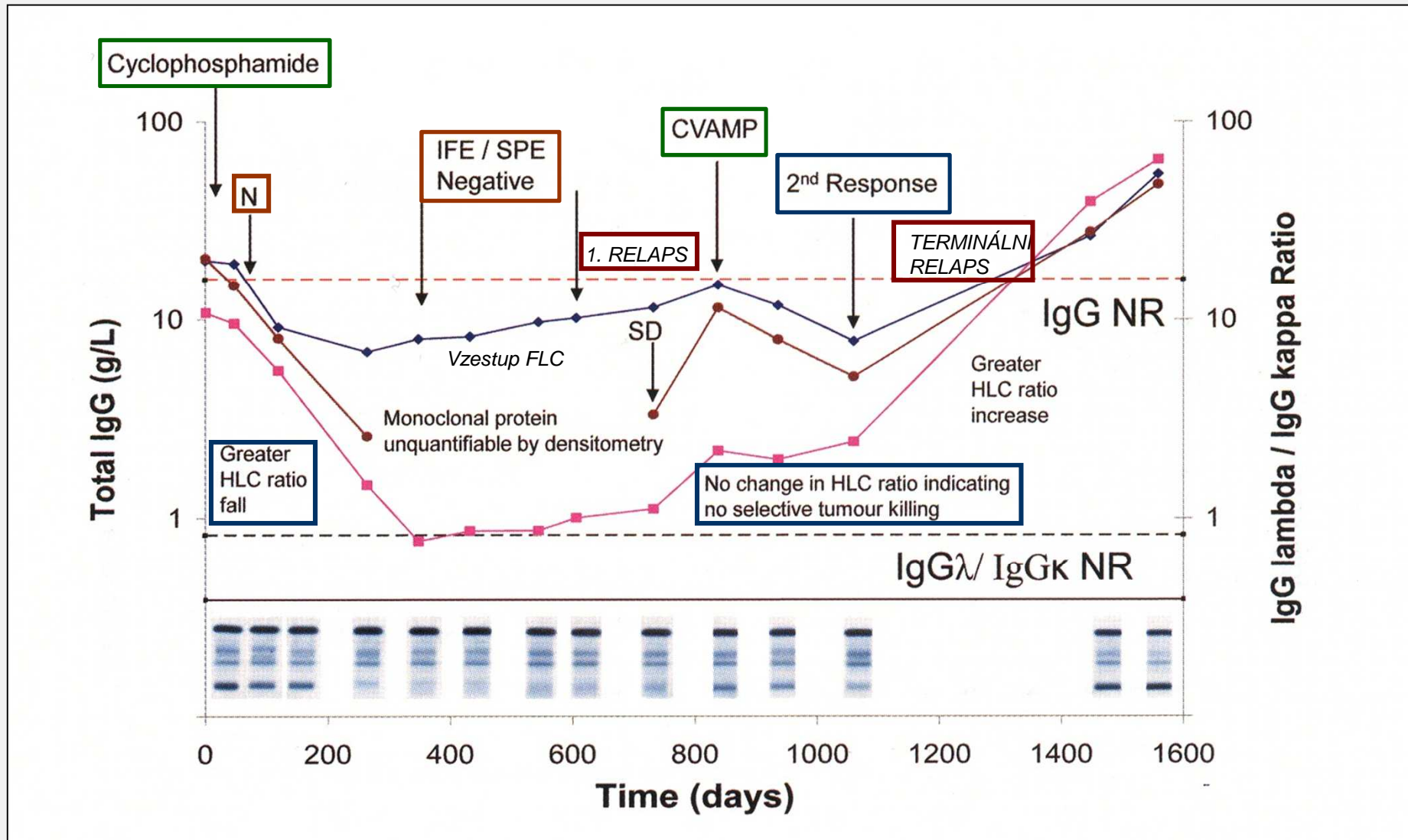
□ **HLC – POTENCIÁLNĚ NOVÝ PŘÍSTUP PŘI HODNOCENÍ MRD**

- 27 pac s MM: před ATKB (MRD-1), po ATKB (MRD-2) a po konz. terapii (MRD-3)
 - MFC (6-barevná) vs IFE vs HLC vs FLC



- **MFC a IFE** – obdobná senzitivita u 50 intaktních (před léčbou) vzorků MM (60 vs 58%) → HLC a FLC abnorm. u 46 a 30%
- **MFC u MRD před ATKB (MRD-1)** → nejcitlivější MFC a IFE (100 vs 80%), pak HLC (70%) – nikoliv ale u MRD-2 a MRD-3
- ❖ Existuje určitá globální komparabilita u různých stupňů MRD (MRD-1 až MRD-3)

MM – IgGλ – monitorování průběhu nemoci s pomocí Hevylite poměru
 (IgG-λ / IgG-κ, S-ELFO a „scanning denzitometrie“ IgG a nefelometrie, NR – normální rozmezí)

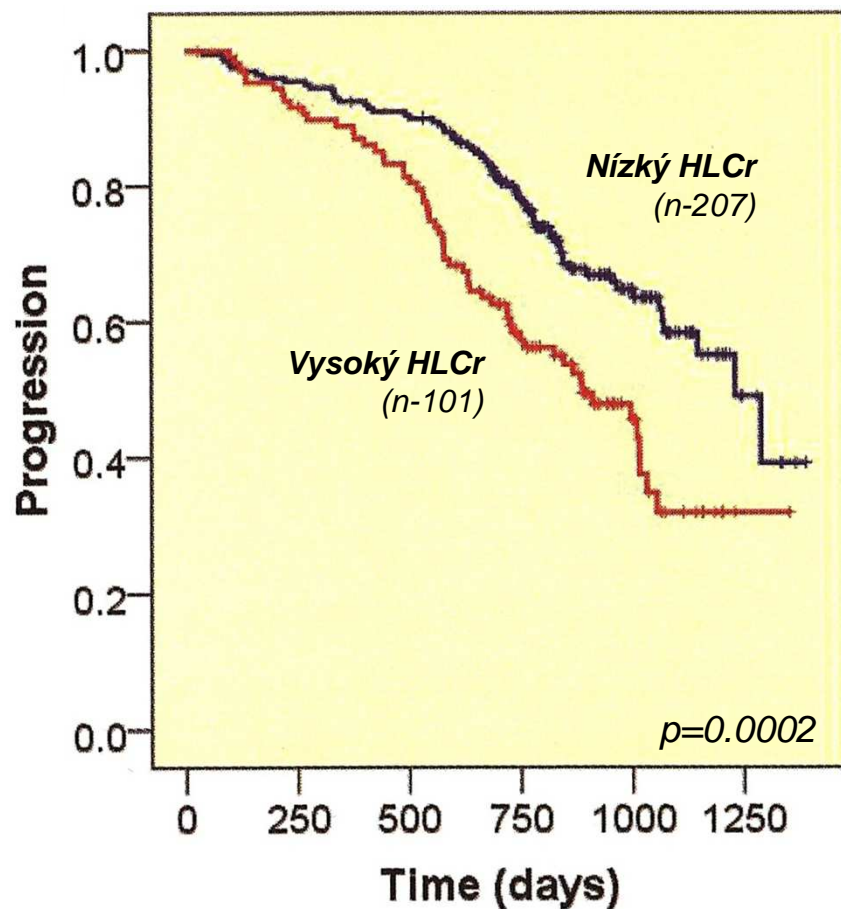


Hevylite™ – prognostický význam u MM

□ HLCr u MM

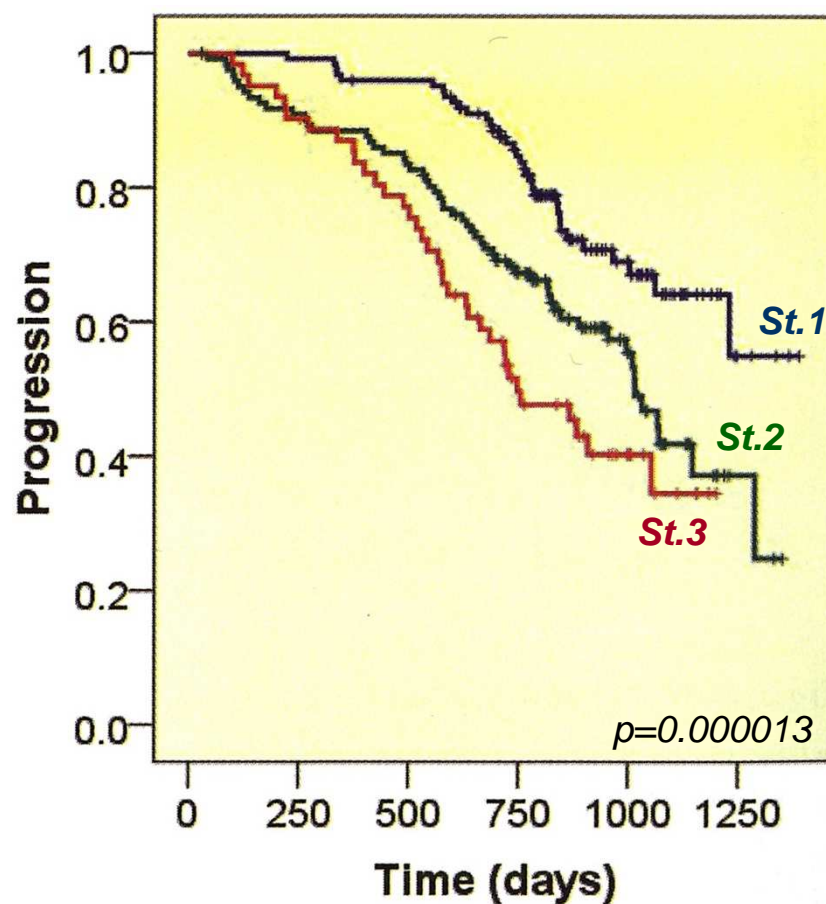
- **Vysoce patol. HLCr před. a po terapii je nezávislý PF s významným vztahem k OS**
 - významnější nežli výše M-proteinu v důsledku „imunoparézy“ po terapii
- **Normalizace HLCr má vyšší prediktivní hodnotu, nežli úprava S-FLC**
 - ale současná normalizace HLCr + FLCi je silnější PF nežli dosažení sCR a CR
- **HLCr a B₂M - vzájemně nezávislé PF u MM** (*nikoliv LDH, albumin*)
- **V případě ISS zvyšuje inkorporace HLC jeho prognostický potenciál** (stratifikaci rizika)
- **HLCr + B₂M: nový 3-stupňový (0, 1, 2) stratifikační model klin. rizika, významnější než ISS:** - 50% OS: 131, 53 a 29(m)

MM – PFS v souboru 308 pacientů dle HLCr při diagnóze



Avet-Loiseau, H, 2010

HLCr (dolní tercil) modrá křivka (n-207)
HLCr (horní tercil) červená křivka (n-101)
Vysoký HLCr poměr se vyznačoval kratším PFS



Avet-Loiseau, H, 2010

St.1 – $\beta_2M < 3.5 + HLCr < 0.01$ (modrá)
St.2 – $\beta_2M > 3.5$ nebo $HLCr > 200$ (zelená)
St.3 – $\beta_2M > 3.5 + HLCr > 200$ (červená)

Hevylite™ – klinický význam u MGUS

□ MGUS

- **Abnormální HLCr zjištěn v 66%: IgA-97%, IgM- 90%, IgG- 56%**
 - patol. HLCr především při vyšší hodnotě monokl. IgG
- **V případě dg. MGUS dle IFE, 16% neg. HLCr**
- **Záchyt suprese HLC- alternativního/polykl. Ig („imunoparéza“)**
u 27% MGUS

□ Významné rizikové faktory maligní transformace MGUS

- **IMWG – počet „rizikových faktorů“:** výše Mlg, non-IgG typ, patol. FLC index

- **NOVĚ: selektivní suprese HLC altern./polykl. Ig je nezávislým prediktorem transformace MGUS (IgG typu) v MM**
 - začlenění suprese syntézy polyklon. IgG maligním PC klonem zvyšuje citlivost dosavadního IMWG stratifikačního modelu

- **Stupeň suprese HLC altern. páru Ig koreluje se stádiem IMWG „rizika“ MGUS:** nejvyšší výskyt patol. HLCr ve stadiu „high risk“ oproti „low a low-interm. risk“

Hevylite™ – význam u Waldenströmovy makroglobulinémie

□ IgM HLC

- Vhodná metoda ke kvantifikaci IgM Mlg (v budoucnu náhrada SEP)?
- Vyšší hodnota HLCr u „high risk“ IPSS nežli v „intermediate“ a „low risk“ skupině
- Medián IgM HLCr vyšší:
 - v progresivní/symptomatické fázi vs. fázi asymptomatické
 - ve fázi vyžadující nežli nevyžadující terapii

□ IgM HLCr

- Vztah k TTT a k BMPC (%)
- Prognostický 3-stupňový stratifikační model pro OS:
 - IgM HLCr, B₂M a LDH - vyčlenění „high risk“ MW

□ PŘEDBĚŽNĚ:

- Marker léčebné odezvy a monitorování progresu MW

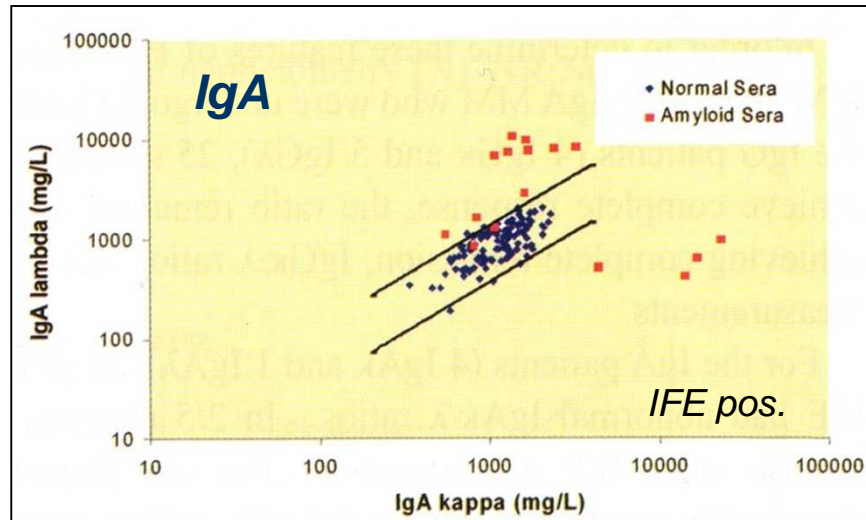
Hevylite™ – klinický význam u AL systémové amyloidózy

□ AL systémová amyloidóza

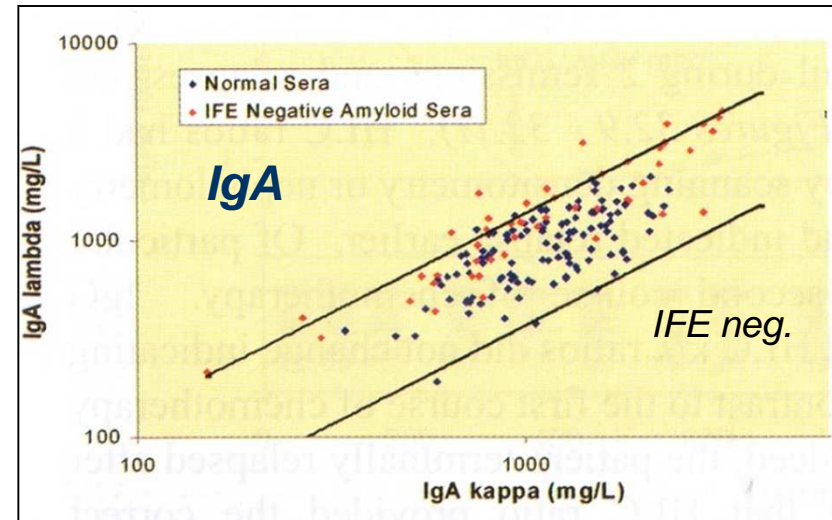
- **HLCr abnormální v 61%** (FLC pouze ve 32%)
- **Při izolované pozitivě IFE - abnormální HLCr v 87%**
- **Při negativě IFE**
 - **abnormální HLC u IgA - 26%, IgG -20% a IgM -2%**
- **Monitorování léčebné odezvy u normální/lehce abnormální hodnotě FLC**
- **Kombinace vyšetření HLCr a FLCr poskytuje významnou prognostickou informaci → excelentní vztah k OS**
 - *v případě normálních FLC je abnormální HLCr nepříznivý PF*

- **Analýza HLC/ HLCr doplňuje v algoritmu AL dg. testů použití IFE (IFE + FLC + U-elfo) – obdobná citlivost, kvantita výsl.**

AL – AMYLOIDÓZA



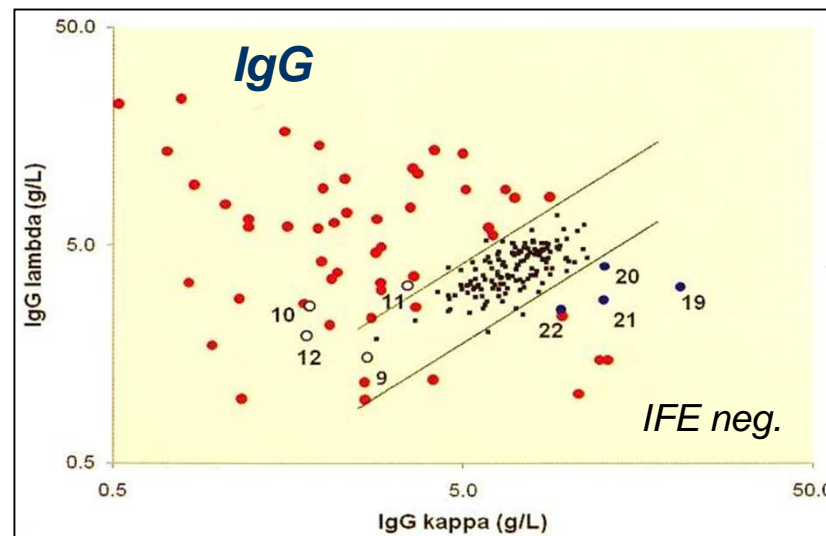
Bradwell, R. A., 2008



Bradwell, R. A., 2008

IgA Hevylite vyšetření v souboru 118 normálních sér a 16 nemocných s AL-amyloidózou, s přítomností IgA Mlg – 14/16 (87%) mělo abnormální hodnoty

IgA Hevylite koncentrace u AL-amyloidózy s chybějící detekcí Mlg s pomocí IFE



Wachalekar, A, 2010

IgG-K vs IgG-λ u AL-amyloidózy
v souboru 146 dárců krve (černá) a 58 pac. s IgG AL-amyloidózou
SPE pozitivita – červené body, kroužky SPE negativita. Pouze IgG-K/IgG-λ poměr (modré body)

Hevylite™ – závěr (1)

□ HLC resp. HLCr (Hevylite™)

- Dostupná, rychlá, přesná a unikátní technika
- Citlivější než SEP, Freelite™
→ doplněk IFE s velmi přesnou kvantifikací HLC-K/L
- HLCr - koriguje variabilitu katabol. poločasu Mlg, změny HTK a plazm. objemu
- HLCr - poměr nádorového Mlg/nenádorového Ig, tj. výše nádor./nenádor. klonu

□ MM – HLCr

- Spolehlivý parametr v Dg. a monitorování oligosekreční formy s velmi nízkým Mlg
- Hodnocení aktivity, hloubky léčebné odezvy (*CR a MRD*), včasné i progrese/relapsu
- Nezávislý PF (*silnější nežli FLC*), vztah k OS
- Potenciální přínos pro prognostickou stratifikaci MM (*„Low risk“ MM - nízký Mlg+norm.HLCr a FLCi*)

Hevylite™ – závěr (2)

□ MGUS – HLCr

- rozšíření IMWG kritérií „rizika“ maligní transformace o HLCr
- „High risk“ MGUS – suprese „nenádorového / polyklonálního“ Ig („imunoparéza“)
→ nezávislý rizikový faktor maligní transformace MGUS (*projev pokročilejší klonality*)

□ MW – HLCr

- „high risk“ MW, marker léčebné odezvy a progresu

□ AL systémová amyloidóza – HLCr

- u části nemocných odhalení Mlg i při negativitě IFE a normální hodnotě FLC
- abnorm. HLCr + FLC – vztak k OS

Hevylite™ – závěr (3)

□ **HLC a HLCr**

- *reálné obohacení dosavadního armamentaria standardních testů u MG, vedoucí k dalšímu zvýšení úrovně diagnostiky v této skupině nemocných*

□ **Hevylite™**

- *potenciál perspektivního doplnění („zlatého standardu“?) klasických metod analýzy Mlg/Plg a efektivity vedení nemocných v éře rychle se rozvíjející a stále účinnější moderní terapie (?)*

- *Pro další validaci a zhodnocení reálného přínosu vyšetřování párů HLC a HLCr jsou nezbytné další poznatky, jež vyplynou z prospektivních randomizovaných studií a v rámci získání vlastních praktických zkušeností.*

Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií

Ščudla V., Pika T., Heřmanová Z.

Klin. Biochem. Metab., 18 (39), 2010, No. 2, p. 62-68

Stanovení volných lehkých řetězců a Hevylite™ u monoklonálních gamapatií

Vávrová J., Tichý M., et al.

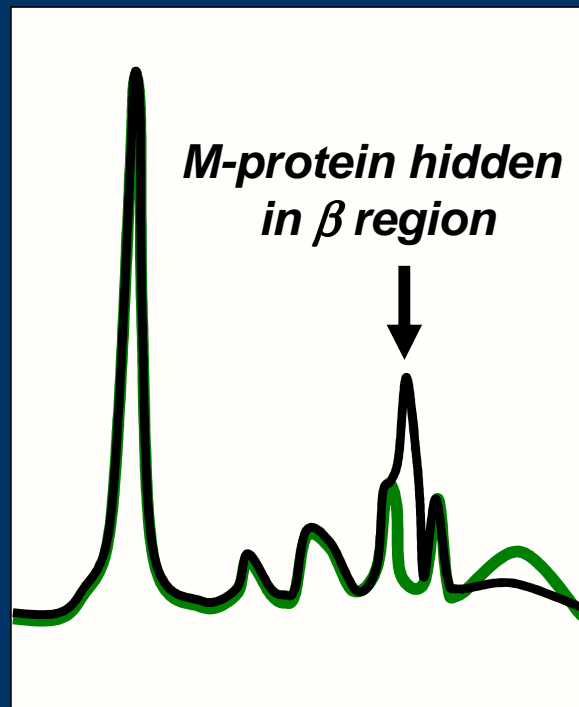
In: Maisnar V., Tichý M. a kol. – Monoklonální imunoglobuliny – výskyt, význam a možnosti jejich průkazu.

Nucleus. HK, 2012, s.55-60



Děkuji za pozornost

Hevylite allows identification, quantitation and typing of M-proteins



Hevylite

IgA κ = 5000 mg/L

IgA λ = 20 mg/L

IgA κ/λ = 250

Normal sera
MM patient

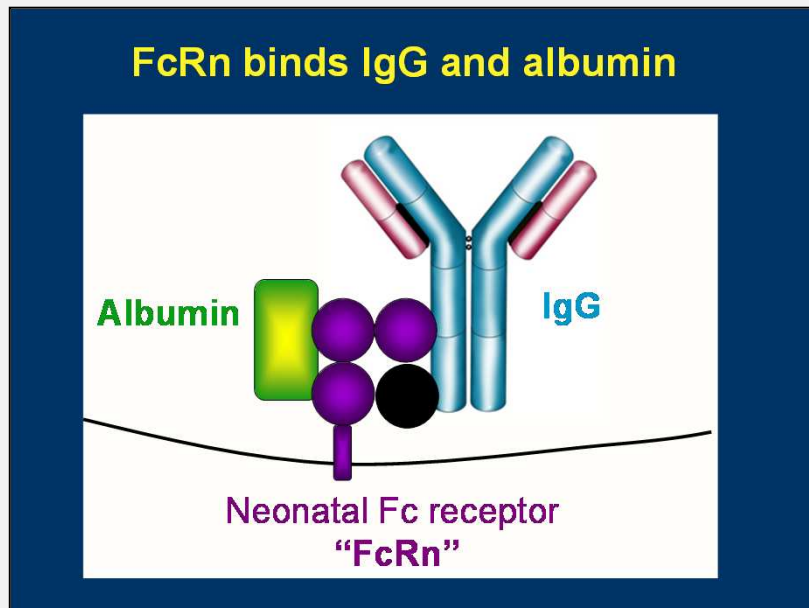
MG – závislost výše S-MIG třídy IgG (event. IgA) na stupni degradace

❑ NEONATÁLNÍ Fc receptory pro IgG (FcRn)

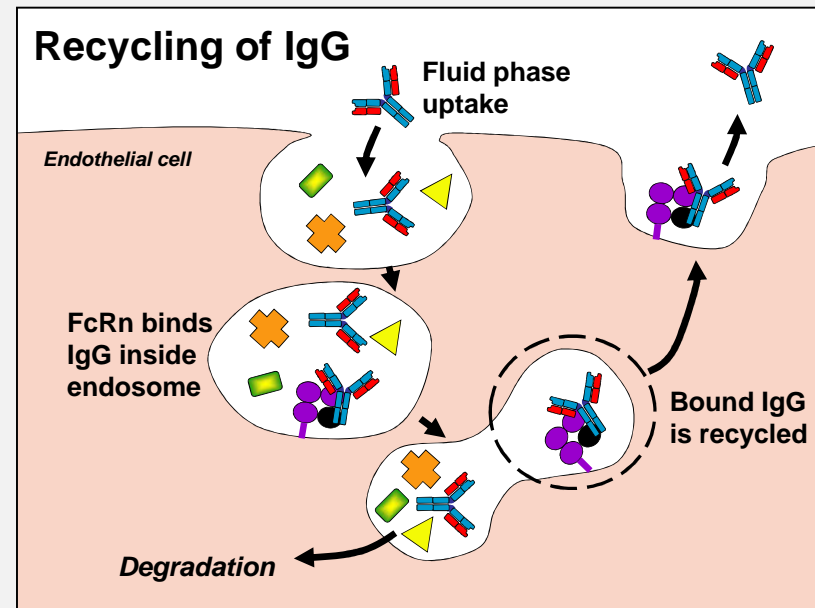
- **FcRn** – se váží na albumin a IgG imunoglobulin
- **Při vysoké koncentraci IgG v séru jsou FcRn plně saturovány**
⇒ rychlá degradace nevázaného/volného IgG → ↓ katabol. poločas (~ 3 dny)
⇒ recyklace IgG vázaného na FcRn
- **Normální koncentrace IgG** → katabol. poločas ~ 21 dnů

❖ MONITOROVÁNÍ MM dle výšky S-M-komponenty neodráží adekvátně změnu produkce Mlg nádorovou tkání

- **Hladina S-Mlg není dobrým PF u MM**



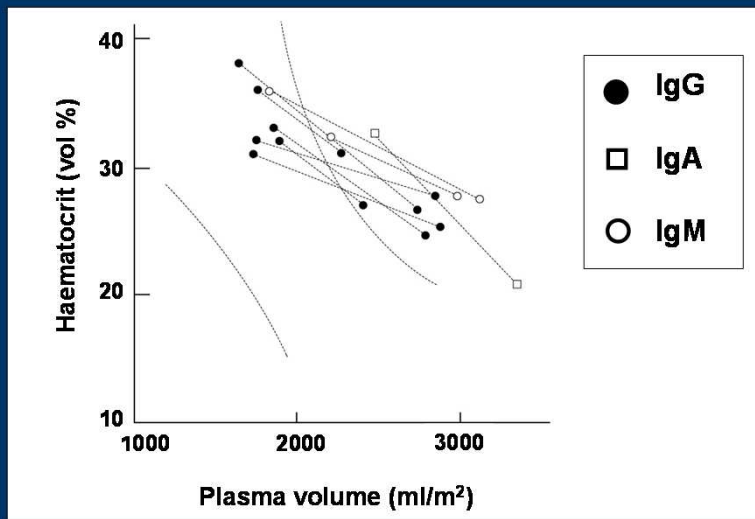
Bradwell, R. A., 2008
Hobbs, J., 2009



Bradwell, R. A., 2008
Hobbs, J., 2009

MG – závislost výše Mlg na hodnotě hematokritu, objemu plazmy a rychlosti katabolismu MIG

Relationship of monoclonal Ig' changes to plasma volume and haematocrit

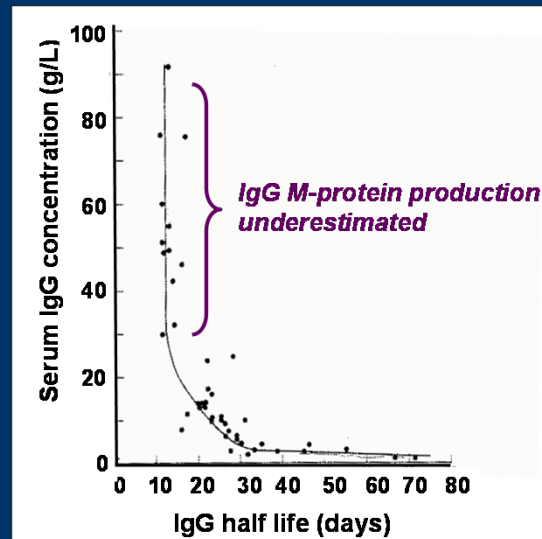


Alexanian et al. *Blood* 1977 49: 301-307

Hobbs, J., 2009

- **Kolísání S-MIG ~ o 30 – 50%**
 - neodráží věrně změnu nádorové masy

Concentration-dependent catabolism of IgG



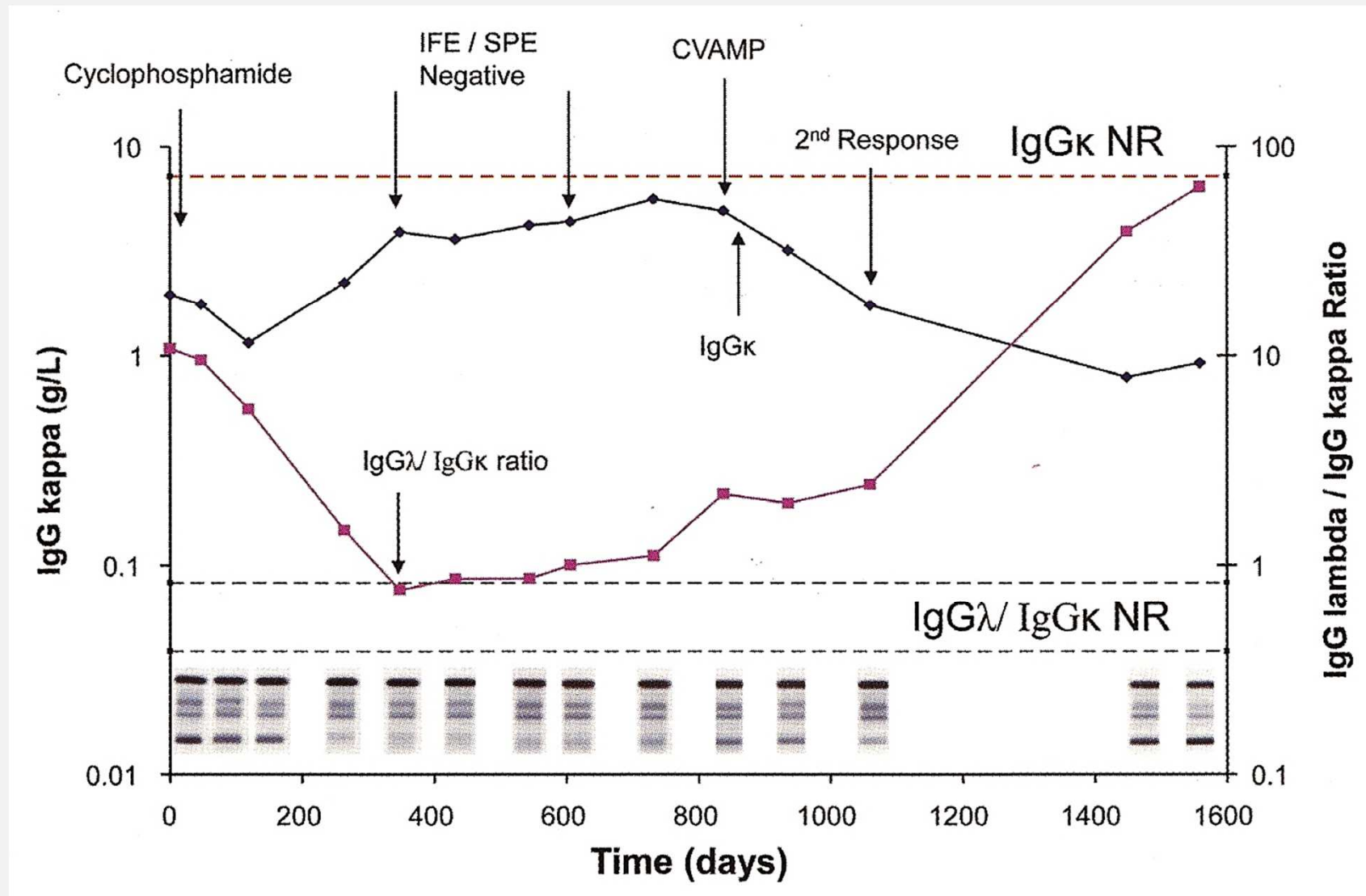
Hevylite ratio corrects for this

Waldmann and Strober
Prog Allergy 1969; 13: 1-110

Hobbs, J., 2009

- **Katabolický poločas:**
 - IgG ~ 21 dnů = dny až týdny
 - IgA ~ 6 dnů
 - IgM ~ 5dnů
- ❖ **IgA a IgM tumory jsou proto relativně větší než IgG**

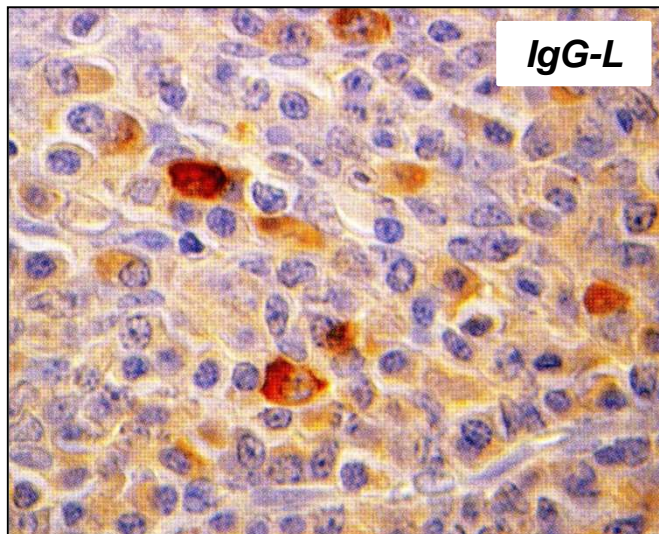
MM – IgGλ – monitorování průběhu nemoci s pomocí Hevylite IgG-κ a poměru IgG-λ / IgG-κ



HEVYLITE – imunohistochemie

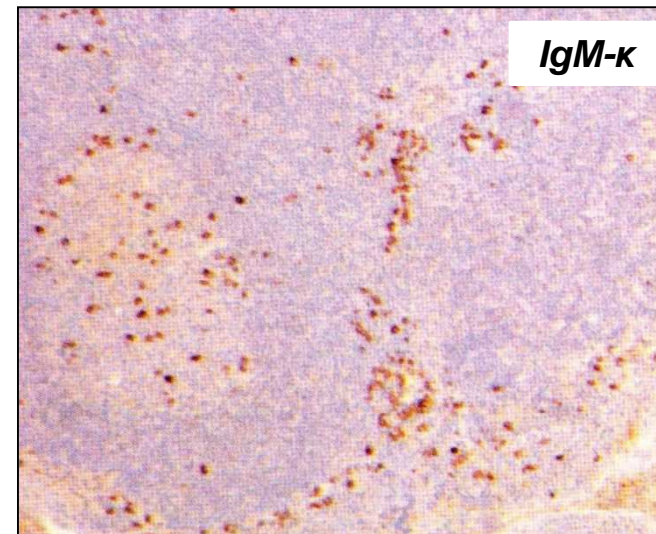
□ **IMUNOHISTOCHEMIE**

- **HLC protilátky** – imunohistochemické hodnocení „subsetů“ LŘ Ig
- **Posouzení klonality** v tkáni LU, KD a dalších tkání, obsahujících B-bb. a Pb
 - **Namísto techniky dvojího barvení lze použít:**
 - **HLC protilátky** označené peroxidázou nebo fluorochromem
 - **Příslib citlivé analýzy klonality** u širokého spektra imunoproliferativních chorob



Bradwell, R. A., 2008

Imunohistochemie lymfatické uzliny barvené s pomocí peroxidázové reakce označené IgG-L Hevylite reagensí



Bradwell, R. A., 2008

Peroxidázové reakce označené IgM-K Hevylite reagensí