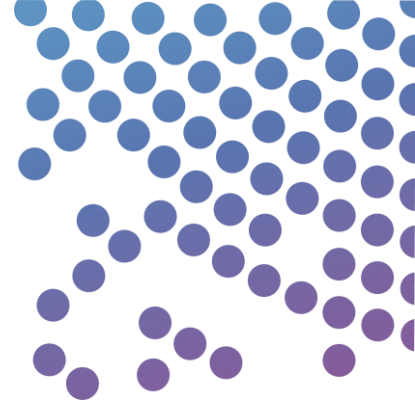




Monitoreo de **DARZALEX** en pacientes
con Mieloma Múltiple con
HYDRASHIFT 2/4 daratumumab

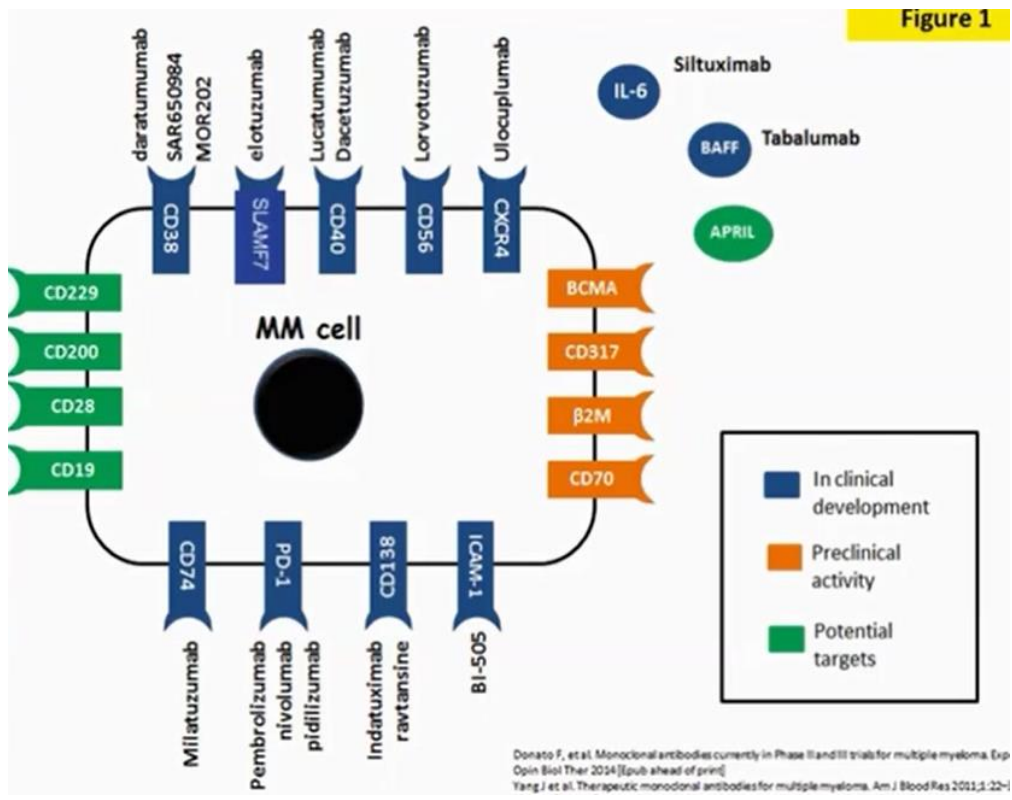


Medicamentos utilizados en el tratamiento de Mieloma Múltiple

Descripción general

IMiDs Thalidomide Lenalidomide Pomalidomide	PIs Bortezomib Carfilzomib Ixazomib Oprozomib	Alkylators/ anthracyclins Melphalan Cyclophosphamide Doxorubicin	Steroids Dexamethasone Prednisone
---	--	--	--

Monoclonal Antibodies

Muchos Anticuerpos Monoclonales están siendo investigados en diferentes etapas.

El más avanzado con aprobación para multi-refractarios en monoterapia o en combinación con otros agentes:

- Daratumumab (Janssen Biotech),
- Elotuzumab (BMS)



DARZALEX™

(daratumumab)

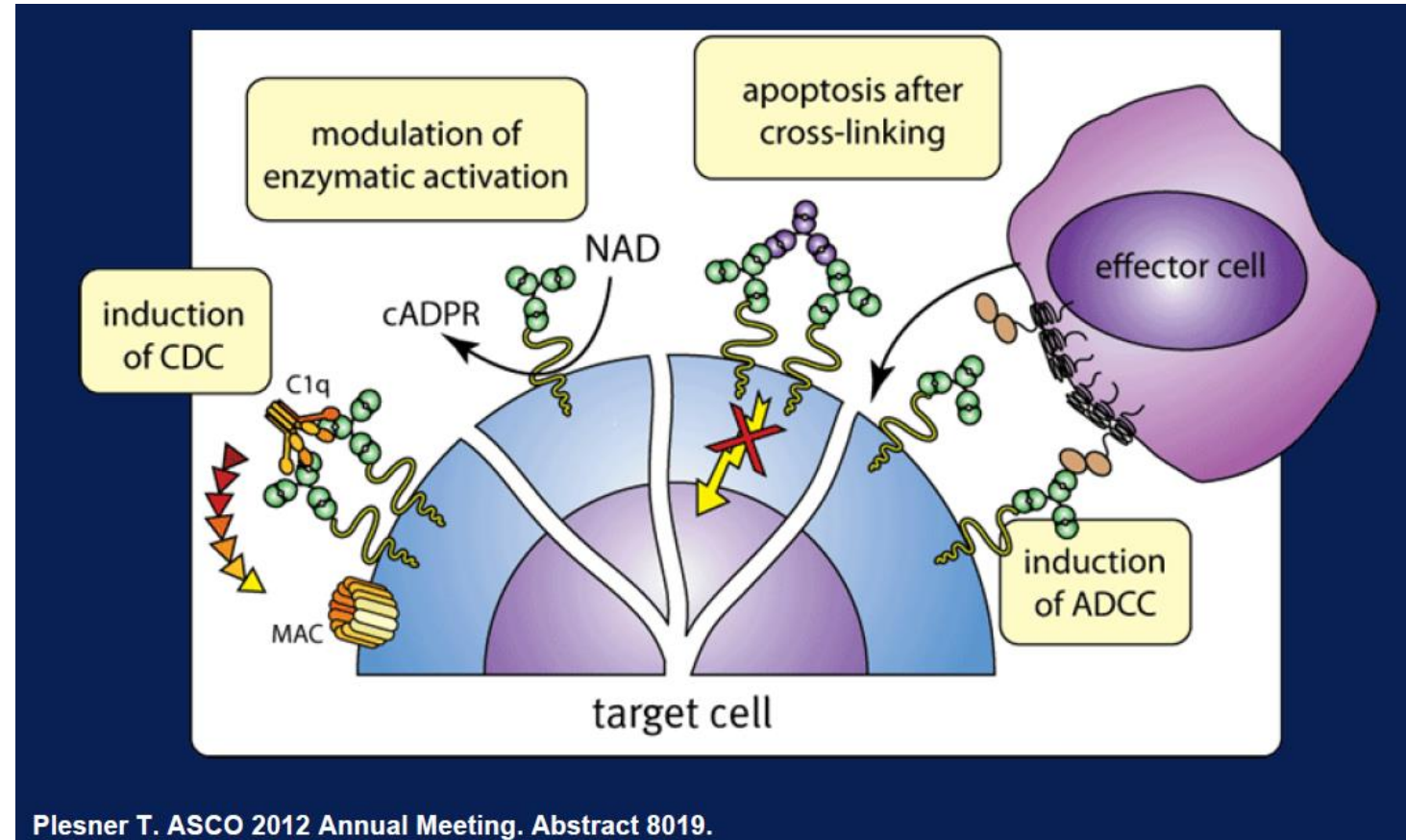
injection for intravenous infusion
100 mg/5 mL, 400 mg/20 mL



sebia

DARATUMUMAB

- Daratumumab (también se conocido como HuMax-CD38 e IgG1-005) es una inmunoglobulina G1 kappa (IgG1 κ) anticuerpo monoclonal humano (mAb) que une específicamente un epítipo único presente en la molécula CD38.
- Daratumumab tiene actividad letal de amplio espectro.



CD38

- Los primeros estudios funcionales mostraron que el CD38 regula los eventos de **adhesión débiles** que tienen lugar entre los **linfocitos circulantes y las células endoteliales, transducción de señales y actividad enzimática.**
- Más notablemente, CD38 se expresa en un gran número de **neoplasias malignas hematológicas.** La expresión se ha observado particularmente en las células malignas del mieloma múltiple (MM) en la macroglobulinemia de Waldenstrom, amiloidosis sistémica primaria, etc.
- CD38 se encuentra prácticamente **todas las células MM** en altos niveles en su superficie celular
- Además de Janssen Biotech, otras dos empresas, Morphosys (Múnich, Alemania) y Sanofi-Aventis (París, Francia), tienen anticuerpos específicos de CD38 en desarrollo clínico.

Expresión de CD38 en enfermedades hematológicas

- Transmembrane glycoprotein and ectoenzyme
- High receptor density on MM cells

CD38 Expressed in Hematological Malignancies

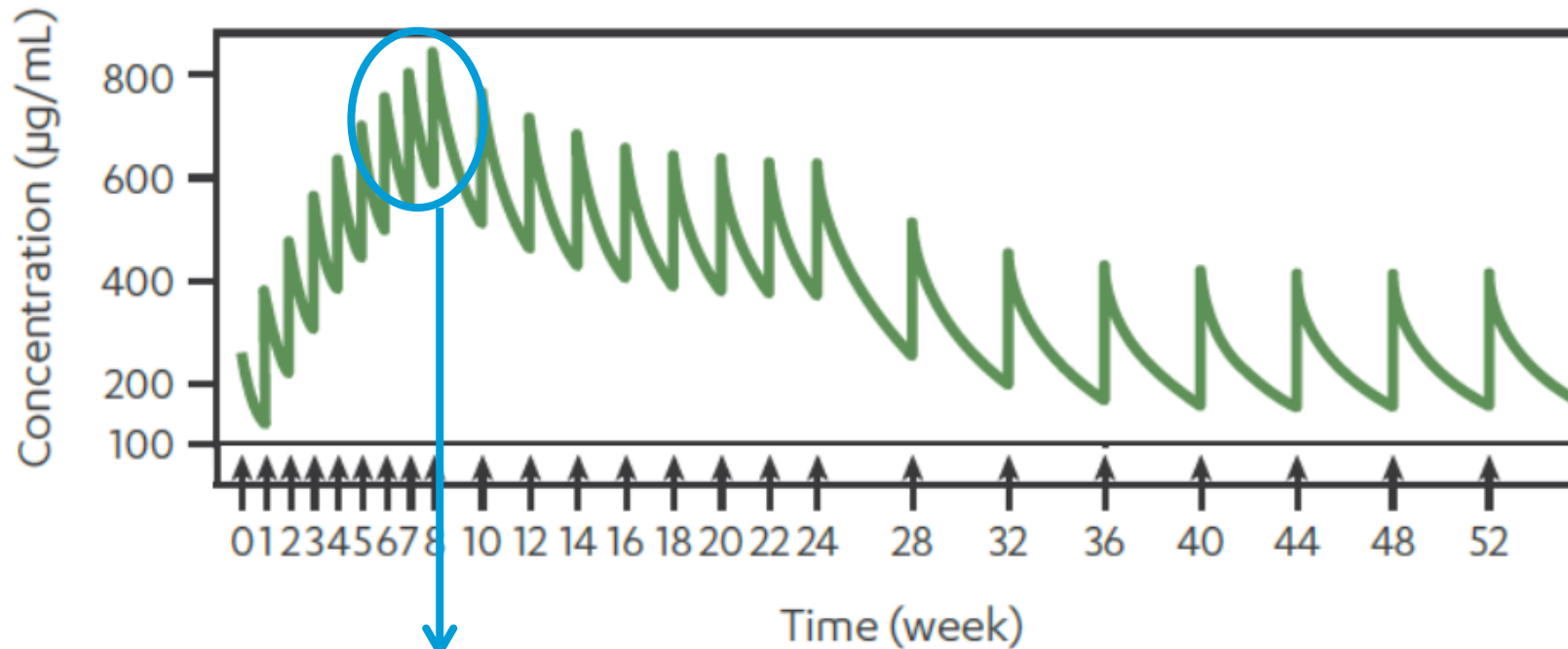
Disease	CD38 + Expression (%)
Multiple myeloma	80-100 ¹
Non-Hodgkin lymphoma	30-80 ^{2,3}
Acute myeloid leukemia	58 ⁴
B chronic lymphocytic leukemia	20-25 ⁵

1. Lin P et al. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:482-488; 2. Angelopoulou MK et al. *Eur J Haematol.* 2002;68:12-21;
3. Schwonzen M et al. *Br J Haematol.* 1993;83:232-239; 4. Keyhani A et al. *Leukemia Res.* 1999;24:153-159;
5. Domingo-Domenech E et al. *Haematologica.* 2002;87:1021-1027.

(daratumumab)
injection for intravenous infusion
100 mg/5 mL, 400 mg/20 mL

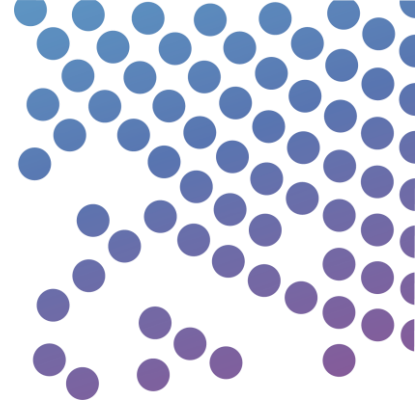
Daratumumab level

Representative PK profile of DARA for the recommended dose and schedule



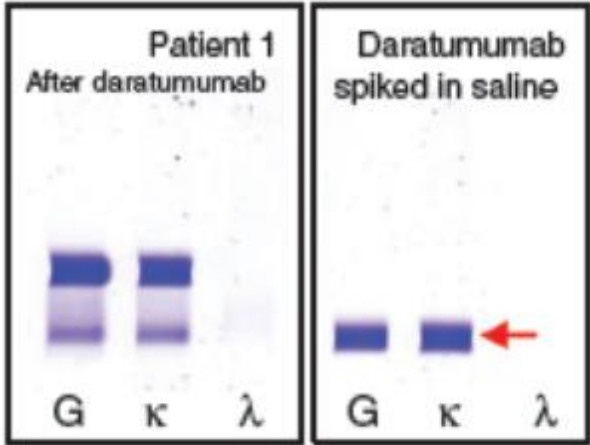
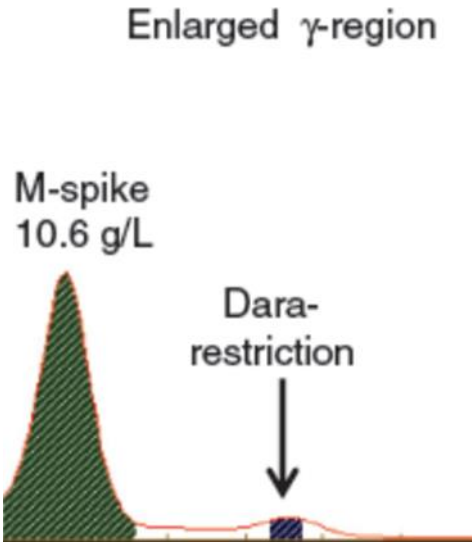
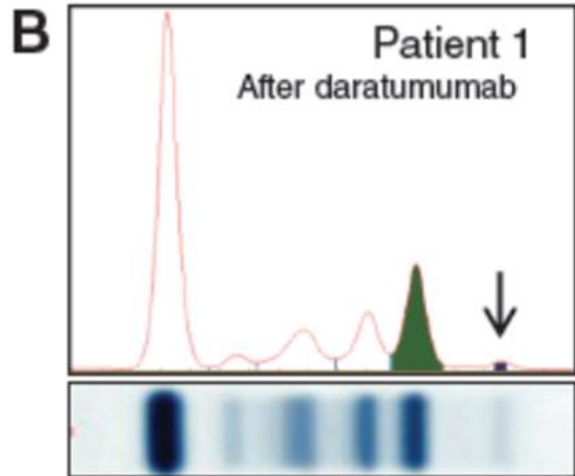
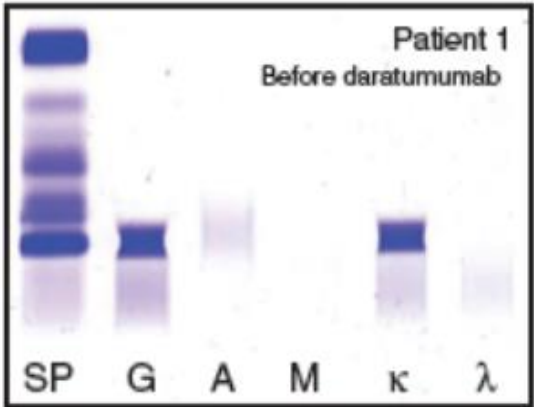
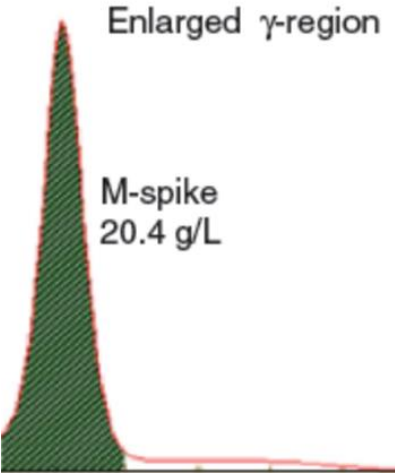
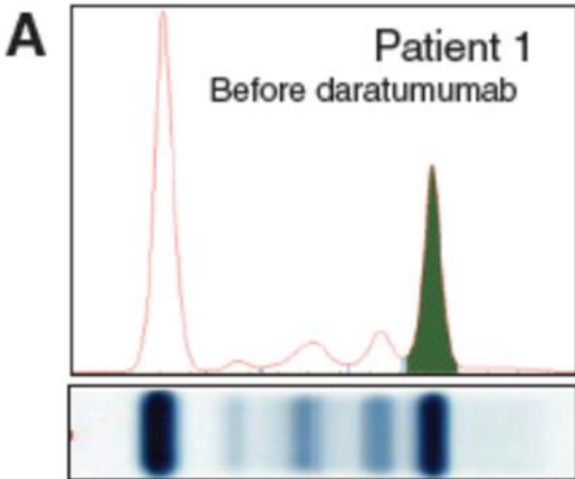
Can reach 1g/L in the blood during treatment





Interferencias de Daratumumab

Interferencia con EPS e IF



Van De Donk Clin Chem Lab Med 2016;54:1105-9

Table 4. 2011 response criteria

Response subcategory	Response criteria
Molecular CR	CR plus negative ASO-PCR, sensitivity 10^{-5}
Immunophenotypic CR	Stringent CR plus Absence of phenotypically aberrant PCs (clonal) in BM with a minimum of 1 million total BM cells analysed by multiparametric flow cytometry (with > 4 colours)
Stringent CR	CR as defined below plus Normal FLC ratio and Absence of clonal PCs by immunohistochemistry or 2- to 4-colour flow cytometry

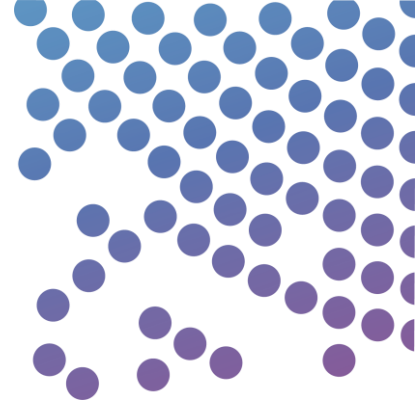
CR
 Negative immunofixation on the serum and urine and
 Disappearance of any soft tissue plasmacytomas and
 $\leq 5\%$ PCs in BM

VGPR
 Serum and urine M protein detectable by immunofixation but not on electrophoresis or $\geq 90\%$ reduction in serum M protein
 plus urine M protein level < 100 mg per 24 h

	<p>If serum and urine M protein are unmeasurable, and serum-free light assay is also unmeasurable, $\geq 50\%$ reduction in PCs is required in place of M protein, provided baseline BM PC percentage was $\geq 30\%$</p> <p>In addition to the above listed criteria, if present at baseline, a $\geq 50\%$ reduction in the size of soft tissue plasmacytomas is also required</p>
Progressive disease	<p>Increase of 25% from lowest confirmed response value in one of the following criteria:</p> <p>Serum M protein (absolute increase must be ≥ 0.5 g/dL)</p> <p>Serum M protein increase ≥ 1 g/dL, if the lowest M component was ≥ 5 g/dL</p> <p>Urine M protein (absolute increase must be ≥ 200 mg/24 h)</p>

ASO-PCR, allele-specific polymerase chain reaction; BM, bone marrow; CR, complete response; FLC, free light chain; M protein, monoclonal protein; PCs, plasma cells; PR, partial response; VGPR, very good partial response.

Adapted from [9] with permission of the American Society of Hematology; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

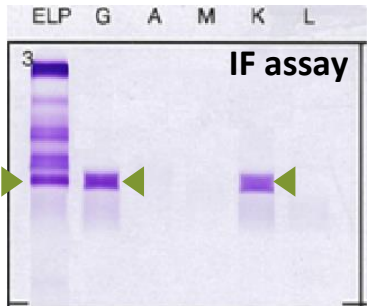




Paul K.

DATE OF BIRTH	02-09-1955
SERUM PEAK/ Pathology	IgG Kappa (K) Multiple Myeloma ◀
URINE PEAK	Free Light Chain K

Screening



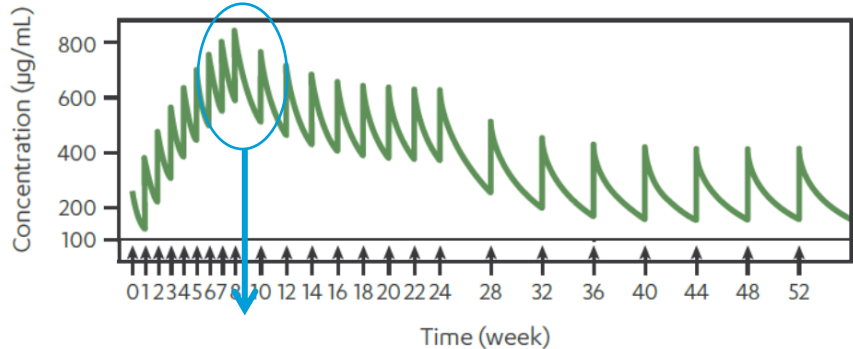
Paul's monoclonal IgG Kappa

Daratumumab therapy (16mg/Kg)

Sample 1

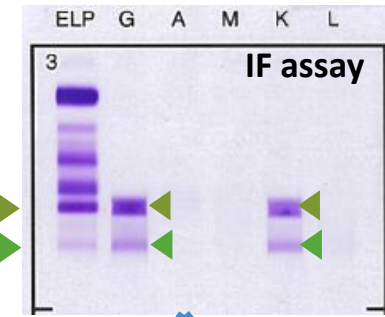
Daratumumab level

Representative PK profile of DARA for the recommended dose and schedule

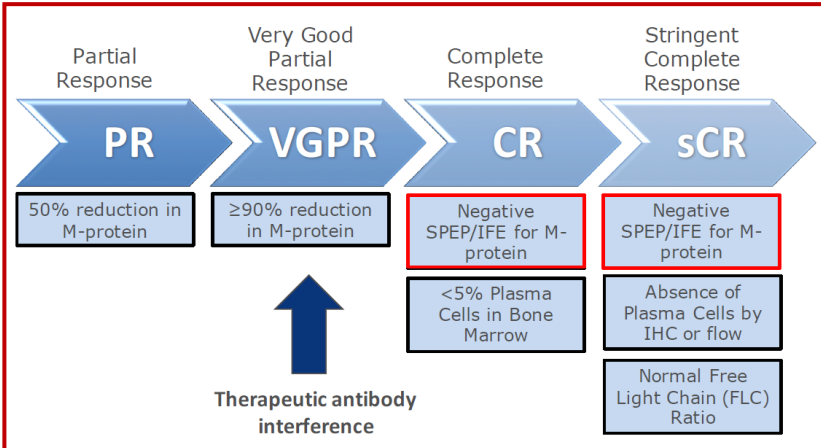


Can reach 1g/L in the blood during treatment

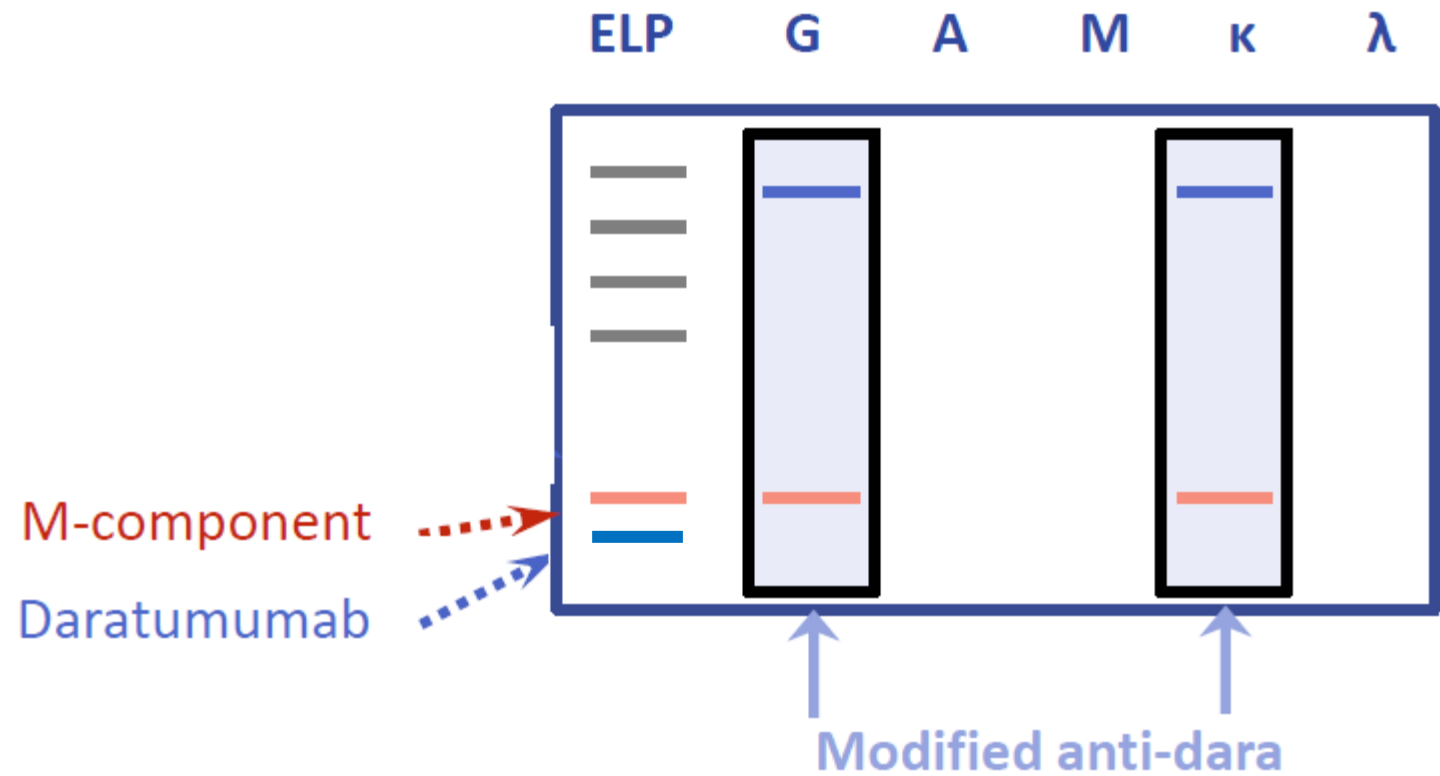
Interferes with SPE, IF and with response assesment



? ?



HYDRASHIFT



CONTEXTO

- HYDRASHIFT es un estudio desarrollado por Sebia que permite **mitigar las interferencias** causadas por terapias basadas en anticuerpos monoclonales (mAbs).
- El kit **HYDRASHIFT 2/4 daratumumab** debe ser usado en conjunto con los kits **HYDRAGEL 2 IF ó 4 IF** con el colorante **violeta ácido** y el instrumento **HYDRASYS 2**.
- Durante el monitoreo clínico de los pacientes tratados con daratumumab, este **anticuerpo monoclonal** aparece como una **banda homogénea en la zona gamma** en la electroforesis de proteínas séricas y en la inmunofijación (IF).
- La práctica actual para el seguimiento de las respuestas y recaídas del mieloma múltiple incluye la electroforesis de proteínas séricas (SPE) y la inmunofijación (IF) para determinar la **respuesta completa (CR)**.
- En los pacientes tratados con daratumumab, un **resultado negativo** de la inmunofijación realizada con la técnica HYDRASHIFT 2/4 daratumumab, sugiere una **respuesta completa (CR)** debido al tratamiento.

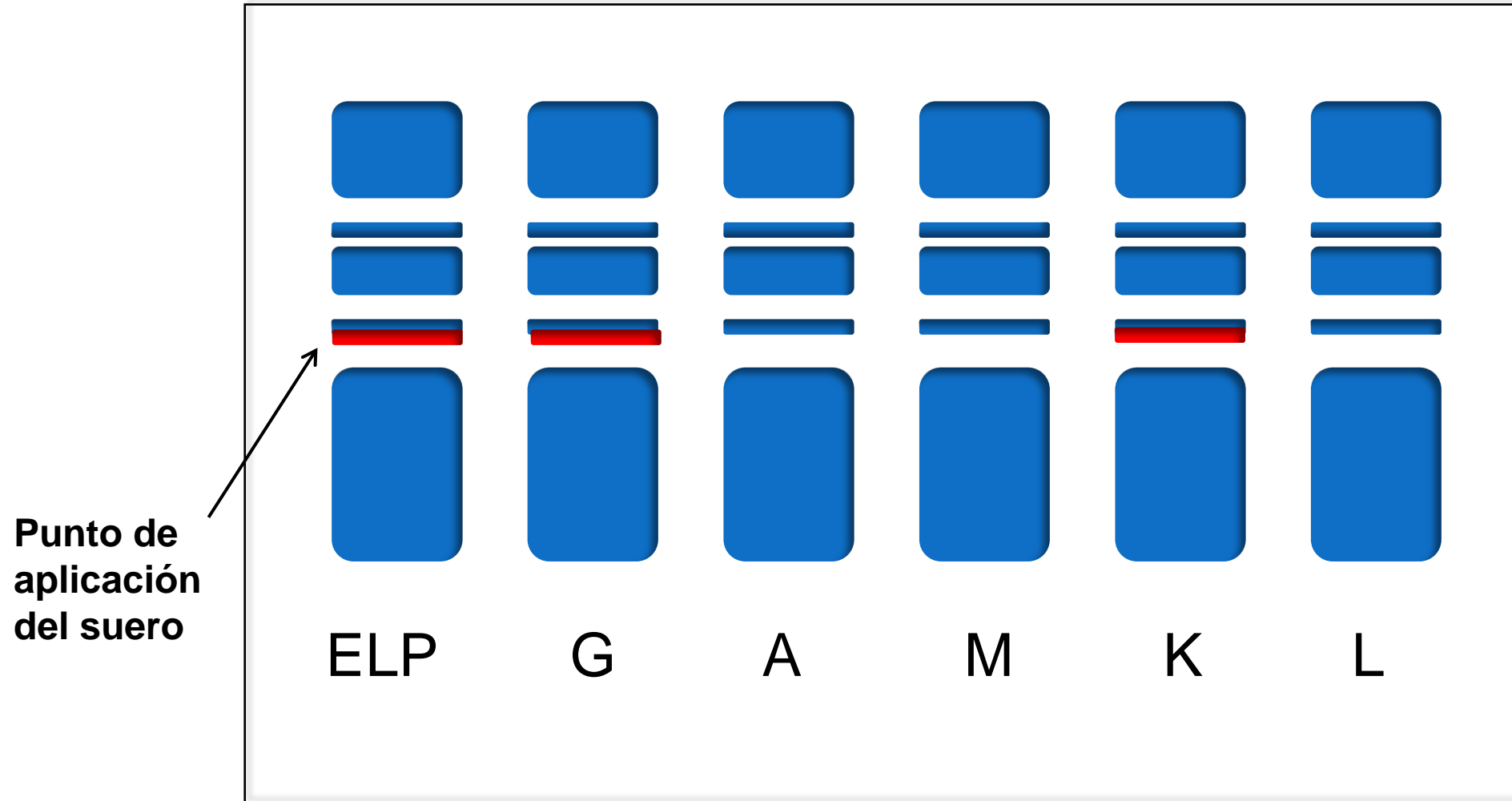
PRINCIPIO DEL TEST

1. **Aplicación** de las **muestras** de suero y del **antisuero** anti-daratumumab en los aplicadores.
2. **Migración electroforética** de las proteínas séricas y del anticuerpo anti-daratumumab
3. **Inmunofijación** de las proteínas separadas por electroforesis.
4. Las proteínas solubles no precipitadas son eliminadas del gel mediante **absorción** con papel de filtro y lavado.
5. Las proteínas inmunoprecipitadas son **visualizadas** mediante coloración (violeta ácido).

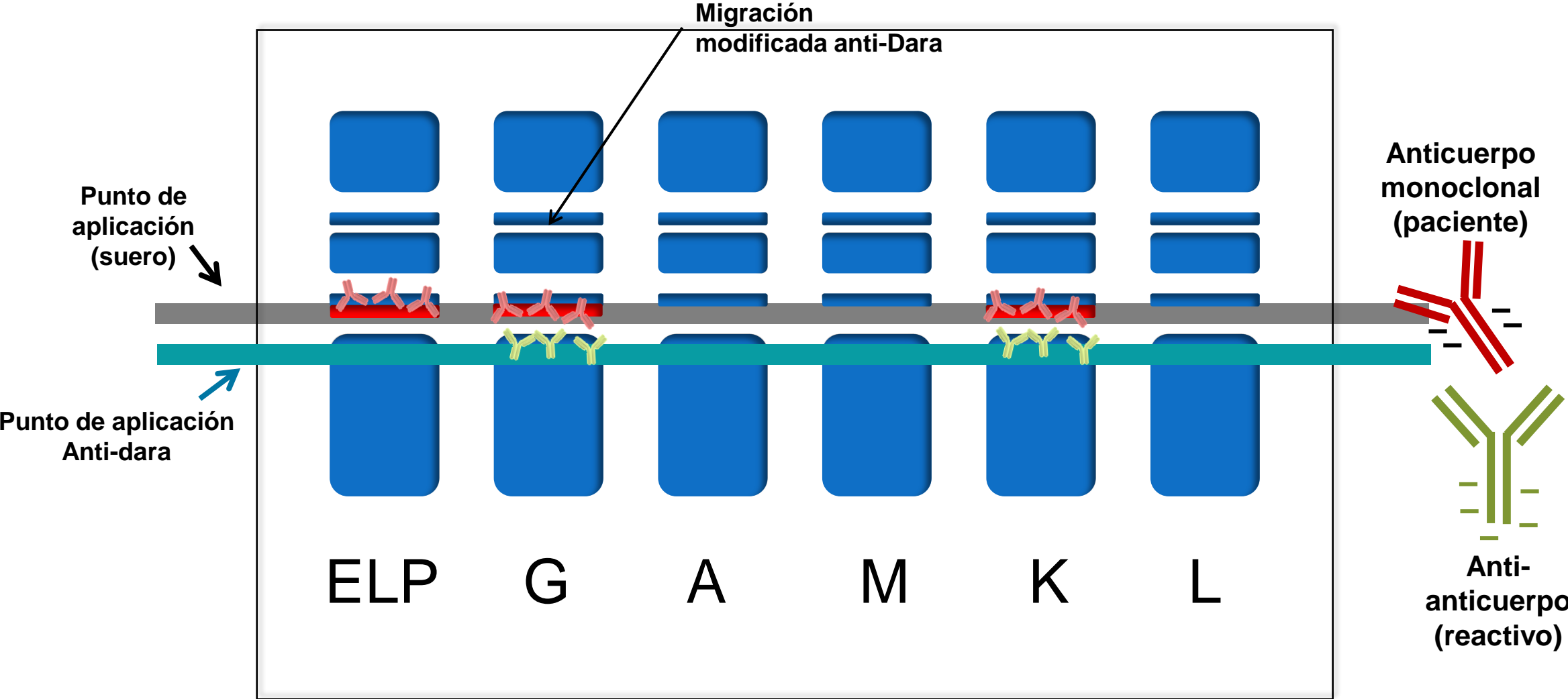
MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Las muestras de suero pueden conservarse un máximo de **7 días** en nevera (entre 2 y 8°C) o un máximo de 3 meses congelados entre - 26 a - 30 °C.

Inmunofijación clásica



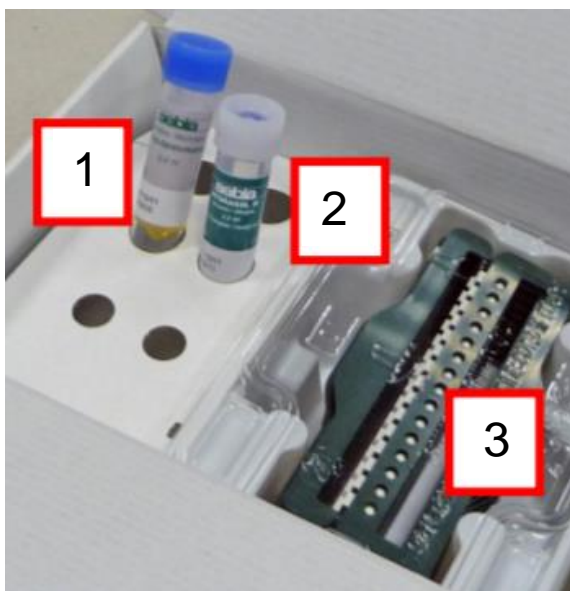
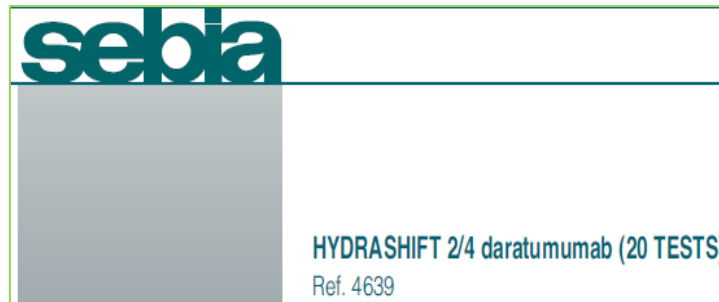
Detección del Anticuerpo



HYDRASHIFT 2/4 Daratumumab - Ref. 4639

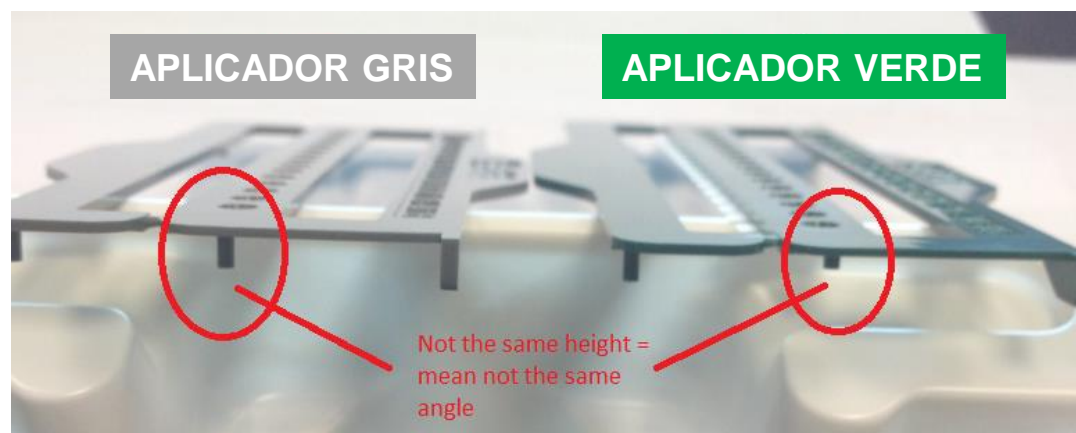
Reactivos suministrados

COMPONENTES	REF. 4639
Antisuero anti-daratumumab (listo para usar)	1 vial de 0,4 mL
Diluyente de muestras (listo para usar)	1 vial de 2,2 mL
Aplicadores verdes (listo para usar)	1 caja de 10 (15 pocillos)



20 tests posibles

1. Para formar un complejo con el Daratumumab-Muestra
2. Para llenar los pocillos no usados de los aplicadores verdes
3. Aplicadores: Antisuero anti-daratumumab.



Reactivos/accesorios necesarios no suministrados

CONTROL DE CALIDAD – Ref 4765



Aplicación

- Destinado al control de calidad de la técnica de inmunofijación HYDRASHIFT, debe ser usado como un suero humano.

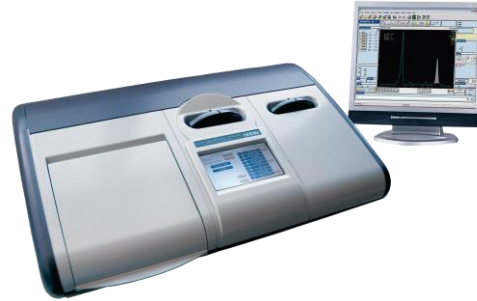
Conservación y estabilidad

- Antes de la reconstitución, el control debe conservarse en nevera.
- El Control reconstituido puede congelarse y conservarse un máximo de 6 meses entre - 18 °C y - 30 °C.

	REFERENCIA SEBIA
HYDRAGEL 2 ó 4 IF Violeta ácido – Plantilla dinámica	4302, 4304 ó 4381*
Antisueros y Solución Fijadora para inmunofijación IF – Plantilla dinámica	4315
ó	
HYDRAGEL 2 ó 4 IF Violeta ácido – Plantilla estándar	4802, 4804 ó 4881*
Antisueros y Solución Fijadora para inmunofijación IF – Plantilla estándar	4815
y	
SOLUCIÓN DECOLORANTE	4540
SOLUCIÓN DE LAVADO HYDRASYS	4541

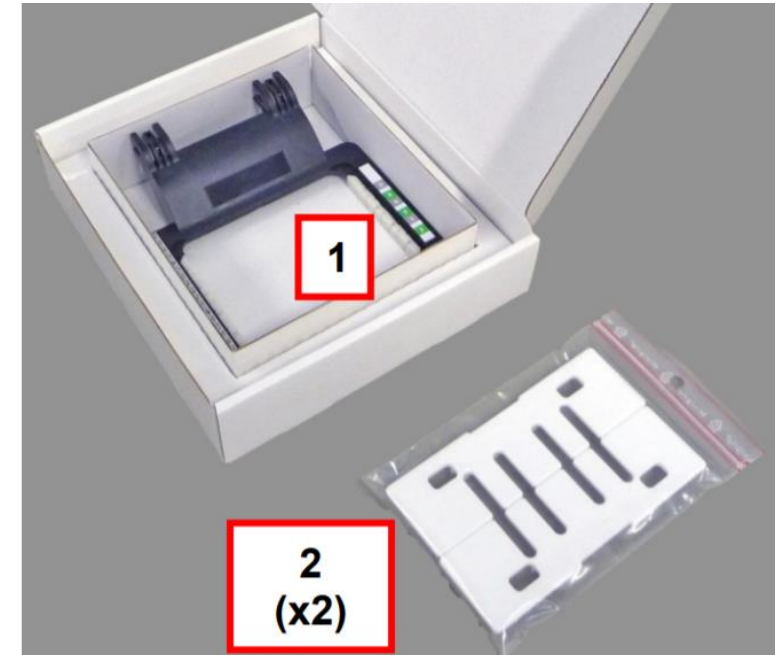
EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema **HYDRASYS 2**

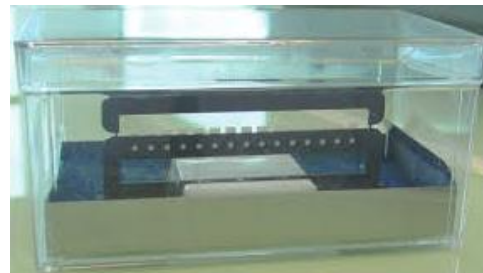


2. **Kit Accesorios HYDRASHIFT 2/4**, SEBIA, Ref. n° 1251

- 1 soporte de aplicadores específico para la técnica HYDRASHIFT
- 2 guías de aplicación del antisuero anti-daratumumab en el aplicador verde de 15 pocillos.



3. **Cámara húmeda**, Ref. n° 1270.

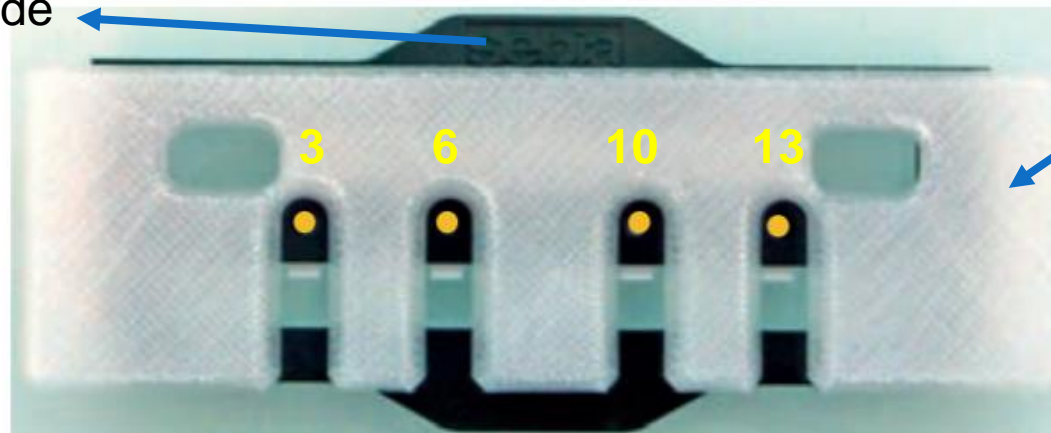


PROCEDIMIENTO - Preparación de la migración

1. Prepare los aplicadores grises con las muestras de suero tal como se describe en las instrucciones de los kits HYDRAGEL IF. Coloque los aplicadores grises en la cámara húmeda.
2. En la técnica HYDRASHIFT, cada análisis requiere la **aplicación del antisuero anti-daratumumab en los carriles de inmunofijación G y K** mediante un aplicador verde
 - Usar 1 aplicador verde para el análisis de 2 muestras
 - Usar 2 aplicadores verdes para el análisis de 4 muestras
3. Coloque una **guía para la aplicación** del antisuero anti-daratumumab en cada aplicador verde.

4. Dispense 10 μ L de antisuero anti-daratumumab en los pocillos visibles (pocillos n° 3, 6, 10 y 13).

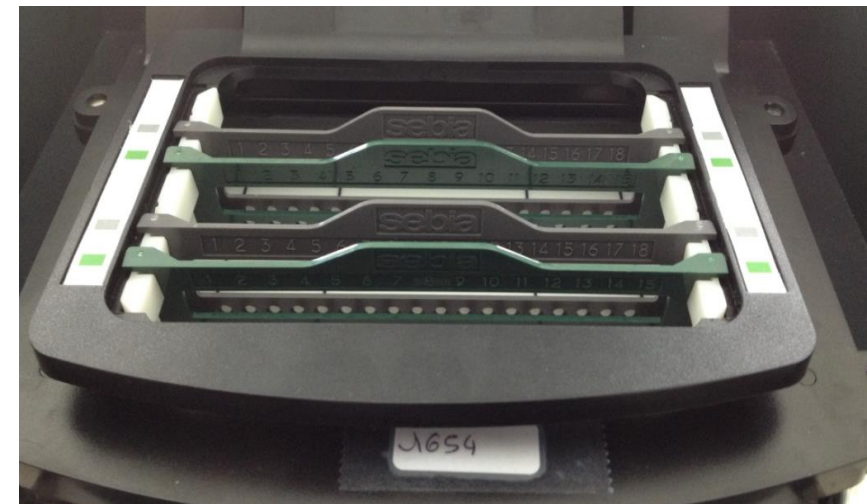
Aplicador verde



Guía de aplicación

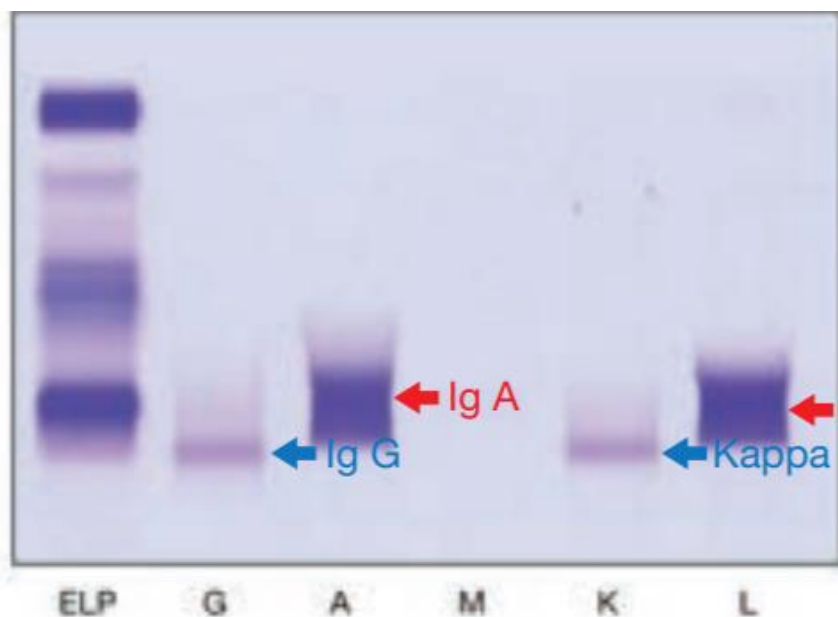
PROCEDIMIENTO - Migración e inmunofijación

5. Coloque los **aplicadores** en la **cámara húmeda**
6. Abra la tapa del módulo de migración y **cambie el soporte de los aplicadores** del instrumento por el soporte de los aplicadores del **kit Accesorios HYDRASHIFT 2/4**. No saque el soporte de electrodos.
7. Seleccione el **programa de migración "2/4 IF MS/MD"** en el menú del instrumento.
8. Coloque las **esponjas** y el **gel** en el módulo de migración.
9. Coloque los **aplicadores (Grises y verdes)**.
10. Continúe con el proceso de la inmunofijación, coloración y escaneo del gel

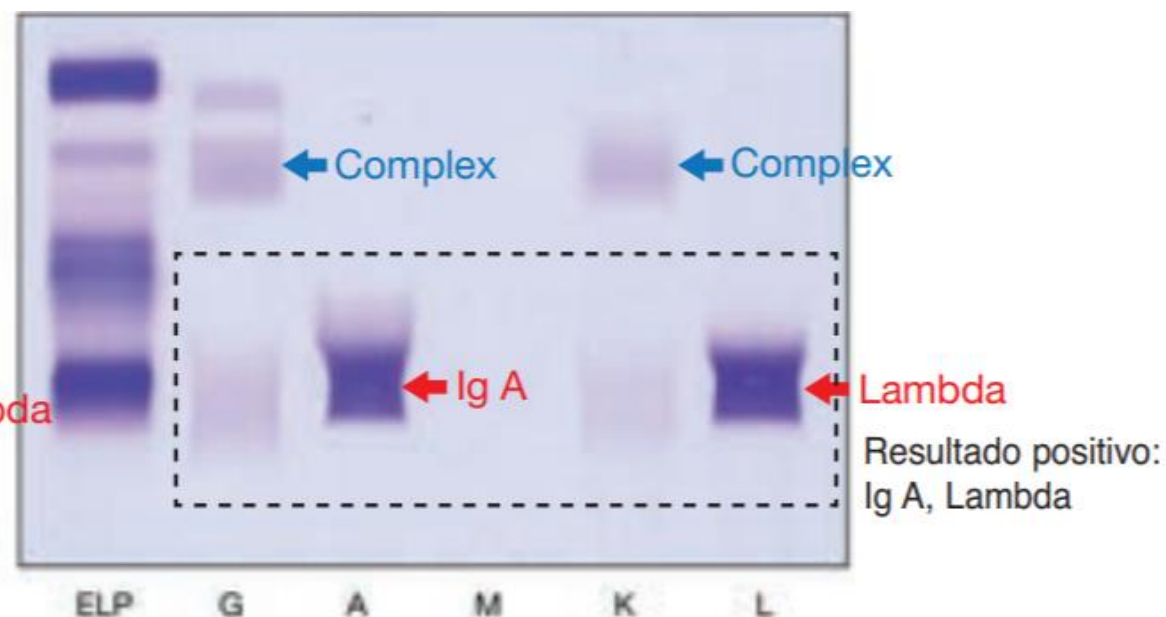


RESULTADOS: Muestra positiva

- Una **banda** presente en los carriles de inmunofijación **G y K** a nivel de la **zona alfa-1** indica la **presencia del complejo daratumumab / anticuerpo anti-daratumumab**.
- La presencia de proteína(s) monoclonal(es) (o biclonales) en las zonas Alfa 2, Beta o Gamma en la técnica de inmunofijación HYDRASHIFT es interpretada como un **resultado positivo** para la presencia de proteína monoclonal.



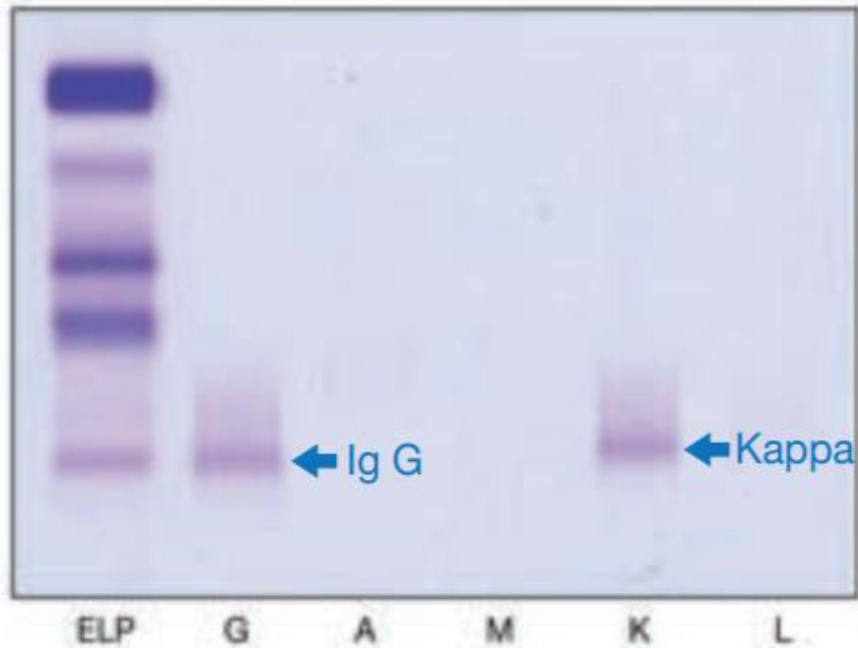
HYDRAGEL IF



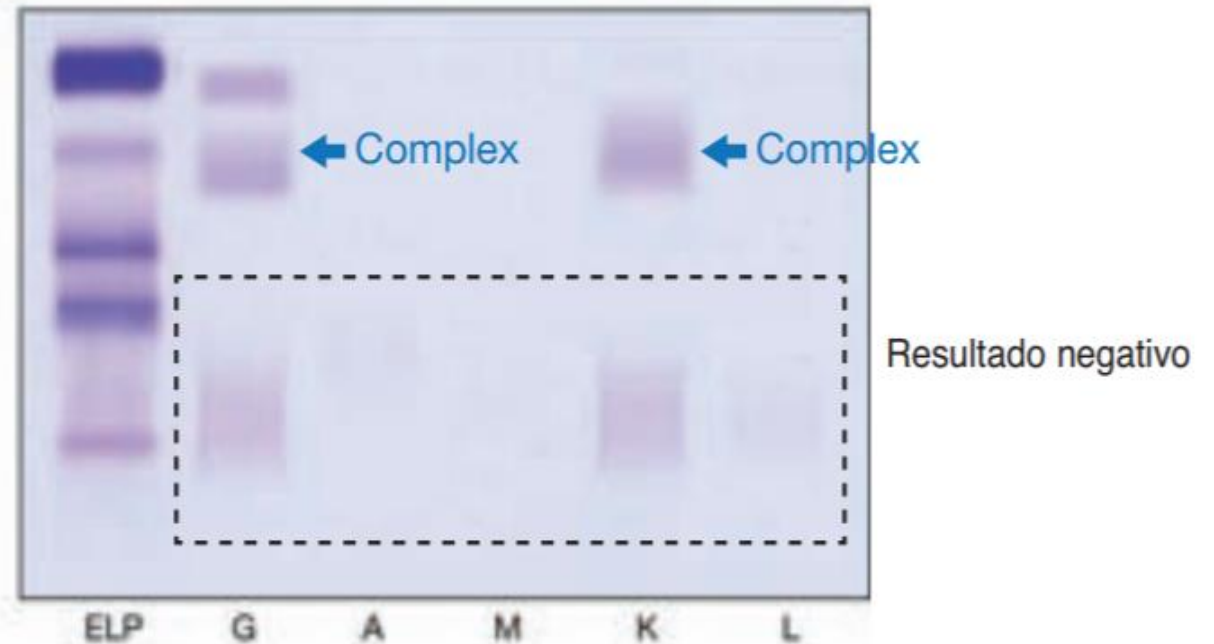
HYDRASHIFT 2/4 daratumumab

RESULTADOS: Muestra negativa

- La ausencia de proteína(s) monoclonal(es) en las zonas Alfa 2, Beta o Gamma en la técnica de inmunofijación HYDRASHIFT es interpretada como un **resultado negativo** para la presencia de proteína monoclonal.

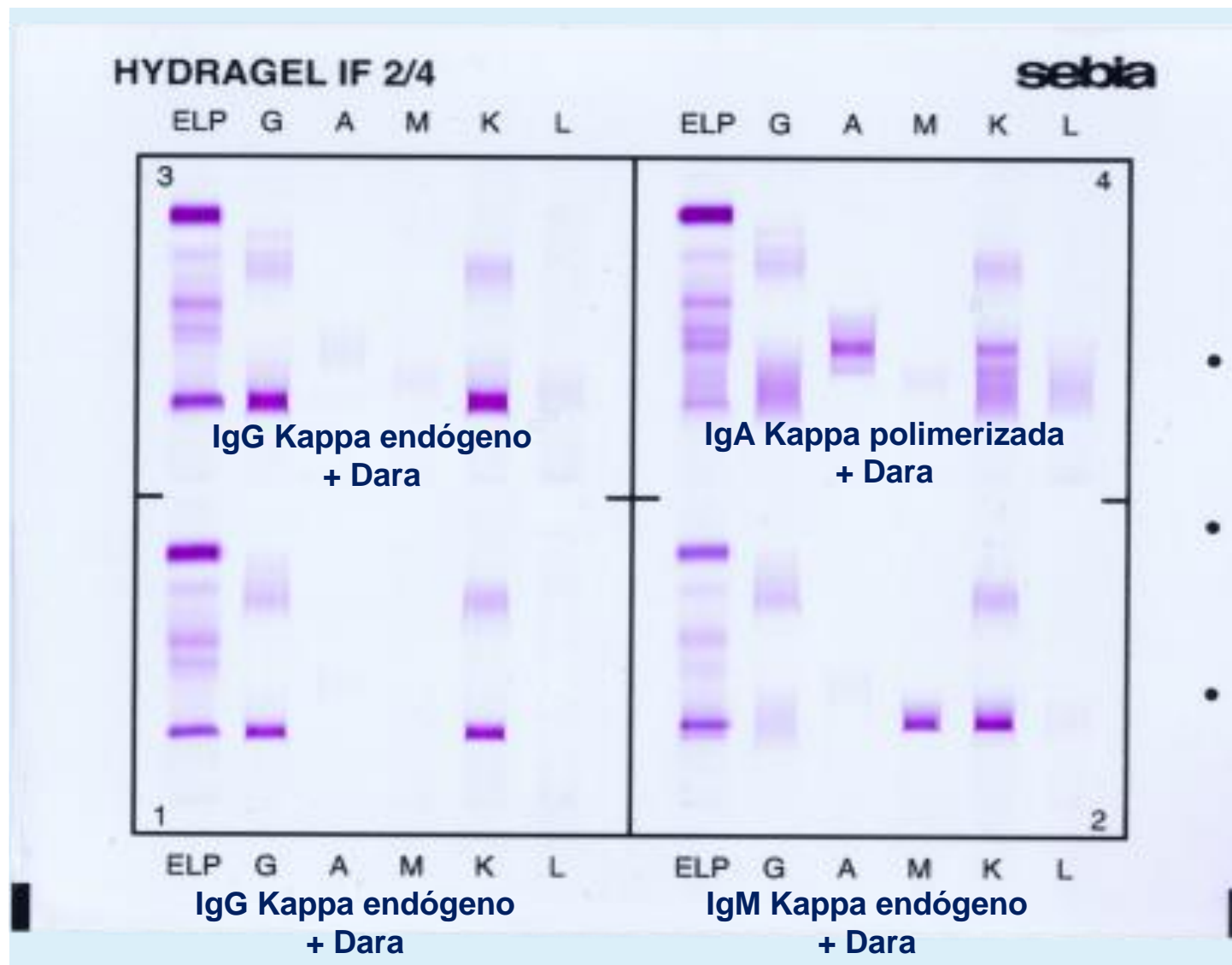


HYDRAGEL IF



HYDRASHIFT 2/4 daratumumab

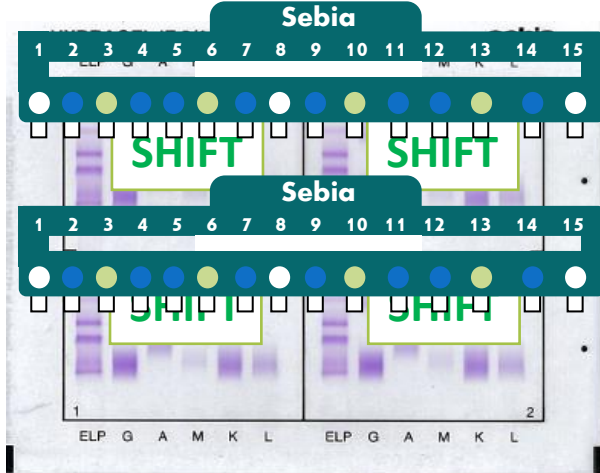
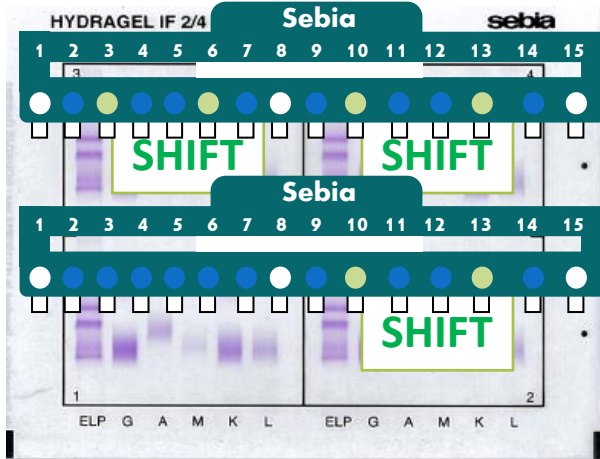
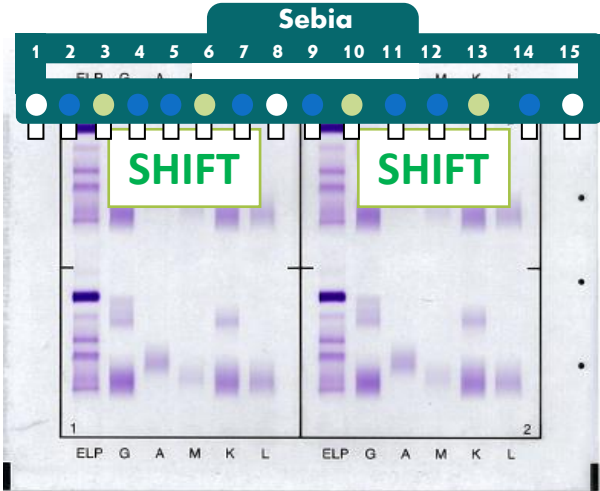
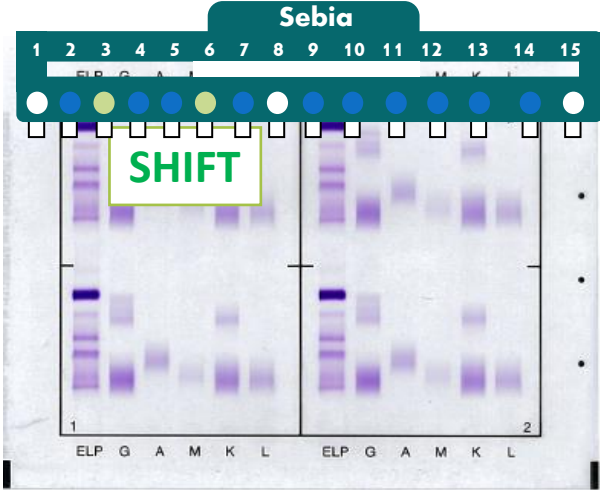
RESULTADOS



La concentración durante el tratamiento del Daratumumab es de 1,0 g/L

El límite de detección en Hydrashift: 0,3 g/L

Diseño Flexible

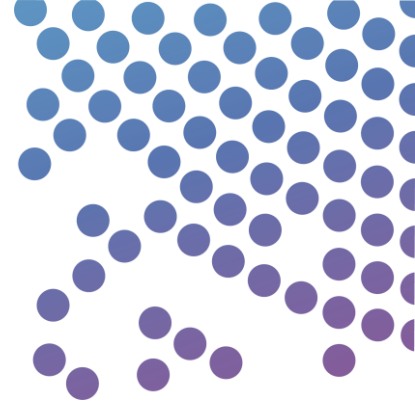


Ejemplo 1



Paul K.

DATE OF BIRTH	02-09-1955
SERUM PEAK/ Pathology	IgG Kappa (K) Multiple Myeloma ◀
URINE PEAK	Free Light Chain K

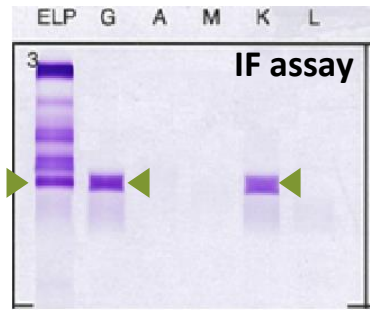


Screening

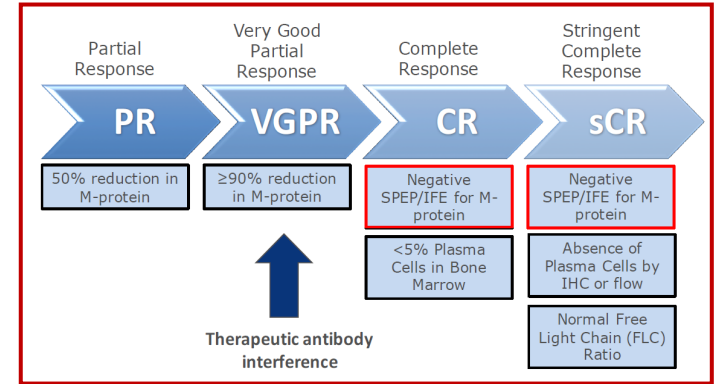
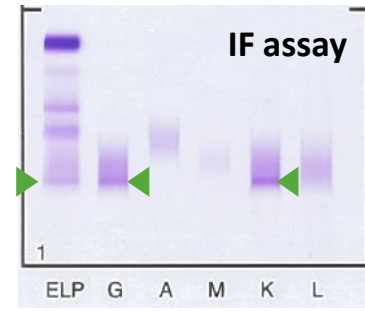
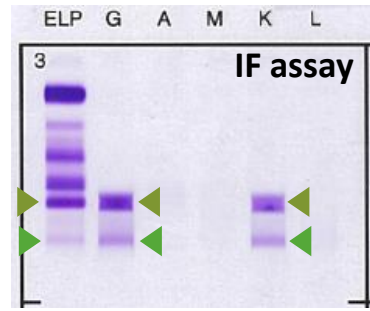
Daratumumab therapy (16mg/Kg)

Sample 1

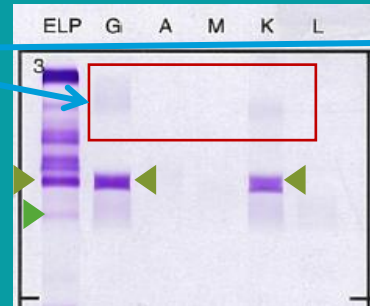
Sample 2



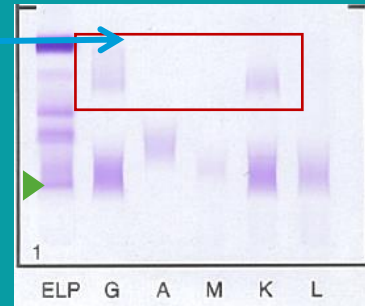
Paul's monoclonal IgG Kappa



daratumumab/anti-daratumumab immune complex



Persistence of Paul's monoclonal IgG K



Paul reached Complete Response according to IMWG response criteria

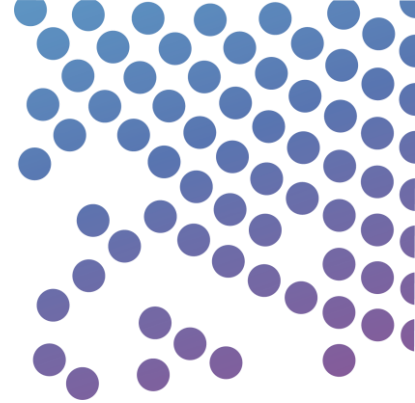
**IF With HYDRASHIFT
2/4 daratumumab**

Ejemplo 2



Anna B.

DATE OF BIRTH	12-23-1948
SERUM PEAK/ Pathology	IgG Kappa (K) Multiple Myeloma
URINE PEAK	Free Light Chain K

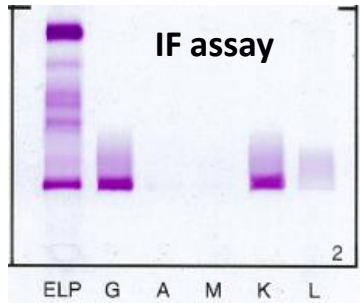


Screening

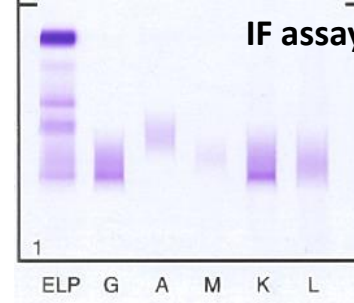
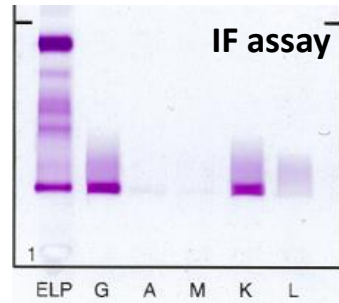
Daratumumab therapy
(16mg/Kg)

Sample 1

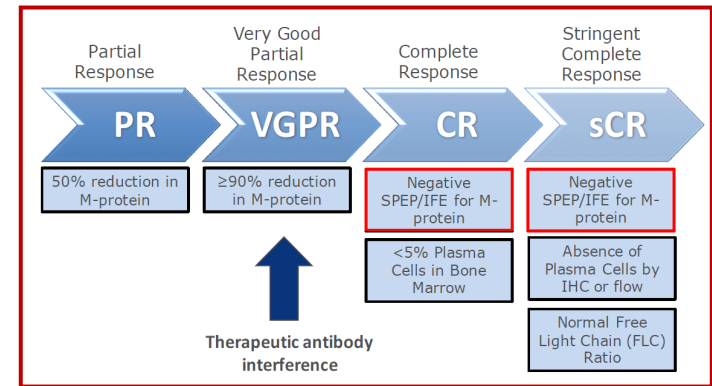
Sample 2



Anna's monoclonal IgG Kappa

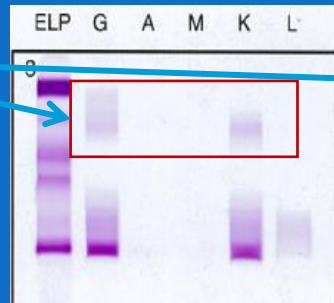


Co-migration with dara:
Impossible to differentiate Anna's monoclonal IgG K from dara interference

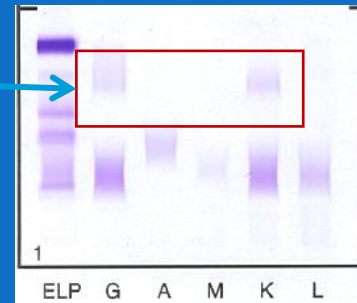


daratumumab/anti-daratumumab immune complex

IF With HYDRASHIFT
2/4 daratumumab



Persistence of Anna's monoclonal IgG K



Anna reached Complete Response according to IMWG response criteria



Muchas gracias por su atención