

# Hoog- en laagrisico-multipel myeloom kunnen worden voorspeld met de combinatie van EMC92 en ISS

Prediction of high- and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System

dr. A Broijl<sup>1</sup>, R. Kuiper, Bsc.<sup>2</sup>, dr. M. van Duin<sup>3</sup>, dr. M.H. van Vliet<sup>4</sup>, dr. B. van der Holt<sup>5</sup>, drs. L. el Jarari<sup>6</sup>, dr. E.H. van Beers<sup>7</sup>, prof. dr. H.M. Lokhorst<sup>8</sup> en prof. dr. P. Sonneveld<sup>9</sup>

*Dit artikel is een verkorte versie van eerder gepubliceerd werk in Blood 2015;126(17):1996-2004.*

## SAMENVATTING

Er bestaat nog steeds een grote variatie in de overleving van patiënten met multipel myeloom. Hiervoor zijn betrouwbare prognostische testen van belang. In dit artikel laten we zien hoe uit bestaande prognostische markers – zoals het ‘international staging system’ (ISS), ‘fluorescence in situ hybridisation’ (FISH) en genexpressie (GEP)-‘classifiers’ – een optimaal presterende combinatie kan worden samengesteld en gevalideerd. De hiervoor gebruikte datasets zijn afkomstig uit de volgende studies: HOVON-65/GM-MG-HD4, UAMS-TT2, UAMS-TT3, MRC-IX, APEX en IFM-G met in totaal 4.750 patiënten. Er werden 20 risicomarkers geëvalueerd, waaronder markers met sterke prognostische waarde zoals FISH t(4;14) en del(17p), GEP-‘classifiers’ EMC92 en UAMS70, en ISS. Bij de nieuw samengestelde risicoclassificatie blijkt

ISS een sterke bijdrage aan zowel GEP- als FISH-prognostiek te leveren. De sterkst voorspellende combinatie bleek te bestaan uit EMC92 gecombineerd met ISS. Hiermee worden patiënten in vier risicogroepen geassocieerd met een mediane overleving oplopend van 24 maanden, 47 maanden, 61 maanden, tot ‘niet bereikt na 96 maanden’ in de laagste risicogroep. Van alle patiënten valt 17% in de hoogste risicogroep en 35% in de laagste. De EMC92ISS-‘classificatie’ is daarmee een belangrijke, relevante voorspeller van overleving, gebaseerd op zowel biologische als klinische parameters. De EMC92-ISS-combinatie is een nieuwe prognostische marker, superieur en robuust vergeleken met overige prognostische markers zoals bevestigd in onafhankelijke gegevens.

(NED TIJDSCHR HEMATOL 2017;14:172-82)

## SUMMARY

Patients with multiple myeloma have variable survival and require reliable prognostic and predictive scoring systems. Here, International Staging System (ISS), fluorescence in situ hybridization (FISH) markers, and gene expression (GEP) classifiers were

combined to identify novel risk classifications in a discovery/validation setting. We used the datasets of the Dutch-Belgium Hemato-Oncology Group and German-speaking Myeloma Multicenter Group (HOVON-65/GMMG-HD4), University of Arkansas for Medical Sciences-TT2 (UAMS-TT2), UAMS-TT3,

<sup>1</sup>hematoloog, afdeling Hematologie, Erasmus MC Kanker Instituut, <sup>2</sup>Bioinformatician, afdeling Bioinformatics, SkylineDx, <sup>3</sup>post-doc, afdeling Hematologie, Erasmus MC Kanker Instituut, <sup>4</sup>EVP Bioinformatics and Product Development, afdeling Bioinformatics, SkylineDx, <sup>5</sup>statisticus, HOVON datacentrum, Erasmus MC Kanker Instituut, <sup>6</sup>trial manager, Clinical Trial Center (CTC), Erasmus MC Kanker Instituut, <sup>7</sup>VP Genomics, afdeling Genomics, SkylineDx, <sup>8</sup>hematoloog, afdeling Hematologie, VU medisch centrum, <sup>9</sup>hematoloog, afdeling Hematologie, Erasmus MC Kanker Instituut. Correspondentie graag richten aan mw. dr. A. Broijl, hematoloog, afdeling Hematologie, kamer Na806, Erasmus MC Kanker Instituut, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam, tel.: 010 703 01 48, e-mailadres: a.broyl@erasmusmc.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

**Trefwoorden:** EMC92, gen-‘signature’, myeloom, prognosemarkers, risico

**Keywords:** EMC92, gene signature, myeloma, prognostic markers, risk

Medical Research Council-IX (MRC-IX), Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX), and Intergroupe Francophone du Myélome (IFM-G) (total number of patients: 4,750). Twenty risk markers were evaluated, including t(4;14) and deletion of 17p (FISH), EMC92, and UAMS70 (GEP classifiers), and ISS. The novel risk classifications demonstrated that ISS is a valuable partner to GEP classifiers and FISH. Ranking all novel and existing risk classifications showed that the EMC92-ISS combination is

the strongest predictor for overall survival, resulting in a 4-group risk classification. The median survival was 24 months for the highest risk group, 47 and 61 months for the intermediate risk groups, and the median was not reached after 96 months for the lowest risk group. A total of 17% is classified as high-risk and 38% as low-risk. The EMC92-ISS classification is a novel prognostic tool, based on biological and clinical parameters as validated in independent data.

## INLEIDING

Multipel myeloom (MM) karakteriseert zich door een expansie van maligne plasmacellen in het beenmerg met klinische kenmerken als osteolytische laesies, hypercalciëmie, nierinsufficiëntie en anemie.<sup>1</sup> Nieuw gediagnosticeerde MM-patiënten hebben een mediane overleving van vijf tot zeven jaar. De prognose van individuele patiënten varieert echter sterk, van minder dan twee jaar tot meer dan 20 jaar. Een betrouwbare voorspelling van overleving is belangrijk om het risico op progressie of overlijden te kunnen inschatten en waarschijnlijk in de toekomst ook voor de keuze van behandeling. Serum- $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2M), albumine en lactaatdehydrogenase (LDH) zijn standaard risicomarkers.<sup>2,3</sup> Met name de combinatie  $\beta$ 2M en albumine - bekend als het 'international staging system' (ISS) - heeft relevante prognostische waarde.<sup>4</sup> Variatie in overleving kan verder deels worden verklaard door biologische factoren. Erkende biologische subgroepen als 'multiple myeloma SET domain' (MMSET), ook wel 'Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1' (WHSC1) genoemd, en kenmerkend voor alle t(4;14), laten duidelijke correlatie met overleving zien.<sup>5,6</sup> Ondanks dat deze subgroepen voor het eerst zijn ontdekt met behulp van cytogenetische technieken zoals karyotypering en 'fluorescence in situ hybridisation' (FISH), zijn deze ook terug te vinden door middel van genexpressieanalyse.<sup>7,8</sup> Genexpressieprofielering (GEP)-analyse heeft geleid tot een aantal nieuwe prognostische markers (GEP-'classifiers') die in staat zijn patiënten te identificeren die voorheen niet werden herkend als hoog- of laagrisicopatiënten. De eerste prognostische MM-'classifier' staat bekend als de UAMS70-gen-'classifier', later uitgebreid met andere 'classifiers' waaronder de EMC92-gen-'classifier'.<sup>9-15</sup> Deze laatste is verder ontwikkeld tot de MM-'profiler' en is reeds in acht cohorten succesvol gevalideerd.

De veelheid aan markers roept de vraag op welke marker, of welke combinatie van markers, het meest geschikt is voor een zo accuraat mogelijke inschatting van de prognose. ISS is onder andere reeds gecombineerd met hoogrisico cytogenetische markers t(4;14) en del(17p) waaraan recentelijk ook t(14;16) en LDH zijn toegevoegd; de 'revised ISS-score' (R-ISS).<sup>16-18</sup> Ook zijn er voorstellen gedaan voor alternatieve prognostische scoringssystemen bestaande uit combinaties zoals del(17p), t(4;14) en gain(1q).<sup>19</sup> Het doel van deze studie is om te komen tot een optimale combinatie van bestaande markers met prognostische waarde bij MM. Door toepassing van onafhankelijke trainings- en validatiedatasets laten we zien dat de combinaties van ISS met GEP krachtige voorspellers zijn voor de prognose bij MM.

## METHODEN

### KLINISCHE GEGEVENS

Deze studie gebruikte klinische gegevens van de Stichting Hemato-Oncologie voor Volwassenen Nederland (HOVON) en de Duitstalige Myeloma Multicenter Group (GMMG) (HO65/HD4), Medical Research Council-IX (MRC-IX), UAMS Total Therapy (UAMS-TT2 en TT3), Intergroupe Francophone du Myelome (IFM-G) en het APEX-cohort (recidiefpatiënten).<sup>9-11,17,20,21</sup> Een overzicht van studies met therapieën is gegeven in *Tabel 1*, pagina 175. Overleving (OS), progressievrije overleving (PFS) en ten minste één prognostische marker waren beschikbaar voor alle patiënten. Alle patiënten hadden toestemming gegeven voor de studie in overeenstemming met de Verklaring van Helsinki, en alle protocollen waren goedgekeurd door de betreffende medisch-ethische commissies.

### GEP

Alle gegevens zijn afkomstig van Affymetrix HG U133 Plus 2.0 genexpressie-'arrays', behalve de APEX-studie

(Affymetrix U133A/B-platform). Het opwerken en analyseren van HO65/HD4-samples is uitgebreid beschreven en de gegevens zijn beschikbaar in publieke databases, voor HO65/HD4 betreft dit dataset GSE19784.<sup>9,21,19</sup> Andere GEP-sets waren: TT2 (GSE24080), TT3 (E-TABM-1138 en GSE24080), MRC-IX (GSE15695) en APEX (GSE9782).<sup>10,20-22</sup>

## STANDAARD PROGNOSTISCHE MARKERS

Prognostische markers beschikbaar in deze analyse omvatten ISS, GEP-‘classifiers’ en cytogenetica. Iedere marker was beschikbaar in ten minste twee cohorten. ISS is de meest gebruikte klinische risicoclassificatie en is gebaseerd op serumconcentraties van  $\beta$ 2M en albumine, waarbij stadium I laag risico en stadium III hoog risico vertegenwoordigt.<sup>4</sup> Voor deze analyse zijn acht GEP-‘classifiers’ geëvalueerd: EMC92, UAMS17, UAMS70, UAMS80, IFM15 en MRCIX6 (onderverdeling in standaard en hoog risico), en HM19 en GPI50 (onderverdeling in laag, intermediair en hoog risico).<sup>9-15</sup> Cytogenetische markers zijn translocaties t(4;14), t(11;14), t(14;16), t(14;20) of IGH-split, deleties del(13q) en del(17p), addities gain(1q) en hyperdiploïde MM gedefinieerd als een extra kopie van chromosoom 9.<sup>19,23</sup> Cytogenetica is alleen met FISH bepaald, waarbij een 10% ‘cut-off’ is gehanteerd, behalve voor numerieke afwijkingen in de MRC-IX studie waarvoor 20% werd gehanteerd.<sup>17,24-26</sup> Twee bestaande samengestelde markers zijn geïnccludeerd in de analyse. De eerste wordt aangeduid als FISH.A en is gedefinieerd als positief wanneer del(17p) en/of t(4;14) en/of gain(1q) is aangehouden.<sup>19</sup> De tweede is FISH.B/ISS waarvoor geldt: graad 1 (ISS = 1 of 2 zonder t(4;14) en zonder del(17p)), graad 2 (niet graad 1 of 3), en graad 3 (ISS = 2 of 3 met t(4;14) en/of del(17p)).<sup>17</sup>

## STATISTISCHE ANALYSE

De associatie van elke ‘classifier’ met overleving werd geanalyseerd in een Cox-overlevingsmodel, waarbij werd gecorrigeerd voor de overlevingsverschillen tussen de klinische studies (R ‘survival’ package, version 2.38-1).<sup>27-29</sup> Patiënten werden vervolgens willekeurig toegewezen aan een training- of validatiedataset. Om de optimale combinatie van markers te vinden, werden markers systematisch paarsgewijs gecombineerd tot een potentiële nieuwe marker en werd de prognostische waarde hiervan getest op de trainingsgegevens. Wanneer deze combinatiemarkers de prognostische waarde van de beide markers (waaruit deze was opgebouwd) overtrof, werd de combinatie verder gevalideerd op de validatie-

gegevens. De gevalideerde combinatiemarkers werden vervolgens gesorteerd op ‘performance’. De procedure is weergegeven in *Figuur 1*, pagina 177 en beschreven in het artikel van Kuiper et al.<sup>30</sup>

## RESULTATEN

### BEVESTIGING VAN BESTAANDE RISICOMARKERS

Twintig bestaande markers werden na correctie voor overlevingsverschillen tussen de klinische studies geëvalueerd bij 4.750 patiënten (zie *Tabel 1*). Van vier markers kon de prognostische waarde niet worden bevestigd of deze hadden een zodanige variantie dat ze ongeschikt waren voor inschatting van prognose. Dit waren FISH-markers gain(9), t(11;14), t(14;16), en t(14;20). Deze markers werden buiten beschouwing gelaten voor verdere analyse.

Alle GEP-‘classifiers’ waren significant geassocieerd met OS resulterend in hazardratio’s (HR) tussen 2,0 (95%-betrouwbaarheidsinterval (BI) 1,6-2,4; IFM15) en 3,3 (95%-BI 2,6-4,3; UAMS70). De ‘classifiers’ deden het beter voor OS dan voor PFS. Voor PFS lagen de HR’s tussen 1,8 (95%-BI 1,5-2,1; IFM15) en 2,3 (95%-BI 1,9-2,7; EMC92). Het percentage patiënten in de hoogrisicogroep per GEP-‘classifier’ varieerde van 18% (EMC92), 12% (UAMS17), 10% (GPI50), 9% (UAMS70), tot 8% (UAMS80 en HM19; zie *Tabel 1*). Significante cytogenetische markers voor OS waren t(4;14), del(17p), gain(1q) en del(13q) met HR’s tussen 1,7 (95%-BI 1,5-1,8; del(13q)) en 2,3 (95%-BI 2,0-2,6; del(17p)). Vergelijkbare resultaten werden gevonden voor PFS maar met lagere HR’s, te weten van 1,4 (95%-BI 1,3-1,5; del(13q)) tot 1,8 (95%-BI 1,6-2,0; t(4;14)). ISS kon worden bevestigd als significante prognostische marker, met HR’s van 1,6 (95%-BI 1,4-1,8; ISS = 2) en 2,3 (95%-BI 2,1-2,6; ISS = 3) voor OS en 1,4 (95%-BI 1,3-1,6; ISS = 2) en 1,7 (95%-BI 1,6-1,9; ISS = 3) voor PFS. Eerdere gepubliceerde samengestelde markers, hier geëvalueerd als FISH.A (t(4;14) en/of del(17p) en/of gain(1q)), alsmede de combinatiemarkers FISH.B/ISS, bleken significant met een HR van 2,3 (95%-BI 2,0-2,5; FISH.A) en voor de 3-klassen FISH.B/ISS-marker waren de HR’s 1,8 (95%-BI 1,4-2,4; middel risico) en 3,6 (95%-BI 2,7-4,7; hoog risico).<sup>17,19</sup>

### COMBINATIES VAN MARKERS

Van de 16 significante (uit 20 geëvalueerde) bestaande markers voor OS en/of PFS is vervolgens elke mogelijke combinatie van twee markers getest. Twintig combinaties bleken een significante associatie met OS te hebben in de trainingset die de waarde van de markers waaruit

**TABEL 1.** Verdeling van risicomarkers en behandeling per cohort. De aantallen patiënten waarvoor een marker is bepaald, is gegeven met tussen haakjes het percentage patiënten dat positief was voor de marker.

	HO65/HD4	MRC-IX		TT2	TT3
		intensief	niet-intensief		
N	827	701	491	351	238
Mediane leeftijd [IQR]	57 (51 - 61)	58 (54 - 63)	74 (70 - 77)	57 (49 - 64)	60 (53 - 66)
Behandelgroep [n]	PAD (413)	CTD (351)	CTDa (257)	THAL (175)	VTD (238)
Controlegroep	VAD (414)	CVAD (350)	MP (234)	Geen THAL (176)	Geen controle-groep
Hoge dosis alkylator	JA	JA	NEE	JA	JA
ISS [n (I/ II/ III %)]	756 (38 /37 /25%)	636 (25 /39 /36%)	449 (13 /41 /45%)	351 (54 /25 /21%)	208 (50 /28 21%)
t(4;14) [n (%positief)]	492 (12%)	619 (12%)	434 (10%)		
t(11;14)	437 (16%)	617 (15%)	434 (12%)		
t(14;16)	360 (2%)	612 (3%)	434 (3%)		
t(14;20)	255 (0%)	612 (2%)	429 (1%)		
IgH-split	372 (48%)	609 (44%)	429 (40%)		
gain(1q)	344 (32%)	531 (37%)	371 (41%)	248 (47%)	
del(13q)	686 (41%)	612 (46%)	428 (43%)		
del(17p)	351 (11%)	591 (8%)	423 (9%)		
gain(9)	454 (57%)	480 (60%)	351 (66%)		
EMC92 [n (%positief)]	‡	138 (17%)	109 (24%)	345 (19%)	238 (15%)
UAMS17	327 (12%)	138 (9%)	109 (16%)	‡	238 (14%)
UAMS70	327 (9%)	138 (7%)	109 (10%)	‡	238 (12%)
UAMS80	327 (8%)	138 (8%)	109 (9%)	345 (9%)	‡
MRCIX6	327 (5%)	‡	‡	345 (7%)	238 (5%)
IFM15	327 (25%)	138 (25%)	109 (28%)	345 (24%)	238 (24%)
HM19 [n (%laag / medium /hoog)]	327 (43 /49 /8%)	138 (45 /48 /7%)	109 (39 /53 /8%)	345 (50 /47 /8%)	238 (47 /47 /7%)
GPI50	327 (34 /51 /15%)	138 (52 /41 /7%)	109 (52 /38 /10%)	345 (63 /31 /7%)	238 (58 /34 /8%)
HR.FISH.A [n (%positief)]	354 (46%)	535 (48%)	368 (48%)		
HR.FISH.B/ISS [n (1 /2 /3%)]	334 (60 /22 /18%)	‡	‡		

PAD=bortezomib, doxorubicine, dexamethason, VAD=vincristine, doxorubicine, dexamethason, CVAD=cyclofosfamide, vincristine, doxorubicine, dexamethason, CTD=cyclofosfamide, thalidomide, dexamethason, MP=melfalan, prednison, CTDa=verlaagde dosis CTD, VTD=bortezomib, thalidomide, dexamethason, VD=vincristine, dexamethason, BOR=bortezomib, THAL=thalidomide.

APEX	IFM-G	POOLED
264	1878	4750
61 (54 - 67)	57 (51 - 61)	57 (51 - 62)
BOR (188)	VD (740)	BOR (1579) / THAL (783)
DEX (76)	VAD (1138)	BOR (1628) / THAL (760)
JA	JA	
202 (34 /33 /33%)	1475 (34 /39 /28%)	4074 (34 /37 /30%)
	1635 (14%)	3180 (13%)
		1488 (15%)
	456 (4%)	1862 (3%)
		1296 (1%)
		1410 (44%)
	891 (37%)	2385 (38%)
	1807 (48%)	3533 (46%)
	1651 (15%)	3016 (12%)
		1285 (60%)
264 (16%)		1094 (18%)
264 (12%)		1076 (12%)
264 (8%)		1076 (9%)
264 (7%)		1183 (8%)
264 (3%)		1174 (5%)
		1157 (25%)
264 (41 /50 /8%)		1420 (44 /48 /8%)
		1159 (51 /39 /10%)
	1022 (64%)	2395 (57%)
	516 (55 /29 /17%) ‡	850 (57 /26 / 17%)

\* trainingsdata voor deze marker. Enkel de aantallen patiënten niet gebruikt voor het ontwerpen van de marker zijn gegeven en gebruikt in deze studie.

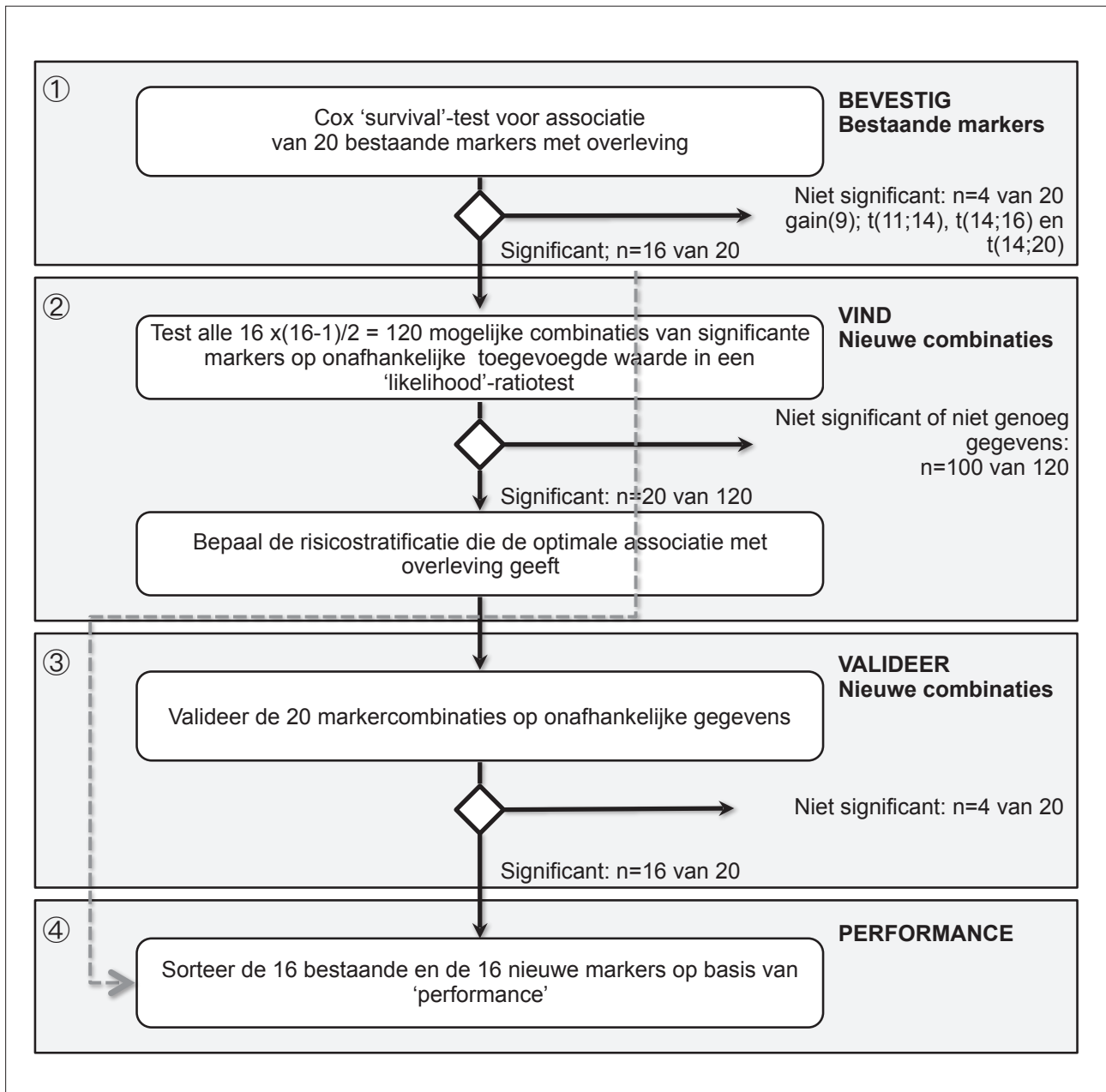
de combinatie bestond overtrof en 16 daarvan hielden stand in de validatieset.<sup>30</sup> Tien van de 16 samengestelde markers bevatten ISS, wat suggereert dat ISS een belangrijke onafhankelijke marker is. Combinaties van GEP met FISH werden niet gevonden, voornamelijk omdat er weinig overlappende gegevens beschikbaar waren. Ten slotte werden alle 16 bekende markers en de 16 nieuwe samengestelde markers gerangschikt op 'performance'.<sup>30</sup> ISS-GEP-combinaties, waarvan EMC92/ISS de eerste positie innam (zie *Figuur 2*, pagina 178), bleken een goede 'performance' te hebben. Overige goed scorende markers waren ISS-UAMS17, ISS-HM19 en ISS-UAMS70. De FISH.B-ISS-marker kwam op de vijfde plek. ISS kwam op plek 23 van 32. Gemiddeld scoorden samengestelde markers beter. De best scorende enkelvoudige marker was EMC92 op de zevende plek.

De markercombinatie EMC92/ISS classificeert patiënten in vier risicogroepen, respectievelijk met 38%, 24%, 22% en 17% van de patiënten van laag naar hoog risico (zie *Figuren 3A en 3B*, pagina 179). Bijbehorende HR's berekend ten opzichte van de laagste risicogroep waren 2,6 (95%-BI 1,6-4,5; middel-laag), 3,2 (95%-BI 1,9-5,4; middel-hoog) en 6,9 (95%-BI 4,1-11,7; hoog). Voor de laagste risicogroep was de mediane overleving nog niet bereikt op 96 maanden, de mediane overleving was 61 maanden voor de middel-lage risicogroep, 47 maanden (middel-hoog) en 24 maanden voor de hoogrisicogroep. De overlevingscurves voor de individuele EMC92- en ISS-markers zijn weergegeven in *Figuren 3C en 3D*. De FISH-combinatie (t(4;14) en/of del(17p) en/of gain(1q)) en FISH/ISS-combinatiesmarkers zijn weergegeven in *Figuren 3E en 3F*, pagina 179.

De EMC92/ISS-marker is geëvalueerd voor de verschillende leeftijdsgroepen en overtuigend toepasbaar bij jongere, oudere en tevens recidiefpatiënten. Het behoudt haar validiteit gedurende follow-up (zie *Tabel 2*, pagina 180). Uitermate relevant bleek het dat driekwart van de patiënten in de laagste risicogroep - met daadwerkelijk goede overleving - ten onrechte als hoog risico zouden zijn aangemerkt door FISH (t(4;14) en/of del(17p) en/of gain(1q)) [FISH.A].

**BIOLOGISCHE RELEVANTIE VAN GEP-'CLASSIFIERS'**

Ondanks dat genen voor de 'classifiers' werden geselecteerd op hun correlatie met overleving, en niet in de eerste plaats op hun relevante biologie, blijken er toch prominente 'pathways' naar voren te komen in een 'ontology enrichment'-analyse die samenhangen met

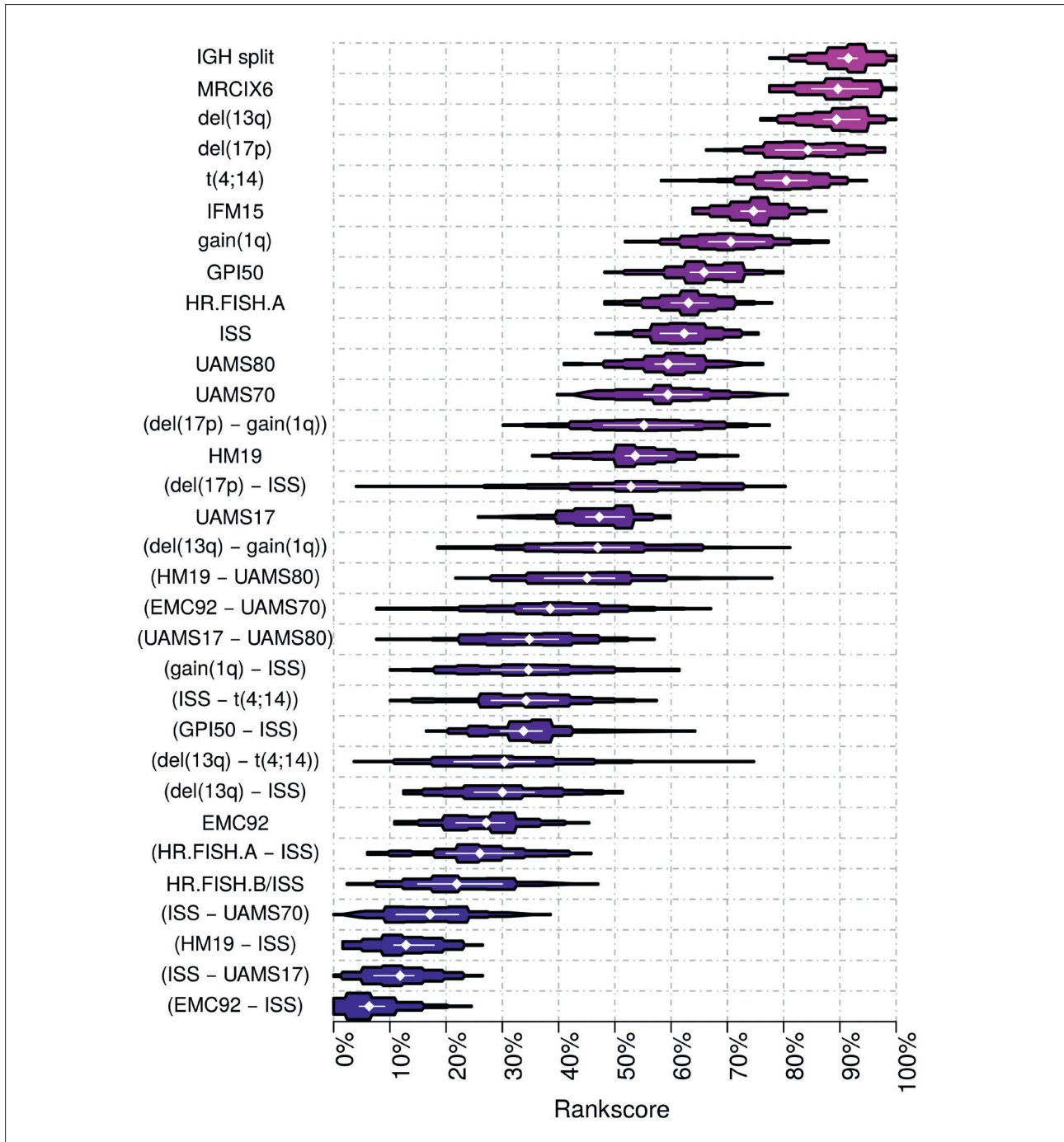


**FIGUUR 1.** Schema van de analyse, bestaande uit vier onderdelen. 1) Bevestiging van bestaande risicomarkers op alle gegevens, 2) systematische zoektocht naar nieuwe combinaties van twee bestaande markers in de trainingsgegevens, 3) validatie van de markers uit stap 2 op de validatiegegevens, 4) sorteren van de gevonden markers op prognostische kracht.

overleving.<sup>31</sup> Zo zijn in alle GEP-'classifiers' 'cell cycle-related' genen oververtegenwoordigd. Alle GEP-'classifier'-genen samen blijken significant oververtegenwoordigd ('false discovery rate' = 0,05) voor 191 biologische processen. De voornaamste processen daarin zijn 'nuclear division', 'mitosis' en 'cell division' met daarin de vertegenwoordigende genen BIRC5, BUB1 en UBE2C. Tevens vonden we 'DNA metabolic process', 'DNA packaging' en 'DNA replication' met de daartoe behorende genen *TOP2A* en *MCM2*.

## DISCUSSIE

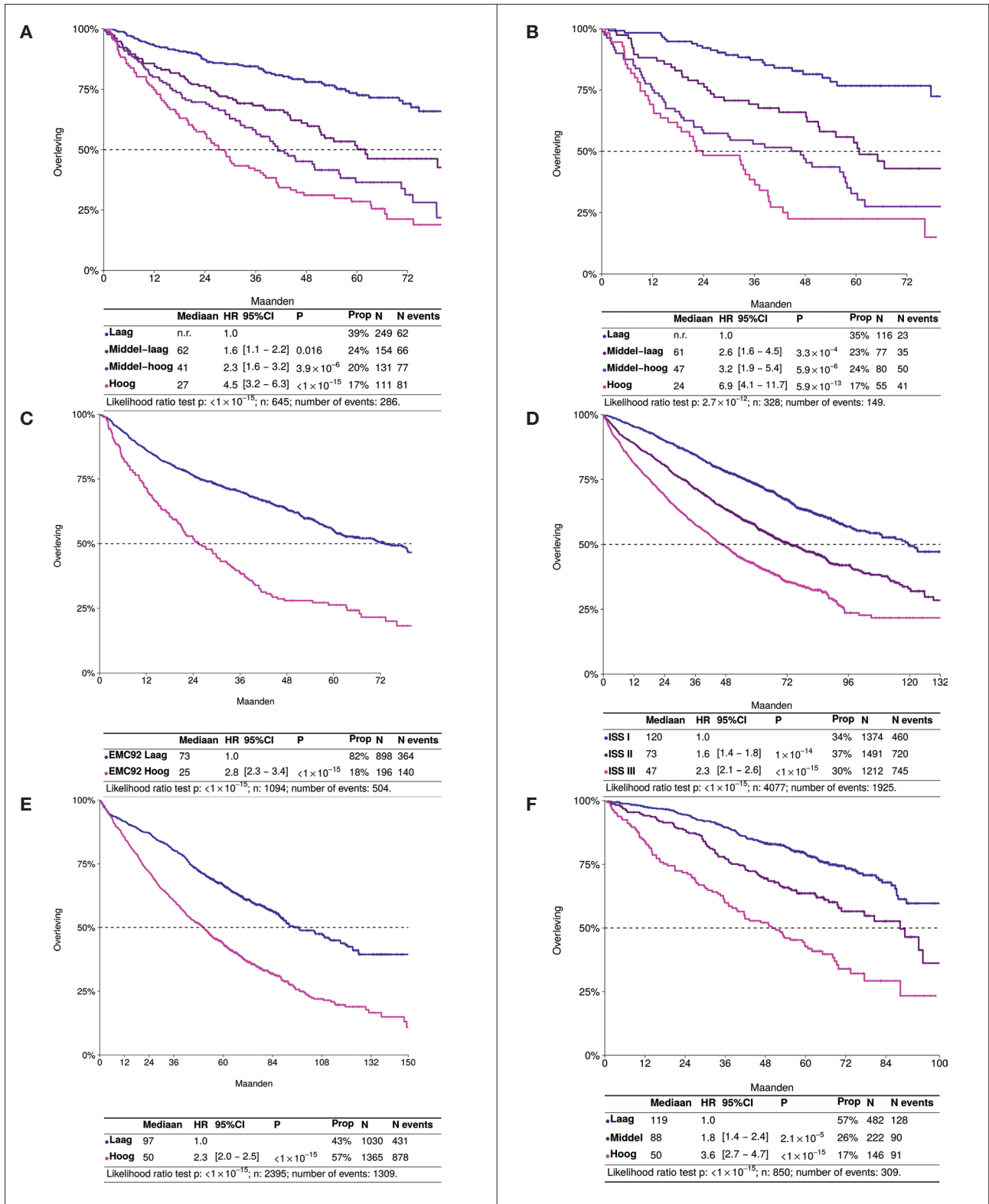
Prognostische markers voor MM zijn gebaseerd op ISS, GEP en FISH.<sup>4,9-15,32</sup> In deze studie zochten we systematisch naar de beste combinaties van prognostische markers door deze paarsgewijs te combineren. Het aantal hoogrisicopatiënten dat werd gescoord met elk van de geëvalueerde risicomarkers was opvallend constant tussen de studiecohorten, hetgeen een robuuste classificatie suggereert buiten de onderzochte patiënten. Uit deze analyse bleek dat ISS een duidelijke onafhankelijke



**FIGUUR 2.** Sortering van de bevestigde, bestaande risicomarkers en gevalideerde nieuwe risicomarkers in relatie tot totale overleving in de validatiedataset. De markers staan langs de Y-as gesorteerd op rankscore, die aangeeft hoe frequent deze marker het slechter deed dan een andere marker. De box geeft de distributie van de rankscore per marker met daarin de interquartiele range en mediaan aangegeven door de witte streep en stip.

toegevoegde waarde had in combinatie met GEP of FISH. GEP-‘classifiers’ met ISS waren de beste voorspellers voor overleving. De toegevoegde waarde van ISS in combinatie met GEP was al eerder gerapporteerd, maar in tegenstelling tot onze analyse, werd eerder geen rekening gehouden met correlaties tussen markers en

werd deze ook nooit gevalideerd in onafhankelijke validatiegegevens.<sup>33,34</sup> Ook werd duidelijk dat enkele FISH-markers, zoals t(4;14), gain(1q), del(17p) en del(13q), robuust en reproduceerbaar waren. Daarnaast bleken combinaties zoals FISH.A, FISH.B/ISS en EMC92/ISS solide prognostische waarde te hebben en superieur



**FIGUUR 3.** Overlevingsanalyse van EMC92-ISS, FISH en ISS, Kaplan-Meier-plots en Cox-regressieresultaten. Cox-regressieresultaten zijn gecorrigeerd voor verschillen in overleving tussen cohorten. **A.** EMC92-ISS in de 'discovery set'. **B.** EMC92-ISS in de validatieset. **C.** EMC92-ISS in alle gegevens. **D.** ISS in alle gegevens. **E.** HR.FISH.A in alle gegevens. **F.** HR.FISH.B/ISS in alle gegevens. Risicogroepen zijn aangegeven van laag naar hoog in kleur van blauw naar paars. Onder elke overlevingscurve staan de resultaten van het Coxmodel. Hazardratio's (HR) met 95%-betrouwbaarheidsinterval (95%-BI) en p-waarde (P) zijn relatief ten opzichte van de laagste risicogroep. Prop, N en N events zijn het percentage, het aantal patiënten en het aantal patiënten dat is overleden in de specifieke risicogroep. Daaronder telkens het resultaat van de 'likelijkheid'-ratio van de 'goodness-of-fit'-test.



**TABEL 2.** Percentage overlevende patiënten per tijdstip per EMC92-ISS-risicogroep in de validatiegegevens. Van boven naar onder: 6, 12, 24 en 72 maanden. Opeenvolgende kolommen geven de overleving in de validatiegegevens voor: alle patiënten (n=328), nieuw gediagnosticeerde patiënten jonger dan 65 jaar (n=174), nieuw gediagnosticeerde patiënten vanaf 65 jaar (n=90) en recidiefpatiënten (n=64). Voor deze laatste categorie is het 72 maandentijdstip niet beschikbaar.

6 maanden	Alle patiënten	<65 jaar	≥65 jaar	Recidief
Laag risico	98%	97%	96%	95%
Middellaag risico	96%	95%	95%	85%
Middelhoog risico	86%	93%	77%	79%
Hoog risico	84%	88%	75%	57%
<b>Totale overleving</b>	<b>92%</b>	<b>94%</b>	<b>87%</b>	<b>83%</b>
12 maanden	Alle patiënten	<65 jaar	≥65 jaar	Recidief
Laag risico	97%	97%	96%	89%
Middellaag risico	87%	93%	91%	54%
Middelhoog risico	74%	93%	73%	42%
Hoog risico	67%	72%	56%	57%
<b>Totale overleving</b>	<b>84%</b>	<b>91%</b>	<b>81%</b>	<b>60%</b>
24 maanden	Alle patiënten	<65 jaar	≥65 jaar	Recidief
Laag risico	92%	97%	92%	55%
Middellaag risico	76%	88%	73%	23%
Middelhoog risico	57%	77%	58%	24%
Hoog risico	46%	56%	31%	0%
<b>Totale overleving</b>	<b>72%</b>	<b>84%</b>	<b>67%</b>	<b>30%</b>
72 maanden	Alle patiënten	<65 jaar	≥65 jaar	Recidief
Laag risico	77%	86%	69%	-
Middellaag risico	43%	59%	32%	-
Middelhoog risico	27%	39%	28%	-
Hoog risico	22%	33%	0%	-
<b>Totale overleving</b>	<b>48%</b>	<b>62%</b>	<b>36%</b>	

te zijn aan individuele markers. De EMC92/ISS bleek in staat ook patiënten met een goede overleving te identificeren die opmerkelijk genoeg door de FISH.A-marker juist als hoog risico werden aangemerkt en was daarmee een van de meest informatieve prognostische markers. In tegenstelling tot veel gepubliceerde risicovergelijkingen,

zijn de hier vergeleken markers geïnccludeerd zonder selectie vooraf. Bovendien is getracht om iedere marker ongewogen te waarderen door niet de 'effect size' (een hazardratio heeft immers een andere betekenis voor een risicoclassificatie in twee groepen dan in drie groepen), maar de 'Akaike Information Criterion' (AIC) als maat-

## AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1 ISS in combinatie met de EMC92-genexpressie-‘classificer’ is een nieuwe klinisch bruikbare risicostratificatie voorspellend voor overleving.**
- 2 ISS en EMC92 zijn onafhankelijke additieve markers voor de prognose van multipel myeloom.**

staf te nemen. Alle vergelijkingen tussen twee markers zijn enkel gedaan als de onderliggende patiëntengroepen dezelfde waren om ongeldige vergelijkingen te voorkomen. Deze opzet heeft in belangrijke mate bijgedragen aan een objectieve vergelijking gebaseerd op grote aantallen patiënten resulterend in nieuwe inzichten. De geanalyseerde patiëntengroep omvat een heterogene populatie, zodat mag worden verwacht dat de gevonden resultaten geldigheid hebben voor de dagelijkse praktijk. Een beperking van de studie ligt in het ontbreken van LDH-metingen, hetgeen voor dit moment de vergelijking met R-ISS onmogelijk maakt. Ten slotte is het - ondanks de grote heterogeniteit in de gegevens - (nog) niet mogelijk geweest om markers te valideren voor de nieuwste middelen.

De combinatie EMC92/ISS classificeert de patiënten in vier risicogroepen, waaronder 38% laagrisico- en 17% hoogrisicopatiënten. Deze risico-indeling is onafhankelijk van behandeling: EMC92/ISS identificeerde risicogroepen bij zowel bortezomib en thalidomide als bij de meer conventionele behandelingen.<sup>9</sup> Eerder is gesuggereerd dat bortezomib en andere nieuwe middelen de PFS van een hoogrisicogroep zoals gedefinieerd door FISH zou hebben verbeterd.<sup>35</sup>

In tegenstelling tot FISH, dat net als GEP-‘classifiers’ hoogrisicopatiënten herkent, is de EMC92/ISS-combinatie vooral bruikbaar doordat ze zowel hoog- als laagrisicopatiënten identificeert. Met het beschikbaar komen van nieuwe therapeutische middelen voor MM-patiënten zal de ontdekte risicostratificatie in vier groepen steeds belangrijker worden voor de klinische toepasbaarheid. Ten eerste omdat de toegenomen zekerheid van de prognose de arts meer zekerheid geeft dan voorheen.<sup>32</sup> Ten tweede omdat risicostratificatie een belangrijke rol kan gaan spelen in risicogestuurde behandeling.

De EMC92 is doorontwikkeld tot gestandaardiseerde klinische test en maakt deel uit van de MMprofler™ als SKY92.

De hoeveelheid beenmerg en het adres waarnaartoe het materiaal kan worden verzonden, staan beschreven in het Vademecum Hematologie van het Erasmus MC. ([www.vademecumhematologie.nl/artikelen/hemato-oncologie/maligne-plasmacelziekten](http://www.vademecumhematologie.nl/artikelen/hemato-oncologie/maligne-plasmacelziekten)).

De gevonden EMC92/ISS-combinatie zal daarmee aan de basis kunnen staan van toekomstige patiëntspecifieke risicogestuurde onderzoeken.<sup>36,37</sup> We concluderen dat de combinatie EMC92 met ISS een sterke prognostische marker is voor overleving bij MM.

## REFERENTIES

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538-48.
2. Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, et al. Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood* 1993;81(12):3382-7.
3. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003;78(1):21-33.
4. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2005; 23(25):6281]. *J Clin Oncol* 2005;23(15):3412-20.
5. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, et al. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(24):13931-6.
6. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101(11):4569-75.
7. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006;108(6):2020-8.
8. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood* 2010; 116(14):2543-53.
9. Kuiper R, Broyl A, De Knecht Y, et al. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia* 2012;26(11):2406-13.
10. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007;109(6):2276-84.
11. Shaughnessy JD Jr, Qu P, Usmani S, et al. Pharmacogenomics of bortezomib

- test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3. *Blood* 2011; 118(13):3512-24.
12. Decaux O, Lodé L, Magrangeas F, et al; Intergroupe Francophone du Myélome. Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncol* 2008;26(29):4798-805.
13. Hose D, Rème T, Hielscher T, et al. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica* 2011;96(1):87-95.
14. Rème T, Hose D, Theillet C, Klein B. Modeling risk stratification in human cancer. *Bioinformatics* 2013;29(9):1149-57.
15. Dickens NJ, Walker BA, Leone PE, et al. Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. *Clin Cancer Res* 2010;16(6):1856-64.
16. Neben K, Jauch A, Bertsch U, et al. Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica* 2010;95(7):1150-7.
17. Avet-Loiseau H, Durie BG, Cavo M, et al. International Myeloma Working Group. Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia* 2013;27(3):711-7.
18. Moreau P, Cavo M, Sonneveld P, et al. Combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t(4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with front-line autologous stem-cell transplantation at high risk of early MM progression-related death. *J Clin Oncol* 2014;32(20):2173-80.
19. Broyl A, Kuiper R, Van Duin M, et al. Dutch- Belgian HOVON group; German GMMG Group. High cereblon expression is associated with better survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with thalidomide maintenance. *Blood* 2013;121(4):624-7.
20. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, et al. Longterm follow-up of MRC Myeloma IX trial: survival outcomes with bisphosphonate and thalidomide treatment. *Clin Cancer Res* 2013;19(21):6030-8.
21. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B, et al. Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* 2007;109(8):3177-88.
22. Nair B, Van Rhee F, Shaughnessy JD Jr, et al. Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with VRD maintenance. *Blood* 2010;115(21):4168-73.
23. Willeme S, Robillard N, Lodé L, et al. Intergroupe Francophone de Myélome. Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia* 2005;19(2):275-8.
24. Ross FM, Ibrahim AH, Vilain-Holmes A, et al. UK Myeloma Forum. Age has a profound effect on the incidence and significance of chromosome abnormalities in myeloma. *Leukemia* 2005;19(9):1634-42.
25. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 2010;116(15):e56-65.
26. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, et al. European Myeloma Network. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2012;97(8):1272-7.
27. Cox DR, Oakes D. Analysis of survival data. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 1984.
28. Bland JM, Altman DG. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 1995;310(6973):170.
29. Therneau TM, Grambsch PM. Modeling survival data: extending the Cox model. New York: Springer, 2000.
30. Kuiper R, Van Duin M, Van Vliet MH, et al. Prediction of high- and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System. *Blood* 2015;126(17):1996-2004.
31. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. The Gene Ontology Consortium. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 2000;25(1):25-9.
32. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, et al. International Myeloma Working Group. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28(2):269-77.
33. Waheed S, Shaughnessy JD, Van Rhee F, et al. International staging system and metaphase cytogenetic abnormalities in the era of gene expression profiling data in multiple myeloma treated with total therapy 2 and 3 protocols. *Cancer* 2011;117(5):1001-9.
34. Meissner T, Seckinger A, Rème T, et al. Gene expression profiling in multiple myeloma - reporting of entities, risk, and targets in clinical routine. *Clin Cancer Res* 2011;17(23):7240-7.
35. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, Van der Holt B, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol* 2012;30(24):2946-55.
36. Ludwig H, Sonneveld P, Davies F, et al. European perspective on multiple myeloma treatment strategies in 2014. *Oncologist* 2014;19(8):829-44.
37. Crawley C, Iacobelli S, Björkstrand B, et al. Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning. *Blood* 2007;109(8):3588-94.

ONTVANGEN 6 MAART 2017, GEACCEPTEERD 18 APRIL 2017.

ALLE Gepubliceerde artikelen kunt u vinden op onze website:

**WWW.ARIEZ.NL**

Tevens kunt u daar zoeken naar artikelen die in onze andere tijdschriften zijn gepubliceerd.