**CYTOFLUORIMETRIC CHARACTERIZATION AND ENUMERATION OF CIRCULATING MULTIPLE MYELOMA CELLS (CMMCs)**

STATE OF THE ART: Multiple myeloma (MM) is a hematological neoplasm characterized by the presence of clonal plasma cells (PC) in the bone marrow. MM is also characterized by the presence of tumor circulating cells in the peripheral blood (PB), which in the specific case of MM are defined as circulating multiple myeloma cells (CMMCs). This type of cell is already found in the early stages of the disease, up to the full-blown stage of Plasma Cell Leukemia (PCL) where at least 20% of clonal PCs are found in peripheral blood [1]. Next-generation flow (NGF) methods have also shown that a greater number of CMMCs present in the PB, even at initial stages/diagnosis, corresponds to a poor prognosis [2]. The study of CMMCs in recent years has therefore aroused much interest in monitoring the development/progression of the disease, also in terms of minimal residual disease (MRD), as well as a possible alternative as a liquid biopsy method, as 1) the collection of PB is less invasive than bone marrow and 2) there is no hemodilution, which makes the enumeration and characterization of PCs punctual [3].

AIMS OF THE STUDY: The objective of the study is to develop a protocol for the characterization and enumeration of PB CMMCs on patients with MM at diagnosis, and to follow them also in the progression of the disease, using flow cytometry. In fact, considering the guidelines suggested by the EuroFlow consortium [4] in terms of characterization of minimal residual disease (MRD) and characterization of plasma cells (PC) in general on the bone marrow, a protocol will be integrated that allows to characterize in a fine way CMMCs also in terms of percentage, with the final aim of following the course of the disease in terms of liquid biopsy.

EXPERIMENTAL PLAN AND EXPECTED RESULTS: The experimental plan includes two main tasks, as shown below:

Task 1: Collection of bone marrow and PB samples from patients diagnosed with MM. For peripheral blood, samples are also collected at least 2 follow-up points (every 3/6 months).

Total expected enrolled patients and expected samples: 10 patients (1 BM + 1 PB) x 3 points (diagnosis + 2 follow-up points) = 10 BM + 30 PB = 40 samples

Task 2: Development of an immunophenotypic characterization protocol based on flow cytometry of CMMCs, integrating guidelines for the study of MRD in flow cytometry and characterization of PC from bone marrow. In particular, the guidelines of the EuroFlow consortium will be integrated, carrying out parallel tests which include:

- Characterization of PC by flow cytometry using 2 tubes and an 8-color flow cytometer, using the following antibodies:

o CD138 - PE

o CD38 - PE-Cy

o CD45 - v500

o CD19 - APC H7

o CD56 - PerCp

o CD117 - VioBright

o CD27 - VioBlue

o CD81 - FITC

o CD20 - APC

o Kappa light chain - APC

o Lambda light chain - FITC

- Various tests will be carried out with an increasing number of events acquired, in order to have at least 1 million events acquisition, as suggested in MRD methods in flow cytometry.

**Caratterizzazione ed enumerazione citofluorimetriCA di CMMCs (Circulating Multiple Myeloma cells)**

STATO DELL’ARTE: Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia ematologica caratterizzata dalla presenza di plasmacellule clonali (PC) nel midollo osseo. Come molte altre neoplasie, il MM è caratterizzato anche dalla presenza di cellule tumorali circolanti nel sangue periferico e provenienti da distretti di residenza, che nel caso specifico del MM vengono definite CMMCs (circulating multiple myeloma cells). Questa tipologia di cellule viene riscontrata già nei primi stadi di malattia, fino allo stadio conclamato di Plasma Cell Leukemia (PCL) dove a livello del sangue periferico viene riscontrato almeno il 20% di PC clonali [1]. Metodiche di next-generation flow (NGF) hanno dimostrato, inoltre, che a un maggior numero di CMMCs presenti a livello del sangue periferico, anche a stadi iniziali/diagnosi, corrisponde una prognosi infausta [2]. Lo studio delle CMMCs negli ultimi anni ha quindi destato molto interesse per il monitoraggio dello sviluppo/progressione della malattia, anche in termini di malattia minima residua (MRD), nonché di possibile alternativa come metodica di biopsia liquida, in quanto 1) il prelievo di sangue periferico risulta meno invasivo del midollo osseo e 2) non si ha emodiluizione, che rende puntuali l’enumerazione e la caratterizzazione delle PC [3].

OBIETTIVI DELLO STUDIO: L’obiettivo dello studio è quello di mettere a punto un protocollo di caratterizzazione ed enumerazione delle CMMCs del sangue periferico su pazienti affetti da mieloma multiplo alla diagnosi, e seguirli anche nella progressione della malattia, utilizzando metodiche di immunofenotipizzazione utilizzando la citofluorimetria a flusso. Tenendo conto infatti delle linee guida suggerite dal consorzio EuroFlow [4] in termini di caratterizzazione della malattia minima residua (MRD) e di caratterizzazione delle plasma cellule (PC) in generale sul midollo osseo, si integrerà un protocollo che permetta di caratterizzare in modo fine le CMMCs anche in termini percentuali, con lo scopo finale di seguire l’andamento della malattia in termini di cellule tumorali circolanti presenti nel sangue periferico.

Piano sperimentale E RISULTATI ATTESI: Il piano esperimentale prevede due task principali, come di seguito enunciate:

Task 1: Raccolta di campioni di midollo osseo e sangue periferico di pazienti con diagnosi di mieloma multiplo. Per il sangue periferico è prevista la raccolta di campioni anche ad almeno 2 punti di follow-up (ogni 3/6 mesi).

Totale di pazienti arruolati previsti e di campioni attesi: 10 pazienti (1 BM + 1 PB) x 3 punti (esordio/diagnosi + 2 punti di follow-up) = 10 BM + 30 PB = 40 campioni

Task 2: Messa a punto di un protocollo di caratterizzazione immunofenotipica basata su citofluorimetria a flusso di CMMCs, integrando linee guida per lo studio della MRD in citofluorimetria e caratterizzazione di PC da midollo osseo. In particolare, si andranno a integrare le linee guida del consorzio EuroFlow, eseguendo prove parallele che prevedono:

* Caratterizzazione di PC tramite citofluorimetria a flusso con utilizzo di 2 tubi e un citofluorimetro a 8 colori, utilizzando i seguenti anticorpi:
	+ CD138 - PE
	+ CD38 – PE-Cy
	+ CD45 – v500
	+ CD19 – APC H7
	+ CD56 - PerCp
	+ CD117 - VioBright
	+ CD27 - VioBlue
	+ CD81 - FITC
	+ CD20 - APC
	+ Catena leggera Kappa - APC
	+ Catena leggera Lambda - FITC
* Verranno effettuate diverse prove con numero crescente di eventi acquisito, per avere almeno acquisizione di 1 milione di eventi, come suggerito in metodiche di MRD in citofluorimetria.

Bibliografia:

1. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment; Michael Tveden Gundesen, et al; Current Oncology Reports 2019
2. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma; J Flores-Montero et al; Leukemia 2017
3. Comprehensive characterization of circulating bone marrow-derived multiple myeloma cells at minimal residual disease; Waldschmidt JM et al; Semin Hematol. 2018
4. https://euroflow.org/