Sviluppo di un metodo standardizzato per lo studio del riarrangiamento clonale della catena pesante delle immunoglobuline in pazienti affetti da mieloma multiplo

BACKGROUND

Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia ematologica complessa ed eterogenea caratterizzata dalla proliferazione clonale di plasmacellule maligne nel midollo osseo. Secondo tumore del sangue più comune, il MM colpisce prevalentemente gli anziani e presenta sfide significative nella diagnosi e nella gestione a causa della sua variabilità genetica e delle diverse manifestazioni cliniche. Questo tipo di tumore ha inizio da un tipo specifico di globulo bianco, la plasmacellula, che deriva dalle cellule B del midollo osseo. Le plasmacellule normalmente producono anticorpi che aiutano l'organismo a combattere le infezioni, ma nel MM queste cellule proliferano in modo incontrollato e producono una proteina monoclonale anomala, o proteina M, che può portare a una vasta gamma di complicazioni, tra cui lesioni ossee, insufficienza renale, anemia e ipercalcemia.

Un aspetto critico della gestione del MM è il monitoraggio accurato della malattia minima residua (*Minimal Residual Disease*, MRD), che si riferisce al piccolo numero di cellule tumorali che rimangono dopo il trattamento, non rilevabili con i metodi convenzionali. La capacità di rilevare accuratamente queste cellule residue è fondamentale perché, nonostante il raggiungimento della remissione completa, la maggior parte dei pazienti affetti da MM va incontro a una ricaduta. Ciò rende la valutazione della MRD un aspetto indispensabile per valutare l'efficacia a lungo termine dei regimi terapeutici, soprattutto in un panorama terapeutico in rapida evoluzione, caratterizzato dall'introduzione di nuove terapie, come anticorpi monoclonali, terapie cellulari CAR-T e inibitori del proteasoma.

Tuttavia, gli attuali metodi di rilevamento della MRD mancano di standardizzazione, il che porta a incongruenze tra i diversi centri clinici e complica lo sviluppo di strategie terapeutiche universalmente accettate. Una delle sfide principali nella valutazione della MRD è la difficoltà di identificare le sequenze clonotipiche, ovvero le sequenze uniche di DNA presenti in tutte le plasmacellule cancerose di un determinato paziente. I protocolli esistenti, come quello offerto dal saggio LymphoTrack Dx e dal relativo software bioinformatico Invivoscribe, sono tra i pochi che offrono criteri per l'identificazione del clonotipo, ma non sempre sono sufficienti. Questi metodi spesso si basano molto sul giudizio di esperti per distinguere tra popolazioni clonali dominanti e popolazioni sub-clonali minori, che possono coesistere all'interno di un paziente. Questo

affidamento a un processo decisionale soggettivo può portare a una significativa variabilità dei risultati della MRD, rendendo difficile stabilire chiari parametri di riferimento prognostici tra diversi studi e popolazioni di pazienti.

SCOPO DEL PROGETTO

Questo progetto ha lo scopo di validare l'efficacia di un metodo standardizzato per l'identificazione della sequenza clonotipica. Facendo utilizzo di linguaggi di programmazione, come R, le candidate sequenze clonotipiche saranno valutate sulla base di un indice statistico ideato affinché quelle che meglio soddisfano i requisiti richiesti siano associate ad un punteggio più alto. L'indice sarà poi utilizzato all'interno di un foglio di calcolo preimpostato che, inseriti i parametri, produrrà il punteggio per ciascuna sequenze, al fine di distinguere in maniera standardizzata tra le popolazioni clonali e sub-clonali. L'obiettivo finale è quello di sviluppare una strategia diagnostica innovativa basata sull'analisi di biopsie liquide. Questa strategia mira a stratificare precocemente i pazienti con mieloma multiplo (MM) di nuova diagnosi, caratterizzati da un alto rischio di complicanze ossee, tenendo conto della presenza di eterogeneità spaziale

PIANO SPERIMENTALE

Lo studio inizierà con l'inclusione di 50 pazienti di nuova diagnosi, per i quali è sarà identificata la sequenza clonotipica utilizzando metodi tradizionali. Questa fase iniziale consentirà di confrontare i risultati previsti in base all'indice con le conclusioni degli esperti del settore. Successivamente, la valutazione della sequenza clonotipica verrà eseguita analizzando i dati disponibili relativi alla prima rilevazione della malattia minima residua, spostandosi così dalla fase di esordio alla fase di "follow-up" della malattia. Le sequenze clonotipiche candidate saranno estratte dai report finali generati dal software bioinformatico LymphoTrack Dx.

Nel dettaglio, il piano sperimentale sarà così strutturato:

1. Preimpostazione di un foglio di calcolo che, inseriti i parametri richiesti, proceda con il calcolo dell'indice per ciascuna sequenza.
2. Confronto tra le sequenze individuate come clonotipo sulla base dell'indice più alto con le sequenze selezionate dagli esperti, con conseguente approfondimento nei casi di discordanza.

3. Creazione di un sottogruppo di pazienti, individuando coloro per cui è già stata effettuata almeno una rilevazione di malattia minima residua e valutazione del clonotipo.
4. Integrazione del metodo standardizzato con i risultati relativi alla caratterizzazione dell'eterogeneità spaziale.

RISULTATI ATTESI

Si prevede di ottenere i seguenti risultati:

MESI 1-3: Foglio di calcolo funzionante che calcola il punteggio clonotipico e confronto tra i clonotipi identificati dall'indice e quelli selezionati dagli esperti, con analisi dei casi discordanti.

MESI 4-12: Identificazione delle sequenze clonotipiche dominanti e confronto tra le fasi di esordio e follow-up, con potenziale sviluppo di parametri prognostici per il monitoraggio della MRD, e successiva integrazione dei risultati per la caratterizzazione dell'eterogeneità spaziale.

BIBLIOGRAFIA

1. Langerhorst, P., Brinkman, A. B., Vanduijn, M. M., Wessels, H. J. C. T., Groenen, P. J. T. A., Joosten, I., van Gool, A. J., Gloerich, J., Scheijen, B., & Jacobs, J. F. M. (2021). *Clonotypic Features of Rearranged Immunoglobulin Genes Yield Personalized Biomarkers for Minimal Residual Disease Monitoring in Multiple Myeloma*. *Clinical Chemistry*, 67(6), pp. 867–875.
2. Medina-Herrera, A., Sarasquete, M. E., Jiménez, C., Puig, N., & García-Sanz, R. (2023). *Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: Past, Present, and Future*. *Cancers*, 15(14). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
3. Paiva, B., San-Miguel, J., Hervé, H., & Avet-Loiseau, H. (2022). *MRD in multiple myeloma: does CR really matter?*. *Blood*, 140(23), pp. 2423-2428.
4. Paiva, B., van Dongen, J. J. M., & Orfao, A. (2015). *New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma*. *Blood*, 125(20), pp. 3059-3068.