

Impiego di un pannello NGS per la caratterizzazione e definizione di caratteri associati alla lungo sopravvivenza in pazienti con Mieloma Multiplo

INTRODUZIONE

Il Mieloma Multiplo (MM) è una malattia linfoproliferativa rara che rappresenta l'1% dei tumori e il 10% dei tumori ematologici ed è caratterizzata dall'espressione aberrante di plasmacellule nel midollo osseo.

Il MM è preceduto da una fase preneoplastica, la gammopatia monoclonale di significato incerto (MGUS), da uno stadio indolente, lo smoldering (SMM) e da una fase terminale caratterizzata dall'*escape* delle plasmacellule che, dal midollo osseo invadono il sangue periferico e aree extramidollari, con possibili lesioni ossee che riguardano principalmente colonna vertebrale, bacino e costole. Quando le plasmacellule si accumulano nel tessuto osseo possono formare piccole masse chiamate plasmocitomi.

Nel caso di un sospetto di malattia, il medico prescrive esami del sangue e delle urine che mettono in evidenza alterazioni come l'anemia, l'ipercalcemia e l'insufficienza renale. Vengono inoltre prescritti una radiografia dello scheletro, una risonanza magnetica nucleare (RMN) o una tomografia assiale computerizzata (TAC), l'esecuzione di una tomografia a emissione di positroni (PET) e una biopsia del midollo per valutare il numero di plasmacellule presenti.

Più recentemente viene valutata anche la percentuale di infiltrazione midollare di plasmacellule, ovvero il rapporto tra le catene leggere libere circolanti kappa e lambda.

Il Mieloma Multiplo è una patologia che insorge in età avanzata e la mediana di sopravvivenza è di circa 6-7 anni.

Nonostante i successi della terapia di ultima generazione, il MM ha un andamento clinico altalenante, in cui fasi di risposta alla terapia si alternano con fasi di ripresa della malattia. Questa particolare dinamica è dovuta all'evoluzione del clone che tende ad adattarsi all'ambiente e i cloni selezionati devono essere in grado di resistere alla terapia farmacologica e ad espandersi ulteriormente. La comprensione di questo meccanismo evolutivo è fondamentale per definire nuovi schemi di terapia del MM.

L'impegno della ricerca si concentra sullo sviluppo di terapie in grado di prolungare i periodi di remissione e sulla riduzione delle recidive. Infatti, rendere meno frequenti queste recidive ha un effetto sul miglioramento della qualità della vita dei pazienti.

Nonostante la disponibilità di nuovi farmaci e di protocolli terapeutici efficaci il MM resta ancora una patologia difficile da trattare.

Nella pratica clinica quotidiana, la caratterizzazione genomica del clone tumorale alla diagnosi e alla ricaduta è fondamentale per identificare fattori prognostici che permettano di stratificare i pazienti in base al rischio e per valutare eventuali dinamiche di evoluzione clonale.

Ad oggi, la stratificazione del rischio nel MM è basata su esami clinici e citogenetici effettuati tramite la tecnica FISH, che però in alcuni casi risulta poco esauriente.

Pertanto, nel contesto di una medicina moderna sarebbe più efficace effettuare la stratificazione del rischio su caratteristiche genomiche.

L'avvento delle tecnologie NGS ha aumentato esponenzialmente la quantità di dati disponibili e, nel caso specifico del MM, rappresenta una chiave importante per definirne il rischio clinico. Quindi sarebbe auspicabile impiegare la tecnologia NGS da affiancare alla FISH nella routine diagnostica di questa patologia, con l'obiettivo di avere una migliore caratterizzazione genomica del paziente e poter adoperare delle terapie appropriate nell'ottica di una medicina personalizzata. Infatti, oggi la tecnologia NGS ha dato già ottimi risultati in questo senso e l'interesse nello sviluppare protocolli specifici per la caratterizzazione genomica dei pazienti è sempre crescente.

SCOPO DEL PROGETTO

Il progetto proposto si inserisce nel contesto dello studio "*Impact of different treatment strategies on clonal evolution in Multiple Myeloma*" (RF-2016-02362532) e si propone come studio retrospettivo di analisi e caratterizzazione da un punto di vista genomico di una coorte di pazienti all'esordio che siano lungo sopravvissuti (> 5 anni) e in remissione completa (CR). Tale

popolazione, viene confrontata con una popolazione normale di MM (i cui dati sono disponibili in repository pubbliche) in modo da identificare caratteri prognostici che possano essere tipici di una remissione del paziente. Nei casi ricaduti dopo l'ottenimento di una CR, verranno inoltre studiate le dinamiche di evoluzione clonale valutando il profilo genomico del clone che caratterizza la fase di ricaduta.

PIANO SPERIMENTALE

Il progetto si propone come studio retrospettivo il cui obiettivo è quello di analizzare il profilo genomico (in termini di mutazioni, traslocazioni e variazione del numero di copie) di 70 pazienti all'esordio della malattia che ad oggi risultano in CR da almeno 5 anni e che quindi non abbiano avuto un evento di ricaduta o non siano deceduti. Nel caso di ricaduta in corso di studio, dopo l'ottenimento di una CR, verranno inoltre studiate le dinamiche di evoluzione clonale valutando il profilo genomico del clone che caratterizza la fase di ricaduta.

L'analisi del profilo genomico verrà effettuata con un pannello NGS (denominato "AIO - *All In One-panel*") ideato e sviluppato nel laboratorio di Biologia Molecolare dell'Istituto Seràgnoli di Bologna. Tale pannello è in grado di individuare le alterazioni genomiche (CNA, SNV e i riarrangiamenti cromosomici IgH) che tipicamente caratterizzano il MM. Ciò viene fatto con un unico esperimento in modo da minimizzare costi e tempo. Il pannello, inoltre, è stato ideato per riconoscere 83 geni che da letteratura è noto che siano significativamente mutati nel MM. Ad esempio, con l'AIO Panel è possibile riconoscere oncogeni o tumor suppressor come: CD19, CD27, CD38, ATR, ATM, BRAF, HIST1H1B, MYC, MYD88, NRAS, STAT3, TP53.

Lo studio, che si svolgerà nell'arco di 1 anno si svilupperà come segue:

- 1) *creazione di una lista di 70 pazienti che siano in linea con i criteri scelti per l'analisi: ovvero lungo-sopravvissuti in CR da almeno 5 anni e di cui si ha materiale CD138+ relativo al loro esordio in malattia;*
- 2) *analisi del profilo genomico dei pazienti mediante l'uso del pannello NGS di cui sopra: creazione delle library con protocollo "Nextera Flex for Enrichment with RNA Probes" e sequenziamento con tecnologia MiSeq Illumina;*
- 3) *analisi bioinformatica dei dati: verranno adoperate pipeline specifiche per il riconoscimento delle mutazioni, traslocazioni e Copy Number Alteration;*
- 4) *analisi statistica: comparazione dei risultati ottenuti dall'analisi della coorte di pazienti presi in esame con una popolazione normale di mieloma, con lo scopo di individuare alterazioni genomiche che possano correlare con una migliore prognosi del paziente;*
- 5) *nel caso di ricaduta in corso di studio, dopo l'ottenimento di una CR, sarà rivalutato il profilo genomico del clone che caratterizza la fase di ricaduta.*

BIBLIOGRAFIA

- Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2014;5:2997. doi: 10.1038/ncomms3997
- Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, Munshi N, Palumbo A, Miguel JS, Sonneveld P, Cavo M, Usmani S, Durie BG, Avet-Loiseau H; International Myeloma Working Group. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia.* 2014 Feb;28(2):269-77. doi: 10.1038/leu.2013.247
- Jones JR, Weinhold N, Ashby C, Walker BA, Wardell C, et al. Clonal evolution in myeloma: the impact of maintenance lenalidomide and depth of response on the genetics and sub-clonal structure of relapsed disease in uniformly treated newly diagnosed patients. *Haematologica.* 2019 Jul;104(7):1440-1450. doi: 10.3324/haematol.2018.202200

- Romano A, Palumbo GA, Parrinello NL, Conticello C, Martello M, Terragna C. Minimal Residual Disease Assessment Within the Bone Marrow of Multiple Myeloma: A Review of Caveats, Clinical Significance and Future Perspectives. *Front Oncol.* 2019 Aug 20;9:699. doi: 10.3389/fonc.2019.00699
- Bolli N, Genuardi E, Ziccheddu B, Martello M, Oliva S, Terragna C. Next-Generation Sequencing for Clinical Management of Multiple Myeloma: Ready for Prime Time? *Front Oncol.* 2020 Feb 25;10:189. doi: 10.3389/fonc.2020.00189