

“Caratterizzazione molecolare ad alta risoluzione mediante *SNPs array* di pazienti con Mieloma Multiplo trattati in prima linea con nuovi farmaci”

Relazione scientifica dell’attività svolta

proponente: dott.ssa Carolina Terragna

Istituto di Ematologia “L-A-Seràgnoli” – Via Massarenti, 9 – 40138 Bologna

Azienda Ospedaliero-Universitaria Sant’Orsola Malpighi

1. Introduzione e scopo dello studio

Il Mieloma Multiplo (MM) è una malattia caratterizzata da un alto livello di eterogeneità genomica, che è la conseguenza di un processo evolutivo già attivo nelle fasi pre-neoplastiche della malattia. Alcune alterazioni sono prevalenti rispetto ad altre e l’impiego di tecniche di citogenetica convenzionale e molecolare (FISH) ne consente l’identificazione routinaria nei pazienti di nuova diagnosi. Questo ha permesso nel tempo di attribuire un significato prognostico alla presenza delle diverse alterazioni genomiche e di stratificare i pazienti in sottogruppi caratterizzati da un decorso clinico diverso.

La stratificazione dei pazienti su base citogenetica è molto importante dal punto di vista clinico per identificare i pazienti a prognosi più sfavorevole e disegnare strategie terapeutiche sempre più efficaci per la cura della malattia, specifiche per le diverse categorie di pazienti. Tuttavia, il solo impiego di metodiche citogenetiche come la FISH limita l’analisi ad un numero finito di alterazioni genomiche, riducendo la possibilità di identificare correttamente le diverse categorie di rischio e soprattutto di descrivere il meccanismo biologico che potrebbe spiegare i diversi fenotipi clinici dei pazienti.

Il presente progetto era stato disegnato allo scopo di caratterizzare in maniera profonda ed estesa il genoma di pazienti con MM di nuova diagnosi, trattati in maniera omogenea nel contesto di uno studio clinico, utilizzando una metodica di cariotipizzazione molecolare ad alta risoluzione (*SNPs array*). L’obiettivo era quello di contribuire ad ottenere una più corretta stratificazione dei pazienti su base molecolare e possibilmente identificare nuovi fattori prognostici associati alla risposta alla terapia e/o al decorso clinico dei pazienti. Obiettivo secondario era inoltre quello di proporre una metodica di valutazione del profilo genomico dei pazienti con MM che integrasse tecnologie ad alta risoluzione e tecnologie di citogenetica molecolare, per una valutazione completa del panorama genomico dei pazienti analizzati.

2. Disegno sperimentale

La fase di raccolta del materiale biologico e di esecuzione della metodica *SNPs array*, che era già stata iniziata prima della presentazione del presente progetto di ricerca, è stata eseguita per un totale di 300 pazienti, e completata nel periodo precedente all’erogazione del finanziamento. Durante i 12 mesi di

finanziamento è stata eseguita **l'analisi dei dati molecolari** ottenuti da tutti i pazienti, secondo il seguente piano sperimentale:

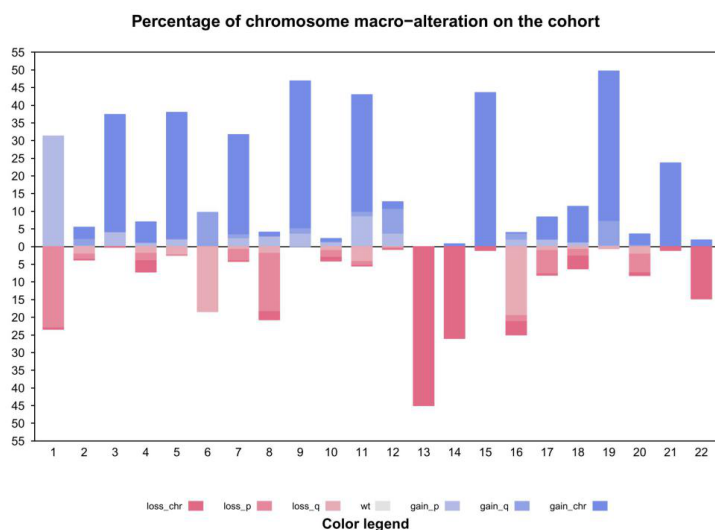
- descrizione del profilo genomico di tutti i pazienti inseriti nello studio, in termini di alterazioni cromosomiche numeriche (Copy Number Alterations, CNAs)
- identificazione di sottogruppi di pazienti con profili genomici simili
- correlazioni tra la presenza di un particolare profilo genomico, in termini di CNAs, e il decorso clinico della malattia
- definizione di uno “*score* di rischio” basato su CNAs
- in un subset di pazienti, confronto della potenzialità delle metodiche FISH e SNPs array nella definizione delle CNAs.

3. Risultati ottenuti

I risultati prodotti nell'ambito di questo progetto di ricerca sono stati integrati in un sotto-studio biologico del protocollo europeo di fase III EMN02 (EMN02_HOVON95), disegnato con l'obiettivo di confrontare la terapia di consolidamento con Bortezomib, Melphalan e Prednisone verso il trapianto di cellule staminali autologhe, in cui entrambi i bracci erano preceduti da una terapia di induzione con Bortezomib, Ciclofosfamide e Desametasone. L'obiettivo del sotto-studio era quello di definire (nuovi) fattori prognostici associati al decorso clinico dei pazienti.

I principali risultati ottenuti sono i seguenti:

- Descrizione del profilo genomico. Il dato grezzo di SNPs array è stato analizzato con l'obiettivo di identificare alterazioni prevalenti nell'intera casistica di pazienti. A questo scopo, si è scelto di utilizzare un approccio “gene-specifico”: sono state valutate le CNAs di ogni gene rappresentato sullo SNPs array, ottenendo il profilo di CNAs di ca. 20,000 geni per ciascun paziente analizzato. Il profilo genomico dell'intera casistica di pazienti analizzati è riassunta nella figura 1.



b. Identificazione di sottogruppi di pazienti con profilo genomico simile. L'analisi delle CNAs prevalenti nella casistica analizzata ha messo in evidenza l'esistenza di 4 alterazioni (iperdiploidia dei cromosomi dispari, amplificazione 1q, delezione 13q, traslocazioni coinvolgenti il locus della catena pesante delle immunoglobuline, IgH, rilevate mediante FISH) che sono le più ricorrenti nella popolazione, con frequenze simili tra loro (intorno al 40-50% per ognuna di esse). La co-segregazione di queste quattro alterazioni è risultata in grado di descrivere l'intera casistica di pazienti analizzati, che quindi possono essere portatori di una, due, tre o quattro di queste alterazioni, combinate tra loro. La figura 2 mostra la co-segregazione di queste quattro alterazioni e delle altre alterazioni meno frequentemente osservate nella casistica analizzata. Le correlazioni più significative sono risultate le seguenti:

- amplificazione 1q e delezione 13q (correlazione diretta)
- delezione cromosomi 13 e 14 (correlazione diretta)
- iperdiploidie dei cromosomi dispari e traslocazioni IgH (correlazione inversa)

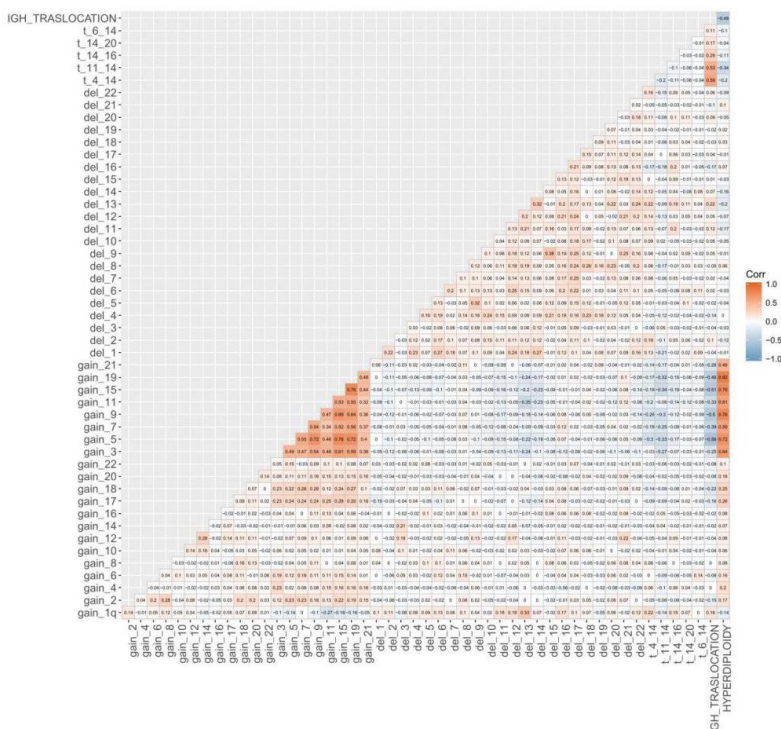


Figura 2

Per valutare il contributo dato dalle diverse alterazioni osservate alla variabilità rilevata nella casistica di pazienti analizzati, è stata eseguita una Principal Component Analysis (PCA) su tutte le CNAs di tutti i pazienti inseriti nello studio, con l'obiettivo di identificare le alterazioni più informative nel descrivere la variabilità genomica tipica del MM. La figura 3 descrive il risultato della PCA eseguita su tutte le alterazioni osservate: lungo l'asse delle y è possibile osservare una

chiara divisione tra due sottopopolazioni di pazienti, caratterizzate rispettivamente da traslocazioni IgH e iperdiploidia dei cromosomi dispari; tuttavia solo il 10% di della variabilità totale del *data set* può essere spiegato lungo questa componente, mentre una quota maggiore di variabilità (30%) viene spiegata lungo una seconda componente (descritta lungo l'asse delle x), identificando così due ulteriori sottogruppi di pazienti, caratterizzati o meno dalla presenza contemporanea di amplificazione 1q e delezione 13q. Quindi oltre alle due classi di pazienti già note, caratterizzate dalla presenza di iperdiploidia dei cromosomi dispari e traslocazioni IgH, è stato possibile identificare una nuova classe di pazienti, caratterizzata dalla presenza contemporanea di amplificazione 1q e delezione 13q.

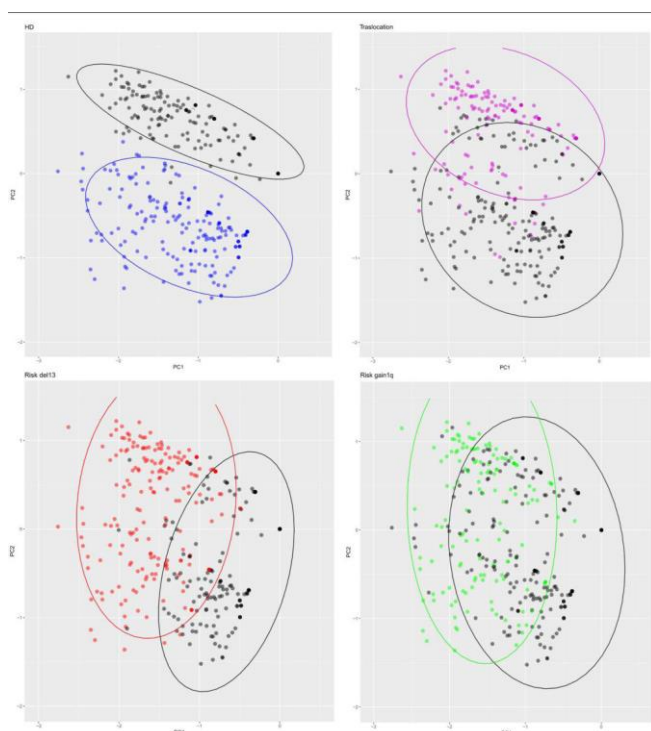


Figura 3

- c. Correlazioni cliniche. Per valutare il significato clinico della presenza contemporanea di amplificazione 1q e delezione 13q, è stata eseguita una analisi di sopravvivenza dei pazienti stratificati in base alla presenza di queste due alterazioni, identificando così tre sottogruppi di pazienti: quelli portatori di entrambe le alterazioni, quelli portatori di almeno una delle due alterazioni, quelli privi di entrambe le alterazioni. L'analisi univariata della sopravvivenza libera da progressione (PFS) e della sopravvivenza globale (OS) è mostrata nella figura 4, e ha dimostrato che la presenza contemporanea di amplificazione 1q e delezione 13q conferisce un rischio di progressione e di morte significativamente superiore all'assenza di almeno una o entrambe queste alterazioni.

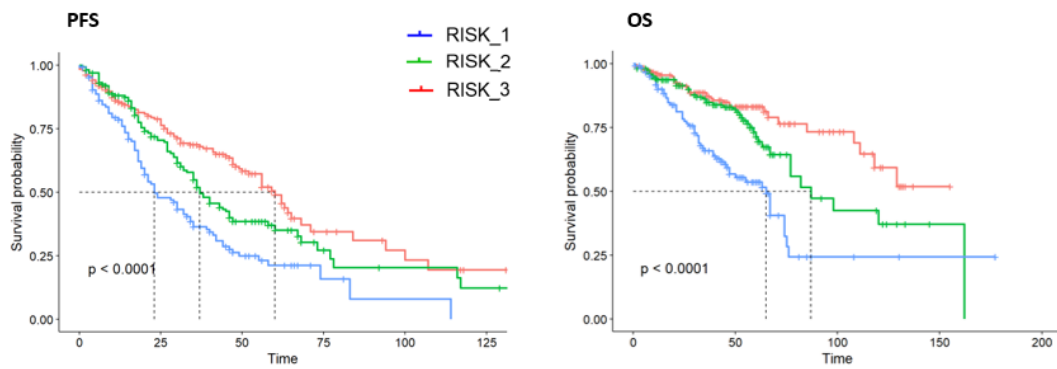


Figura 4

In un modello di Cox di analisi multivariata, la co-presenza di queste alterazioni risulta indipendente da altri fattori prognostici noti nel MM (delezione 17p, traslocazione 4;14, delezione 1p, traslocazioni 14;16 e 14;20), come pure dal tipo di trattamento eseguito dai pazienti (chemioterapia ad alte dosi e trapianto, oppure terapia continua con farmaci di nuova generazione) (tabella 1).

Treatment	As treated	Intention to treat
HDM-1	65 (26,3%)	71 (28,7%)
HDM-2	80 (32,4%)	81 (32,8%)
VMP	76 (30,8%)	92 (37,2%)
protocol dropouts - not treated	26 (10,5%)	3 (1,2%)
	247	247

Tabella 1

- d. Definizione di uno score di rischio. Per ottenere una stratificazione ottimale dei pazienti con MM, la letteratura descrive la messa a punto di classificatori, basati essenzialmente su dati genomici, in grado di stratificare i pazienti in categorie di rischio di progressione e/o di morte. Utilizzando i risultati genomici ottenuti in questo studio e integrandoli con alcuni dati clinici (descrittivi di alcune caratteristiche basali dei pazienti, riassunte nel cosiddetto International Staging System, ISS), abbiamo quindi definito un nuovo **score di rischio**, come mostrato nella tabella 2.

	MM	ISS
UHR	1	III
	1	II
IR	1	I
	2	III
	2	II
	2	I
	3	III
	3	II
FR	3	I

Tabella 2

In questo modo siamo stati in grado di definire tre categorie di pazienti con sopravvivenze libere da malattia e globali significativamente diverse tra loro. In particolare, abbiamo identificato una categoria di pazienti (circa il 20% dell'intera popolazione) con un *Hazard Ratio* molto protettivo, caratterizzati dall'assenza delle alterazioni genomiche amplificazione 1q e delezione 13q e con ISS1 (figura 5).

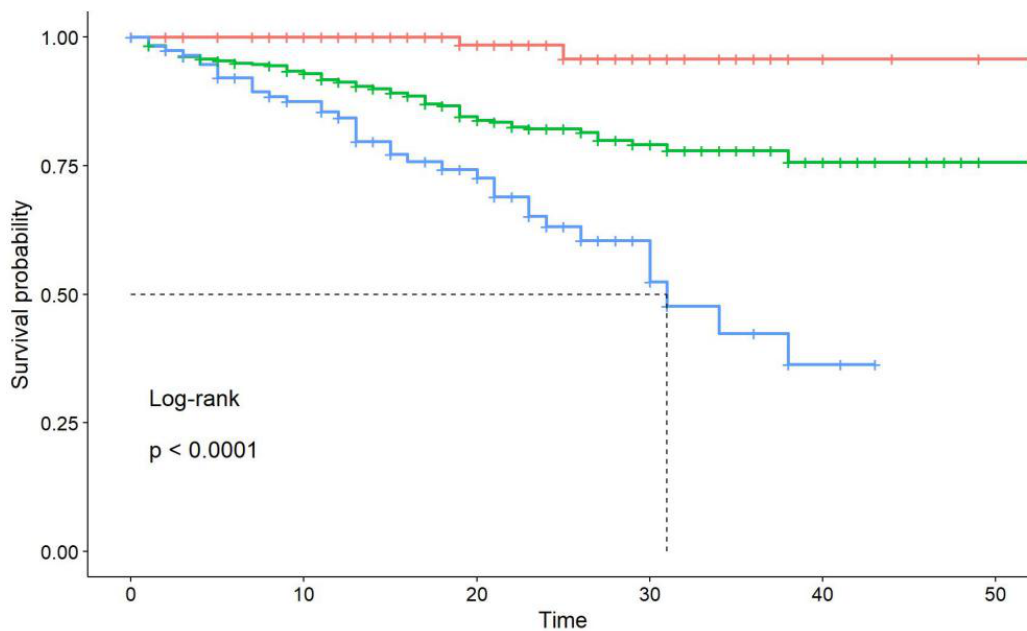


Figura 5

- e. Confronto FISH e SNPs. Con l'obiettivo di attribuire alla metodica SNPs array una valenza diagnostica, in un sub-set di pazienti abbiamo eseguito un confronto delle due metodiche utilizzate per la definizione delle alterazioni genomiche (quella tradizionale, FISH, e quella genomica SNPs array). Lo scopo di questo confronto era quello di validare la metodica SNPs array rispetto alla metodica attualmente di riferimento per la diagnostica molecolare nel MM. I

risultati del confronto sono riassunti nella tabella 3 e dimostrano che l'impiego di una metodica genomica (SNPs array) consente di ottenere informazioni sovrapponibili a quelle che si ottengono con la metodica FISH.

	FISH	SNP (CN)	CONCORDANZA
TP53 LOSS	7/64	7/64	100%
CKS1B GAIN	24/64	24/64	
RB1 LOSS	34/64	34/64	
CDKN2C LOSS	9/64	9/64	

Tabella 3

Tuttavia, l'impiego di una metodica genomica ha il vantaggio di riuscire ad analizzare tutte le regioni cromosomiche possibilmente coinvolte nella progressione del MM e di riuscire ad identificare eventi genomici che la FISH non riesce a rilevare (es. cromotripsì), e che potrebbero avere un significato prognostico rilevante, come mostrato nella figura 6.

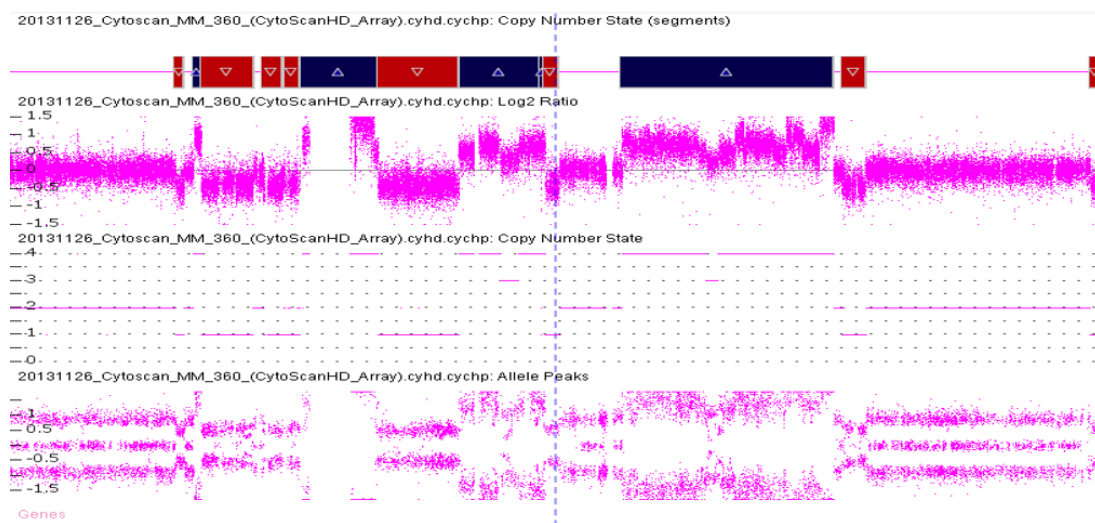


Figura 6

4. Conclusioni

- L'analisi del profilo genomico dei pazienti inseriti nello studio mediante SNPs array ha mostrato che tutti i pazienti con MM di nuova diagnosi sono portatori di CNAs e che ciascun paziente ha un profilo genomico privato, caratterizzato da alterazioni ricorrenti anche in altri pazienti e da alterazioni molto più rare. In generale, i pazienti con MM già all'esordio di malattia presentano una eterogeneità genomica molto elevata.
- Tra tutte le alterazioni genomiche descritte nei pazienti con MM, 4 risultano più frequenti delle altre e con frequenze simili tra loro. La co-segregazione di queste 4 alterazioni è in grado di

riassumendo tutta la variabilità osservata nei pazienti analizzati. I pazienti possono essere stratificati in tre sottogruppi, caratterizzati rispettivamente dalla presenza di traslocazioni IgH, di iperdiploidia dei cromosomi dispari e dalla presenza contemporanea di amplificazione 1q e delezione 13q.

- c. La presenza contemporanea di amplificazione 1q e delezione 13q correla con PFS e OS significativamente inferiore, rispetto all'assenza di entrambe le alterazioni. Il significato prognostico sfavorevole di queste due alterazioni è indipendente da quello da attribuirsi alla presenza di altre alterazioni genomiche, già note per la correlazione con decorso clinico avverso (delezione 17p, traslocazioni 4;14, 14;16, 14;20).
- d. L'integrazione di dati clinici e dati genomici ha consentito di definire uno score di rischio molto efficace, in grado di identificare già alla diagnosi tre categorie di pazienti: una a rischio molto basso (ca. 20% della popolazione), una a rischio molto elevato e una a rischio intermedio. L'impiego di questo score di rischio potrebbe contribuire ad una corretta stratificazione dei pazienti alla diagnosi, per l'eventuale definizione di terapie mirate per le diverse categorie di pazienti.
- e. Il confronto della metodica tradizionale (FISH) con la metodica genomica (SNPs array) suggerisce che quest'ultima potrebbe efficacemente sostituire anche in diagnostica quella convenzionale per la descrizione delle alterazioni numeriche, con un notevole risparmio di tempo e denaro e l'ottenimento di una quantità di dati maggiore, in grado di definire meglio il panorama genomico dei pazienti analizzati.