Italiano

Il DNA tumorale circolante è un biomarcatore prognostico nel linfoma di Hodgkin classico.

Primo rapporto scientifico

A. Riassunto del progetto

L'identificazione dei pazienti con linfoma di Hodgkin classico (cHL) ad alto rischio alla diagnosi è importante per ottimizzare le possibilità di cura in un approccio teraputico sempre più personalizzato. Il cHL è una malattia fenotipicamente eterogenea che comprende sottotipi definiti anche dalla morfologia e dallo stato di EBV. La scarsità di cellule maligne nelle biopsie e la necessità del loro arricchimento prima del sequenziamento hanno limitato la dimensione del campione degli studi genomici del cHL e di conseguenza la granularità della sua caratterizzazione molecolare. Diversi studi hanno confermato che il DNA tumorale circolante (ctDNA) rispecchia il profilo genetico delle cellule maligne del cHL. Sfruttando il ctDNA e le scansioni PET/CT raccolte durante lo studio osservazionale prospettico IOSI-EMA003 (NCT03280394), abbiamo individuato il carico di ctDNA pre-trattamento come un forte fattore prognostico nel cHL e abbiamo caratterizzato le mutazioni del cHL su larga scala e identificato le firme genetiche associate all'outcome. Le domande del progetto sono: i) il carico di ctDNA pre-trattamento è una misura quantificabile e priva di radiazioni del carico del cHL, dell'infiammazione o di entrambi; ii) se il carico di ctDNA pre-trattamento può essere validato come biomarcatore prognostico del cHL; e iii) se i cluster molecolari del cHL sono biologicamente plausibili.

B. Contesto

Un bisogno medico insoddisfatto nel cHL è l'identificazione precoce e accurata dei pazienti che sono candidati all'intensificazione del trattamento per massimizzare le possibilità di cura, nonché dei pazienti che sono candidati alla de-escalation del trattamento che potrebbe portare a meno complicazioni a breve e lungo termine della chemio-radioterapia. L'*international prognostic score* è l'indice di stratificazione del rischio più ampiamente utilizzato nel linfoma di Hodgkin avanzato, ma ha una sensibilità e una specificità limitate[1]. L'identificazione dei pazienti con malattia ad alto rischio alla diagnosi è importante come la rilevazione precoce della chemio-refrattarietà per scegliere la corretta intensità della terapia e ottimizzare le possibilità di cura in un approccio più personalizzato. La misura del volume tumorale metabolico (MTV) tramite PET/CT fornisce una valutazione quantificabile del carico tumorale e sta ora subendo una convalida prospettica come biomarcatore prognostico [2].

Il linfoma classico di Hodgkin è una malattia fenotipicamente eterogenea. La rarità delle cellule neoplastiche nella biopsia impone notevoli ostacoli tecnici che hanno finora limitato gli studi genomici nel linfoma Hodgkin classico (cHL) [3-5]. Tali ostacoli tecnici sono stati superati grazie all'uso del DNA libero da cellule (cfDNA) come fonte di DNA tumorale del linfoma classico (cHL)[6].

Il progetto qui proposto vorrebbe affrontare le seguenti domande:

1. ***Il carico di ctDNA al pre-trattamento può essere considerato come misura quantificabile e priva di radiazioni del carico di cHL, dell'infiammazione o di entrambi?***
2. ***Il carico di ctDNA pre-trattamento è un biomarcatore prognostico convalidato di cHL?***
3. ***I cluster Heavy ASHM e Lite ASHM sono sottotipi biologicamente plausibili di cHL??***

C. Risultati preliminari

Task 1-2. Nominare il carico di ctDNA pre-trattamento come misura quantificabile e priva di radiazioni del carico di cHL, dell'infiammazione o di entrambi e convalidare il carico di ctDNA pre-trattamento come biomarcatore prognostico di cHL

Ci siamo chiesti se il ctDNA pre-trattamento sia un biomarcatore che identifica i pazienti ad alto rischio più accuratamente delle caratteristiche clinico-radiologiche pre-trattamento. Poiché il carico di ctDNA correla con il volume del cancro e il suo rilascio nella circolazione è proporzionale alla gravità dell'infiammazione[7], abbiamo ipotizzato che il carico di ctDNA pre-trattamento possa essere un parametro di misura delle diverse caratteristiche prognostiche di cHL. Coerentemente, i livelli di ctDNA pre-trattamento erano fortemente associati a caratteristiche cliniche di infiammazione sistemica (ad esempio, sintomi B ed ESR elevati) e correlati al carico della malattia (ad esempio, TMTV e TLG) (Figura 1).

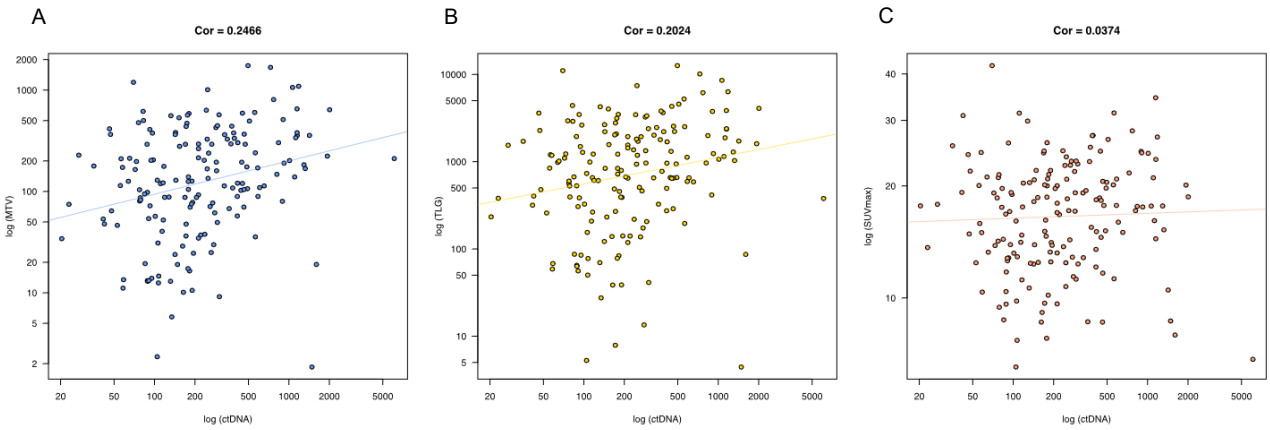

Figura 1. Correlatione tra ctDNA e PET-CT biomarkers in patient con cHL. Lo Scatterplot mostra la relazione tra cariro di ctDNA e (A) TMTV, (B) TLG, e (C) SUV max. Le linee adattate mostrano la linea di regressione lineare adattata..

Per fornire prove solide che il carico basale di ctDNA è un biomarcatore prognostico del cHL, abbiamo diviso il dataset di analisi completo in coorti interne di *training* e di validazione utilizzando una procedura di campionamento casuale (Tabella 1). La dimensione del campione della coorte di training è stata calcolata per rilevare differenze del 10% nella sopravvivenza libera da progressione (PFS) a tre anni quando una variabile è presente in >5% dei pazienti.

Baseline characteristics and treatment of patients of the IOSI-EMA003 cohort						
	All patients (N=215)		Training cohort (N=97)		Validation cohort (N=88)	
Median age (Range)	39 years	16-84	38	17-75	40	17-84
Sex						
Male	110	51%	49	51%	46	52%
Female	105	49%	48	49%	42	48%
B symptoms						
Yes	104	48%	46	47%	46	52%
No	111	52%	51	53%	42	48%
Extranodal involvement						
Yes	80	37%	80	37%	80	37%
No	135	63%	135	63%	135	63%
Bulky						
Yes	52	24%	24	25%	23	26%
No	163	76%	73	75%	65	74%
Epstein-Barr virus						
Positive	31	15%	16	17%	13	15%
Negative	138	64%	68	70%	60	68%
Missing	46	21%	13	13%	15	17%
GHSG stage						
Early	19	9%	5	5%	6	7%
Intermediate	67	31%	33	34%	27	31%
Advanced	129	60%	59	61%	55	62%
Histology						
Nodular sclerosis	161	75%	76	79%	67	76%
Lymphocyte-rich	8	4%	3	3%	1	1%
Mixed cellularity	24	11%	8	8%	12	14%
Lymphocyte-depleted	3	1%	1	1%	1	1%
Not otherwise specified	19	9%	9	9%	7	8%
ABVD	125	58%	67	31%	58	66%
Unplanned radiotherapy	23	**11%**	7	7%	14	16%
Interim PET/CT driven treatment	17	8%	7	7%	10	11%

Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti

Nella coorte di *training* i livelli di ctDNA pre-trattamento sono correlati in modo inverso con la PFS con una soglia ottimizzata di 650 hGE/mL di plasma. Utilizzando questa soglia, i pazienti con alti livelli di ctDNA pre-trattamento hanno avuto tassi significativamente inferiori di PFS a 3 anni rispetto a quelli con bassi livelli (Figura 3A). Nell'analisi multivariata, i livelli di ctDNA pre-trattamento sono rimasti prognostici per la PFS confrontati con la stadiazione clinica o la TMTV. Per confermare la riproducibilità di questi risultati, abbiamo valutato l'effetto del carico di ctDNA pre-trattamento nella coorte di validazione (Figura 3B). I pazienti con livelli di ctDNA pre-trattamento ≥ 650 hGE/mL di plasma hanno avuto PFS a 3 anni inferiore rispetto ai pazienti con livelli di ctDNA più bassi, in linea con quello osservato nella coorte di *training*. La capacità di discriminazione del ctDNA pre-trattamento per la PFS (c-index: 0,62) era superiore a quella della stadiazione clinica (c-index: 0,54) e ha separato la PFS a 3 anni nei pazienti con cHL di stadio intermedio e avanzato (Figura 3C, 3D).

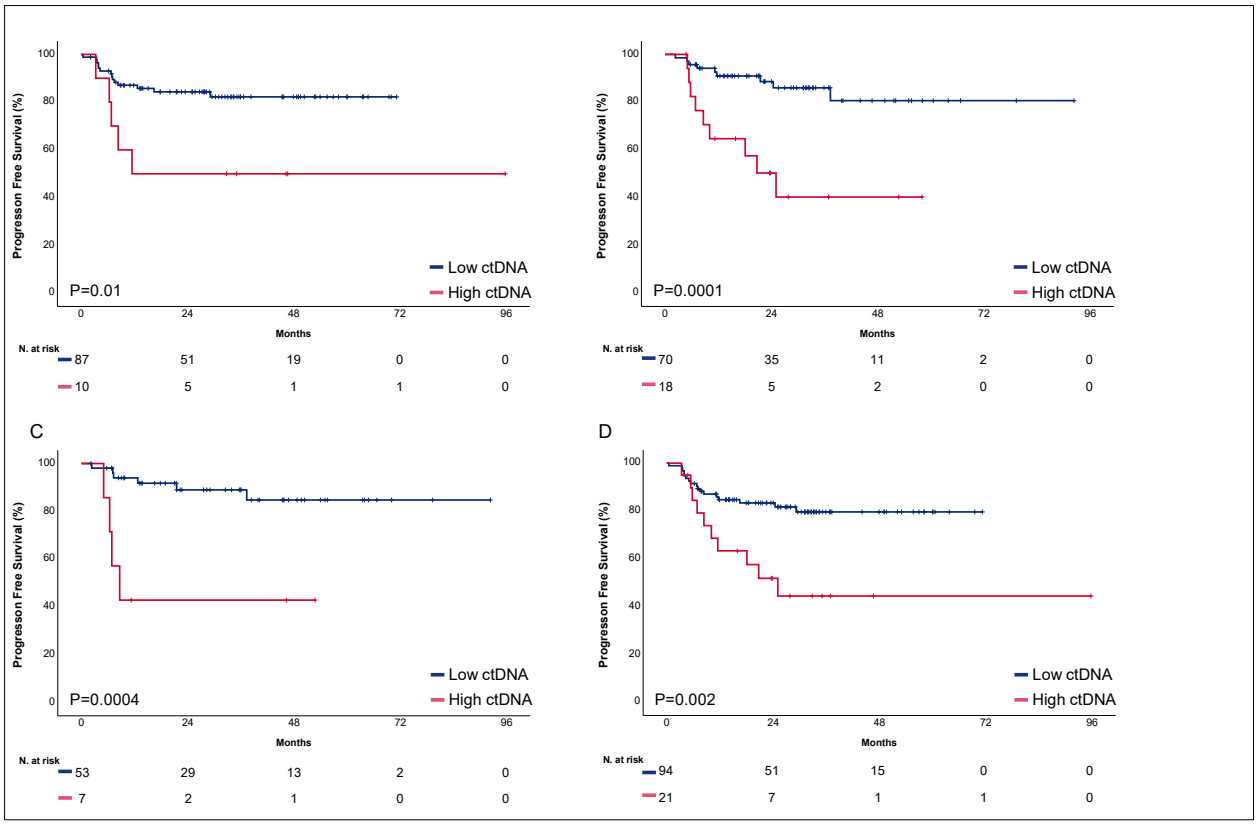

Figura 3. Il carico di ctDNA stratifica la sopravvivenza libera da progressione (PFS) nei pazienti affetti da cHL naïve al trattamamento trattati con chemioterapia +/- radioterapia. (**A**) PFS stratificata in base al carico di ctDNA pre-trattamento (alto ctDNA ≥650 hGE/mL di plasma; basso ctDNA <650 hGE/mL di plasma) nella coorte di addestramento (basso ctDNA, N=87; PFS a 3 anni 82,2%, IC 95% 73,6-90,8; alto ctDNA, N=10, PFS a 3 anni 50,0%, IC 95% 19,1-80,9, p log-rank=0,01). (B) PFS stratificata in base al carico di ctDNA pre-trattamento (alto ctDNA ≥650 hGE/mL di plasma; basso ctDNA <650 hGE/mL di plasma) nella coorte di convalida (basso ctDNA, N=70; PFS a 3 anni 86,0%, IC 95% 76,6-95,4; alto ctDNA, N=18, PFS a 3 anni 40,3%, IC 95% 14,0-66,6, p log-rank=0,0001). (C) PFS stratificata in base al carico di ctDNA pre-trattamento (alto ctDNA ≥650 hGE/mL di plasma; basso ctDNA <650 hGE/mL di plasma) in pazienti affetti da cHL in stadio intermedio (basso ctDNA, N=53; PFS a 3 anni 89,0%, IC 95% 90,0-98,0; alto ctDNA, N=7, PFS a 3 anni 42,9%, IC 95% 6,9-78,9, p log-rank=0,0004). (D) PFS stratificata in base al carico di ctDNA pre-trattamento (alto ctDNA ≥650 hGE/mL di plasma; basso ctDNA <650 hGE/mL di plasma) in pazienti affetti da cHL in stadio avanzato (basso ctDNA, N=94; PFS a 3 anni 79,6%, IC 95% 70,6-88,6; alto ctDNA, N=21, PFS a 3 anni 44,4%, IC 95% 20,7-68,1, p log-rank=0,002).

A differenza di altri linfomi a cellule B[8], le mutazioni genetiche individuali non sono state associate alla PFS nella cHL.

Collettivamente, questi dati indicano che il carico di ctDNA è il biomarcatore prognostico più forte della cHL.

D. Piano del progetto

Dopo il completamento delle prime due attività, la seconda parte del progetto procederà ad affrontare la terza e ultima attività:

Task 3. Testare la plausibilità biologica dei cluster Heavy ASHM e Lite ASHM

Compileremo le coorti di *training* e di validazione (totale: 255 pazienti) per migliorare la robustezza della clusterizzazione molecolare e la potenza delle statistiche, che a loro volta potrebbero rivelare altri sottogruppi genetici più piccoli che non possono essere risolti solo con 118 casi. Affronteremo molteplici compiti per affrontare gli aspetti della biologia e dell'eterogeneità del cHL al fine di correlarli con i cluster molecolari e convalidare i cluster molecolari a livello biologico, compresi:

i. analisi del frammentoma di ctDNA, ovvero la distribuzione delle dimensioni e la frequenza dei frammenti di ctDNA in tutto il genoma, poiché il frammentoma di ctDNA è un rappresentazione delle caratteristiche della cromatina del tumore;
ii. inferenza del carico di neoantigeni
iii. revisione delle biopsie diagnostiche delle coorti di *training* e di validazione per valutare il sottotipo istologico di cHL e lo stato di EBV;
iv. profilare l'espressione di 1402 geni nelle biopsie diagnostiche concentrandosi sulle interazioni tumore/immunità per ricostruire virtualmente il microambiente tumorale utilizzando HTG EdgeSeq Precision Immuno-Oncology (HTG-PIO);
v. ricostruire precisamente il microambiente tumorale mediante scRNA-seq di cellule congelate e vitali dalla biopsia diagnostica di 4 casi appartenenti al cluster Heavy ASHM e 4 casi appartenenti al cluster Lite ASHM;
vi. misurare le citochine nei campioni di plasma basale tramite l'Human Cytokine/Chemokine 71-Plex Discovery Assay..

E. Dettagli del progetto

Tempistiche del progetto

	Primo anno		**Secondo anno**	
	Primo + Secondo Trimestre	**Terzo + Quarto Trimestre**	**Primo + Secondo Trimestre**	**Terzo + Quarto Trimestre**
Task 1				
Task 2				
Task 3				

F. Referenze

1 Russell J, Collins A, Fowler A et al. Advanced Hodgkin lymphoma in the East of England: a 10-year comparative analysis of outcomes for real-world patients treated with ABVD or escalated-BEACOPP, aged less than 60 years, compared with 5-year extended follow-up from the RATHL trial. Ann Hematol 2021; 100 (4): 1049-1058.

2 Frood R, Burton C, Tsoumpas C et al. Baseline PET/CT imaging parameters for prediction of treatment outcome in Hodgkin and diffuse large B cell lymphoma: a systematic review. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2021; 48 (10): 3198-3220.

3 Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Blood 2015; 125 (7): 1061-1072.

4 Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. Blood 2018; 131 (22): 2454-2465.

5 Wienand K, Chapuy B, Stewart C et al. Genomic analyses of flow-sorted Hodgkin Reed-Sternberg cells reveal complementary mechanisms of immune evasion. Blood Adv 2019; 3 (23): 4065-4080.

6 Spina V, Bruscaggin A, Cuccaro A et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. Blood 2018; 131 (22): 2413-2425.

7 Pirosa MC, Borchmann S, Jardin F et al. Controversies in the Interpretation of Liquid Biopsy Data in Lymphoma. Hemasphere 2022; 6 (6): e727.

8 Mansouri L, Thorvaldsdottir B, Laidou S et al. Precision diagnostics in lymphomas - Recent developments and future directions. Semin Cancer Biol 2022; 84: 170-183.