

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA**

Ciclo 33

Settore Concorsuale: 06/D3 – MALATTIE DEL SANGUE, ONCOLOGIA E REUMATOLOGIA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 – MALATTIE DEL SANGUE

**MIELOMA MULTIPLO: IDENTIFICAZIONE DI FATTORI PROGNOSTICI,
BIOMARCATORI DI RISPOSTA ALLA TERAPIA, EVOLUZIONE
CLONALE E DI TERAPIE INNOVATIVE E PERSONALIZZATE**

Presentata da: Katia Mancuso

Coordinatore Dottorato

Manuela Ferracin

Supervisore

Michele Cavo

Esame finale anno 2021

Sommario

1. INTRODUZIONE	5
2. IL MIELOMA MULTIPLO	6
2.1 EPIDEMIOLOGIA	6
2.2 STORIA NATURALE E CRITERI DIAGNOSTICI	6
2.3 MIELOMAGENESI	8
2.3.1 MICROAMBIENTE MIDOLLARE E CITOCHINE	9
2.3.2 ANGIOGENESI	10
2.3.3 IL DANNO OSSEO	12
3. PRESENTAZIONE CLINICA, METODICHE DIAGNOSTICHE E FATTORI PROGNOSTICI	14
3.1 MANIFESTAZIONI CLINICHE	14
3.2 METODOLOGIE DIAGNOSTICHE	15
3.3 STADIAZIONE	17
3.4 RUOLO PROGNOSTICO DI CITOGENETICA ED ESPRESSIONE GENICA	20
4. TERAPIA	23
4.1 I NUOVI FARMACI	24
4.1.1 AGENTI IMMUNOMODULATORI	24
4.1.2 INIBITORI DEL PROTEASOMA	27
4.1.3 ANTICORPI MONOCLONALI	28
4.1.4 INIBITORI DELL'ISTONE DE-ACETILASI	29
4.1.5 CHECK-POINT INHIBITORS	29
4.1.6 INIBITORI DI BCL-2	30
4.1.7 INIBITORI DELL'ESPORTINA	30
4.2 TERAPIA NEL PAZIENTE CON MM DI NUOVA DIAGNOSI	30
4.2.1 TERAPIA DI PRIMA LINEA NEL PAZIENTE CANDIDATO AL TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI	31
4.2.1.1 REGIMI DI INDUZIONE	35
4.2.1.2 MOBILIZZAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE E REGIMI DI CONDIZIONAMENTO	38
4.2.1.3 TERAPIA DI CONSOLIDAMENTO	38
4.2.1.4 TERAPIA DI MANTENIMENTO	39
4.2.2 TERAPIA DI PRIMA LINEA NEL PAZIENTE NON CANDIDATO AL TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI	41
4.3 TERAPIA DEI PAZIENTI CON MIELOMA MULTIPLO RICADUTO/REFRATTARIO	44
5. SIGNIFICATO DELLO STUDIO	49
5.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO	50
5.2 PAZIENTI E METODI	51
5.2.1 ELEGGIBILITA' ALLO STUDIO	51
5.2.2 DESCRIZIONE DELLO STUDIO	52
5.2.3 CRITERI DI VALUTAZIONE DI RISPOSTA ALLA TERAPIA	55
5.2.4 ANALISI CITOGENETICO-MOLECOLARE	56
5.2.5 ANALISI STATISTICA	56
5.3 RISULTATI	57
5.3.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI	57

5.3.2 CONFRONTO ASCT versus VMP (R1)	59
5.3.3 CONFRONTO SINGOLO versus TANDEM ASCT	63
5.3.4 TERAPIA DI CONSOLIDAMENTO (R2) E MANTENIMENTO	70
5.3.5 TERAPIE SUCCESSIVE E OUTCOME A LUNGO TERMINE	71
5.4 TOSSICITÀ	72
5.5 DISCUSSIONE	74
6. BIBLIOGRAFIA	79

1. INTRODUZIONE

Per molti anni la strategia terapeutica del Mieloma Multiplo (MM) è stata finalizzata al contenimento della taglia neoplastica attraverso l'impiego di un ristretto numero di farmaci, primi tra tutti gli agenti alchilanti in associazione ai corticosteroidi, con una sopravvivenza mediana dell'intera popolazione non superiore ai 3 anni dalla diagnosi.

Al fine di superare la chemioresistenza e di ottenere un prolungamento della sopravvivenza, a partire dalla dagli anni '90 è stata introdotta nella pratica clinica la chemioterapia ad alte dosi con successivo supporto di cellule staminali ematopoietiche (ASCT), divenuto lo *standard of care* nella terapia di prima linea dei pazienti giovani. A questa era di successi terapeutici ha fatto seguito, nelle ultime due decadi, l'ulteriore arricchimento dell'armamentario terapeutico del MM grazie all'introduzione di nuovi farmaci, attivi nei confronti del clone neoplastico e del microambiente midollare. Esempi paradigmatici di questa nuova classe di agenti sono i farmaci immunomodulanti, gli inibitori del proteasoma e gli anticorpi monoclonali.

L'impiego dei nuovi farmaci come terapia di induzione prima, e come terapia di consolidamento e mantenimento dopo trapianto autologo ha consentito di incrementare significativamente la percentuale di remissioni complete e di prolungare la sopravvivenza dei pazienti.

Gli altrettanto significativi avanzamenti terapeutici ottenuti con i nuovi farmaci nei pazienti non candidabili al trapianto autologo, hanno aperto l'interrogativo se l'impiego esclusivo dei nuovi farmaci, senza l'uso *up-front* dell'ASCT, consenta di raggiungere gli stessi risultati nella terapia dei pazienti giovani con MM di nuova diagnosi (NDMM).

In questo contesto, sono stati pertanto disegnati studi randomizzati volti a comparare prospetticamente ASCT e schemi di terapia contenenti i nuovi farmaci.

L'European Myeloma Network ha proposto il trial clinico multicentrico, prospettico, di fase III EMN02/HO95 MM, coordinato principalmente dall'Istituto di Ematologia "Seràgnoli" di Bologna. Lo studio, che ha visto la partecipazione di oltre 1500 pazienti, ha comparato l'efficacia della terapia di intensificazione con Bortezomib, Melphalan e Prednisone (VMP) rispetto a chemioterapia ad alte dosi di Melphalan (HDM) e successivo ASCT nei pazienti di età ≤ 65 anni affetti da NDMM. In aggiunta, essendo ancora molto dibattuto l'impiego sistematico della terapia di consolidamento con nuovi farmaci, nel trial EMN02/HO95 è stato indagato il ruolo di un consolidamento con Bortezomib, Lenalidomide e Desametasone (VRD) rispetto a nessun consolidamento. Inoltre, è stata confrontata l'efficacia del singolo versus il doppio ASCT.

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è quello di identificare le migliori strategie terapeutiche e i possibili fattori prognostici predittivi di *outcome* nel contesto della popolazione di pazienti arruolati nel trial EMN02/HO95. Nel presente elaborato saranno riportati i dati relativi all'analisi finale dello

studio, in particolare per quanto concerne il confronto dell'efficacia, in termini di PFS e OS, di VMP rispetto a HDM con successivo ASCT e del singolo ASCT rispetto al tandem ASCT, sia nella popolazione generale sia in subsets di pazienti con specifici fattori prognostici clinici e genetici. Inoltre, relativamente alla comparazione ASCT versus VMP, verranno riportati i risultati degli *outcomes* a lungo termine, ottenuti con un follow-up più prolungato dei pazienti.

2. IL MIELOMA MULTIPLO

Il Mieloma Multiplo (MM) è una patologia neoplastica caratterizzata dalla proliferazione e dall'accumulo nel midollo osseo di linfociti B e plasmacellule che sintetizzano immunoglobuline monoclonali, complete o incomplete (componente monoclonale (CM)), rilevabili nel siero e/o nelle urine (1).

2.1 EPIDEMIOLOGIA

In Italia, il MM rappresenta l'1,3% di tutti i tumori diagnosticati nella donna e l'1,2% nell'uomo, con un'incidenza di 9,5 casi/100.000 per anno nell'uomo e di 8,1 casi/100.000 per anno nella donna e costituisce circa il 10% delle neoplasie ematologiche. Esso rappresenta una patologia tipica dell'adulto-anziano: l'età mediana alla diagnosi è di 68 anni, il 2% dei pazienti ha un'età inferiore a 40 anni, il 38% ha un'età superiore a 70 anni (2) (3).

Secondo i dati epidemiologici riportati dall'AIRTUM (Associazione Italiana Registro Tumori), l'incidenza globale nel 2015 è rimasta stabile (8 casi per 100.000 abitanti) con una Overall Survival (OS) del 76% a un anno e del 42% a cinque anni. L'etnia afroamericana presenta un'incidenza da due a tre volte superiore rispetto a quella dell'etnia caucasica.

L'eziologia del MM non è tuttora nota. È stata osservata dal punto di vista epidemiologico una possibile correlazione con l'esposizione ad agenti tossici ambientali e/o professionali (es. radiazioni ionizzanti, pesticidi, derivati del petrolio); sono stati inoltre descritti *clusters* familiari di malattia, secondari evidentemente alla presenza di comuni caratteristiche genetico-molecolari predisponenti, ma non esiste una vera e propria ereditarietà della patologia (4) (5).

2.2 STORIA NATURALE E CRITERI DIAGNOSTICI

La storia naturale del MM può essere rappresentata da un modello di sviluppo multistep, caratterizzato da una fase pre-maligna asintomatica chiamata gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS), che può progredire verso la forma di Mieloma Multiplo Smouldering o asintomatico

(SMM), fino allo sviluppo di MM intra o extra-midollare sintomatico o verso la forma di leucemia plasmacellulare (6).

In circa un terzo dei pazienti il MM è preceduto dal riscontro occasionale di una **MGUS**, clinicamente silente e laboratoristicamente caratterizzata dalla presenza di una modesta componente monoclonale, per lo più sierica. La MGUS è presente in circa in oltre il 4% degli individui di età superiore ai 50 anni, nel 5% degli individui di età superiore a 70 anni e nel 7,5% degli individui di età superiore a 80 anni (7). Il tasso di progressione dell'MGUS a MM è pari a circa 1% annuo e si mantiene costante nel tempo. I principali fattori associati a un maggior rischio di progressione sono: CM > 1.5 g/dl e il pattern evolutivo, l'isotipo della CM (non IgG), la percentuale ed il fenotipo clonale delle plasmacellule midollari e l'alterazione del rapporto delle catene leggere libere nel siero (sFLC) (8) (9).

Lo stadio clinico intermedio tra la MGUS e il MM è il **MM asintomatico o Smouldering** (SMM), caratterizzato da una più elevata quota di plasmacellule neoplastiche e quantità di componente monoclonale, in assenza tuttavia di danno d'organo. Nel SMM il rischio di progressione a MM attivo è maggiore rispetto all'MGUS, ed è pari a circa il 10% annuo nei primi 5 anni dopo la diagnosi (10). Anche in questo caso vi sono fattori associati ad un significativo rischio di progressione: CM sierica > 3 g/dl, isotipo IgA, immunoparesi (soppressione di una o più Ig non coinvolta), pattern evolutivo (aumento $\geq 25\%$ della CM sierica o delle catene leggere libere a 6 mesi dal precedente controllo), alterazioni citogenetiche ad alto rischio, plasmocitosi midollare del 50-60%, "pattern diffuso" o presenza di una lesione focale alla risonanza magnetica (RMN) e lesioni captanti alla PET-TC senza evidenza di lesioni osteolitiche sottostanti (11) (12).

La diagnosi di **Mieloma Multiplo attivo** si basa sui criteri diagnostici revisionati dall'IMWG nel 2014 e riportati nella Tabella 1 (13).

Le novità sostanziali dei criteri diagnostici del 2014 sono rappresentate dall'introduzione dei tre biomarcatori di malignità, indicativi di imminente rischio di sviluppo di danno d'organo (stimato del 70-90% a due anni per singolo fattore) e da una migliore definizione dei criteri CRAB. Infatti, per ciò che concerne i criteri CRAB è stata precisata la definizione di insufficienza renale attraverso l'aggiunta del valore di clearance della creatinina < 40/ml accanto al valore di creatininemia > 2 mg/dl e inoltre nella valutazione delle lesioni ossee, sono state aggiunte alla radiografia convenzionale la tomografia computerizzata (TC) e la tomografia ad emissione di positroni (PET-TC).

Tabella 1: Criteri IMWG per la diagnosi delle discrasie plasmacellulari

MGUS
1. Componente monoclonale sierica < 30 g/L 2. Plasmacellule clonali midollari < 10% 3. Assenza di danno d'organo secondo i criteri CRAB
MIELOMA MULTIPLO SMOULDERING
1. Componente monoclonale sierica ≥ 30 g/L o urinaria ≥ 500 mg/24h 2. Plasmacellule midollari ≥ 10% e < 60% 3. Assenza di Myeloma Defining Events
MIELOMA MULTIPLO
1. Plasmacellule midollari ≥ 10% e/o presenza di plasmocitoma confermato istologicamente 2. Presenza di uno o più dei seguenti Myeloma Defining Events (MDE): <ul style="list-style-type: none"> ▪ Evidenza di disfunzione d'organo correlata al MM (criteri CRAB): <ul style="list-style-type: none"> - [C] calcio: calcemia > 11 mg/dl o superiore ai valori normali - [R] rene: clearance creatinina < 40 ml/min o creatinina sierica > 2 mg/dl - [A] anemia (Hb < 10 g/dl o 2 g < normale) - [B] bone: 1 o più lesioni osteolitiche identificate ad Rx scheletro, TC o PET/TC ▪ Uno o più dei seguenti biomarcatori di malignità: <ul style="list-style-type: none"> - Plasmacellule midollari ≥ 60% - sFLC ratio (<i>involved/uninvolved</i>) > 100 - > 1 lesione focale alla Risonanza Magnetica (diametro almeno 5 mm)

2.3 MIELOMAGENESI

Il MM è una neoplasia monoclonale della B linfocitopoiesi che può svilupparsi attraverso differenti fasi: una fase inattiva, in cui le cellule tumorali sono plasmacellule mature non proliferanti; una fase attiva, con una piccola percentuale ($\leq 1\%$) di plasmablasti proliferanti; ed una fase fulminante, che si caratterizza per un incremento dei plasmablasti e per la disseminazione extramidollare della malattia (14). La trasformazione neoplastica delle plasmacellule nel MM è un processo le cui tappe patogenetiche non sono ancora completamente chiarite. Tuttavia, negli anni passati sono stati fatti dei progressi nell'identificazione di alcuni suoi punti chiave.

In condizioni normali, le cellule deputate alla B linfocitopoiesi vanno incontro ad un riarrangiamento di diversi segmenti genici delle sequenze V ("regione variabile"), D ("regione della diversità") e J ("regione della ricongiunzione – *joining*") dei geni codificanti per le catene pesanti (IgH) e delle sequenze V e J dei geni codificanti per le catene leggere (IgL) delle immunoglobuline – processo pertanto definito "ricombinazione V(D)J". Risultato è la formazione di cellule B *naïve* esprimenti Ig di superficie, le quali dal midollo osseo trasmigreranno agli organi linfoidei secondari, dove si realizzerà l'incontro con l'antigene. Il destino dei linfociti B potrà dunque essere duplice: da una parte, quello di differenziare, all'interno di foci extrafollicolari, in plasmacellule a breve sopravvivenza (*short-lived plasma cells*) caratterizzate principalmente da espressione di IgM, nel

corso di risposte T-indipendenti oppure nelle fasi precoci delle risposte T-dipendenti, e successivamente di restare localizzate nei tessuti linfoidei secondari oppure in organi non linfoidei; dall'altra, l'incontro con antigeni di natura proteica in corso di risposte T-dipendenti, determinerà la reazione del centro germinativo con i successivi processi di maturazione dell'affinità recettoriale tramite processi di ipermutazione somatica, *switch* isotipico delle catene pesanti (da IgM a IgG, IgA, IgD o IgE), nonché generazione di linfociti B della memoria e di plasmablasti. Questi andranno incontro al processo di *homing* (cioè migreranno nuovamente al midollo osseo) e qui differenzieranno in plasmacellule a lunga sopravvivenza (*long-lived plasma cells*) grazie all'interazione con il microambiente midollare (15). Poiché le cellule mielomatose presentano le ipermutazioni somatiche a carico dei geni codificanti per le Ig, esse possono essere identificate come elementi neoplastici originanti dalla maturazione antigene-dipendente che si realizza nel contesto della reazione del centro germinativo all'interno degli organi linfoidei secondari (*in primis*, i linfonodi) e da qui migrate a livello midollare, dove l'interazione con il microambiente effettuerà un'importante azione di stimolo sul clone neoplastico

2.3.1 MICROAMBIENTE MIDOLLARE E CITOCHINE

Se la citogenetica non basta a spiegare l'evoluzione da MGUS a MM è evidente che ci devono essere altri fattori a regolare questo processo, non interni alle PC ma concernenti il loro rapporto con l'ambiente circostante.

Il microambiente midollare è composto da un compartimento cellulare e da uno non cellulare.

- Il compartimento cellulare comprende sia elementi ematopoietici (cellule staminali -HSCs-, progenitori e precursori di cellule ematopoietiche e mesenchimali, cellule NK, macrofagi, megacariociti, piastrine, eritrociti, linfociti, cellule dendritiche) sia elementi non ematopoietici (condrociti, osteoclasti, osteoblasti, fibroblasti, cellule endoteliali).
- Il compartimento non cellulare è costituito dalle proteine della matrice extracellulare (ECM) quali collagene, laminina, fibronectina, glicosamminoglicani, proteoglicani e da numerosissimi fattori solubili (citochine, chemochine, fattori di crescita) (16).

Il MM si caratterizza per un'alterazione della complessa modulazione svolta proprio da queste molecole di segnalazione e della fisiologica omeostasi relativa alle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. Gli effetti di tali alterazioni si esplicano non solo nella sopravvivenza, nella proliferazione e nell'espansione del clone plasmacellulare maligno (cui sono indispensabili), ma anche in un incremento dell'angiogenesi, nella formazione di lesioni litiche ossee e nell'acquisizione di resistenza ai farmaci da parte delle cellule tumorali, tramite meccanismi di adesione cellulare e

meccanismi citochino-mediati. Le principali cellule del microambiente coinvolte sono rappresentate dalle cellule stromali midollari (BMSC) (17). Questo complesso processo prende avvio quando le cellule neoplastiche circolanti trovano dei siti di ancoraggio tramite il legame delle loro molecole di adesione LFA-1 e VLA-4 con, rispettivamente, ICAM-1 e VCAM-1 (esposte dalle BMSC); questo comporta, in entrambe le popolazioni cellulari, l'attivazione di diverse vie intracellulari di trasduzione del segnale. Nelle BMSC sono attivati, ad esempio, MEK/MAPK e NF- κ B/I κ B α , determinando un'aumentata espressione delle stesse molecole di adesione (e dunque un'amplificazione del segnale), ma anche di fattori di crescita quali IGF-1, TGF- β , FGF e VEGF e, soprattutto, dell'IL-6. Tale citochina, sia nella crescita in vitro che in vivo, esercita importanti effetti quali l'inibizione dell'apoptosi, lo stimolo alla proliferazione, l'angiogenesi e l'attivazione osteoclastica ma anche l'acquisizione di farmaco-resistenza da parte del clone neoplastico. Queste osservazioni hanno condotto al tentativo di impiego di farmaci aventi tale target (ad esempio anticorpi monoclonali anti IL-6 o anti IL6R) con scarsi risultati, dimostrando il ruolo fondamentale ma non esclusivo di questo pathway (16). Le interazioni viste determinano invece nelle cellule mielomatose l'attivazione di vie di trasduzione del segnale quali PI-3K/Akt/mTor, Ras/Raf/MAPK, JAK/STAT3, Wnt/APC/ β -catenina, Wnt/Rho e IKK/NF- κ B (quest'ultimo divenuto importante oggetto di studio in quanto costituisce uno dei targets degli inibitori del proteasoma).

Gli effetti di queste vie includono l'inibizione dell'apoptosi, lo stimolo alla proliferazione, il danno osseo e la farmaco-resistenza (ad esempio tramite la resistenza alla morte cellulare indotta dal desametasone e dagli altri farmaci convenzionalmente impiegati) (16) (17) (18).

Il microambiente midollare sembra inoltre giocare un ruolo chiave nella ripresa di malattia. Tuttavia, sono ancora da chiarire i meccanismi chiave della ricomparsa e riespansione del clone tumorale: alcuni studi sostengono che le plasmacellule neoplastiche non sarebbero cellule terminalmente differenziate come ritenuto in passato, ma cellule dotate di importante plasticità e dunque della capacità di "autosostenere" la malattia (con peggior prognosi correlata alla presenza di cellule meno differenziate) (19); in altri studi, è stata invece evidenziata la presenza delle "Myeloma Propagating Cells", una sottopopolazione di cellule immature che potrebbero dar luogo alla recidiva di malattia (20).

2.3.2 ANGIOGENESI

Il ruolo fondamentale dell'angiogenesi nei processi di cancerogenesi è noto e riconosciuto da anni (21). L'angiogenesi tumorale è un processo *multistep* che si sviluppa per la maggiore richiesta tissutale di ossigeno e nutrienti e si contraddistingue per la formazione di strutture vascolari aberranti, con vasi scarsamente organizzati ed immaturi, generalmente tortuosi, dilatati, fenestrati, con scarsa

membrana basale e radi periciti – peculiarità che conferiscono una marcata permeabilità ed un flusso ematico anomalo. Tale processo è da imputare al fatto che, durante l'accrescimento e la progressione tumorale, si assiste ad uno squilibrio tra fattori anti-angiogenici e pro-angiogenici a favore di questi, con conseguente stimolo alla formazione di nuovi vasi (22) (23). I principali stimoli all'angiogenesi ad oggi individuati sono rappresentati dalla crescita della massa neoplastica (che determina una condizione di ipossia relativa del clone in accrescimento), l'attivazione di alcuni oncogeni (riconosciuto è, ad esempio, il ruolo delle proteine Ras e di HER-2) (24) (25), l'inattivazione di alcuni oncosoppressori (quali p53 e VHL) (26) (27), e la presenza, nel microambiente, di alcuni tipi cellulari – un ruolo fondamentale sembra svolto dai macrofagi che si accumulano nelle aree poco vascolarizzate, ipossiche e necrotiche e qui secernono molecole pro-angiogeniche (28). Anche nel Mieloma è stato riscontrato un incremento dell'angiogenesi: il microambiente midollare si caratterizza per un'aumentata densità microvascolare rispetto ai soggetti sani. L'entità del processo angiogenico sembra correlare al grado di infiltrazione midollare, all'attività proliferativa delle cellule neoplastiche ed allo stato di malattia. La progressione del MM è infatti caratterizzata da una fase pre-angiogenica, rappresentata dalle forme indolenti di MGUS e dallo SMM, seguita da un *angiogenic switch* indotto dalla progressiva crescita tumorale ed ipossia relativa del clone mielomatoso in accrescimento, che corrisponde alla fase del MM conclamato. Tale *switch* è stato imputato alla secrezione aberrante di VEGF da parte di plasmacellule CD45 negative (29) (30). VEGF stimola, mediante i suoi diversi complessi recettoriali, la proliferazione e la chemiotassi delle cellule endoteliali e delle BMSC: nel processo di neo-angiogenesi, i vasi neoformati derivano, infatti, soprattutto da vasi preesistenti piuttosto che da una componente progenitrice, nonostante sia stata pure evidenziata una mobilitazione di precursori delle cellule endoteliali dal midollo osseo. L'angiogenesi determina dunque la formazione della complessa rete di vasi patologici sopra descritta, che contribuiscono al nutrimento, all'accrescimento ed alla diffusione ematogena del clone neoplastico (23), ma anche allo sviluppo delle alterazioni midollari e delle lesioni ossee di tipico riscontro nel MM. Si viene a creare un circolo vizioso nel quale le plasmacellule CD45- secernono VEGF (ma anche FGF2 e MMPs), determinando un incremento dei processi di neo-vascularizzazione; questa, a sua volta, stimola l'espansione della malattia tramite citochine, chemochine e fattori di crescita. Contemporaneamente, l'interazione tra le plasmacellule neoplastiche e le BMSC stimola pure l'angiogenesi (mediatore chiave, in questo contesto, sembra essere la già descritta IL-6) ed induce il reclutamento e l'attivazione di cellule stromali infiammatorie (specialmente macrofagi e mastociti) che contribuiscono ad amplificare il processo tramite diversi mediatori solubili (31) (32) (33).

L'entità del processo angiogenico sembra inoltre correlare direttamente all'aggressività della malattia e ad un peggioramento prognostico: numerosi studi hanno infatti evidenziato come i pazienti affetti da MM presentino un'aumentata densità microvascolare (MVD) rispetto a quelli affetti da MGUS e SMM e ai soggetti sani. La MVD nei pazienti affetti da Mieloma sembra correlare ad un più alto indice proliferativo e a fasi di malattia più attiva (31) (34).

Ad ulteriore dimostrazione del valore prognostico della MVD, differenti studi hanno dimostrato la persistenza di angiogenesi a livello midollare anche nei pazienti che abbiano raggiunto uno stato di remissione completa: questo è stato imputato alla persistenza di uno stimolo pro-angiogenico da parte della comunque presente Malattia Minima Residua (*Minimal Residual Disease* o MRD), il quale contribuisce alla ricaduta mediante l'azione di stimolo sulle plasmacellule maligne residue, secondo i meccanismi molecolari descritti (35).

Il ruolo dell'angiogenesi è inoltre dimostrato dal fatto che diversi farmaci oggi impiegati nel trattamento del MM (sia gli inibitori del proteasoma che gli immunomodulanti) presentano, tra le altre, anche un'azione anti-angiogenica (36).

2.3.3 IL DANNO OSSEO

Caratteristica saliente dei pazienti affetti da MM è la presenza di lesioni scheletriche, le quali possono essere imputate ad un'alterazione del normale rimodellamento osseo. Questo si realizza da una parte mediante uno stimolo all'osteoclastogenesi con successiva iper-attivazione osteoclastica, dall'altra mediante una (più tardiva) riduzione dell'attività osteoblastica. L'aumentata attività osteoclastica (evento precoce) è stata ricondotta a diversi meccanismi molecolari. Quello maggiormente studiato riguarda l'aumentata secrezione del RANK-L da parte delle BMSC a seguito dell'interazione con le cellule mielomatose, con successivo legame a RANK e dunque stimolo alla proliferazione ed alla maturazione dei precursori osteoclastici, all'attivazione degli osteoclasti maturi e loro ridotta apoptosi; dall'altra, si ha invece una riduzione della osteoprotegerina (OPG) – il cui fisiologico ruolo è quello di antagonizzare RANK-L come recettore *decoy* – a causa pure delle interazioni tra le cellule neoplastiche e BMSC, ma anche per l'internalizzazione dell'OPG da parte delle PC mediante legame al Syndecan-1 (CD138) (37) (38) (39). Contro RANK-L è stato sviluppato un anticorpo monoclonale, Denosumab, ad oggi approvato da EMA per la terapia dell'osteoporosi in donne in post-menopausa, in uomini affetti da cancro alla prostata in terapia ormonale ablativa, in pazienti affetti da osteoporosi secondaria alla terapia cronica con glucocorticoidi ed in pazienti affetti da neoplasie maligne in fase avanzata che coinvolgano l'osso (40) (41). Recenti *trials* dimostrano inoltre come l'aggiunta di bifosfonati e Denosumab alla terapia standard del MM determini un beneficio in termini di sopravvivenza, ed in particolare Denosumab determini un aumento della PFS rispetto ai bifosfonati

a conferma del ruolo chiave di RANK-L nella patogenesi del MM (42). Sulla base di questi, Denosumab è stato approvato da FDA per la prevenzione degli SRE (*skeletal-related events*) in pazienti affetti da MM (43).

Altri meccanismi chiamati in causa per l'iper-attivazione osteoclastica includono l'aumentata secrezione di MIP-1 α (che stimola sia l'attività degli osteoclasti – con meccanismi RANK-L mediati e RANK-L indipendenti – che l'*homing* midollare delle cellule mielomatose e dunque l'interazione con le BMSC) (37) (44), di activina A ed IL-3 (entrambe correlate ad incremento della formazione di osteoclasti ed inibizione del differenziamento degli osteoblasti e proposte come *targets* terapeutici; la concentrazione plasmatica dell'activina A correla inoltre all'entità del danno osseo) (37) (45) (46) e l'attivazione del *pathway* di Notch (con azione di incremento dell'osteoclastogenesi mediante lo stimolo alla secrezione di RANK-L non solo da parte delle BMSC, ma anche delle cellule neoplastiche) (45). Anche la IL-6 (al pari di numerose altre citochine, quali IL-1 β , TNF- α e TGF- β), oltre alle già descritte attività di stimolo al mantenimento e alla proliferazione del clone mielomatoso e all'aumento dell'angiogenesi, sembra correlata allo sviluppo delle lesioni ossee (mediante un incremento della secrezione di RANK-L ed una riduzione della secrezione di OPG) ed è stata valutata come bersaglio terapeutico (37) (45). Dubbio e controverso appare invece il ruolo della osteopontina, una glicoproteina della ECM secreta dagli osteoclasti che generalmente correla allo sviluppo di lesioni osteolitiche ma, in un sottogruppo di pazienti con specifiche mutazioni nelle cellule mielomatose (*in primis* la traslocazione di maf), è associata invece ad un effetto osteo-protettivo, che si ipotizza essere dovuto ad alterazione del *crossstalk* tra le PC neoplastiche e gli osteoclasti (45). È stato inoltre proposto che gli osteoclasti stessi promuovano la sopravvivenza e la proliferazione delle PC, tramite il rilascio di diversi *growth factors* e citochine solubili.

Per quanto riguarda invece la minore attività osteoblastica che pure si riscontra nel Mieloma, questa è stata ricondotta sia ad interazioni cellula-cellula tra le cellule mielomatose e gli osteoblasti – il legame di VLA-4, molecola di adesione espressa dalle prime, a VCAM-1, espresso dai secondi, determinerebbe un'inibizione di Runx2, fattore necessario a proliferazione ed attivazione delle cellule osteoprogenitrici e la secrezione di OPG (37) – che a fattori solubili secreti dalle PC neoplastiche e dalle cellule del microambiente in seguito ai processi di interazione, quali IL-3 ed IL-7, ma anche DKK1, inibitore del *pathway* di Wnt e contro il quale sono stati anche recentemente sviluppati anticorpi monoclonali (37) (47). Studi recenti hanno inoltre valutato la correlazione tra il danno osseo e gli adipociti midollari (in considerazione del fatto che il MM è una patologia tipica dell'età adulto-anziana ed ha un rischio notevolmente aumentato in caso di obesità, entrambe condizioni associate ad un incremento dell'adiposità midollare). È stato evidenziato come gli adipociti non siano direttamente responsabili delle lesioni ossee, ma la loro secrezione di varie citochine ed adipochine

possa correlare ad un' aumentata sopravvivenza ed espansione delle cellule neoplastiche, favorendo così lo sviluppo del danno scheletrico (48).

3. PRESENTAZIONE CLINICA, METODICHE DIAGNOSTICHE E FATTORI PROGNOSTICI

3.1 MANIFESTAZIONI CLINICHE

L'incontrollata proliferazione midollare delle plasmacellule neoplastiche, l'aumentata produzione di immunoglobuline monoclonali e le loro peculiari caratteristiche chimico-fisiche, la produzione autocrina e paracrina di citochine sono responsabili dei principali quadri clinici di presentazione della malattia:

- L'interessamento scheletrico, caratterizzato prevalentemente dalla patologia osteoporotica-osteolitica è la più frequente modalità di esordio della malattia (presente nel 70% dei pazienti alla diagnosi e nella quasi totalità dei pazienti durante la progressione). La sua patogenesi è secondaria all'esaltata attività osteoclastica e alla ridotta azione osteoblastica (rimodellamento osseo *uncoupled*). Alla malattia scheletrica si associano complicazioni quali severo dolore osseo, fratture patologiche, compressione del midollo spinale, ipercalcemia.
- L'interessamento renale, dovuto all'iperproduzione e alle peculiari caratteristiche di nefrotossicità delle catene leggere, che danneggiano in modo selettivo il tubulo renale del nefrone determinando il classico quadro del rene da mieloma o *myeloma cast nephropathy*; altri rari quadri di danno renale tubulare e/o glomerulare includono la sindrome di Fanconi, l'amiloidosi AL, la malattia da deposito di catene leggere e la malattia da deposito di catene pesanti. La malattia renale è presente in circa il 20% dei pazienti alla diagnosi e fino ad un ulteriore 30% dei pazienti in corso di progressione.
- L'insufficienza midollare, presente in circa 80% dei pazienti, si manifesta più comunemente con un quadro di anemia normocromica, normocitica dovuta *in primis* alla sostituzione della normale emopoiesi da parte di un ricco infiltrato plasmacellulare ma anche secondaria al rilascio di citochine pro-infiammatorie e di altri mediatori nel contesto del microambiente midollare, al deficit di eritropoietina conseguente alla malattia renale e agli effetti mielotossici delle terapie impiegate. All'anemia possono associarsi quadri di trombocitopenia e/o leucopenia.
- L'aumentata morbilità infettiva, legata alla ridotta efficacia sia dell'immunità umorale sia dell'immunità cellulo-mediata, per soppressione della normale produzione

immunoglobulinica e della risposta anticorpale, riduzione del numero e dell'attività dei linfociti T CD4+ Th1, ridotta capacità citotossica dei linfociti T CD8+, disfunzione delle cellule NK e delle cellule dendritiche. Il risultato finale è un quadro di immunoparesi la cui causa principale è da ricercarsi nella ricca produzione citochinica (TGFβ, IL10, IL6, VEGF) ad opera delle plasmacellule neoplastiche (PC) e delle cellule stromali del midollo osseo (BMSC). Le infezioni ricorrenti rappresentano una manifestazione iniziale in circa il 25% dei pazienti, ma l'impatto clinico di queste aumenta progressivamente con la durata (e l'espansione) della malattia e con le terapie impiegate: oltre il 75% dei pazienti svilupperà un'infezione importante/settica durante il decorso della malattia e fino al 50% dei decessi in pazienti affetti da MM (dato storico: studi più recenti propongono circa un 25%) sarebbe da imputare ad un evento infettivo (49).

3.2 METODOLOGIE DIAGNOSTICHE

La diagnosi di MM attivo sintomatico necessitante di terapia si fonda sui criteri diagnostici revisionati dall'IMWG nel 2014, già descritti (13). Essa richiede l'impiego di specifiche indagini diagnostiche laboratoristiche e strumentali.

Indagini laboratoristiche

Da un punto di vista laboratoristico, il biomarcatore della presenza del clone PC è tipicamente rappresentato dalla CM, la quale può essere costituita dalla Ig intera, costituita nella sua integrità da due catene pesanti e due leggere (più frequentemente IgG e IgA, più raramente IgM o IgD), o da un suo frammento, generalmente rappresentato dalla sola catena leggera. Con l'impiego delle comuni tecniche di elettroforesi delle proteine sieriche (SPEP) ed immunofissazione (IFE) sierica ed urinaria, il MM può essere così classificato in MM secernente Ig intere (77% dei casi), MM di Bence Jones (o "micromolecolare", a catene leggere urinarie, 22% dei casi) e MM non secernente (1% dei casi).

Inoltre, con l'impiego del dosaggio delle sFLC, una clonalità evidenziabile come alterazione del rapporto κ/λ può essere evidenziata nel 70% circa dei pazienti altrimenti identificati come non secernenti, nel 100% dei pazienti Bence Jones e nel 90% dei pazienti secernenti Ig intere. Le prime indagini da eseguire nel sospetto di MM sono rappresentate quindi dal dosaggio delle proteine sieriche totali, da SPEP ed IFE sierica, dal dosaggio di Ig totali e sFLC e dalla valutazione della proteinuria nelle 24 ore con elettroforesi urinaria (UPEP) ed IFE urinaria.

La diagnosi si completa con l'esecuzione dell'aspirato midollare e/o della biopsia osteomidollare, al fine di quantificare la componente plasmacellulare e di poter effettuare le valutazioni di carattere immunofenotipico, citogenetico e molecolare necessarie alla definizione della prognosi.

Per evidenziare le disfunzioni d'organo correlate al MM attivo (criteri CRAB) è poi necessaria la valutazione dell'esame emocromocitometrico completo, della calcemia e della funzionalità renale; la valutazione della concentrazione ematica di albumina e β 2-microglobulina risulta invece fondamentale per la stadiazione secondo l'*International Staging System* (ISS).

Indagini strumentali

Le metodiche strumentali che mirano essenzialmente allo studio della patologia scheletrica e di eventuale diffusione extramidollare di malattia, rivestono un ruolo fondamentale non solo nella diagnosi ma anche nella valutazione prognostica e dell'efficacia terapeutica, durante o al termine del trattamento (50).

Negli ultimi anni, sono state introdotte nella pratica clinica metodiche innovative e più sensibili rispetto alla radiografia convenzionale, che è stata utilizzata come tecnica standard per diversi anni. La RX dello scheletro in toto è in grado di evidenziare le lesioni ossee (come aree osteolitiche senza reazione periostale e/o osteopeniche/osteoporotiche) solo quando si abbia un coinvolgimento di almeno il 50% della massa ossea locale, pertanto si ha un alto rischio di sottostima della malattia scheletrica. Queste considerazioni, assieme allo scarso potere risolutivo della tecnica radiografica convenzionale nello studio del rachide (sede più frequentemente interessata) la rendono oggi di scarso impiego ed hanno fatto sì che lo studio routinario dello scheletro sia stato sostituito dall'impiego della TC total body a bassa intensità di radiazioni (LDCT) – la quale rappresenta attualmente il *gold standard* nello studio delle lesioni osteolitiche, nella stima del rischio di fratture, ma anche come guida per l'esecuzione di biopsie e nella pianificazione di radioterapia ed interventi chirurgici.

La RMN rappresenta invece la metodica di elezione per lo studio del rachide. La RMN tradizionale, con mezzo di contrasto al gadolinio, è in grado di riconoscere la diffusione tumorale a livello midollare nelle sequenze T1 e T2, in cui le lesioni si presentano ipointense e iperintense rispettivamente. La *whole-body* MRI rappresenta una versione più evoluta della RMN che non necessita dell'impiego di mezzo di contrasto, con tempi di esecuzione di circa 20 minuti. La RMN permette inoltre lo studio di eventuali masse extra-ossee, delle complicanze neurologiche (risultando ad esempio mandatoria nel sospetto di compressione del midollo spinale) e nella diagnosi differenziale tra osteoporosi benigna e maligna.

La ^{18}F -FDG-PET/TC combina i dati metabolici, relativi all'attività di malattia, con quelli anatomici, consentendo di studiare il metabolismo delle lesioni sulla base dell'entità della captazione di glucosio (e dunque di differenziare lesioni attive e non, ad esempio per esiti necrotici o fibrotici). Essa consente di individuare lesioni metabolicamente attive con un potere di risoluzione di 5 mm ed è particolarmente impiegata nello studio della risposta alla terapia. Costituisce inoltre l'attuale

metodica di prima scelta nello studio della malattia extramidollare. In virtù delle caratteristiche descritte, le attuali raccomandazioni prevedono, in presenza di un sospetto clinico-laboratoristico di MM, l'esecuzione della LDCT (o, in alternativa, della PET/TC) al fine di valutare presenza ed estensione delle lesioni osteolitiche; in caso di negatività di queste indagini ed assenza di altri MDE, è indicata l'esecuzione di una RMN *whole-body* (oppure, se non disponibile, di una RMN di rachide e pelvi, oppure di PET/TC in caso di infattibilità o di controindicazioni alla RMN) per la ricerca di lesioni focali che consentano la diagnosi definitiva di MM. Nella valutazione della risposta alla terapia, la metodica di *imaging* da utilizzare dipende invece da quelle inizialmente adoperate: in caso di PET/TC non eseguita oppure negativa, è previsto il ricorso alla LDCT; in caso di PET/TC positiva, invece, è previsto il suo successivo reimpiego così da consentire un adeguato confronto (51) (52).

3.3 STADIAZIONE

La notevole eterogeneità del MM per presentazione clinica, anomalie genetico-molecolari e decorso ha reso indispensabile l'individuazione sempre più precisa di parametri che consentano di distinguere una malattia aggressiva ad alto rischio da una relativamente indolente, con lo scopo di predire la sopravvivenza e di stimare la risposta alle terapie. La ricerca di modelli prognostici è divenuta particolarmente rilevante negli ultimi anni in relazione alla disponibilità di differenti opzioni terapeutiche con l'obiettivo di modulare la strategia terapeutica sulle caratteristiche di rischio di ogni paziente.

Stadiazione di Durie e Salmon

Il primo sistema classificativo utilizzato fu quello introdotto da Durie e Salmon nel 1975 che identificava tre stadi clinici (I, II, III) corrispondenti a una massa tumorale di taglia progressivamente maggiore e due varietà (A e B) a seconda della funzionalità renale (A: normale, B: alterata, ovvero creatinina > 2 mg/dL) (53). Tuttavia, tale classificazione presenta diversi limiti nella predizione della sopravvivenza e della prognosi, perciò ad oggi non viene più utilizzata (Tabella 2).

Tabella 2. Classificazione di Durie & Salmon

Stadio I	Tutti i criteri devono essere soddisfatti: Hb > 10 g/dL Calcemia normale Struttura ossea normale o presenza di 1 sola lesione Bassi valori di componente M (IgG < 50 g/L, IgA < 30 g/L, BJ < 4 g/24 h)	Massa tumorale <0.5x10 ¹² /m ²
Stadio II	Non soddisfatti i criteri del I e del III	0.5-1.2x10 ¹² /m ²
Stadio III	È sufficiente la presenza di uno solo dei seguenti criteri: Hb < 8,5 g/dl Calcemia ≥ 12 mg/dl Almeno 3 lesioni ossee Alti valori di componente M (IgG > 70 g/L, IgA > 50 g/L, BJ > 12 g/24 h)	>1.2x10 ¹² /m ²

Stadiazione ISS

Di più recente introduzione è invece il sistema classificativo ISS (*International Staging System*), che distingue tre stadi sulla base di due semplici parametri: i livelli sierici di albumina e di β2 microglobulina; Tabella 3 (54).

In questo caso c'è una dimostrata correlazione con la prognosi: in particolare lo stadio I correla con una sopravvivenza mediana di 62 mesi, lo stadio II di 44 mesi, lo stadio III di 29 mesi.

Ci si chiese inizialmente come mai questi due parametri avessero questa stretta correlazione con la sopravvivenza:

- Probabilmente, il valore della β2 microglobulina correla con la taglia neoplastica (si tratta di un dominio dell'MHC di classe I espresso dalle plasmacellule) e con la funzionalità renale, ma anche con fattori immunologici.
- La riduzione dell'albumina riflette invece probabilmente l'aumentata espressione di IL-6 da parte del clone neoplastico, che risulta in uno *shift* verso la produzione di proteine di fase acuta a livello epatico a discapito di quelle normalmente prodotte (l'albumina è la proteina plasmatica più rappresentata).

Tabella 3. Stadiazione ISS

Stadio I	β2 microglobulina < 3.5 mg/L e albumina ≥ 3,5 g/dl
Stadio II	Non soddisfatti criteri per I e III*
Stadio III	β2 microglobulina > 5.5 mg/L

* lo stadio II identifica pertanto due possibili situazioni: β2 microglobulina < 3.5 mg/L ma albumina < 3.5 g/dL; oppure β2 microglobulina compresa tra 3.5 e 5.5 mg/dL, indipendentemente dai valori di albumina sierica.

Revised-ISS

Tuttavia, nel tempo sono stati definiti numerosi altri fattori che possono influenzare la prognosi: nel 2015 l'IMWG ha revisionato l'ISS formulando, a seguito di uno studio su oltre 3000 pazienti, un nuovo score prognostico, l'R-ISS (*revised ISS*) che integra il classico ISS (albumina e $\beta 2$ microglobulina) con altri due fattori: il valore sierico di LDH (la cui elevata concentrazione correla ad una malattia più aggressiva, ad un maggior indice proliferativo e può suggerire la presenza di malattia in sede extramidollare) e la eventuale presenza di alcune anomalie citogenetiche ad alto rischio quali la del17p13, t(4;14) e t(14;16), valutate mediante FISH; Tabella 4 (55).

Tabella 4. Stadiazione R-ISS

Stadio I	ISS I senza anomalie citogenetiche ad alto rischio, LDH normale
Stadio II	Non r-ISS I né III
Stadio III	ISS III oppure almeno una tra anomalie citogenetiche ad alto rischio e alti livelli di LDH

Il ruolo prognostico della stadiazione R-ISS risulta evidente dalla valutazione degli *outcome*: la PFS a 5 anni è del 55% per R-ISS I, del 36% per R-ISS II e del 24% per R-ISS III; la OS a 5 anni è dell'82% per R-ISS I, del 62% per R-ISS II e del 40% per R-ISS III. Sebbene il R-ISS rappresenti il sistema di stadiazione più completo tra quelli ad oggi proposti e dunque di maggiore impiego attuale, occorre comunque tenere in considerazione i suoi limiti. Diversi studi hanno infatti valutato come, nonostante l'importante validità del R-ISS ai fini prognostici (specialmente se confrontata con il precedente ISS), sussista una notevole eterogeneità relativa alla prognosi specialmente nei pazienti in stadio R-ISS II, che richiedono dunque ulteriori e più approfondite subclassificazioni (56) (57) (58). Inoltre, esso non valuta vari elementi il cui ruolo è stato progressivamente messo in luce negli anni più recenti e che diversi studi hanno validato: la presenza di PC neoplastiche circolanti (59), la presenza di malattia a sede extramidollare (60), lo sFLC *ratio* (61) (62), la presenza di ulteriori alterazioni citogenetiche e di caratteristici *pattern* di espressione genica. In particolare, per quanto riguarda l'eterogeneità nel contesto dello stadio R-ISS II, è stata proposta la valutazione della presenza di un basso *performance status*, di trombocitopenia e di ipodiploidia o del(17p) come fattori prognostici negativi (56); nello stadio R-ISS III, è stata proposta l'identificazione dei pazienti affetti da *Double-Hit Myeloma* (cioè caratterizzati da inattivazione biallelica di TP53 oppure da amplificazione di CKS1B, dunque del cromosoma 1q) in quanto caratterizzati da prognosi avversa (58) (63).

3.4 RUOLO PROGNOSTICO DI CITOGENETICA ED ESPRESSIONE GENICA

La caratteristica sostanzialmente unica del MM di avere i due stati pre-maligni di MGUS e SMM (virtualmente presenti in tutti i pazienti prima dell'esordio del MM attivo) (8) ha dato particolare adito allo studio delle caratteristiche genetiche della malattia conclamata e dei suoi precursori. Diversi eventi mutazionali sono stati individuati e suddivisi in primari e secondari a seconda che siano già presenti nei cloni della malattia MGUS (e dunque siano mutazioni con effetto iniziante la patologia neoplastica) oppure che si ritrovino negli stadi più avanzati di MM conclamato (e siano dunque correlati all'acquisizione di malignità ed alla progressione di malattia).

È stato altresì osservato come, sulla base delle caratteristiche genetiche, il MM possa essere suddiviso in vari sottotipi con differente *outcome* (64).

Risulta fondamentale, in questo contesto, stabilire adeguatamente le tecniche diagnostiche da utilizzare. Negli scorsi anni, è stato ampiamente dimostrato l'impatto prognostico associato a mutazioni di tipo genomico e cromosomico, dunque facilmente valutabili tramite lo studio del cariotipo e le indagini di tipo *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), con una superiorità di quest'ultima – in grado di riscontrare anomalie clonali finanche nell'80-90% dei casi, indipendentemente dallo stadio di malattia – rispetto al solo studio del cariotipo – che rileva alterazioni nel 30-50%, con notevole sottostima, poiché in grado di studiare unicamente cellule in metafase e dunque in fase replicativa, a fronte di un basso indice proliferativo delle PC neoplastiche (65). Tuttavia, sta emergendo in modo sempre più lampante come anche la valutazione di singoli geni possa avere un importante ruolo di stratificazione prognostica, richiedendo l'impiego di indagini molecolari più raffinate (ad esempio, il *Next Generation Sequencing*, NGS). In generale, l'assetto genetico del clone neoplastico deve essere valutato, per avere un'adeguata definizione prognostica, non solo alla diagnosi, ma anche nel contesto delle ricadute (in virtù della pressione selettiva che le terapie esercitano sulle cellule neoplastiche).

Le alterazioni genetiche primarie sono considerate, come visto, eventi inizianti e tenderanno a rimanere stabili con la progressione della malattia (anche durante la ricaduta e le fasi avanzate). Esse sono a loro volta suddivise in mutazioni iperdiploidi e non iperdiploidi:

- Le mutazioni iperdiploidi sono presenti in circa il 50-60% dei pazienti alla diagnosi e riguardano, generalmente, trisomie a carico dei cromosomi 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e/o 21; esse sono associate alla presenza di traslocazioni primarie in meno del 10% dei casi (generalmente riguardanti IGH). Esse correlano generalmente ad una malattia meno aggressiva (la cui prognosi sembra anche migliorare con l'aumento del numero di trisomie presenti) e ben responsiva ai farmaci di impiego comune come la Lenalidomide (64) (66).

- Le mutazioni non iperdiploidi sono invece correlate generalmente ad una prognosi più severa e si caratterizzano per traslocazioni coinvolgenti il gene codificante per la catena pesante delle immunoglobuline IGH (sul cromosoma 14q32) con punti di rottura che suggeriscono l'origine dell'evento durante lo *switch* isotipico oppure durante il processo di ipermutazione somatica. Tali traslocazioni fanno sì che degli oncogeni vengano a trovarsi sotto il controllo del promotore di IGH (gene iperespresso nelle PC, deputate alla sintesi e secrezione anticorpale), risultando dunque essi stessi in un'aumentata espressione. Le traslocazioni sono subclassificate sulla base della famiglia di oncogeni coinvolti: appartenenti alla famiglia della ciclina D, ai fattori trascrizionali MAF, al *pathway* di MMSET/FGFR3 (64) (67). Tra le traslocazioni ricorrenti con maggiore frequenza, occorre ricordare:

- t(11;14) che coinvolge il gene codificante per la ciclina D1 ed è oggi considerata a rischio standard; la si ritrova nel 15-20% dei pazienti;
- t(4;14) che coinvolge MMSET/FGFR3 ed è considerata ad alto rischio ma sembra correlare ad una buona risposta al trattamento precoce con inibitori del proteasoma; la si ritrova in circa il 15% dei pazienti;
- t(14;16) che coinvolge MAF ed è considerata ad alto rischio; la si ritrova in circa il 5% dei pazienti;
- t(6;14) che coinvolge la ciclina D3 ed è considerata a rischio standard;
- t(14;20) che coinvolge MAFB ed è considerata ad alto rischio (64) (68) (69) (70) (71) (72).

Le alterazioni genetiche secondarie non sono invece presenti nella MGUS (al contrario delle primarie) ma potrebbero giustificare l'evoluzione a MM conclamato e dunque la progressione ed espansione della malattia (avrebbero, dunque, un ruolo promuovente). Queste mutazioni non sono presenti in tutte le PC neoplastiche, ad ulteriore conferma dell'evoluzione policlonale che accompagna lo sviluppo della malattia maligna, rendendola geneticamente complessa ed eterogenea e favorendo la resistenza ai trattamenti impiegati (64) (68) (72).

Le più frequenti alterazioni genetiche secondarie rilevate sono:

- delezione del cromosoma 13 (o del suo braccio lungo 13q o della sua regione 13q14), riscontrata in circa il 50% dei pazienti e coinvolgente l'oncosoppressore RB1. Il significato di questa anomalia risulta tuttora controverso: è stata classificata sia tra le anomalie primarie (in quanto riscontrata sovente già nelle MGUS) che tra le secondarie (poiché correlabile anche alla progressione di malattia). È considerata ad alto rischio quando identificata in citogenetica convenzionale mentre rappresenta un rischio standard se identificata in FISH;
- anomalie a carico del cromosoma 1, che comprendono:

- duplicazione del braccio lungo 1q (presente in circa il 35-40% dei pazienti) e dunque del gene CSK1B, correlata ad alto rischio (con prognosi che peggiora all'aumentare delle cellule con tale mutazione);
- delezione del braccio corto 1p (presente in circa il 30% dei pazienti) che coinvolge diversi geni e correla ad alto rischio;
- delezione di 17p13 e dunque dell'oncosoppressore p53 (con successiva alterazione del ciclo cellulare, della morte cellulare programmata e della riparazione del DNA) è presente in circa il 5-10% dei pazienti alla diagnosi e fino all'80% dei pazienti durante la progressione, correlando infatti ad un'importante aggressività e ad una significativa riduzione della sopravvivenza (73) (74).

Occorre tuttavia considerare come, nonostante i diversi fattori genetici con ruolo prognostico ad oggi individuati, non esista un modello standardizzato di definizione della prognosi che integri in modo olistico tutti questi marcatori di rischio. Come precedentemente descritto, è stata ad esempio proposta la valutazione di un sottotipo di MM definito "Double-Hit", caratterizzato dalla compresenza di una mutazione biallelica di TP53 (17p13) e di un'amplificazione (≥ 4 copie) di CSK1B (1q21), nel contesto di uno stadio ISS III. Un confronto con i sistemi di stratificazione prognostica comunemente impiegati ha evidenziato come i pazienti con MM *Double-Hit* possano essere classificati talvolta come *High-Risk* (HR) e talvolta come *Standard-Risk* (SR) secondo i criteri IMWG di uso routinario, nonostante la loro prognosi assolutamente negativa (63). Un ulteriore e più recente sistema proposto per la definizione prognostica è rappresentato invece da uno *score* (*Prognostic Index*) basato sulla valutazione di alcuni eventi mutazionali fondamentali, quali del(17p), t(4;14), del(1p32), ampl(1q21) e trisomia dei cromosomi 3, 5 e 21, con la possibilità di distinguere i pazienti in tre categorie di rischio (alto, intermedio o basso) (73). Una stratificazione ottimale della prognosi rappresenta dunque tuttora uno degli *input* più stimolanti per quanto riguarda la ricerca nell'ambito del MM, dal momento che risulta fondamentale nell'ottica di guidare in modo adeguato l'*iter* terapeutico (74).

Nonostante non siano di comune valutazione nella *routine* clinica, è ormai validato da numerosi studi il potenziale impatto prognostico della presenza di mutazioni o dell'espressione relativa a singoli geni: la presenza di traslocazioni o mutazioni causanti iper-espressione di MYC risulta un evento tendenzialmente tardivo e rappresenta un fattore prognostico sfavorevole (67); mutazioni di RAS correlano potenzialmente alla progressione da MGUS a MM (67) e solo mutazioni di KRAS (ma non di NRAS) sembrano correlare ad un notevole peggioramento prognostico (75); l'attivazione costitutiva del *pathway* di NF- κ B (correlata a diverse possibili mutazioni, *in primis* quella del suo inibitore TRAF3) sta assumendo un ruolo sempre più

importante per le sue implicazioni prognostico-terapeutiche, in virtù dell'impiego degli inibitori del proteasoma (76). Tra le metodologie diagnostiche utilizzabili per la valutazione di singoli geni hanno preso piede, ad esempio, il NGS, l'analisi dei *Single Nucleotide Polimorphisms* (SNPs) ed il *Gene Expression Profiling* (GEP). Sulla base pure di queste indagini sono stati realizzati dei modelli di stratificazione prognostica, il cui impiego resta però, ad oggi, solo sperimentale (77). Queste metodiche hanno inoltre messo in luce e confermato un ulteriore livello di complessità della malattia mielomatoso, ossia l'eterogeneità intra-clonale: sotto la pressione selettiva delle terapie impiegate avrebbero origine diversi sub-cloni geneticamente differenti caratterizzati dallo sviluppo di mutazioni conferenti resistenza ai trattamenti (78).

4. TERAPIA

La terapia del MM ha una storia lunga ed inizialmente poco fruttuosa. Fallito l'impiego dell'uretano negli anni '40, rivelatosi non superiore al placebo in termini di attività anti-mielomatoso, la terapia prese di fatto avvio a partire dagli anni '50-'60, con l'introduzione nell'oncologia di agenti alchilanti, quali melphalan e ciclofosfamide (derivati di mostarde azotate), delle antracicline (doxorubicina), degli alcaloidi della vinca (vincristina) e delle nitrosuree; anche il cortisone a dosi pulsate (prednisone e desametasone) si dimostrò efficace in monoterapia. La combinazione melphalan-prednisone (MP) ha rappresentato per molti decenni lo *standard of care* dei pazienti con MM (79) (80). Con questa strategia terapeutica si ottiene una risposta (ORR) in circa il 50-60% dei pazienti, ma solo nel 5-10% si tratta di una remissione completa (CR). Nel tentativo di migliorarne l'efficacia, vennero quindi tentate differenti associazioni di farmaci chemioterapici quali VBMCP (vincristina, carmustina, melphalan, ciclofosfamide e prednisone), BMCP (carmustina, melphalan, ciclofosfamide e prednisone) e VAD (vincristina, adriamicina, desametasone). Tali regimi polichemioterapici determinavano un più alto *rate* di risposta, senza tuttavia aumentare la sopravvivenza, che si attestava comunque intorno ai 3 anni (81) (82) (83). L'incapacità di altri agenti chemioterapici, da soli o in combinazione, di aumentare la sopravvivenza dei pazienti con MM, ha portato ad una sostanziale stagnazione terapeutica per oltre 20 anni.

Agli inizi degli anni '80, l'introduzione della chemioterapia con melphalan ad alte dosi seguita dal **trapianto di cellule staminali emopoietiche**, autologo e allogenico, ha aperto una nuova era terapeutica: a metà degli anni '90 è stato dimostrato che, nei pazienti di età inferiore ai 60 anni, il trapianto di cellule staminali autologhe (ASCT) è superiore rispetto alla chemioterapia tradizionale in termini di percentuale e durata della risposta (84) (85).

La vera “rivoluzione” nella terapia del MM è avvenuta a partire a partire dal 2000, grazie all’introduzione nella pratica clinica dei cosiddetti “nuovi farmaci”: ovvero agenti non antitumorali che agiscono con grande efficacia sulle plasmacellule neoplastiche e sul microambiente midollare, il cui ruolo è cruciale nel promuovere la crescita e la progressione del clone mielomatoso e nell’indurre la resistenza alla terapia. Tali agenti, variabilmente associati tra loro o in combinazione con chemioterapici convenzionali, hanno drasticamente migliorato l’*outcome* clinico dei pazienti con mieloma, sia all’esordio di malattia che nelle fasi più avanzate ed indipendentemente dall’età.

Quelli introdotti da più anni e più largamente utilizzati appartengono a tre categorie:

- **Immunomodulatori (IMiDs)**: il primo farmaco di questa categoria fu la Talidomide, poi superata in efficacia e minore tossicità da suoi derivati Lenalidomide e Pomalidomide.
- **Inibitori del proteasoma (PI)**: il capostipite è il Bortezomib, a seguire sono stati sviluppati Carfilzomib e Ixazomib.
- **Anticorpi monoclonali (moAb)**: rappresentati da due anticorpi anti-CD38, vale a dire Daratumumab ed Isatuximab e dall’anti-SLAMF7 Elotuzumab.

Le ultime novità del panorama terapeutico sono rappresentate dagli **inibitori dell’istone deacetilasi** (HDACi, principale dei quali è Panobinostat), **check-point inhibitors** (anti-PD1 quali Nivolumab e Pembrolizumab), **inibitori di Bcl-2** (Venetoclax) ed **inibitori di XPO1** (Selinexor).

4.1 I NUOVI FARMACI

Nei prossimi paragrafi saranno analizzati i meccanismi d’azione ed il profilo di tossicità dei principali nuovi farmaci e, successivamente, sarà illustrato il ruolo fondamentale che rivestono nella terapia del MM di nuova diagnosi, con particolare riguardo al paziente giovane (di età ≤ 65 anni) candidabile al trapianto autologo di cellule staminali.

4.1.1 AGENTI IMMUNOMODULATORI

La **Talidomide** è un derivato sintetico dell’acido glutammico realizzato negli anni Cinquanta ed inizialmente impiegato per le sue proprietà sedativo-ipnotiche e antiemetiche. Tuttavia, fu ritirata dal commercio negli anni Sessanta in seguito all’evidenza di teratogenesi (in particolare per focomelia, ma anche difetti uditivi, visivi, cardiaci e renali) nelle donne che ne fecero uso contro la nausea gestazionale. Successivamente alla dimostrazione dei suoi effetti anti-angiogenici ed immunomodulatori e della sua efficacia, venne ufficialmente approvata per il trattamento del Mieloma da FDA nel 2006 e da EMA nel 2008. I suoi principali meccanismi chiamati in causa nel contesto del MM sono:

- inibizione dell'angiogenesi (mediante la riduzione dell'espressione di VEGF, bFGF e numerosi fattori solubili e molecole di adesione) (86)
- ridotta secrezione di citochine fondamentali nell'interazione tra le PC neoplastiche ed il microambiente oltreché a sopravvivenza ed espansione del clone neoplastico (*in primis* IL-6, ma anche TNF- α e IL-1 β) (87)
- modulazione dell'attività del sistema immunitario (favorendo la proliferazione ed attivazione della linea linfocitaria T con azione sinergica all'IL-2 – soprattutto l'attivazione dei CD8+ e delle cellule NK, ma anche la secrezione di IFN- γ da parte dei Th1)
- stimolazione dell'apoptosi nelle PC neoplastiche (tramite l'attivazione della caspasi-8, la sensibilizzazione all'apoptosi Fas-mediata e la inibizione del *pathway* di NF- κ B) (88)
- riduzione dell'interazione tra le cellule mielomatose ed il microambiente (specialmente tramite una ridotta espressione delle molecole di adesione) (89).

La Talidomide presenta un complesso profilo di tossicità; le reazioni avverse di grado lieve-moderato più comuni sono astenia, sonnolenza, disturbi gastrointestinali (specialmente costipazione), bradicardia e rash cutanei. La neuropatia periferica (PN), nella terapia a lungo termine (>1 anno), è la complicanza più frequente (presente fino al 30% dei pazienti) e quella che più inficia la qualità di vita dei pazienti. Si tratta di una neuropatia prevalentemente sensitiva, ma può essere anche motoria periferica con estensione disto-proximale in forma di intorpidimento, crampi muscolari, formicolii, alterata coordinazione e debolezza motoria). La più seria complicanza correlata alla terapia con Talidomide è rappresentata, invece, dal tromboembolismo venoso (TEV), la cui incidenza raggiunge il 25% se la Talidomide è associata ad altri chemioterapici, in particolare nei primi mesi di terapia; sulla base del rischio individuale del paziente, è indicata una profilassi con ASA, con anticoagulanti eparinici o, in alcuni casi, con warfarin; visti i noti effetti teratogeni, è poi fondamentale, laddove indicato, il ricorso a metodiche contraccettive (90; 91).

Alla Talidomide hanno fatto seguito altri IMiD, rappresentati dalla Lenalidomide (di seconda generazione) e dalla Pomalidomide (di terza generazione). La **Lenalidomide** (Revlimid®) è stata approvata ufficialmente nel 2006 da FDA e nel 2008 da EMA per la terapia del RRMM (in associazione al desametasone); successivamente, l'indicazione è stata estesa a pazienti in prima linea non candidabili a chemioterapia ad alte dosi e ASCT (2017) e poi come terapia di mantenimento dopo ASCT (2018). Diversi studi ne hanno dimostrato una maggiore efficacia e una minore tossicità rispetto alla Talidomide.

I suoi meccanismi d'azione sono simili a quelli del farmaco di prima generazione:

- azione di co-stimolazione sui linfociti T, la cui attivazione richiede normalmente un doppio segnale: il primo derivante dal T-cell receptor, il secondo dall'attivazione dei sistemi di co-stimolazione come B7/CD28; la Lenalidomide rende non necessario il secondo segnale, grazie ad un incremento dell'IL-2, con effetto di attivazione e proliferazione
- attivazione delle cellule NK: favorisce, tramite IL-2 e IFN- γ , la proliferazione delle cellule NK e promuove la ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity)
- effetti anti-angiogenici tramite riduzione di VEGF ed altri fattori di crescita, ma anche mediante inibizione del pathway di PI3K/Akt
- effetto diretto anti-proliferativo e anti-tumorale sulla plasmacellula mediante la caspasi-8 e sul microambiente midollare attraverso la riduzione della sintesi di molecole di adesione ed inibizione del differenziamento osteoclastico, oltre ad avere documentati effetti anti-infiammatori (mediante inibizione di COX-2 e quindi della sintesi di prostaglandine coinvolte nei processi di flogosi con effetto pro-mielomatoso) (92). Per quanto riguarda la tossicità, i principali eventi avversi correlati all'assunzione di Lenalidomide comprendono astenia, rash cutanei, mielotossicità (anemia, trombocitopenia e soprattutto neutropenia), eventi infettivi (infezioni di grado 3 o 4 in circa il 20% dei pazienti, specialmente se neutropenici o in terapia cronica con glucocorticoidi), TEV (fino al 10% dei pazienti, soprattutto nei primi 6-12 mesi di trattamento; è richiesta un'adeguata profilassi come per la Talidomide) e tossicità gastrointestinale (soprattutto diarrea correlata a malassorbimento degli acidi biliari ed è infatti generalmente responsiva alla somministrazione di colestiramina); è stata anche riscontrata un'aumentata incidenza di fibrillazione atriale mentre non è presente la neuropatia periferica descritta invece per la Talidomide (93). Poiché la Lenalidomide è principalmente escreta in forma immodificata per via urinaria, è fondamentale l'aggiustamento del dosaggio sulla base della funzionalità renale al fine di non incrementarne la concentrazione plasmatica e quindi la tossicità (94).

La **Pomalidomide** (Imnovid®) è stata invece approvata nel 2013 da FDA e successivamente da EMA nel trattamento del RRMM dopo almeno due linee di terapia, comprendenti Lenalidomide e Bortezomib. I suoi meccanismi d'azione sembrano sostanzialmente analoghi a quelli della Lenalidomide, rispetto alla quale presenta il vantaggio di essere eliminata per via renale in forma di metaboliti inattivi e dunque di non necessitare di aggiustamenti di dosaggio nella malattia renale cronica. Anche la tossicità è simile: gli eventi avversi più importanti sono rappresentati da astenia, mielotossicità e TEV (95) (96).

4.1.2 INIBITORI DEL PROTEASOMA

Gli inibitori del proteasoma sono la seconda categoria di “nuovi farmaci” che hanno rivoluzionato la terapia del MM. Il proteasoma è un complesso citoplasmatico multienzimatico, responsabile della degradazione della maggior parte delle proteine intracellulari danneggiate o non funzionanti. Pertanto, in virtù dei suoi diversi *target* di degradazione (tra cui cicline, chinasi ciclino-dipendenti, fattori di trascrizione, oncogeni ed oncosoppressori), è un elemento chiave nella regolazione di vari processi cellulari quali proliferazione, apoptosi, angiogenesi ed invecchiamento cellulare. Il proteasoma 26S si compone di un *core* catalitico (subunità 20S), la cui attività proteolitica può essere di tre tipi, sulla base della varietà di dominio β presente a livello del sito catalitico (*chymotrypsin-like* CT-L, *trypsin-like* T-L e *caspase-like* C-L) e due complessi regolativi (19S). Il MM beneficia in modo molto importante di questa categoria farmacologica, in virtù dell’abnorme sintesi proteica da parte delle PC neoplastiche, relata all’iper-produzione di Ig monoclonali (97) (98) (99).

Bortezomib (Velcade®) rappresenta il PI di prima generazione. Esso è stato approvato nel 2003 per il trattamento del RRMM e, successivamente, nel contesto di regimi di prima linea (sia per i pazienti candidabili che non candidabili al trapianto autologo). La somministrazione era eseguita inizialmente per via endovenosa, ma alcuni studi hanno dimostrato la non inferiorità di quella sottocutanea (che dunque rappresenta oggi lo *standard*) (100).

Il principale meccanismo d’azione di questo farmaco è da imputare al suo legame reversibile al sito proteolitico 20S del proteasoma con sua successiva inibizione e quindi accumulo proteico avente esito nell’attivazione di meccanismi apoptotici; tuttavia, sono stati individuati altri meccanismi quali l’inibizione del *pathway* di NF- κ B (tramite la ridotta degradazione del suo inibitore I κ B), la stimolazione dell’apoptosi tramite l’aumento dello stress ossidativo e l’attivazione della caspasi-9 ma anche mediante un’inibizione dei sistemi di riparazione del genoma (consentendo così anche un effetto sinergico con altri farmaci), inibizione di alcuni meccanismi di farmaco-resistenza (mediati ad esempio dal *pathway* di NF- κ B e dalla glicoproteina P), stimolo del differenziamento osteoblastico ed inibizione di quello osteoclastico, riduzione della sintesi di citochine pro-infiammatorie in tutto l’organismo ed anche a livello renale (dove risulta particolarmente efficace nel rallentare lo sviluppo della *cast nephropathy*) (101) (102) (103) (104) (105).

Le principali tossicità correlate all’impiego di questo farmaco sono rappresentate dalla neuropatia periferica (sviluppata in circa il 40% dei pazienti), da trombocitopenia (fino al 30% dei pazienti) ed altre manifestazioni di mielotossicità, da riattivazione di un’infezione latente da virus della varicella-zoster VZV (da imputare presumibilmente ad una riduzione della conta linfocitaria T CD4+) e gastrointestinali. Al contrario degli IMiD, il Bortezomib non determina un aumentato rischio tromboembolico, non richiedendo pertanto la profilassi antiaggregante/anticoagulante convenzionale

(106).

Successivamente a Bortezomib, sono stati sviluppati PI di seconda generazione rappresentati da **Carfilzomib** (Kyprolis®), la cui unica modalità di somministrazione è endovenosa) ed **Ixazomib** (Ninlaro®, disponibile invece per via orale), entrambi approvati da FDA e poi da EMA per il trattamento del RRMM. I meccanismi d'azione sono simili a Bortezomib. Carfilzomib si caratterizza per un legame molto più selettivo ma irreversibile al proteasoma, mentre Ixazomib dà luogo ad un legame altrettanto selettivo ma reversibile. Per quanto concerne il profilo di tossicità, l'impiego di Carfilzomib è gravato principalmente dallo sviluppo di possibili complicanze cardiovascolari (sono stati ipotizzati meccanismi causali differenti, quali il danneggiamento delle cellule endoteliali oppure un danno diretto a carico dei cardiomiociti). In particolare, questo farmaco è correlato allo sviluppo di ipertensione arteriosa, slatentizzazione o aggravamento di scompenso cardiaco, cardiopatia ischemica – per cui è raccomandato un adeguato *screening* cardiologico prima dell'inizio del trattamento ed un monitoraggio di pressione arteriosa, elettrocardiografia ed ecocardiografia, troponine e BNP/NT-ProBNP). Altri possibili eventi avversi comprendono astenia, infezioni, tossicità gastrointestinale ed ematologica (soprattutto piastrinopenia ed anemia), mentre l'incidenza di neuropatia è nettamente inferiore rispetto a Bortezomib; Ixazomib è correlato soprattutto ad effetti avversi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea), mielotossicità ed eruzioni cutanee (107) (108) (109) (110).

4.1.3 ANTICORPI MONOCLONALI

Un'altra importante rivoluzione nella terapia del MM è stata rappresentata dall'introduzione di anticorpi monoclonali rivolti contro *targets* espressi sulle cellule neoplastiche, cellule del microambiente midollare e cellule del sistema immunitario. I principali farmaci appartenenti a questa classe sono rappresentati da due anticorpi anti-CD38, vale a dire **Daratumumab** (Darzalex®) ed **Isatuximab** (Sarclisa®) e dall'anti-SLAMF7 **Elotuzumab** (Empliciti®).

I meccanismi d'azione di questi farmaci sono vari ed includono la citotossicità diretta anticorpo-dipendente (ADCC), la citotossicità complemento-dipendente (CDC) e la citotossicità mediata dalla fagocitosi (ADCP), ma vi è anche evidenza che il riconoscimento di cellule neoplastiche opsonizzate (o di loro frammenti) da parte di cellule immunitarie possa elicitarne una risposta specifica T-cellulare; inoltre, sono stati dimostrati effetti diretti derivanti dall'interazione con i *targets* specifici: il legame di Elotuzumab a SLAMF7 induce direttamente la citotossicità delle cellule NK ed il legame di Daratumumab ed Isatuximab a CD38 ne inibisce le funzioni ectoenzimatiche. Oltre all'azione sul sistema immune, gli anticorpi monoclonali possono pertanto avere azione diretta di induzione della morte cellulare attraverso interferenza con i meccanismi di *signaling* cellulare, inibizione di fattori di

crescita o molecole di adesione. Le principali caratteristiche relativamente alla tossicità di questi farmaci sono riconducibili a *infusion related reactions* (IRR), che si sviluppano nel 10% dei pazienti trattati con anti-SLAMF7 e fino al 40-50% dei pazienti trattati con anti-CD38, in particolare alla prima infusione (111).

4.1.4 INIBITORI DELL'ISTONE DE-ACETILASI

Tra i principali meccanismi epigenetici di regolazione dell'espressione genica uno di quelli maggiormente studiato è l'acetilazione degli istoni. Quando gli istoni sono acetilati, si realizza un'apertura della cromatina (eucromatina) che la rende accessibile agli enzimi necessari ai processi di duplicazione e trascrizione; viceversa, quando gli istoni sono deacetilati, la cromatina risulta non accessibile (eterocromatina) – anche nelle cellule tumorali. Questo razionale ha portato allo sviluppo di farmaci che inibiscono gli enzimi appartenenti alla famiglia dell'istone deacetilasi: il primo ad essere stato approvato per il trattamento del MM è il Panobinostat (Farydak®), un inibitore non selettivo di varie deacetilasi (enzimi che presentano, tra l'altro, un'aumentata espressione nelle cellule mielomatose). Esso regola diversi processi cellulari, quali replicazione e riparazione del DNA, rimodellamento della cromatina, trascrizione di geni, progressione del ciclo cellulare, degradazione proteica e riorganizzazione del citoscheletro. Inoltre, sembra che questo farmaco abbia un ruolo sinergico con i PI: come visto, i PI determinano un accumulo di proteine non adeguatamente eliminate che si accumulano a costituire il cosiddetto “aggresoma”; sembra che Panobinostat interferisca pure con la degradazione dell'aggresoma con successivo effetto citotossico.

Per quanto concerne la tossicità, Panobinostat è stato correlato ad effetti avversi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea), ematologici (in particolare a trombocitopenia) e cardiologici (allungamento del QTc) (112).

4.1.5 CHECK-POINT INHIBITORS

Diversi studi hanno messo in luce, in anni recenti, il ruolo dell'*immune escape*, ovvero la capacità delle cellule neoplastiche di evadere i meccanismi di controllo del sistema immunitario e divenuti oggi *targets* delle immunoterapie. I principali sistemi bersagliati a scopo terapeutico sono rappresentati da CTLA-4/B7 e PD-1/PDL-1. I farmaci utilizzati nella terapia anti-tumorale inibiscono tipicamente il pathway di PD-1. PD-1 (“Programmed cell death protein 1”) è una proteina espressa sulla superficie delle cellule T attivate ed il legame con PDL-1 e PDL-2 determina segnali inibitori sui linfociti stessi. I ligandi sono fisiologicamente espressi dalle APC mentre si ha un'espressione patologica da parte delle cellule neoplastiche e del microambiente tumorale, consentendo un

meccanismo di evasione della risposta immunitaria. Sulla base di queste osservazioni, sono stati sviluppati degli anticorpi monoclonali anti-PD-1 (Nivolumab e Pembrolizumab) ed anti-PDL-1 (Atezolizumab) con la finalità di impedire l'inattivazione della risposta T-cellulare. L'impiego di queste forme di immunoterapia è oggi approvato nella terapia del melanoma e del *Non Small Cell Lung Cancer* (113) (114). Diversi *trials* hanno testato l'impiego degli anticorpi anti-PD-1 in associazione a IMiD e Desametasone, dimostrando il potenziale effetto sinergico di queste classi di farmaci; tuttavia, lo sviluppo di importanti tossicità riconducibili agli *immune-related adverse events* ha determinato la sospensione di questi studi (115).

4.1.6 INIBITORI DI BCL-2

Venetoclax (Venclexta®) è un potente e selettivo inibitore di Bcl-2. Bcl-2, insieme a Mcl-1 e Bcl-XL, è una delle più importanti proteine anti-apoptotiche con ruolo chiave nella sopravvivenza delle cellule di MM. In linea con il suo meccanismo di azione, Venetoclax ha un razionale di sinergismo di azione con i PI via Bcl-2/Mcl-1. Inoltre, sono stati riportati risultati particolarmente favorevoli nell'ambito di pazienti positivi per la t(11;14) (riscontrabile in circa il 20% dei pazienti) e/o con elevati livelli di espressione di Bcl-2, suggerendo la possibilità di una *targeted therapy*. I principali effetti avversi correlati a questo farmaco sono rappresentati da tossicità gastrointestinale ed ematologica e da processi infettivi (116) (117).

4.1.7 INIBITORI DELL'ESPORTINA

Selinexor (Xpovio®) rappresenta il primo inibitore dell'esportina 1 (codificata dal gene XPO1) ad essere stato sviluppato in clinica. Le esportine rappresentano un sistema di canali di membrana che regolano il trasporto di molecole dal nucleo al citoplasma, importanti per l'omeostasi cellulare. L'inibizione dell'esportina 1 risulta capace di indurre la ritenzione nucleare ed attivazione di proteine oncosoppressorie, quali p53 ed Ikb, ma anche la soppressione dell'espressione di oncoproteine, quali Myc e Bcl-2, nonché l'attivazione del recettore per i glucocorticoidi. Per quanto riguarda la tossicità, questo farmaco è correlato soprattutto ad eventi avversi gastrointestinali e a mielotossicità (in particolare piastrinopenia) (118).

4.2 TERAPIA NEL PAZIENTE CON MM DI NUOVA DIAGNOSI

La decisione di intraprendere un trattamento nei pazienti con NDMM è stabilita sulla base dei criteri IMWG 2014 (13). Pertanto, la terapia viene iniziata non appena viene posta diagnosi di mieloma

attivo, ovvero quando sono presenti danni d'organo (CRAB) o almeno uno dei cosiddetti MDE (*Myeloma Defining Events*).

La scelta del tipo di trattamento deve essere effettuata sulla base delle evidenze disponibili e delle caratteristiche del paziente (età, *performance status* e comorbilità):

- In genere, i pazienti giovani (≤ 65 anni) e senza rilevanti comorbilità sono candidati al trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche, preceduto da un breve regime di induzione (3-4 cicli) comprensivo di “nuovi farmaci” (associati o meno a chemioterapia) e seguito da una eventuale terapia di consolidamento/mantenimento.
- I pazienti di età compresa fra i 65 ed i 70 anni considerati ancora *fit* (età biologica inferiore all'età anagrafica, buona funzionalità d'organo e soprattutto assenza di problematiche cardio-respiratorie) sono candidabili al trapianto, eventualmente con chemioterapia a dosaggio ridotto.
- Per i pazienti di età superiore ai 70 anni o per altri motivi non candidabili al trapianto autologo lo *standard* è la chemioterapia convenzionale in associazione ai nuovi farmaci, o in alternativa una combinazione di farmaci non chemioterapici.

4.2.1 TERAPIA DI PRIMA LINEA NEL PAZIENTE CANDIDATO AL TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI

Storicamente, il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (ASCT) ha rappresentato il principale miglioramento della terapia di prima linea dei pazienti giovani affetti da MM. Esso è stato inizialmente introdotto negli anni '80 (119), ma solo a partire dagli anni '90 numerosi studi hanno fornito le prove sostanziali della superiorità di ASCT rispetto alla chemioterapia convenzionale (CCT), sia in termini di CR, PFS, e di OS (Tabella 5).

Attualmente, la chemioterapia ad alte dosi di melphalan (HDM) seguita da ASCT è considerata lo standard di cura per tutti i pazienti affetti da NDMM di età inferiore a 65-70 anni e senza rilevanti comorbilità.

Tabella 5. Risultati dei principali studi di ASCT vs chemioterapia prima dell'introduzione di nuovi

Autore	Random	N° pz	ORR%	CR%	PFS	OS
Attal IFM90 (120)	ASCT	100	81	*22	28m	57m
	CCT	100	57	5	18m	44m
Child MRC VII (85)	ASCT	200	86	44	32m	54m
	CCT	201	48	8	20m	42m
Fernand MAG90 (121)	ASCT	91	78	57	39m	65m
	CCT	94	58	20	13m	64m
Barlogie S9321 (122)	ASCT	261	93	17	17% 7aa	38% 7aa
	CCT	255	90	15	14% 7aa	38% 7aa (NS)
Barlogie TT1 vs SWOG (123)	Tandem CCT	152	NR	41 NR	37m 16m	79m 43m
Bladè PETHEMA (124)	ASCT	81	82	30	42m	66m
	CCT	83	83	11	33m (NS)	61m (NS)
PALUMBO MMSG (125)	ASCT (mel100x2) CCT	95 99	72 66	25 6	28m 16m	58m 42m

farmaci

Sulla base della dimostrata correlazione dose-risposta per il melphalan, nell'intento di aumentare ulteriormente la probabilità di ottenimento della CR e di prolungare la durata di controllo della malattia e l'OS, agli inizi degli anni '90 è stata introdotta nella pratica clinica la somministrazione di due linee sequenziali di chemioterapia ad alte dosi con trapianto di progenitori emopoietici autologhi (doppio trapianto autologo). Alcuni studi prospettici randomizzati di confronto del singolo vs doppio trapianto autologo condotti successivamente hanno prodotto dati in parte discordanti, probabilmente a causa di una non sufficientemente prolungata durata di osservazione (Tabella 6). Lo studio randomizzato francese IFM-94 ha dimostrato il beneficio clinico derivante da un doppio trapianto autologo in termini di significativo prolungamento della OS (42% a 7 anni per i pazienti che avevano ricevuto il doppio autotrapianto vs 21% per il gruppo di controllo) e della sopravvivenza libera da eventi (EFS) (20% vs 10% a 7 anni); d'altro canto lo studio multicentrico randomizzato italiano di fase III, "Bologna 96", ha evidenziato una maggior percentuale di CR nei pazienti

randomizzati a ricevere due trapianti, ed un prolungamento significativo dell'EFS, pari a 12 mesi, per questo gruppo, senza tuttavia rilevare una differenza significativa in termini di OS. In entrambi gli studi i maggiori benefici clinici del doppio ASCT sono stati conseguiti nei pazienti che avevano fallito l'ottenimento di una risposta di elevata qualità (remissione completa o risposta parziale di buona qualità) dopo il primo trapianto autologo (126; 127). Una revisione sistematica di cinque *trials* randomizzati per stabilire il vantaggio del doppio ASCT rispetto a quello singolo ha concluso che non vi sono tuttora dati sufficienti, considerando da una parte che sono stati riscontrati dei *bias* negli studi ad oggi pubblicati, dall'altra che non erano contemplati i più recenti farmaci attualmente a disposizione (128).

Tabella 6. Risultati dei principali studi di singolo vs tandem ASCT prima dell'introduzione di nuovi

Autore	Random	N° pz	ORR%	CR%	PFS	OS
Attal IFM94 (126)	Singolo	199	84	*42	25m	48m
	Tandem	200	88	50	30m	58m
Cavo BO96 (127)	Singolo	163	NR	33	23m	65m
	Tandem	158		47	35m	71m (NS)
Fernand MAG95 (129)	Singolo	94	NR	*37	31m	49
	Tandem	99		39	33m	73 (NS)
Goldschmidt (130)	Singolo	Tot 358	NR	NR	23	NR
	Tandem				29 (NS)	
Sonneveld (131)	Singolo	148	86	13	21m	50
	Tandem	155	90	32	22m	55 (NS)

Note ORR risposte globali, CR remissione completa, PFS sopravvivenza libera da eventi, OS sopravvivenza globale, IFM Intergroupe francophone du myélome, BO Bologna. MAG Myélome autogreffe, NR non raggiunta, nCR remissione quasi completa, *>=nCR

farmaci

Nel corso degli ultimi anni, l'entrata in campo dei nuovi farmaci - rivelatisi strategie terapeutiche altamente efficaci nei pazienti con MM di nuova diagnosi - ha portato ad interrogarsi circa il ruolo del trapianto autologo, fino ad ora considerato lo *standard of care* nella terapia di prima linea dei pazienti di età ≤ 65 anni.

Palumbo et al hanno confrontato, in uno studio randomizzato di fase III, l'effetto sulla PFS e OS di Melphalan (200mg/m²), con successivo ASCT, rispetto a Melphalan-Prednisone-Lenalidomide (MPR), al seguito di una comune terapia di induzione con Lenalidomide-Desametasone. Si è inoltre comparato l'effetto di un mantenimento con Lenalidomide versus no mantenimento. I dati emersi

dimostrano come sia la PFS sia la OS siano significativamente superiori nel braccio dello studio con ASCT rispetto a MPR, con PFS mediana pari a 43 mesi vs 22 mesi ($p < 0.001$, HR 0.44 e CI 0.32-0.61) e OS a 4 anni pari a 82% vs 65% ($p = 0.02$, HR: 0.55, CI 0.32-0.93). Il mantenimento con Lenalidomide ha inoltre dimostrato un effetto nel prolungare significativamente la PFS rispetto all'osservazione (132).

Un ulteriore studio randomizzato, condotto dall'Intergroupe Francophone du Myelome (IFM 2009) ha comparato la terapia con Bortezomib-Lenalidomide-Desametasone (VRD) per 8 cicli rispetto a VRD + ASCT, seguiti (in entrambi i bracci) da un anno di mantenimento con Lenalidomide. Tale *trial*, seppur con un *follow-up* mediano di 48 mesi, ha dimostrato come il gruppo sottoposto ad intensificazione con ASCT avesse un beneficio significativo sia in termini di percentuali di CR e MRD-negatività sia in termini di PFS (mediana di 50 mesi vs 36 mesi; HR=0.65; $p = 0.001$), indipendentemente dallo stadio ISS e dal rischio citogenetico; non sono invece emersi vantaggi statisticamente significativi dell'OS (133).

Nell'era contemporanea dei nuovi farmaci, la definizione del valore aggiuntivo del doppio ASCT risulta ancora più stringente. In considerazione di risultati discordanti e al fine di confrontare il ruolo del doppio rispetto al singolo ASCT, è stata eseguita una analisi a lungo termine, con un *follow-up* mediano di 10 anni, di tre *trials* randomizzati europei basati su regime di induzione con tripletta Bortezomib-*based* (VTD o PAD) seguito da ASCT, consolidamento e/o mantenimento (134; 135; 136). Sulla base dei disegni degli studi, i pazienti erano assegnati a ricevere singolo o doppio ASCT, permettendo quindi una comparazione tra i due trattamenti. I risultati di questa analisi hanno mostrato come l'assegnazione a ricevere doppio ASCT sia correlata ad un vantaggio di PFS e OS e come tale vantaggio sia confermato e maggiormente evidente nei pazienti ad alto rischio, definiti sia sulla base di uno stadio ISS II/III e citogenetica positiva per t(4;14) e/o del(17p), sia sulla base di uno *score* prognostico costruito su un modello multivariato indipendente dalla terapia e dato dall'integrazione di dati derivanti dallo stadio ISS (I *versus* II/III), citogenetica (rischio standard *versus* alto rischio) e raggiungimento o meno di una CR (137).

Discordanti appaiono invece i risultati ottenuti dallo studio "StaMINA", nel quale i pazienti, dopo una terapia di induzione variabile e ASCT singolo, sono stati randomizzati a ricevere terapia di mantenimento con Lenalidomide, oppure terapia di consolidamento con 4 cicli di VRD seguiti da mantenimento con Lenalidomide oppure il secondo ASCT seguito da mantenimento con Lenalidomide fino a progressione; il *follow-up* di questi pazienti non ha mostrato evidenze significative di PFS né di OS; occorre tuttavia considerare che la notevole eterogeneità nei regimi di induzione utilizzati rende i risultati di questo *trial* di difficile valutazione e confronto con altri studi (138).

L'esigenza di investigare prospetticamente il ruolo di ASCT e tandem ASCT per il paziente giovane nell'epoca dei nuovi farmaci, ha portato al disegno del trial clinico europeo EMN02/HOVON65, oggetto della presente tesi.

4.2.1.1 REGIMI DI INDUZIONE

Il primo regime ad essere storicamente impiegato per l'induzione al trapianto è stato rappresentato dalla poli-chemioterapia VAD (vincristina, adriamicina e desametasone), successivamente soppiantato dall'introduzione dei "nuovi farmaci", dimostratisi superiori nella fase preparatoria al trapianto. Esiste un'ampia convergenza di dati circa la superiorità di risposta offerta dalla combinazione Talidomide-Desametasone (TD) o Talidomide-chemioterapia rispetto ai classici regimi VAD o VAD-simili. Il *trial* "Bologna 2002" ha, in tal senso, valutato il ruolo della terapia di induzione con TD mentre altri studi hanno sperimentato l'associazione di TD e chemioterapici convenzionali, quali adriamicina o ciclofosfamide (139; 140; 141).

Negli ultimi anni numerosi trials clinici di fase II e III hanno esplorato l'efficacia di un regime di induzione pre-trapianto autologo comprensivo di **Bortezomib**. Tra questi, lo studio francese IFM2005-01 ha dimostrato la superiorità della combinazione Bortezomib-Desametasone (VD) nei confronti del regime VAD in termini di rate di risposte post induzione e post trapianto e di prolungata PFS (142).

L'aggiunta alla combinazione VD di un terzo farmaco chemioterapico quale la doxorubicina (schema PAD) o la ciclofosfamide (VCD), ha ulteriormente incrementato la probabilità di risposta e di remissione completa (143; 144; 145; 146).

Di particolare interesse risulta la combinazione di Bortezomib con un farmaco attivo sul microambiente midollare come Talidomide. Il protocollo italiano GIMEMA MMY-3006 ha dimostrato la superiorità della tripletta Bortezomib-Talidomide-Desametasone (VTD) vs TD, somministrata come terapia di induzione pre e consolidamento post doppio trapianto, in termini di rate di risposta e PFS (134); inoltre, l'analisi finale con un *follow-up* mediano di 10 anni ha dimostrato un vantaggio significativo anche in termini di OS, anche in pazienti ad alto rischio (sulla base dello stadio ISS, delle caratteristiche citogenetiche e del raggiungimento di una CR) (147). Il ruolo dello schema VTD è stato anche valutato dallo studio "Pethema/GEM 2005", nel quale i pazienti sono stati randomizzati a ricevere tre diversi regimi di induzione: TD, VTD oppure schemi polichemioterapici complessi (tramite alternanza di terapia con VBCP/VBAD) in associazione a V. È stato dimostrato come la tripletta VTD garantisca un miglioramento prognostico significativo in termini di PFS (senza però un aumento significativo di OS) rispetto agli altri regimi terapeutici (148) (149). Anche il confronto tra il *trial* "Total therapy 3" (nel quale i pazienti erano sottoposti a terapia di induzione con VTD e la polichemioterapia PACE – vale a dire la combinazione data da cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamide ed etoposide – seguita da HDM e doppio ASCT e quindi da consolidamento con VTD-PACE e da mantenimento di un anno con VTD e di due anni con TD) ed il suo predecessore "Total

therapy 2” (nel quale non era previsto l’impiego del PI) ha contribuito a validare l’utilizzo della tripletta VTD (150). Due studi successivi, uno retrospettivo e l’altro prospettico, hanno invece confrontato le terapie di induzione con VTD e VCD, evidenziando come la tripletta comprendente l’IMiD si associ ad un maggiore tasso di almeno VGPR e ad una maggiore ORR, a fronte anche di una minore tossicità ematologica (151) (152).

Una metanalisi ha quindi raccolto i risultati dei diversi *trials* di confronto tra regimi di induzione Bortezomib-*based* e non, sancendo definitivamente la superiorità dei primi in termini di qualità della risposta, PFS ed OS (153). I risultati particolarmente incoraggianti ottenuti dall’associazione di un PI ed un IMiD hanno dunque incentivato a sperimentare la tripletta comprendente Bortezomib, Lenalidomide e Desametasone (**VRD**): un primo studio di fase I/II ha valutato l’ottenimento di un ottimo ORR e di risposte di elevata qualità, associate ad un buon profilo di tollerabilità, nell’impiego di questa tripletta (154); uno studio di fase II successivo ha evidenziato come, in pazienti sottoposti ad induzione con VRD, quindi ad HDM e ASCT, a consolidamento con VRD ed infine a mantenimento con R, vi sia un tasso di MRD-negatività valutato tramite citofluorimetria a flusso del 68%, senza alcun paziente ricaduto ad un *follow-up* mediano di 39 mesi (155). Gli ottimi risultati della terapia di induzione con VRD sono stati validati anche dal *trial* francese “IFM 2009” (156).

Sono stati recentemente pubblicati i risultati dello studio di fase III “Pethema/GEM 2012”: oltre quattrocento pazienti sono stati trattati con terapia di induzione data da 6 cicli di VRD, ASCT con regime di condizionamento Busulfano e Melphalan *versus* Melphalan, seguito da 2 cicli di VRD di consolidamento. È stato evidenziato come la profondità della risposta ottenuta migliori nel tempo: sia il tasso di CR che di MRD-negatività sono progressivamente aumentati nel corso dell’intero *iter* terapeutico (anche nei pazienti ad alto rischio citogenetico) (157).

Complessivamente, una terapia di induzione basata su una tripletta comprensiva di Bortezomib ed IMiD è in grado di raggiungere una percentuale di CR fino al 33% e una percentuale di MRD negatività pari al 29% al termine della terapia di induzione (157; 134). Le percentuali di CR e MRD negatività dopo il termine dell’intero programma terapeutico raggiungono valori del 50-54% e 45%, rispettivamente (157; 134). Il regime comprensivo dell’IMiD di seconda generazione Lenalidomide (VRD) ha il vantaggio rispetto a quello comprensivo dell’IMiD di prima generazione Talidomide (VTD) di essere gravato da minore tossicità neurologica (4% *versus* 13% di neuropatia G3-G4), aspetto che permette anche di incrementare il numero di cicli di induzione al fine di massimizzare la profondità di risposta prima di procedere con la fase successiva di trapianto autologo (157).

In uno studio di fase I è stata anche valutata l’aggiunta della Ciclofosfamide alla tripletta VRD (VDCR), dimostrando la maggiore efficacia (per ORR e qualità della risposta ottenuta, finanche sCR) a scapito, tuttavia, di un incremento molto significativo della tossicità (158).

Una recente analisi integrata di più *trials* finalizzata al confronto tra i regimi di induzione con VTD e VRD ha evidenziato come la tripletta comprendente l’IMiD di seconda generazione consenta il

raggiungimento di un maggior tasso di risposte almeno VGPR e di MRD-negatività, con un migliore profilo globale di tollerabilità (159).

Nell'ambito dei "nuovi farmaci" di ultima generazione, è stato inoltre valutato il PI di seconda generazione **Carfilzomib** (K). Vari studi di fase I e II hanno dimostrato buona efficacia e tollerabilità della sua associazione ad IMiD quali T e R oppure a Ciclofosfamide (160) (161) (162) (163). Sono stati recentemente presentati i risultati preliminari dello studio "FORTE" nel quale pazienti candidabili a trapianto sono stati randomizzati a ricevere terapia di induzione con KRd seguita da HDM e ASCT e quindi da consolidamento con KRd, oppure 12 cicli di KRd, oppure terapia di induzione con KCD seguita da HDC e ASCT e quindi da consolidamento con KCD. Analisi eseguite con un *follow-up* mediano di 25 mesi hanno evidenziato una superiorità degli approcci KRd-based in termini di qualità delle risposte ottenute (fino a sCR nel 44% dei pazienti e almeno CR nel 60%) e MRD-negatività (58%); i risultati dei due bracci con KRd (12 cicli *versus* KRd e ASCT) sono statisticamente sovrapponibili, ad eccezione che nei pazienti ad alto rischio, nei quali la terapia inclusiva di ASCT ha ridotto il rischio di *early relapse* (164).

Infine, si sta oggi valutando l'aggiunta di un quarto farmaco (in particolare di anticorpi monoclonali) alle triplette comunemente impiegate nei regimi terapeutici di induzione. A tale proposito, il *trial* randomizzato di fase III "Cassiopeia" ha evidenziato come l'aggiunta di **Daratumumab** alla tripla VTD nella terapia di induzione e consolidamento determini un aumento significativo di profondità della risposta (29% sCR; 39% almeno CR; 64% MRD-negatività), a fronte di una tossicità accettabile (165).

Nello studio randomizzato di fase II "GRIFFIN" l'impiego di Daratumumab in associazione a VRD nella terapia di induzione e consolidamento e in associazione a R nella terapia di mantenimento dei pazienti eleggibili al trapianto ha determinato un miglioramento delle percentuali di sCR e MRD-negatività senza un significativo impatto sul profilo di tossicità e sulla mobilizzazione delle cellule staminali emopoietiche autologhe, indicando che la D-VRD potrebbe diventare un potenziale nuovo *standard of care* per i pazienti NDMM eleggibili a ASCT (166). Inoltre, è attualmente in corso lo studio randomizzato di fase III "Perseus", nel quale pazienti candidabili a trapianto sono stati randomizzati a ricevere terapia di induzione con Dara-VRD seguita da HDC e ASCT, quindi da consolidamento con Dara-VRD e da mantenimento con Dara-R fino a progressione, oppure terapia di induzione con VRD seguita da HDM e ASCT, quindi da consolidamento con VRD e da mantenimento con R fino a progressione; *endpoint* primario è la PFS (167). In Italia, allo stato attuale, la terapia di induzione più frequentemente utilizzata è rappresentata dall'impiego della tripla VTD per un totale di 4-6 cicli.

4.2.1.2 MOBILIZZAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE E REGIMI DI CONDIZIONAMENTO

La mobilitazione delle cellule staminali emopoietiche (CSE) CD34+ dal midollo osseo al sangue periferico è un prerequisito indispensabile per la raccolta di un numero adeguato di CSE e per procedere al ASCT con successo. Il numero di CSE CD34+ da raccogliere per consentire una sufficiente ripopolazione midollare dovrebbe essere compreso tra 2×10^6 e 5×10^6 cellule CD34+ /kg; mentre occorre fissare un target più elevato per i pazienti in cui è previsto un tandem ASCT.

Il regime più ampiamente utilizzato per la chemio-mobilitazione è rappresentato da ciclofosfamide (alla dose di 2-4 g/m²) seguito da una stimolazione con il fattore di crescita granulocitario (G-CSF) (168).

Nel caso di inadeguata mobilitazione, l'aggiunta di Plerixafor è particolarmente efficace nell'incrementare la raccolta delle CSE. Tale farmaco è un antagonista di CXCR-4 che agisce impedendone il legame a SDF-1 e dunque l'adesione delle CSE alla matrice midollare; è oggi approvato da EMA ed AIFA in associazione al G-CSF nei pazienti *poor mobilizers*, cioè che abbiano fallito un precedente tentativo di mobilitazione (169).

Il regime di condizionamento al trapianto autologo più largamente utilizzato è il melphalan alla dose di 200 mg/m², che si è dimostrato essere equivalente e meno tossico rispetto alla dose di 140 mg/m² associata ad irradiazione corporea totale (TBI) (170). Recentemente un *trial* clinico di fase 3 ha mostrato come l'aggiunta di busulfano alla terapia di condizionamento con melphalan 140 mg/m², sia in grado di prolungare la PFS (65 mesi rispetto a 44 mesi con melphalan 200 mg/m² da solo (p=0.022). Pertanto, questo regime di combinazione potrebbe diventare un nuovo standard nel prossimo futuro (171).

4.2.1.3 TERAPIA DI CONSOLIDAMENTO

Nonostante il suo ruolo sia ancora globalmente dibattuto e non vi siano evidenze sufficienti a favore di un suo impiego sistematico, la terapia di consolidamento è frequentemente eseguita per incrementare profondità e durata della risposta ottenuta e ricalca generalmente gli schemi di trattamento utilizzati nei regimi di induzione (172).

Pionieristico è stato, nella valutazione delle terapie di consolidamento, un *trial* che ha dimostrato il miglioramento della PFS e della *response rate* (pur senza un aumento significativo dell'OS) ottenuto tramite la somministrazione di Bortezomib in mono-terapia come consolidamento post-trapianto, rispetto alla mancata somministrazione dello stesso. Tale beneficio è risultato significativo in particolare nei pazienti non aventi raggiunto precedentemente almeno una VGPR (173).

Per quanto riguarda invece le terapie di combinazione, promettenti sono stati i risultati ottenuti dalla tripletta VTD: alcuni studi hanno infatti dimostrato come la terapia di combinazione basata su questo regime consenta un miglioramento prognostico in termini di CR *rate* e dunque di TTP, ma anche in termini di remissione molecolare (174) (175). Anche una sub-analisi del *trial* “GIMEMA-MMY-3006” ha dimostrato come il consolidamento con VTD contribuisca significativamente ad un aumento di profondità della risposta (fino a CR) e di PFS rispetto alla doppietta TD (176). Di contro, lo studio “StaMINA” ha confrontato l’esecuzione di un singolo ASCT, di un *tandem* ASCT e del singolo ASCT seguito da consolidamento con 4 cicli di VRD (con successivo mantenimento a base di R in tutti i bracci) senza evidenziare differenze prognostiche significative di PFS ed OS (177). Risultati preliminari ma molto promettenti sono stati ottenuti in studi di fase II che hanno valutato l’impiego del Carfilzomib in regimi di consolidamento con tripletta KTD e KRD, portando un incremento della qualità di risposta, di MRD-negatività ed è stato anche osservato come la combinazione KRD correli ad un miglioramento del metabolismo osseo, pur senza somministrazione di bifosfonati (160) (163) (178). Un recente *trial* di fase II ha invece valutato il consolidamento con Ixazomib nella tripletta IRD, che si è dimostrata efficace in termini di MRD-negatività con buona tolleranza della terapia (179).

4.2.1.4 TERAPIA DI MANTENIMENTO

La terapia di mantenimento rappresenta invece un trattamento di lungo termine (almeno 1-2 anni, ma oggi spesso impiegato fino a progressione) che ha l’obiettivo di conservare la risposta ottenuta con le terapie precedentemente utilizzate prolungando PFS ed OS. Proprio perché trattamento di lunga durata, particolare enfasi viene posta, in questo contesto, alla tollerabilità ed alla tossicità delle terapie somministrate.

I primi farmaci ad essere impiegati con questo scopo sono stati chemioterapici convenzionali, IFN e glucocorticoidi; il fallimento di questi approcci (i cui risultati sono stati poco soddisfacenti in termini di efficacia e di tollerabilità nel lungo termine) e l’introduzione dei “nuovi farmaci” hanno aperto la strada all’impiego di questi ultimi (in particolare di IMiD e PI) anche come terapie di mantenimento (180) (181). Il primo dei “nuovi farmaci” ad essere studiato con finalità di mantenimento è stato la Talidomide. Diversi studi hanno dimostrato il beneficio sulla PFS di talidomide come agente singolo o associato al prednisone nella terapia di mantenimento dopo ASCT, ma solo in due di questi è emerso un prolungamento della OS (182) (183) (184). Visti i risultati piuttosto discordanti, sono state condotte due metanalisi, che hanno valutato come la terapia di mantenimento con T conduca ad un miglioramento prognostico in termini di PFS (solo nei pazienti a basso rischio citogenetico) ma non di OS (che è risultata anzi finanche significativamente peggiorata nei pazienti ad alto rischio

citogenetico), ed è stato nuovamente evidenziato come l'assunzione di questo farmaco per lunghi periodi possa correlare ad importanti tossicità (in particolare polineuropatia ed eventi tromboembolici) tali da determinare frequentemente la discontinuazione fino all'eventuale interruzione del trattamento (185) (186).

Per quanto riguarda invece l'IMiD di seconda generazione Lenalidomide, questo costituisce attualmente il farmaco di impiego routinario come terapia di mantenimento, secondo approvazione di FDA ed EMA. La sua efficacia è stata provata da diversi *trials* di fase III, che hanno dimostrato come il mantenimento con R (con dose di 5-15 mg/die) fino a progressione determini un incremento significativo di PFS e EFS (187) (188) ma anche di OS (189) rispetto al *placebo*. La metanalisi realizzata sulla base di questi tre studi ha confermato un miglioramento prognostico in termini di PFS ed OS, meno significativo però nei pazienti ad alto rischio citogenetico, con elevata concentrazione sierica di LDH oppure con alterata *clearance* della creatinina (< 50 ml/min). Fino al 29% dei pazienti ha dovuto interrompere la terapia per le tossicità correlate (in particolare eventi ematologici, gastrointestinali e tromboembolici); è stato inoltre confermato l'aumentato rischio (già documentato dai primi studi) di sviluppare *second primary malignancies* (SPM), comunque controilanciato dal miglioramento prognostico globale (190). Le più recenti analisi del *trial* randomizzato di fase III "Myeloma XI" hanno dimostrato come il mantenimento con l'IMiD di seconda generazione sia correlato ad un miglioramento significativo della PFS in modo indipendente dal rischio di base (anche nei pazienti ad alto rischio citogenetico) (191).

Per quanto riguarda invece i PI, due *trials* hanno valutato l'impiego del Bortezomib nella terapia di mantenimento post-ASCT: nel già citato "HOVON-65/GMMG-HD4" sono stati messi a confronto regimi terapeutici di induzione e mantenimento Bortezomib-*based* (PAD in induzione e V in mantenimento) e non (VAD in induzione, T in mantenimento), dimostrando una superiorità dei primi in termini di PFS ed OS, anche nei pazienti ad alto rischio citogenetico e con alterata funzione renale (192) (193); lo studio "Pethema/GEM" non solo ha, come visto, dimostrato la superiorità di regimi terapeutici comprensivi di V (ed in particolare la tripletta VTD) in induzione, ma ha anche randomizzato i pazienti (dopo HDM e ASCT) a ricevere mantenimento con IFN, T o TV (tutti della durata di tre anni), evidenziando un incremento significativo di CR *rate* e PFS (ma non di OS) nei pazienti trattati con il PI (194). Nonostante i buoni risultati ottenuti, la terapia di mantenimento (e dunque di lunga durata) con V ha due principali limiti: l'insorgenza della polineuropatia che spesso determina un notevole peggioramento della *quality of life* (QoL) fino all'interruzione precoce del trattamento e la somministrazione necessariamente per via parenterale. In virtù della sua somministrazione orale che lo renderebbe meglio tollerabile in un regime di mantenimento, è attuale oggetto di studio l'impiego di Ixazomib, PI di seconda generazione. Un primo *trial* randomizzato di

fase III ha valutato la somministrazione di questo farmaco per due anni come mantenimento evidenziando, rispetto al *placebo*, un aumento significativo della PFS con buona tollerabilità (195). Altri farmaci attualmente in corso di valutazione per quanto riguarda l'impiego nella terapia di mantenimento sono rappresentati da Carfilzomib, Daratumumab, Elotuzumab, ma anche dagli HDACi Panobinostat e Vorinostat (196).

Sulla base delle evidenze attuali, una revisione sistematica ha dimostrato come, in termini di PFS ed OS, la terapia di mantenimento Lenalidomide-*based* rappresenti la migliore alternativa disponibile (confronto eseguito con regimi di T + IFN, T, TV e VP) (197); l'IMiD di seconda generazione rappresenta oggi l'unico farmaco approvato da FDA ed EMA per il mantenimento e ne viene attualmente raccomandato l'impiego fino alla progressione di malattia (o comunque per almeno due anni, effettiva durata mediana della terapia nella maggior parte dei *trials* condotti).

4.2.2 TERAPIA DI PRIMA LINEA NEL PAZIENTE NON CANDIDATO AL TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI

Anche per i pazienti che (in virtù di aspetti quali età, comorbidità e *performance status*) non siano candidabili a ricevere HDC e ASCT esistono oggi numerose alternative terapeutiche; per stabilire quale sia la migliore da adottare, è necessaria una stratificazione dei pazienti che ne prenda in considerazione, in modo integrato, le diverse caratteristiche. A tale scopo, è stata proposta il *frailty score* basato sull'integrazione della scala ADL (*Activities of daily living*) di Katz, della scala IADL (*Instrumental activities of daily living*) di Lawton e del CCI (*Charlson comorbidity index*) che analizza il numero e la severità della comorbidità, con particolare attenzione alla funzione cardiocircolatoria, respiratoria, epatica e renale. Tramite queste valutazioni integrate, i pazienti geriatrici possono essere suddivisi in:

- *fit* per i quali sono da preferire regimi terapeutici comprensivi di IMiD o PI *full-dose*, associati tra loro e/o a corticosteroidi o chemioterapici convenzionali oppure, quando possibile, l'uso di molecole innovative e protocolli sperimentali
- *intermediate-fit* e *unfit-frail*, per questi pazienti è previsto l'impiego di combinazioni terapeutiche a base di farmaci a dosaggio ridotto, fino all'eventuale impiego di sole terapie palliative e di supporto) (198).

Nel paziente non candidabile a HDC e ASCT, la terapia basata sull'associazione MP ha rappresentato per anni l'unico schema in grado di determinare una risposta in almeno il 50% dei pazienti trattati, senza tuttavia migliorare la sopravvivenza globale; un incremento significativo di *response rate*, PFS

ed OS è stato ottenuto grazie all'introduzione dei "nuovi farmaci" ed alla loro associazione allo schema terapeutico convenzionalmente impiegato.

I primi regimi sperimentati nell'epoca dei "nuovi farmaci" sono stati quelli comprensivi di MP in associazione all'IMiD di prima generazione Talidomide (MPT) o al PI di prima generazione Bortezomib (MPV). Per quanto concerne lo schema MPT, diversi *trials* ne hanno dimostrato la superiorità rispetto a MP, finché una metanalisi condotta a partire da sei studi ne ha definitivamente validato l'impiego, dimostrando un incremento significativo in termini di ORR, PFS ed OS (del 20%), in modo indipendente dal rischio di base (199). Tale terapia non costituisce più una delle terapie *standard* dal momento che studi successivi hanno valutato la superiorità degli schemi comprensivi dell'IMiD di seconda generazione Lenalidomide (RD). In particolare, nello studio randomizzato di fase III "First" oltre milleseicento pazienti non eleggibili a trapianto sono stati randomizzati a ricevere una terapia di 72 settimane con MPT, una terapia di 72 settimane con RD (per un totale di 18 cicli) oppure una terapia continuativa fino a progressione con RD; tale *trial* ha evidenziato un miglioramento significativo in termini di profondità della risposta (22% CR, 27% VGPR), PFS (fino a 25,5 mesi) ed OS (circa 60 mesi *versus* 50 mesi) grazie al trattamento con RD ed ha anche dimostrato una superiorità della *continuous therapy* rispetto alla *fixed-duration therapy* in termini di *time to next treatment* (TTNT: 69,5 mesi *versus* 40 mesi) (200) (201) – la terapia continuativa con RD è così divenuta uno degli *standard of care* nel paziente non candidabile a HDC e ASCT (172). Un altro *trial* ha invece valutato l'aggiunta di un alchilante alla doppietta data da R e glucocorticoide, confrontando RD, MPR (melphalan, prednisone e Lenalidomide) e CPR (ciclofosfamide, prednisone e Lenalidomide) senza però dimostrare miglioramenti prognostici significativi tramite il ricorso alle triplette MPR o CPR (per le quali si aveva, però, un aumento significativo della tossicità ematologica) (202).

Relativamente invece al regime MPV, pionieristico è stato lo studio di fase III "VISTA", nel quale oltre seicento pazienti con NDMM non candidabili a HDC e ASCT sono stati randomizzati a ricevere MP o MPV. L'aggiunta del PI ha comportato un incremento significativo in termini di ORR (71% *versus* 35%), CR (fino al 30%) e TTP (24 mesi *versus* 16 mesi) (203) e l'analisi eseguita dopo un *follow-up* medio di 60 mesi ha evidenziato anche un miglioramento significativo dell'OS del 23% (con beneficio osservato anche nei pazienti di età superiore ai 75 anni, ISS III e ridotta *clearance* della creatinina) (204). Nel *trial* sopracitato, la somministrazione di V era bisettimanale; studi successivi hanno dimostrato simili benefici ricorrendo ad una singola somministrazione settimanale, con migliore aderenza alla terapia da mettere soprattutto in relazione alla minore incidenza di neuropatia periferica (205). In virtù delle caratteristiche viste, lo schema MPV si è affermato tra gli *standard of care* nelle terapie di prima linea del paziente non candidabile a HDC e ASCT (172).

Nel *trial* “SWOG S0777”, invece, la tripletta VRD è stata confrontata a RD come terapia di prima linea in pazienti con NDMM, eleggibili e non al trapianto; la superiorità della tripletta comprendente sia l’IMiD di seconda generazione che il PI (con una tossicità sovrapponibile, salvo per la neuropatia periferica, di maggiore impatto nei pazienti trattati con la tripletta comprensiva di V) è stata dimostrata in entrambi i gruppi (ORR: 82% *versus* 72%; almeno CR: 16% *versus* 8%; PFS: 43 mesi *versus* 30 mesi; OS: 75 mesi *versus* 64 mesi); subanalisi relative ai pazienti di età superiore ai 65 anni trattati con VRD hanno evidenziato PFS ed OS di 34 e 65 mesi rispettivamente (206) (207). Il *trial* “MARBLE” sta attualmente valutando l’impiego di uno schema terapeutico dato dall’alternanza di VD e RD (208), mentre alcuni studi di fase II hanno già confermato la validità di un regime modificato di VRD con riduzione dei dosaggi (“VRD lite”, che ha dimostrato efficacia comparabile ed ottima tollerabilità) (209) ma anche di un trattamento sequenziale dato da 4 cicli di MPV e quindi RD fino a progressione (210). Sulla base di questi incoraggianti risultati, la tripletta VRD potrebbe, in un futuro prossimo, divenire la terapia di prima linea nei pazienti non eleggibili a trapianto.

Sulla scia degli ottimi risultati ottenuti con Bortezomib, sono stati sperimentati anche regimi comprensivi dei PI di seconda generazione. Per quanto riguarda Carfilzomib, il suo impiego è stato valutato nell’ambito delle triplete KCD (che ha dimostrato buoni risultati in termini di PFS, OS e profondità della risposta ottenuta – fino al 20% dei pazienti ha raggiunto una sCR – con una tossicità accettabile) (211) e KRd (uno studio di fase I/II ne ha valutato l’impiego sia nel contesto di un regime di induzione nei pazienti candidabili a trapianto che come terapia di prima linea in pazienti non candidabili: in entrambe le popolazioni di pazienti sono stati ottenuti ottimi *rate* e profondità della risposta e PFS; è attualmente in corso il *trial* di fase III “EMN20” per il confronto tra KRd e RD) (212).

Relativamente ad Ixazomib, sono stati recentemente presentati i risultati di uno studio di fase II nel quale i pazienti sono stati trattati con la tripletta ITD e quindi randomizzati a ricevere mantenimento con I oppure *placebo*; al termine dell’induzione, sono stati osservati ottimi risultati in termini di profondità della risposta e PFS, mentre il mantenimento non ha migliorato la prognosi in modo significativo (213); un altro studio di fase II ha invece valutato l’efficacia e la buona tollerabilità della terapia con la tripletta IRD seguita da mantenimento con I (214). Per entrambe le combinazioni sono attesi studi di fase III che possano validarne l’impiego.

Infine, particolare interesse sta destando l’impiego degli anticorpi monoclonali anche nella terapia di prima linea del paziente non eleggibile a trapianto. Per quanto concerne Daratumumab, lo studio di fase III “MAIA” ha randomizzato oltre 700 pazienti non candidabili a ASCT a ricevere Daratumumab-RD o RD, dimostrando un miglioramento della profondità di risposta (fino al 47,6%

di CR/sCR e 24,2% di MRD-negatività) ed un minore tasso di progressione (PFS a 30 mesi del 70,6%) grazie all'aggiunta dell'anti-CD38 ad un *follow-up* mediano di 28 mesi (215); il *trial* di fase III "ALCYONE" ha invece messo a confronto Daratumumab-MPV e la tripletta canonica in assenza dell'anticorpo monoclonale, evidenziando un incremento di ORR (fino al 91%), MRD-negatività (fino al 22,3%), PFS (71,6% a 18 mesi) ed OS (78% a 36 mesi) (216) (217). Uno studio di fase Ib ha invece valutato l'efficacia e la tollerabilità dell'aggiunta di Isatuximab alla tripletta VRD (218) ed è attualmente in corso lo studio di fase III "IMROZ" con la finalità di confrontare Isatuximab-VRD e VRD (219); uno studio giapponese di fase II ha messo a confronto Elotuzumab-RD e RD evidenziando un miglioramento significativo dell'ORR nel braccio comprendente l'anti-SLAMF7 (220), tuttavia sono stati recentemente presentati i risultati preliminari dello studio di fase III "ELOQUENT-1" (finalizzato al medesimo confronto) nei quali l'*endpoint* primario, rappresentato dall'aumento della PFS, non è stato raggiunto (221).

4.3 TERAPIA DEI PAZIENTI CON MIELOMA MULTIPLO RICADUTO/REFRATTARIO

Nonostante l'introduzione dei "nuovi farmaci", la loro approvazione nelle terapie di prima linea e dunque la loro diffusione abbiano incrementato in modo importante la qualità della risposta ottenuta e la durata della remissione, la storia naturale del MM continua ad essere caratterizzata in modo quasi ineluttabile dalla ripresa di attività della malattia, fino alla fase definita "ricaduta/refrattaria", caratterizzata dallo sviluppo di progressiva resistenza ai trattamenti farmacologici impiegati. La decisione circa la migliore strategia da impiegare nel RRMM deve essere presa sulla base di diversi aspetti: le caratteristiche generali del paziente (età, *performance status*, riserva midollare, esposizione precedente a chemioterapici e altri farmaci antineoplastici con le relative tossicità residue, altre comorbidità), le terapie precedentemente utilizzate (classe di farmaci, durata del trattamento, profondità e durata della risposta ottenuta, tossicità sviluppate) e la malattia al momento della ricaduta (malattia indolente o aggressiva, presenza di anomalie citogenetiche ad alto rischio, aumento dell'LDH, sviluppo di malattia extramidollare ed eventuale evoluzione a leucemia plasmacellulare. I possibili approcci terapeutici al momento della ricaduta sono numerosi. In linea generale, la raccomandazione è di impiegare regimi terapeutici basati su IMiD o PI, facendo ricorso alla classe di farmaci che non sia stata precedentemente somministrata in prima linea; è anche possibile, tuttavia, re-impiegare il farmaco precedentemente utilizzato (*re-treatment*) oppure una molecola appartenente alla medesima classe (ma di generazione successiva) qualora il paziente vi sia stato responsivo; si possono quindi impiegare IMiD e PI, di prima o nuova generazione, combinati tra loro e/o con anticorpi monoclonali o altri "nuovi farmaci"; il paziente di età inferiore a 65/70 anni e *fit* può essere

sottoposto all'ASCT di salvataggio oppure, in alcune circostanze selezionate, può essere preso in considerazione il trapianto allogenico; infine, l'eventuale arruolamento in *trials* clinici consente l'accesso a nuovi regimi terapeutici e a molecole di ultima generazione. In ogni caso, sta prendendo sempre più piede la necessità di costruire un approccio terapeutico globale, che consideri le opzioni di trattamento da adottare per l'intera durata della malattia in modo individualizzato per ogni singolo paziente, piuttosto che ricorrere ad un approccio *step by step* (222) (223).

Di seguito sono esposti i principali farmaci attualmente utilizzati in questo sottogruppo di pazienti.

Bortezomib

Il primo dei “nuovi farmaci” a raggiungere l'approvazione da parte di FDA ed EMA per il trattamento della malattia ricaduta è stato il Bortezomib. Gli studi di fase II “SUMMIT” e “CREST” ne hanno per primi valutato l'impiego nel RRMM, da solo o in associazione al Desametasone in caso di risposta subottimale, dimostrandone l'efficacia in termini di tasso e profondità della risposta ottenuta, TTP ma anche OS, con risultati migliori ottenuti tramite l'aggiunta del glucocorticoide e con un buon profilo di tossicità (224) (225) (226). In seguito, il *trial* di fase III “APEX”, che ha confrontato V rispetto alle alte dosi di Desametasone in oltre seicento pazienti precedentemente trattati con 1-3 linee di terapia, ha dimostrato una netta superiorità del PI in termini di profondità della risposta, ORR, TTP ed OS (227) (228).

Visti gli ottimi risultati ottenuti con V in associazione a Desametasone (VD), sono quindi state sperimentate con successo diverse terapie di combinazione di VD con doxorubicina (229) (230), Bendamustina (231) (232) (233) e IMiD (234).

In conclusione, l'associazione della doppietta VD ad altri farmaci nella terapia del RRMM può correlare ad un ulteriore miglioramento di efficacia, seppure a fronte di una maggiore tossicità.

Lenalidomide

I *trials* di fase III “MM-009” e “MM-010” ne hanno valutato l'impiego in associazione al glucocorticoide in pazienti precedentemente trattati con almeno una linea di terapia. In tali studi il regime di combinazione Lenalidomide-Desametasone (RD) confrontato con solo Desametasone ha dimostrato un miglioramento significativo in termini di profondità della risposta ottenuta (fino al 60% almeno PR e fino al 15% CR), di TTP (13 mesi *versus* 5 mesi) ed OS (38 mesi *versus* 32 mesi). (235) (236) (237). Sulla base di questi risultati, la doppietta RD è stata approvata nel 2006 per la terapia del RRMM. In virtù della sua buona tollerabilità, della somministrazione orale e della comprovata efficacia nel RRMM, sono stati quindi sperimentati altri regimi di combinazione comprendenti RD. Per quanto riguarda gli agenti alchilanti, sono state impiegate (in studi di fase II) delle associazioni

con la Ciclofosfamide (RCD) (238), il Melphalan (239) ma anche con la Bendamustina in un *trial* di fase I/II (240).

L'associazione con Bortezomib è stata sperimentata in uno studio di fase I mediante la doppietta RV, che ha mostrato ORR del 60% (241), ed in un *trial* di fase II mediante la tripletta RVD che ha mostrato il 65% di almeno PR ed il 25% di CR/nCR, una PFS mediana di oltre 9 mesi ed un'OS mediana di 26 mesi, indipendentemente dal pregresso trattamento con V, T, R o ASCT (242). In conclusione, RD rappresenta oggi uno dei principali capisaldi nella terapia del RRMM e su questo *backbone* è possibile costruire schemi terapeutici più complessi mediante l'aggiunta di PIs di seconda generazione e/o anticorpi monoclonali

Pomalidomide

Sulla base dell'efficacia della combinazione di Pomalidomide e Desametasone evidenziata dal *trial* di fase II "MM-002" (243) e dal *trial* di fase III "NIMBUS (MM-003)" (244) è stato condotto il *trial* di fase IIIb "STRATUS (MM-010)"; tale studio ha fornito i risultati sulla più ampia coorte di pazienti affetti da RRMM ad oggi valutata per quanto riguarda il trattamento con Pomalidomide e Desametasone *low-dose* (circa settecento pazienti, precedentemente esposti ad una mediana di 5 linee di terapia) ed ha confermato i risultati positivi precedentemente descritti (ORR del 32,6%, PFS di 4,6 mesi ed OS di 11,9 mesi) con ottima tollerabilità (245). Buoni risultati sono stati osservati anche nei pazienti ad alto rischio citogenetico, in particolare in presenza di del(17p) (246). È stata inoltre dimostrato come l'aggiunta di Ciclofosfamide alla combinazione Pomalidomide-Desametasone sia in grado di potenziarne l'efficacia anche in pazienti inizialmente non responsivi alla doppietta (247). L'associazione comprensiva anche del PI di prima generazione Bortezomib è stata sperimentata nello studio di fase III "OPTIMISMM", in cui è stato riportato un valore mediano di PFS per Pomalidomide-VD pari a 9,5 mesi nella popolazione globale di pazienti refrattari a Lenalidomide, e pari a 18 mesi nei pazienti refrattari quando impiegato alla prima ricaduta, indicando quindi come quest'ultimo potrebbe essere il posizionamento corretto della combinazione (248). Pomalidomide e Desametasone hanno inoltre formato la base di ulteriori combinazioni comprensive di PI di seconda generazioni o anticorpi monoclonali (249).

In conclusione, Pomalidomide-Desametasone rappresenta un trattamento con provata efficacia nei pazienti *double-refractory*.

Carfilzomib e Ixazomib

Due ampi trials randomizzati di fase III hanno dimostrato, in pazienti sottoposti a 1-3 precedenti linee di terapia, la superiorità del regime Carfilzomib-Desametasone (Kd) rispetto alla combinazione comprensiva del PI di prima generazione Vd (studio ENDEAVOR) e del regime a tre farmaci KRd

rispetto a Rd (studio ASPIRE). In particolare, nel primo trial l'impiego del PI di seconda generazione è stato correlato ad un miglioramento significativo di ORR (77% versus 63%), profondità delle risposte ottenute (CR/sCR: 13% versus 6%), PFS (18,7 mesi versus 9,4 mesi) ed OS (47,6 mesi versus 40 mesi) (250) (251).

Nello studio di fase III "ASPIRE, l'aggiunta del PI alla doppietta RD ha determinato un incremento significativo in termini di ORR (87% versus 77%), CR/sCR (32% versus 9%), PFS (26,3 mesi versus 17,6 mesi) ed OS (48,3 mesi versus 40,4 mesi) (252) (253).

Il PI orale Ixazomib nel RRMM è risultato particolarmente efficace nella combinazione con RD (IRD), valutata nello studio di fase III "TOURMALINE-MM1". IRD rispetto a RD si è associato a un miglioramento prognostico significativo in termini di ORR (78% versus 72%), CR (12% versus 7%), durata della risposta (20,5 mesi versus 15 mesi) e PFS (20,6 mesi versus 14,7 mesi). Tali benefici sono stati riscontrati anche in diversi sottogruppi analizzati, inclusi i pazienti ad alto rischio citogenetico (254).

Sono state recentemente sperimentate, nel contesto di *trials* di fase I/II anche le associazioni di ID a Pomalidomide (255) oppure a Bendamustina (256).

Un recente studio retrospettivo statunitense ha confrontato l'impiego delle triplette date dai diversi PI e RD in pazienti pretrattati con almeno due linee di terapia; è emerso come in pazienti *intermediate fit* e *frail* il TTNT sia significativamente inferiore mediante l'impiego di KRD rispetto a VRD e IRD, mentre in pazienti *fit* il TTNT è significativamente superiore con KRD (257).

Anticorpi monoclonali

Per quanto concerne gli anticorpi monoclonali anti-CD38 e anti-SLAMF7, diversi studi ne hanno valutato l'impiego nel contesto del RRMM. In merito a Daratumumab, un'analisi integrata realizzata sulla base dello studio di fase I "GEN501" e di fase II "SIRIUS" ha dimostrato come la somministrazione di Daratumumab *single-agent* correli, in una popolazione precedentemente trattata con una mediana di 5 linee di terapia, ad ORR del 31,1% (CR nel 4,7%), durata mediana della risposta di 7,6 mesi, PFS mediana di 4 mesi ed OS mediana di 20,1 mesi. Tali *outcomes* sono stati osservati in tutti i sottogruppi di pazienti analizzati (258). L'uso di Daratumumab è stato valutato anche in vari regimi di associazione a IMiD e PI. Nel *trial* di fase III "POLLUX" l'impiego della tripletta Daratumumab-Lenalidomide-Desametasone (DRd) rispetto alla doppietta RD è stato correlato ad un miglioramento significativo in termini di ORR (93% versus 76%), di CR (57% versus 23%), di MRD-negatività (30,4% versus 5,3%), di PFS (45,8 mesi versus 17,5 mesi) e TTNT (50,6 mesi versus 23,1 mesi) (259) (260) (261). Inoltre, è attualmente in corso il *trial* di fase III "APOLLO" per il confronto tra la tripletta Daratumuma-Pomalidomide-Desametasone e la doppietta Pomalidomide-Desametasone (262). Per quanto concerne invece l'associazione ai PI, nel *trial* di fase III "CASTOR"

la tripletta Daratumumab-VD è stata confrontata con VD, dimostrandosi superiore in termini di ORR (85% *versus* 63%), MRD-negatività (12% *versus* 2%) e PFS (16,7 mesi *versus* 7,1 mesi) (263) (264). Daratumumab è stata inoltre recentemente valutato con successo in combinazione a KD (*trial* di fase III “CANDOR”) (265).

Per quanto riguarda il successivo anti-CD38 Isatuximab, il suo impiego nel RRMM è stato valutato in monoterapia (266) ma anche in combinazione a RD (267), a Pomalidomide-desametasone (268) (269) e KD (270).

L'anticorpo anti-SLAMF7 Elotuzumab si caratterizza invece per una scarsa efficacia nel RRMM, se somministrato come *single-agent* (271), mentre l'anti-SLAMF7 è stato approvato FDA e EMA in combinazione con Rd per il trattamento di pazienti con RRMM sottoposti ad almeno una precedente linea di terapia. Infatti nello studio di fase III “ELOQUENT-2”, ancora una volta il regime a tre farmaci ha correlato con un vantaggio significativo, riportando per Elo-Rd vs Rd un miglioramento in termini di ORR (79% *versus* 66%), PFS mediana (19,4 mesi *versus* 14,9 mesi) ed OS mediana (48,3 mesi *versus* 39,6 mesi) (272) (273). Il *trial* di fase III “ELOQUENT-3” ha invece comparato Elotuzumab in combinazione a PomaD oppure la doppietta da sola, mostrando rispettivamente ORR 53% *versus* 26% e PFS mediana 10,3 mesi *versus* 4,7 mesi (274).

5. SIGNIFICATO DELLO STUDIO

Negli ultimi anni l'integrazione dei nuovi farmaci nella terapia del MM ha consentito di incrementare significativamente il *rate* di risposte di elevata qualità e prolungare la PFS e l'OS dei pazienti affetti da MM di nuova diagnosi, sia candidati sia non candidati a ricevere un programma di chemioterapia ad alte dosi con successivo ASCT. Questi eccellenti risultati hanno posto il quesito, se nel paziente giovane, con meno di 65 anni, ASCT sia ancora uno *standard of care* o sia possibile raggiungere gli stessi miglioramenti, in termini di *outcomes*, tramite l'utilizzo esclusivo di regimi contenenti i nuovi farmaci.

In questo contesto, l'esigenza di investigare prospetticamente il ruolo di ASCT ha portato al disegno del trial clinico europeo EMN02/HO95 MM, un protocollo randomizzato, multicentrico, di fase III, che ha coinvolto ben 172 centri accademici della rete del European Myeloma Network (EMN) in 15 paesi europei, coordinati principalmente dall'Istituto di Ematologia "Seràgnoli" di Bologna.

Uno degli *endpoints* primari dello studio, in cui sono stati arruolati oltre 1500 pazienti di età ≤ 65 anni con MM all'esordio, era la comparazione dell'efficacia della terapia di intensificazione con Bortezomib, Melphalan e Prednisone (VMP) rispetto a chemioterapia ad alte dosi di Melphalan (HDM) e successivo ASCT (primo random, R1). Le due alternative terapeutiche facevano seguito a una fase comune di induzione con Bortezomib, Ciclofosfamida e Desametasone (VCD).

Inoltre, con l'obiettivo di indagare il ruolo di due linee sequenziali di HDM, nei centri con *policy* di doppio ASCT, la randomizzazione era pianificata in rapporto 1:1:1 tra VMP, singolo trapianto (ASCT-1) o ASCT-tandem (ASCT-2).

Al contempo, lo studio si proponeva di valutare l'effetto sulla PFS della terapia di consolidamento con Bortezomib, Lenalidomide e Desametasone (VRD) rispetto a nessun consolidamento (secondo random, R2), seguito da mantenimento con Lenalidomide fino a progressione di malattia o intolleranza.

Nella presente tesi verranno riportati i dati relativi all'analisi finale dello studio, con particolare riferimento alla prima randomizzazione e al confronto tra singolo e tandem ASCT. Inoltre, per quanto concerne la comparazione ASCT versus VMP, verranno riportati i risultati degli *outcomes* a lungo termine, ottenuti dall'aggiornamento dell'analisi finale con un follow-up più prolungato dei pazienti.

5.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Obiettivi primari:

- Valutare la PFS per tutti i pazienti inclusi nello studio.
- Comparare l'efficacia, in termini di PFS, di VMP rispetto alla chemioterapia ad alte dosi seguito da ASCT (R1).
- Valutare l'effetto, in termini di PFS, del consolidamento con VRD versus No-Consolidamento (R2) e, a seguire, mantenimento con Lenalidomide.

Obiettivi secondari:

- Confrontare la PFS tra VMP versus singolo-ASCT; o VMP versus tandem-ASCT; o singolo-ASCT versus tandem-ASCT.
- Confrontare il *rate* di risposte e la loro qualità durante le diverse fasi di trattamento (induzione, VMP o ASCT, eventuale consolidamento e durante il mantenimento).
- Valutare l'OS e comparare l'OS di R1 e R2.
- Valutare la frequenza e la severità delle tossicità correlate alla terapia.
- Valutare la qualità della vita tramite l'utilizzo di appositi questionari (EORTC QLQ-C30 e QLQ-MY20).
- Valutare il valore prognostico di fattori di rischio alla diagnosi, inclusi β 2-microglobulina e alterazioni citogenetiche [del(1p), amplificazione 1q, t(4;14), t(14;16), t(11;14), amplificazione 9, del 13q/13-, del 17p] e il rispettivo impatto sulla PFS nella popolazione generale e nei diversi gruppi di trattamento.
- Valutare l'impatto prognostico di *gene expression profiles* (GEP) sulle risposte globali dopo terapia di induzione e nei diversi bracci di randomizzazione.
- Valutare l'impatto prognostico della PET/TC e della malattia minima residua (MRD), misurata con citofluorimetria di flusso.

5.2 PAZIENTI E METODI

5.2.1 ELEGGIBILITA' ALLO STUDIO

I pazienti, al fine di essere arruolabili nel protocollo, dovevano rispettare i seguenti criteri di inclusione:

- MM sintomatico di nuova diagnosi, con la presenza di almeno un criterio CRAB.
- Malattia misurabile definita dalla presenza di CM sierica ed urinaria (CM sierica > 10g/L o CM urinaria > 200 mg/24h o rapporto di sFLC alterato con catena coinvolta in concentrazione > 100mg/L) o documentazione istologica di plasmocitoma.
- Età compresa tra i 18 e i 65 anni
- WHO performance status 0-3 (con grado 3 accettabile solo se causato da MM e non secondario ad altre comorbidità presenti).
- Test di gravidanza negativo, se applicabile.
- Capacità di firmare il consenso informato alla terapia.

Tra i criteri di esclusione, limitanti l'arruolamento nel protocollo, si evidenziavano:

- Amiloidosi AL sistemica.
- Leucemia Plasmacellulare.
- MM non-secernente.
- Precedente chemioterapia-radioterapia.
- Scompenso cardiaco (stadio NYHA II-IV).
- Disfunzione epatica severa (bilirubina sierica $\geq 30\mu\text{mol/L}$ o transaminasi superiori a 2,5 volte il rispettivo valore di riferimento massimo, escluse le alterazioni secondarie a localizzazione di MM).
- Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) $\leq 15\text{ml/min}$.
- Pazienti HIV positivi.
- Pazienti con infezione attiva, non controllata.
- Pazienti con neuropatia grado ≥ 2 secondo i criteri National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE, version 4.0).
- Pazienti con neoplasie maligne attive nel corso degli ultimi 5 anni (ad eccezione di carcinoma cervicale stadio 0 e carcinoma squamoso basocellulare).
- Donne fertili non complianti/impossibilitate ad eseguire terapia contraccettiva o in fase di allattamento.

Per poter accedere alla prima randomizzazione (R1, VMP vs ASCT) dovevano essere rispettati i seguenti criteri di inclusione:

- Aver raccolto un quantitativo di progenitori staminali ematopoietici superiori a 4×10^6 CD34+/kg
- Assenza di grave patologia polmonare, neurologica o psichiatrica.
- Assenza di PNP di grado ≥ 3 , secondaria a Bortezomib.
- Assenza di MM in progressione.
- Non candidabilità ad allotrapianto di precursori staminali ematopoietici.

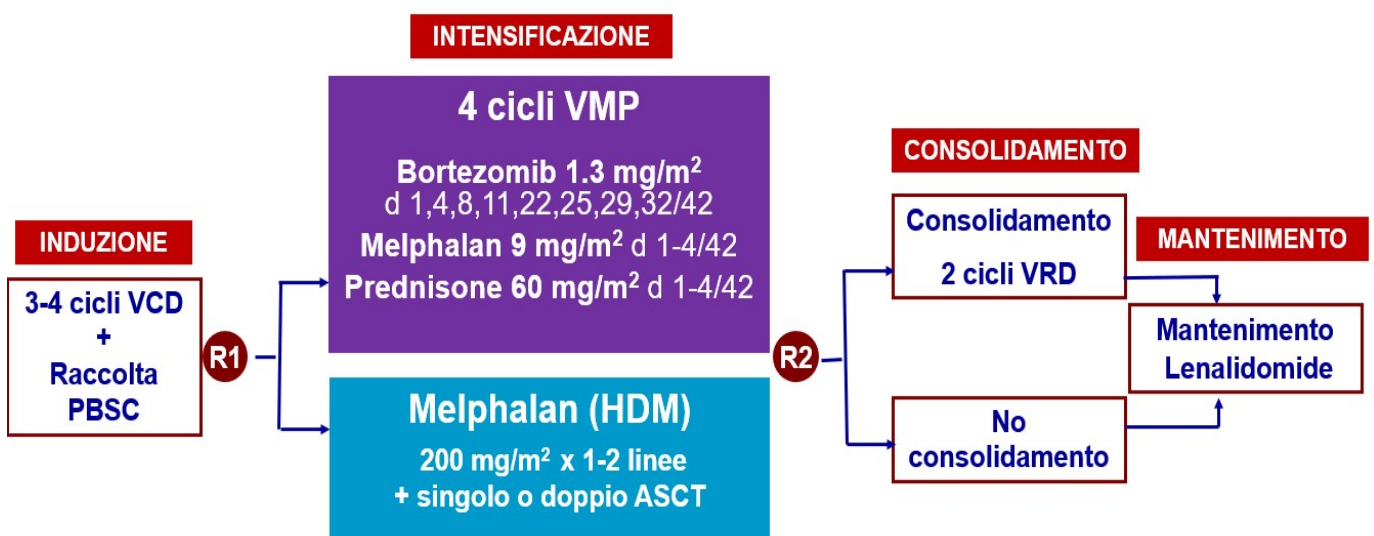
Per poter accedere alla seconda randomizzazione (R2, VRD di consolidamento vs no consolidamento) dovevano essere rispettati i seguenti criteri di inclusione:

- Bilirubina e transaminasi < 2.5 volte il limite superiore di riferimento
- Assenza di PNP di grado ≥ 3 , secondaria a Bortezomib
- Conta piastrinica $> 20 \times 10^9/l$ e valore assoluto di neutrofili $> 0.5 \times 10^9/l$
- Compliance al Lenalidomide Pregnancy Prevention Risk Management Plan
- Assenza di MM in progressione.

5.2.2 DESCRIZIONE DELLO STUDIO

Il protocollo EMN02/ HO95 (EudraCT number: 2009-017903-28) è uno studio multicentrico, randomizzato di fase III, condotto dalla rete del European Myeloma Network (EMN). Le diverse fasi terapeutiche in cui lo studio risultava articolato sono schematizzate nella figura 1 e descritte di seguito.

Figura 1. Disegno dello studio EMN02



Terapia di induzione

Tutti pazienti arruolati nel protocollo, ricevevano una terapia di induzione con 3-4* cicli secondo schema Bortezomib/Ciclofosfamide/Desametasone (VCD):

Agente	Dose	Somministrazione	Giorno
Bortezomib	1.3 mg/m ²	Sottocutanea	1,4,8,11/21
Ciclofosfamide	500 mg/m ²	Intravenosa	1,8/21
Desametasone	40 mg	Orale	1,2,4,5,8,9,11,12/21

*Inizialmente il disegno dello studio prevedeva l'esecuzione di 3 cicli di VCD, con somministrazione endovenosa di bortezomib, seguiti da mobilizzazione PBSC con Ciclofosfamide a dosi intermedie (4 g/m²). In seguito ad un emendamento del protocollo nel 2012, il numero di cicli di VCD è stato incrementato a 4, con passaggio ad una somministrazione sottocutanea di Bortezomib, ed è stata ridotta la dose di Ciclofosfamide a 2 g/m².

La dose di Ciclofosfamide poteva essere modificata in base al filtrato glomerulare del paziente ed alla presenza di eventuale neutropenia.

La valutazione della risposta alla terapia di induzione avveniva al termine dei 4 cicli. In caso di progressione di malattia i pazienti erano discontinuati dal trattamento.

Mobilizzazione e raccolta di progenitori staminali emopoietici

In seguito all'esecuzione del 4° ciclo della terapia di induzione, i pazienti venivano avviati a terapia mobilizzante con Ciclofosfamide (2-4 g/m²) associata a fattore di crescita granulocitario G-CSF (10 µ/kg/die) e raccolta di cellule staminali emopoietiche da sangue periferico (PBSC). La raccolta era ritenuta sufficiente per un quantitativo minimo di cellule CD34+ pari a 4x10⁶/kg.

Prima randomizzazione (R1): VMP versus ASCT

Tutti i pazienti che rispettavano i criteri di inclusione per la R1 venivano randomizzati tra l'esecuzione della terapia intensificazione secondo schema VMP rispetto a 1-2 linee sequenziali di Melphalan ad alte dosi (HDM) e ASCT.

Nei centri che avevano aderito alla possibilità di eseguire il doppio ASCT, era prevista un'ulteriore randomizzazione dei pazienti tra VMP versus singolo-ASCT o VMP versus tandem-ASCT. In caso di insufficiente raccolta di cellule staminali emopoietiche (< 4x10⁶ CD34+/kg), i pazienti non venivano sottoposti alla R1 ma potevano comunque ricevere terapia con VMP ed essere randomizzati per il consolidamento.

Il braccio sperimentale con VMP veniva iniziato tra la 4° e la 6° settimana dalla raccolta delle cellule staminali emopoietiche e prevedeva la somministrazione di 4 cicli secondo il seguente schema:

Agente	Dose	Somministrazione	Giorno
Bortezomib	1.3 mg/m ²	Sottocutanea	1, 4, 8, 11, 22, 25, 29, 32/42
Melphalan	9 mg/m ²	Orale	1, 2, 3, 4/42
Prednisone	60 mg/m ²	Orale	1, 2, 3, 4/42

La valutazione della risposta veniva eseguita dopo il 2° e al termine del 4° ciclo. In caso di progressione di malattia, i pazienti uscivano dal protocollo.

Il braccio di controllo con ASCT, prevedeva la somministrazione di Melphalan ad alte dosi (HDM 200 mg/m²) e re-infusione di progenitori ematopoietici secondo questo schema:

Agente	Dose	Somministrazione	Giorno
Melphalan	200 mg/m ²	Intravenosa	-3, -2*
Reinfusione di PBSC	2 x 10 ⁶ cellule CD34+/kg	Intravenosa	0

* i pazienti con clearance della creatinina ≤ 40 ml/min eseguivano solo 100 mg/m² al giorno -3.

Il secondo ASCT, se previsto in base alla politica del centro, veniva effettuato 2-3 mesi dopo il primo se la qualità della risposta fosse stata almeno pari a PR.

Seconda randomizzazione (R2): consolidamento con VRD versus No-Consolidamento

I pazienti randomizzati nel braccio della terapia di consolidamento, ricevevano a distanza di 8 settimane dal termine del trattamento con VMP o HDM, 2 cicli di Bortezomib/Lenalidomide/Desametasone (VRD):

Agente	Dose	Somministrazione	Giorno
Bortezomib	1.3 mg/m ²	Sottocutanea	1, 4, 8, 11/28
Lenalidomide	25 mg	Orale	1-21/28
Desametasone	20 mg	Orale	1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12/28

Terapia di mantenimento

Infine, tutti i pazienti ricevevano terapia di mantenimento con Lenalidomide alla dose di 10 mg/die per 21 giorni consecutivi ogni 28 giorni fino a intolleranza o progressione di malattia.

5.2.3 CRITERI DI VALUTAZIONE DI RISPOSTA ALLA TERAPIA

La risposta alle varie fasi terapeutiche veniva definita sulla base dei criteri stabiliti dall'*International Myeloma Working Group* (IMWG) (275), riportati nella Tabella 7.

Tabella 7. Criteri per la valutazione della risposta

Categoria di risposta	Criteri di risposta
Risposta completa stringente (sCR)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ devono essere rispettati i criteri per CR ▪ normalizzazione del rapporto κ/λ delle catene leggere libere sieriche (sFLC) ▪ assenza di plasmacellule (PC) clonali documentabili nel midollo osseo tramite Immunofluorescenza (IF) o Immunoistochimica (IIC).
Risposta Completa (CR)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ negativizzazione dell'immunofissazione sierica ed urinaria, confermata da due determinazioni consecutive a 3 settimane l'una dall'altra; ▪ scomparsa di plasmocitoma, assenza di aumento di attività o dimensioni di precedenti lesioni osteolitiche e non comparsa di nuove; ▪ infiltrato midollare $\leq 5\%$.
Very good partial response (VGPR)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CM sierica e urinaria rilevabile all'immunofissazione ma non tramite elettroforesi, oppure ▪ riduzione della CM sierica $\geq 90\%$ e della CM urinaria (proteinuria di Bence-Jones) a valori < 100 mg/die.
Risposta parziale (PR)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ riduzione della CM sierica $\geq 50\%$ del valore iniziale e riduzione della proteinuria di Bence-Jones nelle 24 ore $\geq 90\%$ o inferiore a 200 mg/die (confermate da due determinazioni consecutive eseguite a distanza di 3 settimane); ▪ in assenza di CM sierica ed urinaria quantificabile, era richiesta una riduzione $\geq 50\%$ della differenza tra la catena coinvolta e non coinvolta delle sFLC; in caso di dosaggio delle sFLC non misurabile, era richiesta una riduzione $\geq 50\%$ dell'infiltrato plasmacellulare a livello midollare, se il valore di partenza era $\geq 30\%$; ▪ riduzione $\geq 50\%$ delle dimensioni del plasmocitoma, se presente alla diagnosi.
Malattia stabile (SD)	Non soddisfatti i criteri per le altre categorie di risposta
Progressione di malattia (PD)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ incremento $\geq 25\%$ rispetto al baseline/nadir della CM sierica (con valore assoluto incrementato di almeno 500 mg/dl) e/o ▪ incremento $\geq 25\%$ rispetto al baseline/nadir della CM urinaria (con valore assoluto incrementato di almeno 200 mg/die); ▪ solo per i pazienti con CM sierica ed urinaria non quantificabile: incremento $\geq 25\%$ della differenza tra il dosaggio della catena coinvolta e non coinvolta. L'incremento assoluto doveva essere > 10 mg/dl; ▪ aspirato del midollo con infiltrato plasmacellulare $\geq 10\%$; ▪ comparsa di nuove lesioni ossee o plasmocitoma; incremento dimensionale delle precedenti lesioni ossee o di plasmocitoma; ▪ comparsa di ipercalcemia (calcio sierico corretto > 11.5 mg /dl), attribuibile solo al disordine proliferativo delle plasmacellule.

5.2.4 ANALISI CITOGENETICO-MOLECOLARE

L'analisi citogenetico-molecolare è stata eseguita su sangue midollare prelevato dai pazienti al momento dell'arruolamento. I campioni erano centralizzati c/o il laboratorio di citogenetica del nostro Istituto per i centri italiani, ed in laboratori designati in Olanda, Germania e Danimarca per i restanti centri europei.

E' stata valutata la presenza o assenza delle seguenti alterazioni cromosomiche: del(13q14), del(17p13), del(1p32), gain(1q21), t(4;14)(p16;q32), t(6;14)(p21;q32), t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23), t(14;20)(q32;q11), ed iperdiploidia. La ricerca delle alterazioni è stata effettuata con metodica *fluorescence in-situ hybridisation* (FISH). I pazienti venivano definiti ad alto rischio citogenetico in presenza di almeno una delle seguenti anomalie: t(4;14) in $\geq 10\%$ delle plasmacellule, t(14;16) in $\geq 10\%$ delle plasmacellule o del(17p) in $\geq 20\%$ delle plasmacellule. In assenza di tali anomalie, il profilo citogenetico era considerato a rischio standard.

5.2.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita secondo approccio Intention to Treat (ITT), includendo tutti i pazienti sottoposti alla prima e seconda randomizzazione.

Il protocollo prevedeva 2 analisi ad interim, condotte al raggiungimento del 33% e 66% del numero di eventi (**276; 277; 278; 279**). I dati presentati in questo elaborato sono relativi all'analisi finale dello studio e all'aggiornamento della stessa ad un follow-up più prolungato per quanto concerne la prima randomizzazione.

Le caratteristiche, al basale e alla progressione, sono state descritte in percentuale, se variabili di tipo categorico, oppure attraverso mediana e relativo intervallo di interquartile (IQR), se variabili distribuite in modo continuo. I relativi confronti sono stati eseguiti con il test del χ^2 o di Fisher.

L'analisi di sopravvivenza è stata eseguita stimando i time-to-event mediante metodo Kaplan-Meier e le relative curve di sopravvivenza sono poi state confrontate utilizzando il Log Rank test. Il metodo attuariale di Kaplan-Meier è stato utilizzato per determinare la PFS stimata a determinati intervalli di tempo. La PFS è stata calcolata dalla data di randomizzazione alla data di progressione o morte del paziente. OS è stata calcolata anch'essa dalla data di randomizzazione fino alla morte del paziente.

La PFS2 è stata calcolata dalla data di R1 alla data di seconda progressione o morte del paziente. Il *time to next treatment* (TTnT) è stato definito come l'intervallo di tempo tra la data di R1 e l'inizio della terapia di seconda linea.

La regressione semi-parametrica di Cox è stata utilizzata per l'analisi multivariabile. Le variabili risultate significative all'analisi univariata sono quindi state testate in un modello multivariato e, quelle che riportavano un contributo statisticamente significativo al modello, sono state incluse nel

modello finale multivariabile. Il valore di p è stato considerato significativo solo se risultava inferiore al valore critico di 0.045.

La tossicità, valutata in tutti i pazienti che avessero ricevuto almeno una dose della terapia, è stata analizzata prevalentemente tramite tabulazione ed è stata considerata solo l'incidenza di effetti avversi di grado ≥ 2 , codificati secondo i criteri del National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC version 4.0). I *rates* di *second primary malignancies* (SPMs) sono stati calcolati come il rapporto tra il numero di SPM e il numero di pazienti-anno a rischio e sono stati confrontati tra gruppi utilizzando un test esatto binomiale. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando R e Stata (version 15.0).

5.3 RISULTATI

5.3.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Tra il 25 Febbraio 2011 ed il 03 Aprile 2014, sono stati reclutati 1503 pazienti. Tuttavia solo 1197 pazienti sono oggetto della presente analisi, in quanto in possesso di tutti i requisiti richiesti per essere sottoposti alla prima randomizzazione. Tra questi, 495 hanno eseguito intensificazione con VMP, mentre 702 sono stati randomizzati ad ASCT. In quest'ultimo gruppo, 419 pazienti sono stati assegnati a ricevere un singolo ASCT (n=209) o un tandem ASCT (n=210) nei centri con una policy di doppio trapianto. Il tempo mediano dall'inizio della terapia di induzione a R1 è stato di 3.7 mesi (IQR 3.3–4.1).

877 pazienti sono risultati eleggibili alla seconda randomizzazione: 449 hanno ricevuto 2 cicli di VRD di consolidamento mentre 429 pazienti sono stati assegnati al gruppo senza consolidamento.

Le caratteristiche demografiche e di malattia sono risultate ben bilanciate tra i diversi gruppi di trattamento. Nella Tabella 8 sono illustrate estensivamente tutte le caratteristiche della popolazione ITT.

Tabella 8. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti al *baseline*

	ASCT (n=702)	VMP (n=495)	VRD consolid. (n=449)	No consolid. (n=428)
Età mediana, in anni (IQR)	58 (52-62)	58 (51-62)	57 (52-62)	58 (52-62)
Maschi (%)	412 (59)	279 (56)	259 (58)	243 (57)
Femmine (%)	290 (41)	216 (44)	190 (42)	185 (43)
β2-microglobulina mg/L, mediana (IQR)	3.3 (2.4-4.8)	3.3 (2.4-5.0)	3.3 (2.4-5.0)	3.2 (2.3-4.8)
Albumina g/L, mediana (IQR)	3.8 (3.3-4.2)	3.8 (3.3-4.2)	3.8 (3.3-4.2)	3.8 (3.3-4.2)
Stadio ISS (%)				
I	291 (41)	205 (41)	189 (42)	181 (42)
II	273 (39)	187 (38)	165 (37)	172 (40)
III	138 (20)	103 (21)	95 (21)	75 (18)
Emoglobina g/dL, mediana (IQR)	11.1 (9.7-12.6)	11.0 (9.6-12.6)	11.1 (9.5-12.4)	11.0 (9.7-12.6)
Piastrine x10³/mL, mediana (IQR)	225 (177-280)	232 (180-283)	231 (180-282)	231 (185-283)
Creatinina mg/dL, mediana (IQR)	0.90 (0.75-1.10)	0.92 (0.76-1.18)	0.90 (0.70-1.1)	0.88 (0.72-1.1)
LDH> valore massimo di riferimento*	99/659 (15%)	56/462 (12%)	59/418 (14%)	48/400 (12%)
BM: % plasmacellule, mediana (IQR)	50 (30-80)	50 (27-70)	50 (30-79)	50 (26-75)
Stadio Revised ISS (%)				
I	156 (22)	94 (19)	108 (24)	84 (20)
II	391 (56)	270 (55)	234 (52)	237 (55)
III	58 (8)	38 (8)	39 (9)	28 (7)
Non valutabile	97 (14)	93 (19)	68 (15)	79 (18)
Rischio citogenetico standard (SR)*	402/537 (75%)	264/354 (75%)	259/336 (77%)	244/321 (76%)
Alto rischio citogenetico (HR)[†]	135/537 (25%)	90/354 (25%)	77/336 (23%)	77/321 (24%)
del(17p)	64/589 (11%)	41/410 (10%)	39/371 (9%)	35/357 (10%)
t(4;14)	63/572 (11%)	48/394 (12%)	36/359 (10%)	39/346 (11%)
t(14;16)	20/548 (4%)	15/378 (4%)	11/355 (3%)	14/325 (4%)

IQR: intervallo di interquartile; ISS: International Staging System; R-ISS: Revised ISS; FISH: Fluorescence in-situ Hybridization.

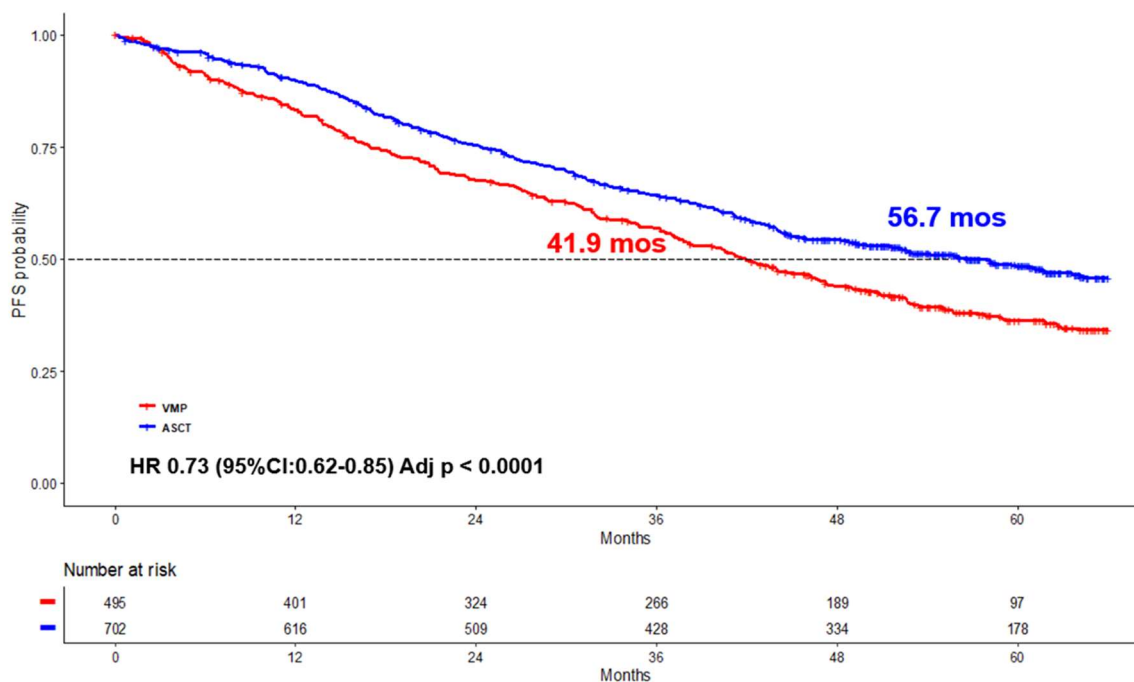
*Proporzione calcolata utilizzando il numero di pazienti valutabili

† Alto rischio: almeno una alterazione fra del(17), t(4;14) e t(14;16)

5.3.2 CONFRONTO ASCT versus VMP (R1)

All'analisi finale per intenzione di trattamento e con un follow-up mediano dalla R1 pari a 60.3 mesi (IQR 52.2 - 67.6 mesi), la PFS mediana di tutti i pazienti analizzati nello studio è risultata di 47.8 mesi (95% CI 44-52.8). Nei due gruppi di trattamento a confronto, ASCT versus VMP, i pazienti sono stati seguiti con follow-up mediano dalla R1 pari a 60.5 mesi (IQR 59.2-61.7) e 59.4 mesi (58.0-61.8), rispettivamente. Complessivamente sono stati registrati 645 eventi di progressione di malattia o morte, pari al 49% (n=346) dei 702 pazienti nel gruppo ASCT e 60% (n=299) dei 495 pazienti nel gruppo VMP. La PFS mediana per i pazienti assegnati al braccio ASCT versus VMP, è risultata rispettivamente di 56.7 mesi (95% CI 49.3-64.5) e 41.9 mesi (95% CI 37.5-46.9) (HR 0.73, 95% CI 0.62–0.85, p=0.0001; figura 2).

Figura 2. Curve di Kaplan-Meier della comparazione ASCT vs VMP (R1) in termini di PFS

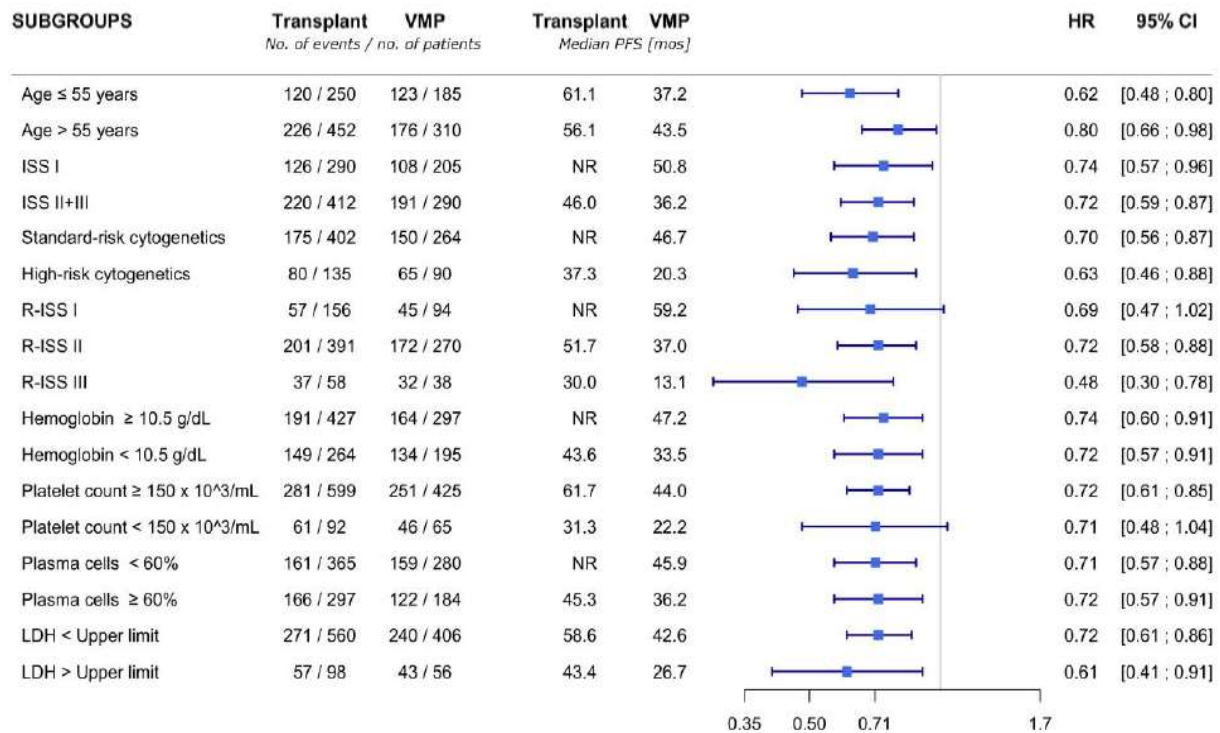


In analisi univariata, la superiorità di ASCT in termini di PFS rispetto a VMP si è mantenuta in tutti i sottogruppi di pazienti, sia con caratteristiche prognostiche favorevoli sia sfavorevoli (figura 3).

In particolare, valutando l'impatto delle due strategie terapeutiche nei pazienti con diverso profilo di rischio citogenetico, è emerso un significativo vantaggio a favore dei pazienti portatori di anomalie citogenetiche di alto rischio sottoposti a ASCT rispetto a VMP: PFS mediana pari a 37.3 mesi versus 20.3 mesi (HR: 0.63, 95% CI 0.46-0.88). Nei pazienti a rischio citogenetico standard, la PFS mediana non è stata raggiunta per il gruppo ASCT ed è risultata di 46.7 mesi per il gruppo VMP (HR 0.70, 95% CI 0.56-0.87). Inoltre, anche in presenza di malattia in stadio avanzato, l'HR per la PFS a favore

di ASCT rispetto a VMP è risultato pari a 0.72 (95% CI 0.59-0.87) nei pazienti con malattia in stadio ISS 2 o 3 e 0.48 (95% CI 0.30-0.78) nei pazienti in stadio R-ISS 3.

Figura 3. Analisi univariata per sottogruppi in termini di PFS (ASCT versus VMP)



Nel modello di regressione multivariata di Cox, le variabili indipendenti predittive di una più prolungata PFS sono risultate essere: la randomizzazione al braccio ASCT, la citogenetica a rischio standard, l'ottenimento di una risposta ≥ VGPR, uno stadio R-ISS 1, e una normale conta piastrinica (Tabella 9).

Tabella 9. Analisi multivariata di Cox di PFS per i pazienti randomizzati ad ASCT vs VMP

Variabili con effetto su PFS	HR	95% CI	P value
Randomizzazione ad ASCT	0.67	0.55 - 0.80	<0.001
Best response ≥ VGPR	0.38	0.30 - 0.47	<0.001
Rischio citogenetico standard	0.70	0.56 - 0.87	0.014
R-ISS I vs II	0.68	0.54 - 0.87	0.002
R-ISS I vs III	0.43	0.30 - 0.63	<0.001
Piastrine ≥ 150.000/mmc	0.68	0.53 - 0.87	0.003

La sopravvivenza globale stimata a 5 anni da R1 è stata di 75.1% (95% CI 71.7–78.5) per i pazienti sottoposti ad ASCT e 71.6% (95% CI 67.4–76.1) per quelli trattati con VMP (HR 0.90, 0.71–1.13, $p=0.35$); figura 4. Invece, valutando l'OS in sottogruppi prognostici predefiniti, la randomizzazione ad ASCT ha determinato un significativo vantaggio per i pazienti portatori di un profilo citogenetico ad alto rischio (HR 0.66, 0.45–0.99; $p=0.042$; figura 5A) e, in particolare, per i pazienti portatori di del(17p) (HR 0.48, 0.27–0.86; $p=0.014$; figura 5B).

Figura 4. Curve di Kaplan-Meier della comparazione ASCT versus VMP in termini di OS

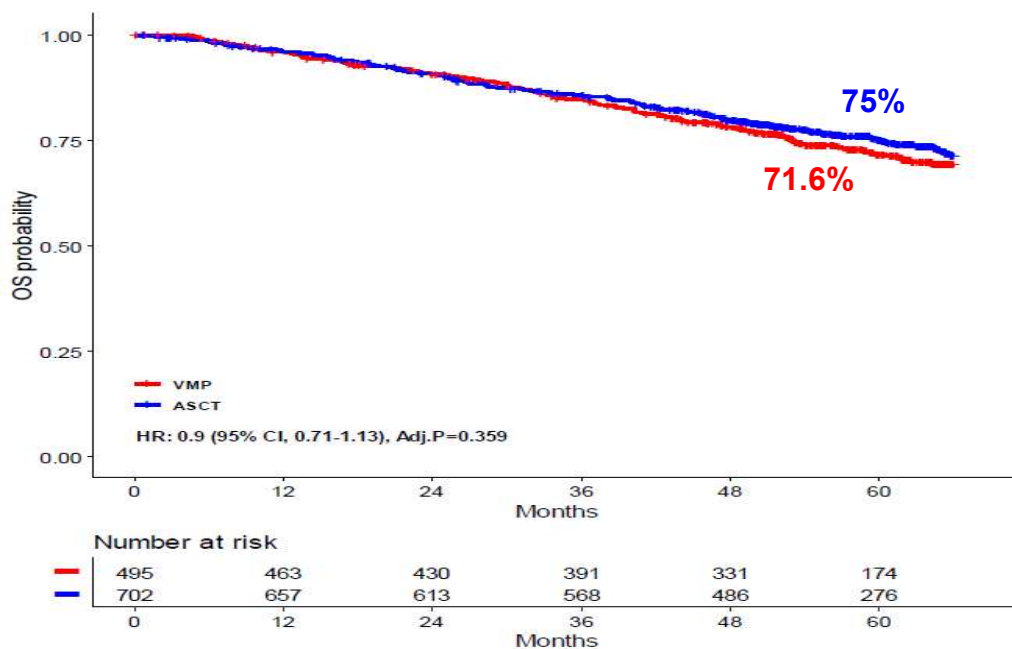
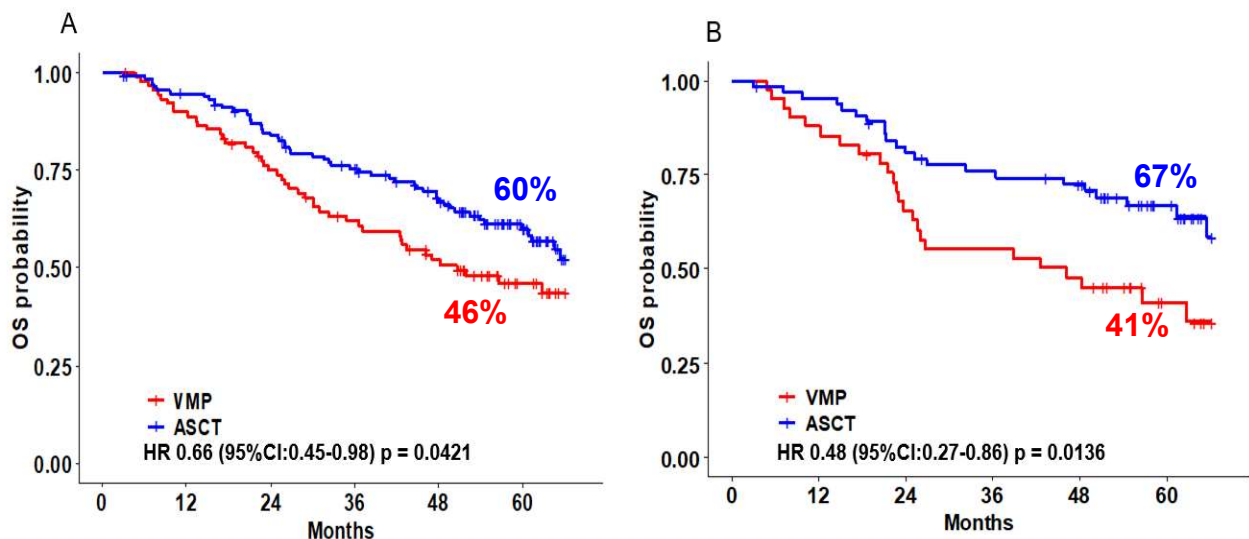


Figura 5. Curve di Kaplan-Meier della comparazione ASCT versus VMP in termini di OS nei pazienti con profilo citogenetico ad alto rischio (A) e nei pazienti con positività di del(17p) (B)



Nel modello di regressione multivariata di Cox, le variabili indipendenti con impatto favorevole in termini di OS sono risultate essere: la citogenetica a rischio standard, l'ottenimento di una risposta \geq VGPR, uno stadio R-ISS 1 e una normale conta piastrinica (Tabella 10).

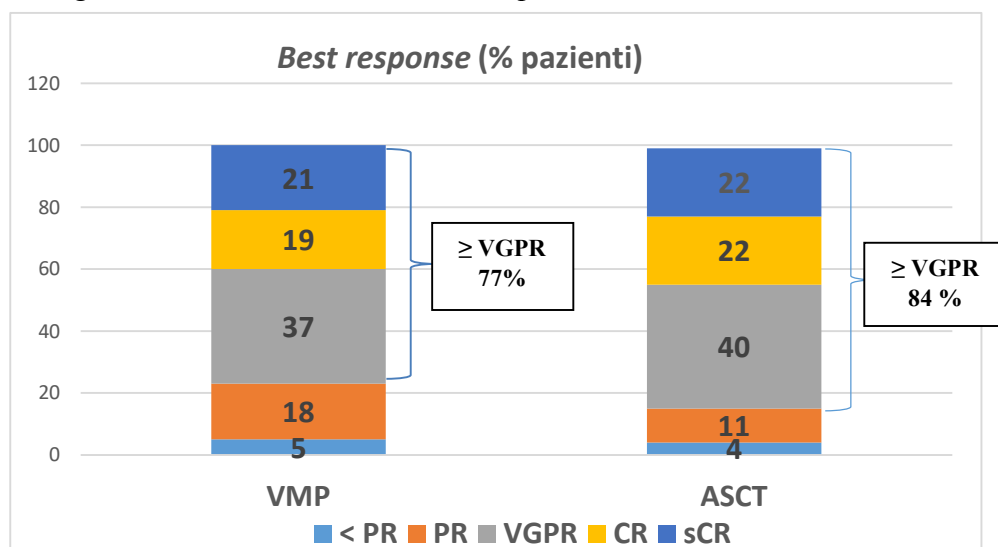
Tabella 10. Analisi multivariata di Cox di OS per i pazienti randomizzati ad ASCT versus VMP

Variabili con effetto su OS	HR	95% CI	P value
Best response \geq VGPR	0.39	0.29 - 0.52	<0.001
Rischio citogenetico standard	0.54	0.40 - 0.72	<0.001
R-ISS I vs II	0.45	0.30 - 0.69	<0.001
R-ISS I vs III	0.24	0.14 - 0.41	<0.001
Piastrine \geq 150.000/mmc	0.54	0.39 - 0.74	<0.001

Per quanto concerne la risposta al trattamento, al momento della prima randomizzazione, 485 (41%) dei 1197 pazienti hanno ottenuto una risposta di elevata qualità \geq VGPR, senza differenze significative tra i due gruppi di randomizzazione: ASCT 41% (n=286) e VMP 40% (n=199). Dopo la terapia di intensificazione, la percentuale di pazienti che hanno raggiunto almeno una VGPR come *best response* è stata significativamente più elevata nel gruppo ASCT (84%, n=593) rispetto al gruppo VMP (77%, n=381); p=0.0020). La qualità di risposta pari a CR+sCR è risultata del 44% (n=309) nel braccio ASCT e 40% (n=200) nel braccio VMP (Figura 6).

Inoltre, uno studio correlativo ha valutato l'impatto prognostico della MRD mediante citofluorimetria a flusso in un sottogruppo di 167 pazienti con immunofissazione sierica e urinaria negative prima dell'inizio della terapia di mantenimento. I risultati concernenti tale sottostudio risultano tuttora in corso.

Figura 6. Distribuzione della *best response*: ASCT versus VMP



5.3.3 CONFRONTO SINGOLO versus TANDEM ASCT

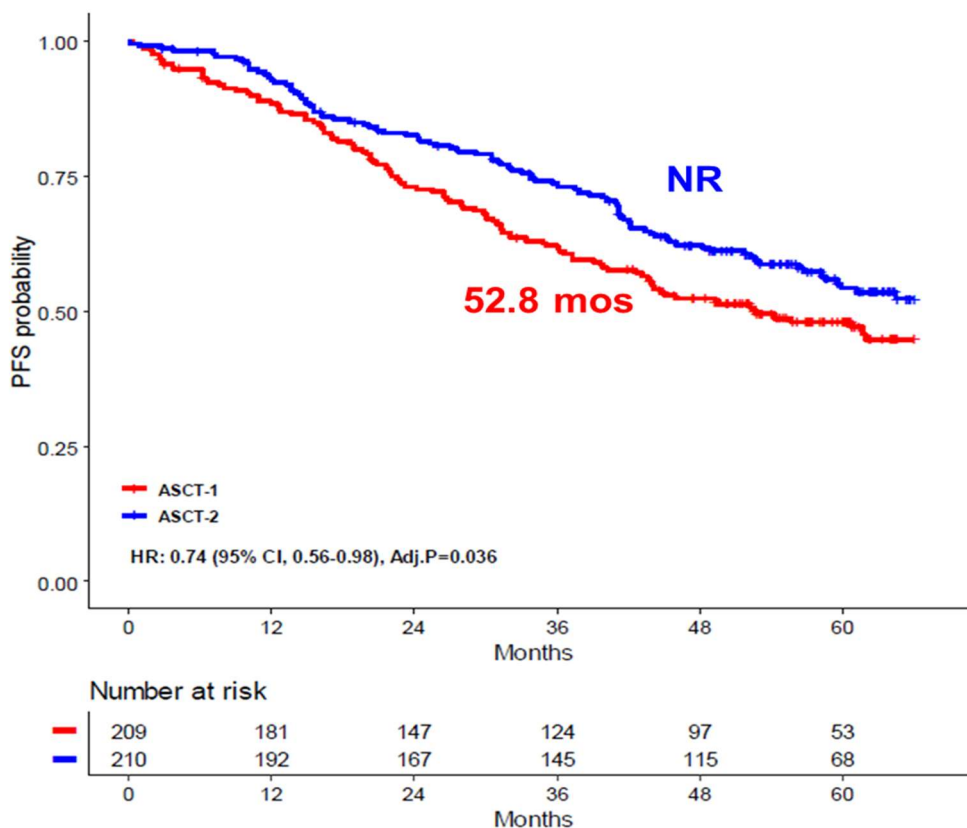
È stato valutato in maniera indipendente, il contributo offerto da tandem-ASCT (ASCT-2) rispetto a singolo-ASCT (ASCT-1). Infatti, secondo il disegno dello studio tra i 702 pazienti randomizzati a ricevere ASCT, 419 pazienti sono stati a loro volta assegnati ad ASCT-1 (n=209) o ASCT-2 (n=210) nei centri con *policy* di doppio ASCT. Le caratteristiche demografiche e di malattia dei pazienti dei due gruppi a confronto sono riportate nella Tabella 11.

Tabella 11: Principali caratteristiche basali dei pazienti randomizzati ad ASCT-1 o ASCT-2

	Doppio ASCT (n=210)	Singolo ASCT (n=209)
Età mediana, in anni (IQR)	57 (51-61)	58 (53-62)
Maschi (%)	131 (62.4)	115 (55)
β2 microglobulina mg/L, mediana (IQR)	3.3 (2.3-4.7)	3.1 (2.3-4.5)
Albumina g/dL, mediana (IQR)	3.9 (3.5-4.2)	3.9 (3.4-4.3)
Stadio ISS stage (%)		
I	90 (43)	94 (45)
II	79 (38)	76 (36)
III	41 (19)	39 (19)
Rischio citogenetico standard (%)	140 (78.2)	125 (74.9)
Alto rischio citogenetico (%)	39 (21.8)	42 (25.1)
del(17p) (n/n totale)	18/188	22/175
t(4;14) (n/n totale)	20/186	16/172
t(14;16) (n/n totale)	6/179	7/175
Stadio R-ISS (%)		
I	59 (28)	54 (26)
II	115 (55)	112 (53)
III	13 (6)	16 (8)
Non valutabile	23 (11)	27 (13)
Emoglobina g/dL, mediana (IQR)	11.4 (10.1-12.9)	11.1 (9.8-12.4)
Piastrine x 10³/mL, mediana (IQR)	234 (178-284]	216 (168-277)
BM: % plasmacellule, mediana (IQR)	55 (30-80)	50 (30-80)
LDH> valore massimo di riferimento (%)	22 (10.9)	28 (14.5)
Creatinina mg/dL, mediana (IQR)	0.88 (0.72-1.1)	0.87 (0.70-1.1)

All'analisi *intention-to-treat* della popolazione, si è osservato un significativo prolungamento della PFS mediana per i pazienti assegnati ad ASCT-2 (non raggiunta) rispetto a ASCT-1 (52.8 mesi). La PFS stimata a 5 anni per ASCT-2 è risultata pari a 53.5% (95% CI 46.6-61.3) rispetto a 44.9% (95% CI 38.0–53.0) per ASCT-1; HR 0.74, CI 95% 0.56-0.98; p=0.036; figura 7).

Figura 7. Curve di Kaplan-Meier del confronto ASCT-1 versus ASCT-2 in termini di PFS



L'analisi per sottogruppi ha mostrato come il prolungamento della PFS correlato al doppio trapianto si confermi anche in sottogruppi predefiniti a diverso rischio prognostico (figura 8). In particolare, il vantaggio in termini di PFS conferito da ASCT-2 è risultato ancora più significativo nei pazienti portatori di anomalie citogenetiche ad alto rischio, nei quali si è osservata una PFS mediana di 46 mesi rispetto a 26.7 mesi per il braccio ASCT-1 (HR 0.59, 0.34–1.03; p=0.062; figura 9A). Inoltre, anche nel sottogruppo di pazienti con positività per del17(p), l'HR per progressione di malattia o morte è risultato a favore di ASCT-2 (0.24, 0.09–0.66; p=0.0060; figura 9B).

Figura 8. Analisi univariata per sottogruppi in termini di PFS (ASCT-1 versus ASCT-2)

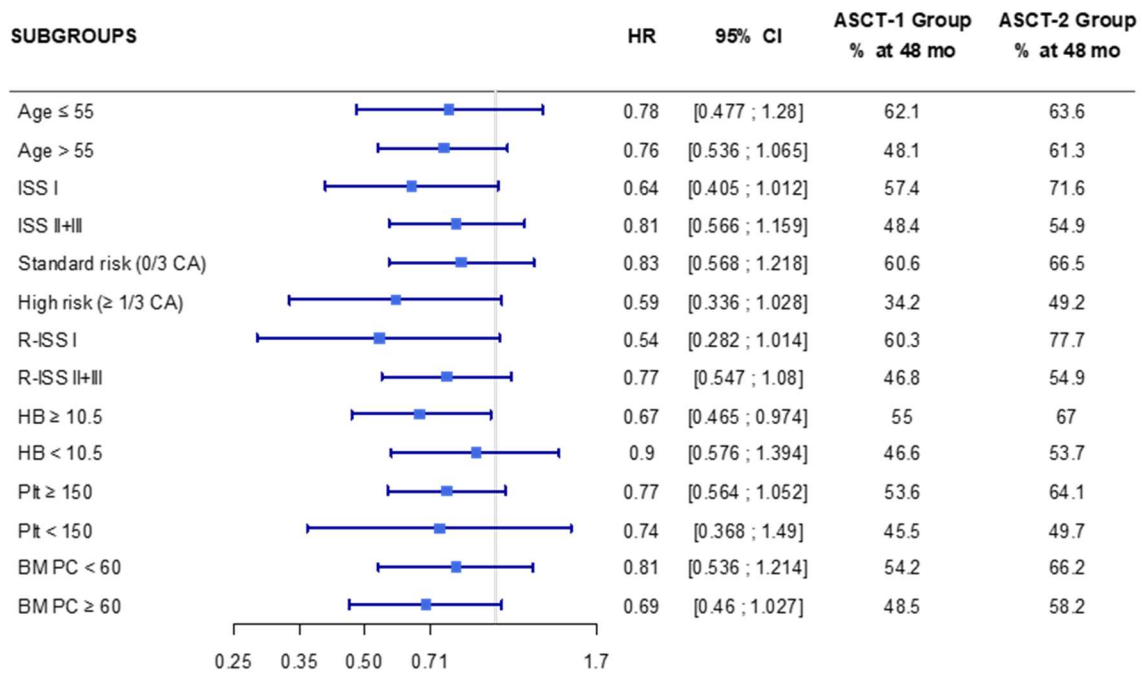
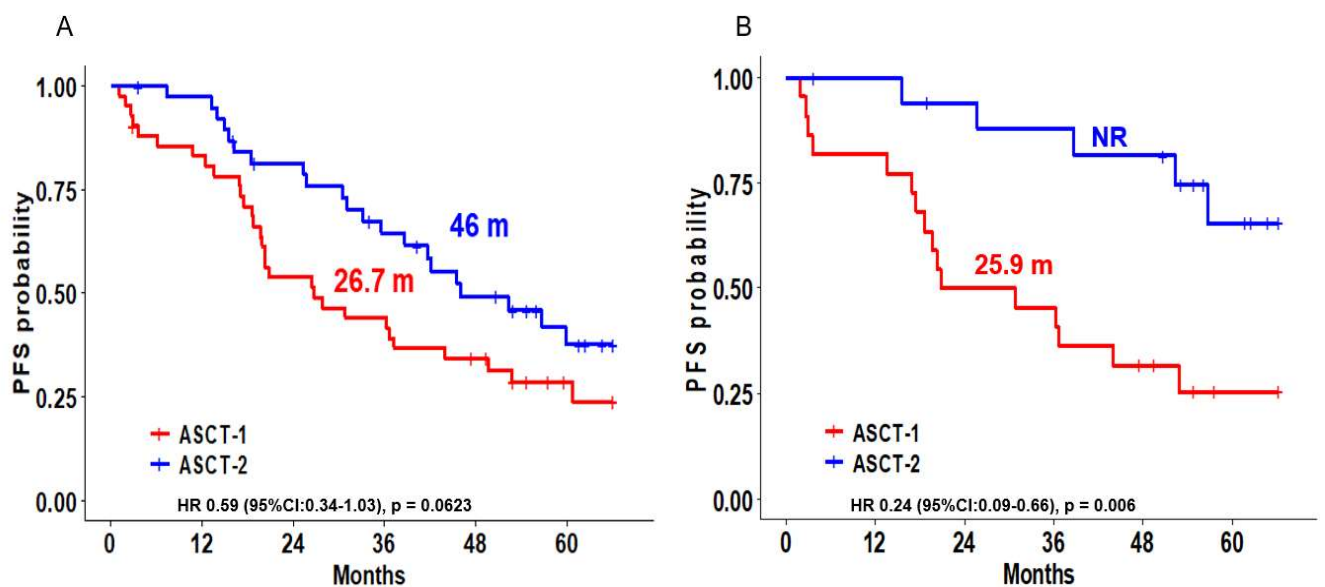
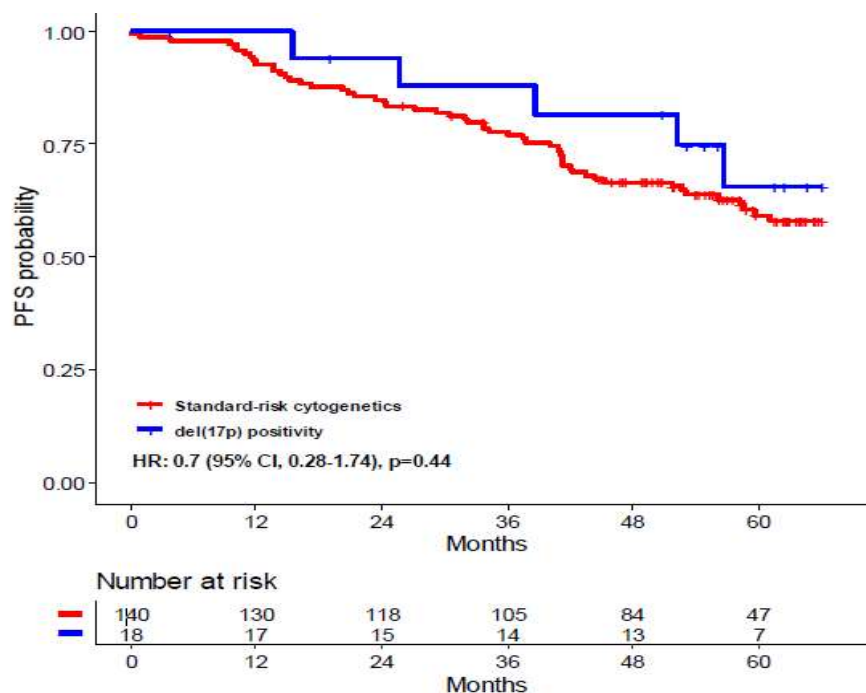


Figura 9. Curve di Kaplan-Meier della comparazione ASCT-1 versus ASCT-2 in termini di PFS nei pazienti con profilo citogenetico ad alto rischio (A) e nei pazienti con positività di del(17p) (B)



Inoltre, confrontando i pazienti positivi per la del(17p) e quelli con citogenetica a rischio standard sottoposti ad ASCT-2, il doppio ASCT si è mostrato probabilmente in grado di superare il noto impatto prognostico negativo associato alla del(17p) in termini di PFS (0.70, 0.28–1.74; p=0.44; figura 10).

Figura 10. Curve di Kaplan-Meier della comparazione in termini di PFS tra i pazienti con del(17p) e i pazienti con rischio citogenetico standard, randomizzati ad ASCT-2



Nel modello di regressione multivariata di Cox, l’assegnazione al gruppo ASCT-2 è risultata tra le variabili indipendenti predittive di una più prolungata PFS, insieme all’ottenimento di una *best response* ≥ VGPR, al rischio citogenetico standard e allo stadio R-ISS 1 (Tabella 12).

Tabella 12. Analisi multivariata di Cox di PFS per i pazienti randomizzati ad ASCT-1 vs ASCT-2

Variabili con effetto su PFS	HR	95% CI	P value
Randomizzazione ad ASCT-2	0.72	0.52 - 0.98	0.041
Best response ≥ VGPR	0.41	0.28 - 0.62	<0.001
Rischio citogenetico standard	0.54	0.37 - 0.79	0.001
R-ISS I vs II + III	0.68	0.54 - 0.87	0.002

L'OS, stimata a 5 anni, è risultata significativamente superiore nei pazienti randomizzati a ASCT-2 rispetto a ASCT-1 (80.3% versus 72.6%); HR=0.62; 95 % CI 0.41-0.93; p=0.022); figura 11. Tale beneficio si è osservato anche in sottogruppi di pazienti con caratteristiche prognostiche sfavorevoli, come lo stadio R-ISS II+III e un profilo di alto rischio citogenetico (figura 12). Infatti, nel sottogruppo di pazienti portatori di anomalie citogenetiche di alto rischio, l'OS stimata a 5 anni è risultata pari a 61.3% (95% CI 45.8-82.1) per ASCT-2 versus 54.7% (95% CI 41.1-72.7) per ASCT-1 (HR 0.70, 0.35-1.42; p=0.32); in particolare, nei pazienti con positività di del(17), l'OS stimata a 5 anni è stata di 80.2% (95% CI 62.4-100) e 57.1% (95% CI 39.2-83.2), rispettivamente per l'assegnazione ad ASCT-2 e ASCT-1 (HR 0.30, 0.08-1.08; p=0.066; figura 13).

Figura 11. Curve di Kaplan-Meier del confronto di ASCT-1 versus ASCT-2 in termini di OS

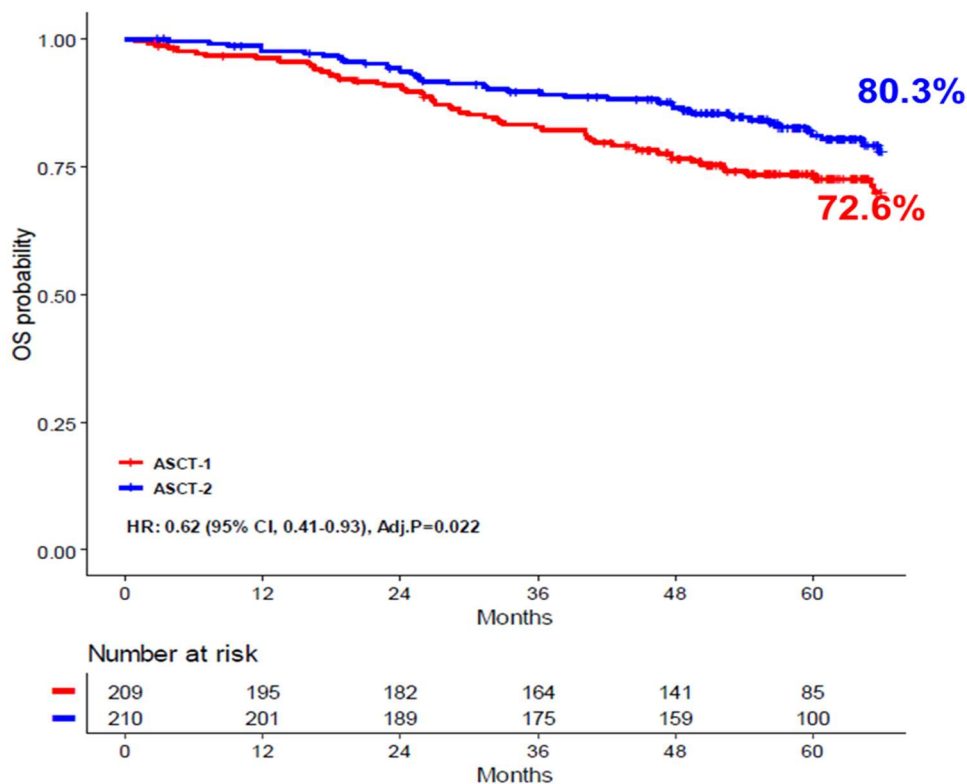


Figura 12. Analisi univariata per sottogruppi in termini di OS (ASCT-1 versus ASCT-2)

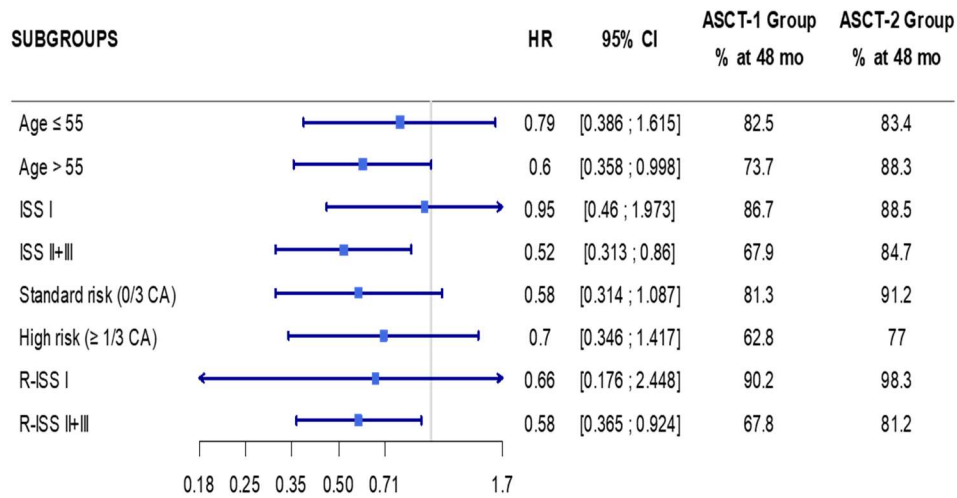
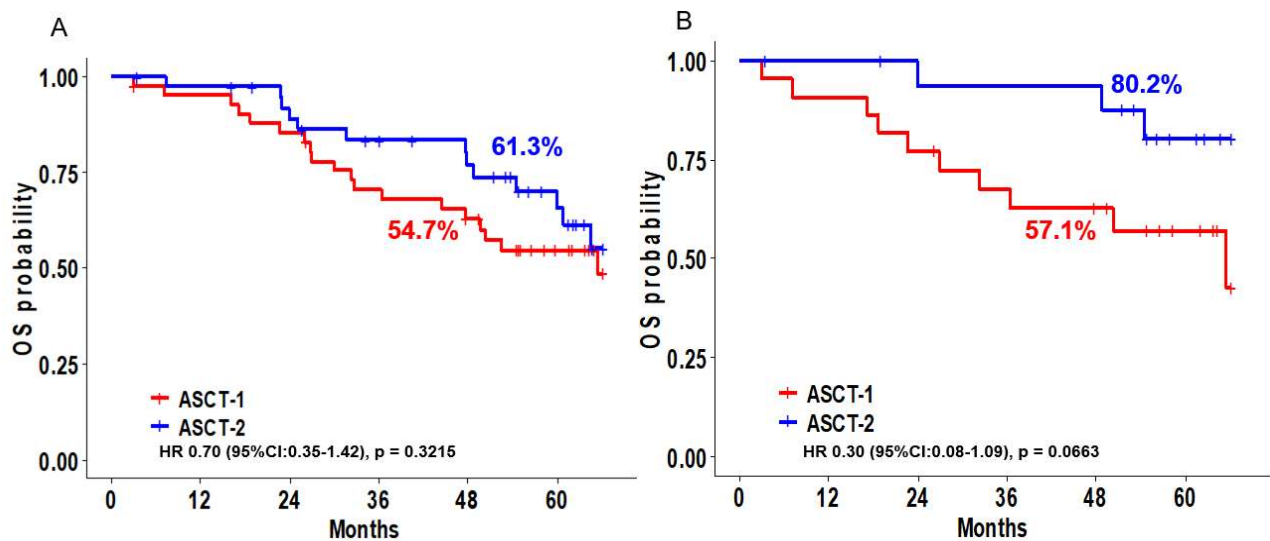
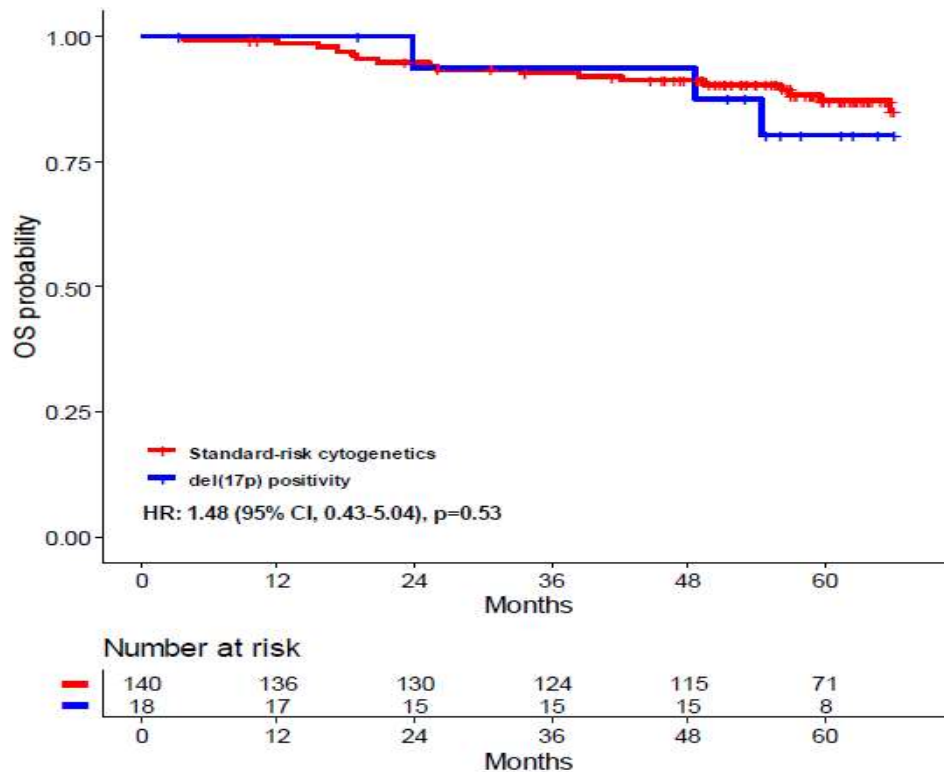


Figura 13. Curve di Kaplan-Meier della comparazione ASCT-1 versus ASCT-2 in termini di OS nei pazienti con profilo citogenetico ad alto rischio (A) e nei pazienti con positività di del(17p) (B)



Come già osservato in termini di PFS, il confronto tra i pazienti positivi per del(17p) e quelli con citogenetica a rischio standard assegnati ad ASCT-2, ha nuovamente visto il doppio ASCT in grado di superare l'effetto prognostico avverso della del(17p) sull'OS (1.48, 0.43–5.04; p=0.53; figura 14).

Figura 14. Curve di Kaplan-Meier della comparazione in termini di OS tra i pazienti con del(17p) e i pazienti con rischio citogenetico standard, randomizzati ad ASCT-2



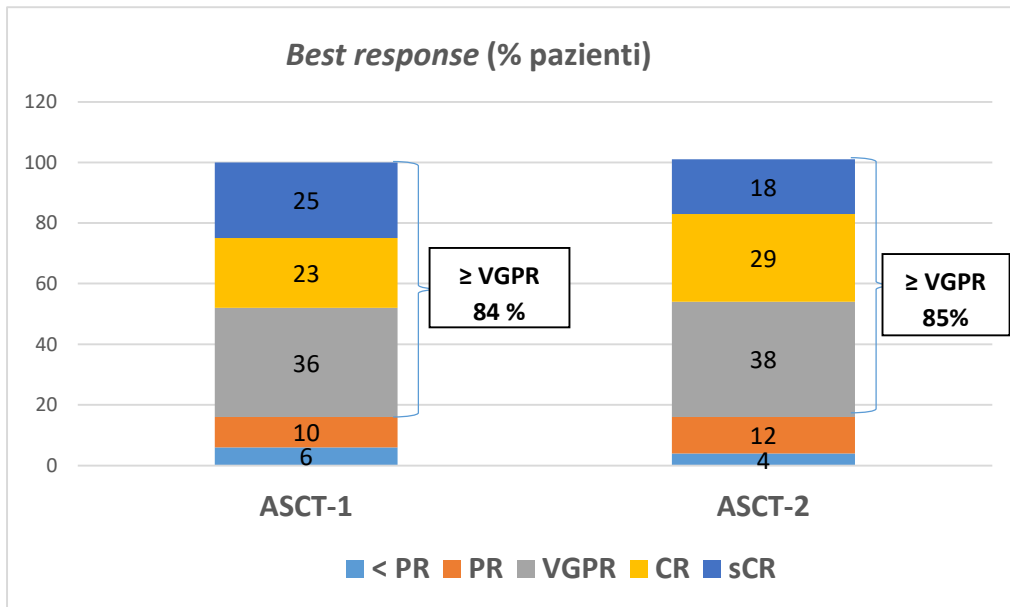
Nel modello di regressione multivariata di Cox, analogamente per quanto descritto in termini di PFS, l'assegnazione dei pazienti al gruppo ASCT-2 è risultata tra le variabili indipendenti predittive di una più prolungata OS, ancora una volta insieme all'ottenimento di una *best response* \geq VGPR, al rischio citogenetico standard e allo stadio R-ISS 1 (Tabella 13).

Tabella 13. Analisi multivariata di Cox di OS per i pazienti randomizzati ad ASCT-1 vs ASCT-2.

Variabili con effetto su OS	HR	95% CI	P value
Randomizzazione ad ASCT-2	0.61	0.38 - 0.97	0.038
Best response \geq VGPR	0.35	0.20 - 0.59	<0.001
Rischio citogenetico standard	0.57	0.34 - 0.95	0.032
R-ISS I vs II	0.28	0.13 - 0.60	0.001
R-ISS I vs III	0.17	0.07 - 0.43	<0.001

Per quanto concerne le risposte al trattamento, non sono state registrate differenze significative nel *rate* di risposte di alta qualità ottenute con ASCT-1 e ASCT-2: la percentuale di pazienti che hanno raggiunto almeno una VGPR come *best response* è stata rispettivamente di 84% versus 85% e la percentuale di CR+sCR è risultata del 48% versus 47% tra i 2 gruppi di trattamento (figura 15).

Figura 15. Distribuzione della *best response*: ASCT-1 versus ASCT-2



5.3.4 TERAPIA DI CONSOLIDAMENTO (R2) E MANTENIMENTO

Un altro obiettivo primario dello studio era la valutazione dell'effetto, in termini di PFS, del consolidamento con VRD versus No-Consolidamento e, a seguire, mantenimento con Lenalidomide. Tale analisi è stata condotta nello specifico dal gruppo olandese e per completezza nel presente elaborato sono riportati i principali risultati della seconda analisi ad interim.

Infatti, al momento del *data cutoff* per l'analisi di R2, il numero di eventi di progressione o morte a seguito della seconda randomizzazione era inferiore rispetto a quello pianificato per il confronto finale tra i due gruppi di trattamento.

Tra i pazienti sottoposti a R2, 447 hanno ricevuto terapia di consolidamento con VRD mentre 431 pazienti sono stati assegnati al braccio nessun consolidamento. Ad un follow-up mediano di 42.1 mesi (IQR 32.3–49.2), la PFS mediana è risultata di 58.9 mesi (95% CI 54–non stimabile) nel gruppo VRD versus 45.5 mesi (39.5–58.4) nel gruppo no consolidamento (HR 0.77, 95% CI 0.63–0.95; p=0.014).

L'OS stimata a 5 anni è stata pari a 77.2% (95% CI 68.7-83.6) nel braccio VRD e 72.2% (95% CI 59.3–81.7) nel braccio senza terapia di consolidamento (HR 0.99, 0.71–1.39; p=0.96).

La terapia di mantenimento con lenalidomide è stata avviata in 975 (81%) dei 1197 pazienti sottoposti a R1: 599 nel gruppo ASCT e 376 nel gruppo VMP. La durata mediana della terapia con lenalidomide è stata di 34 mesi (IQR 13.3-50.8), senza differenze significative tra la randomizzazione a ASCT (34.3 mesi) o VMP (33.4 mesi).

Al momento della presente analisi, il 37% (n=364) dei pazienti è risultato ancora in corso di trattamento dopo una mediana di 53.7 mesi (46.8–60.9), mentre il 63% (n=611) ha interrotto la terapia, più frequentemente a causa di una progressione di malattia (63%, n=383) o per l'insorgenza di eventi avversi (28%, n=170).

La PFS mediana dall'inizio della terapia di mantenimento è stata di 50.4 mesi (95% CI 45.8-57.7) nella popolazione generale, 58 mesi (49.1–non stimabile) nel gruppo ASCT e 43.2 mesi (38.7-50.1) nel gruppo VMP (HR 0.76, 0.64–0.91; p=0.0030).

5.3.5 TERAPIE SUCCESSIVE E OUTCOME A LUNGO TERMINE

Nel gruppo ASCT, 236 pazienti con relapse sintomatico hanno ricevuto terapia di seconda linea con regimi comprensivi di inibitori del proteasoma o agenti immunomodulanti o entrambi, seguiti da ASCT di salvataggio nel 17% (n=40) dei pazienti. Nel gruppo VMP, tra i 209 pazienti che hanno richiesto una seconda linea di terapia, il 63% (n=132) è stato sottoposto ad ASCT di salvataggio.

In seguito all'elaborazione dei risultati finali dello studio relativamente ai pazienti assegnati ad ASCT o VMP, è stata condotta un'analisi aggiornata con un follow-up mediano più prolungato, pari a 75 mesi (IQR 67-84), con l'obiettivo di valutare gli *outcomes* a lungo termine, quali OS, PFS2 e TTnT nei due gruppi di trattamento. Ad un follow-up mediano di 75 mesi, la randomizzazione ad ASCT si è associata a un significativo prolungamento dell'OS rispetto alla randomizzazione a VMP. Infatti, l'OS mediana non è stata raggiunta in entrambi i gruppi a confronto ma l'OS stimata a 75 mesi è risultata pari a 69% nel gruppo ASCT versus 63% nel gruppo VMP (HR 0.81, 95% CI 0.66-0.98, p=0.034). I pazienti che hanno beneficiato maggiormente del trattamento con ASCT sono stati quelli con caratteristiche prognostiche sfavorevoli al *baseline*, inclusi lo stadio ISS 2-3 (HR 0.78, 95% CI 0.61-0.99, p=0.047), lo stadio R-ISS 2-3 (HR 0.79, 95% CI 0.62-0.99, p=0.042) e la presenza di un profilo citogenetico di alto rischio. In particolare, per quest'ultimo sottogruppo di pazienti, l'OS stimata a 75 mesi è stata pari a 54% nel braccio ASCT versus 39% in quello VMP (HR 0.61, 95% CI 0.42-0.88, p=0.009). Il beneficio in termini di OS, misurato dal valore del HR, è risultato ancora più significativo per i pazienti portatori della del(17p) (HR 0.49, 95% CI 0.27-0.85, p=0.012).

Inoltre, la PFS2 stimata a 75 mesi è risultata superiore nel braccio ASCT versus VMP, rispettivamente pari a 57% e 49% (HR 0.76, 95% CI 0.64-0.90, $p=0.001$). I pazienti ricaduti dopo la randomizzazione a VMP e sottoposti ad ASCT di salvataggio hanno mostrato una PFS2 mediana significativamente ridotta (51 mesi) rispetto ai pazienti che hanno ricevuto ASCT *upfront* (85 mesi) (HR 0.52, 95% CI 0.40-0.66, $p < 0.0001$). Anche, il TTnT mediano è stato di 66 mesi per il braccio ASCT versus 47 mesi per il braccio VMP (HR 0.71, 95% CI 0.60-0.82, $p < 0.0001$). Ancora una volta, il trattamento con ASCT *upfront* ha determinato un significativo prolungamento del TTnT (mediana di 59 mesi) rispetto a quanto osservato con ASCT ricevuto al momento della ricaduta di malattia (mediana di 29 mesi; HR 0.32, 95% CI 0.26-0.40, $p < 0.0001$).

5.4 TOSSICITÀ

Il 34 % (n=239) dei pazienti sottoposti ad ASCT e il 27% (n=135) del gruppo VMP hanno presentato almeno un evento avverso severo. Nel gruppo ASCT si è registrata una maggiore incidenza di almeno un evento avverso di grado ≥ 3 , rispetto ad intensificazione con VMP (grado 3: 56% vs 48%; grado 4 o 5: 81% vs 10%; $p < 0.0001$). In particolare, ASCT si è associato a una più elevata frequenza di tossicità ematologica di grado ≥ 3 (neutropenia 79% vs 29%, piastrinopenia 83% vs 16%), disturbi gastrointestinali (12% vs 5%), mucosite (16% vs 0%) e infezioni (30% vs 4%). VMP, di contro, è stato caratterizzato da una maggiore incidenza di tossicità neurologica, con il riscontro nel 15% dei pazienti di polineuropatia periferica relata a Bortezomib di grado ≥ 3 , rispetto a 1% dei pazienti sottoposti ad ASCT (Tabella 14).

Il 58% dei pazienti trattati con VMP e il 3% di quelli trapiantati hanno richiesto riduzioni della dose dei farmaci, dovute allo sviluppo di almeno un evento avverso.

7 (1%) pazienti sono deceduti entro 100 giorni dall'ASCT: sei a causa di infezioni e uno a causa di insufficienza cardiaca.

Complessivamente, 86 (5.8%) di 1493 pazienti hanno sviluppato SPMs in un tempo mediano di 55.6 mesi (IQR 33.5-66.2) dall'ingresso nello studio. In entrambi i gruppi, il 6% dei pazienti ha sviluppato SPMs, senza alcuna differenza significativa tra i due trattamenti nelle percentuali di neoplasie ematologiche (2%) e di tumori solidi (4%).

Tabella 14. Principali eventi avversi (ASCT versus VMP)

Eventi avversi, %	ASCT (n=652)		VMP (n=472)	
	Gr. 1-2*	Gr. ≥ 3	Gr. 1-2*	Gr. ≥ 3
Anemia	51	16	26	<1
Neutropenia	2	79	18	29
Trombocitopenia	2	83	24	16
Gastrointestinali	33	12	26	5
Mucosite	21	16	2	0
Neutropenia febbrile	5	18	<1	<1
Sepsi	1	5	0	0
Infezioni respiratorie	3	2	8	1
Neuropatia periferica	10	1	42	15
Astenia	8	1	17	2
Cardiaci	6	2	6	3

*Gli eventi avversi di grado 1 o 2 riportati nella tabella si sono verificati in almeno il 10% dei pazienti

5.5 DISCUSSIONE

Sin dalla metà degli anni '90, la chemioterapia ad alte dosi con supporto di cellule staminali emopoietiche autologhe rappresenta il *gold standard* terapeutico dei pazienti con MM di nuova diagnosi di età < 65 anni (120; 85; 121; 124; 125).

Nelle ultime due decadi, l'armamentario terapeutico del MM si è arricchito di promettenti nuovi agenti, quali farmaci immunomodulatori, inibitori del proteasoma e anticorpi monoclonali.

L'avvento di questi farmaci, variamente combinati fra di loro in nuovi regimi, ha consentito il raggiungimento di straordinari risultati, inizialmente ottenuti nell'ambito della malattia in fase avanzata e refrattaria, e più recentemente, confermati con maggiore successo nel trattamento dei pazienti con malattia di nuova diagnosi, candidati o meno a ricevere terapia con Melphalan ad alte dosi (HDM) e successivo ASCT.

Infatti l'impiego dei nuovi farmaci come terapia di induzione prima, e come terapia di consolidamento e mantenimento dopo trapianto autologo, ha ulteriormente migliorato gli *outcomes* dei pazienti, in particolare in termini di *rate* di risposte di elevata qualità, di PFS e OS (134; 153; 147).

Altrettanto significativi avanzamenti terapeutici sono stati ottenuti con i nuovi farmaci nei pazienti non candidabili al trapianto autologo (203; 206; 215). In questo *subset* di pazienti, infatti, l'integrazione di Bortezomib nel trattamento convenzionale con Melphalan e Prednisone (MP) si è tradotta in una *rate* di remissioni complete pari a 30% e in una OS a 5 anni di 56.4 mesi (203; 204).

Questi eccellenti risultati, comparabili alla percentuale di risposte di elevata qualità e OS ottenuti con l'ASCT, hanno messo in discussione il ruolo e il corretto *timing* del trapianto autologo, ponendo l'interrogativo se l'impiego esclusivo dei nuovi farmaci, senza l'uso *upfront* di ASCT, consenta di raggiungere gli stessi risultati nella terapia dei pazienti giovani con NDMM.

In questo contesto, sono stati pertanto disegnati studi randomizzati volti a comparare prospetticamente ASCT e schemi di terapia contenenti i nuovi farmaci. Tra questi, il primo è stato uno studio randomizzato di fase III, che ha confrontato l'effetto sulla PFS e OS di HDM, con successivo ASCT, rispetto a Melphalan-Prednisone-Lenalidomide (MPR), al seguito di una comune terapia di induzione con Lenalidomide-Desametasone (188). I dati emersi dimostrano come sia la PFS sia la OS siano significativamente superiori nel braccio dello studio con ASCT rispetto a MPR, con PFS mediana pari a 43 mesi vs 22.4 mesi e OS a 4 anni pari a 81.6% vs 65.3%. Nonostante, dunque, questi dati abbiano dimostrato una superiorità del trapianto rispetto a terapia con soli nuovi farmaci, lo schema di induzione del protocollo era sub-ottimale, in quanto privo di un inibitore del proteasoma.

Sono stati quindi proposti, quasi contemporaneamente, due studi prospettici multicentrici, il primo presentato dall'Intergroupe Francophone Du Myelome (IFM/DFCI 2009) ed il secondo disegnato da

European Myeloma Network (EMN02/HO95). Il trial di fase III IFM/DFCI, è stato condotto su 700 pazienti con MM di nuova diagnosi, sottoposti a terapia di induzione con Bortezomib-Lenalidomide-Desametasone (VRD) e successivamente assegnati in rapporto 1:1 a HDM e ASCT o a solo regime VRD come terapia di consolidamento (156). I risultati di questo studio, recentemente aggiornati ad un follow-up mediano di 93 mesi, hanno confermato la superiorità della chemioterapia ad alte dosi e ASCT rispetto a solo VRD in termini di PFS (mediana di 47 versus 35 mesi; HR 0.70; $p < 0.001$); invece, non sono emerse differenze significative nella sopravvivenza (OS a 8 anni: 62% versus 60%, rispettivamente) (280).

Il trial clinico europeo di fase III, EMN02/HO95, oggetto del presente elaborato, ha comparato l'efficacia della terapia di intensificazione con VMP rispetto a HDM e successivo supporto di cellule staminali emopoietiche autologhe a seguito di una fase comune di induzione con VCD. Inoltre, è stato indagato il ruolo della terapia di consolidamento con VRD rispetto a nessun consolidamento, seguito da mantenimento con Lenalidomide per tutti i pazienti, fino a intolleranza o progressione di malattia. Analogamente al trial francese, uno degli *endpoints* primari dello studio EMN02/HO95 era il confronto in termini di PFS tra ASCT ed una intensificazione con nuovi farmaci, in una delle più ampie casistiche riportate sinora nell'ambito degli studi prospettici condotti in questo setting (oltre 1500 pazienti arruolati complessivamente).

I dati dell'analisi finale dello studio hanno mostrato il raggiungimento di tale *endpoint* primario. Infatti, ad un follow-up mediano di circa 60 mesi, ASCT si è associato a un significativo prolungamento della PFS mediana (56.7 mesi) rispetto alla terapia di intensificazione con VMP (41.9 mesi), determinando una riduzione del rischio di evento pari al 27%.

Il beneficio conferito dall'ASCT rispetto a VMP in termini di PFS, si è mantenuto in tutti i sottogruppi di pazienti analizzati ed in particolare, anche in presenza di fattori basali a noto impatto prognostico negativo, sia per caratteristiche di "high burden" di malattia (quali stadio ISS II-III, stadio R-ISS II e III, elevati livelli di LDH e infiltrato massivo di plasmacellule midollari) sia per caratteristiche citogenetiche di alto rischio, date dalla presenza di $\text{del}(17p) \pm t(4;14) \pm t(14;16)$.

La superiorità di ASCT è stata ulteriormente confermata in analisi multivariata, in cui la randomizzazione al trapianto si è dimostrato il principale fattore predittivo di una più prolungata PFS, insieme alla citogenetica a rischio standard, all'ottenimento di una risposta di elevata qualità, allo stadio R-ISS 1 e a una normale conta piastrinica.

Inoltre, la probabilità di ottenere una risposta di elevata qualità, maggiore o uguale a VGPR, è risultata superiore nei pazienti trapiantati rispetto a quelli trattati nel braccio sperimentale (84 % VS 77%; $p = 0.0020$). Non sono state evidenziate differenze significative in termini di OS stimata a 5 anni tra la randomizzazione ad ASCT o VMP (75% versus 72%).

Un recente aggiornamento dell'analisi finale, condotto con un follow-up mediano di oltre 6 anni dei pazienti sottoposti alla prima randomizzazione, ha invece evidenziato un significativo miglioramento dell'OS stimata a 75 mesi per pazienti del gruppo ASCT rispetto a VMP (69% versus 63%, $p=0.034$). Tale vantaggio è stato ancora una volta confermato anche in presenza di caratteristiche prognostiche sfavorevoli al *baseline*, incluso il profilo citogenetico di alto rischio. Infatti, in questo sottogruppo di pazienti la randomizzazione ad ASCT rispetto a VMP ha determinato una riduzione del rischio di morte pari al 39%, con un vantaggio ancora più significativo per i pazienti portatori di del(17p) (HR 0.49). Inoltre, dall'analisi aggiornata è emerso come ASCT correli con un significativo prolungamento anche di altri outcomes a lungo termine, quali PFS2 stimata a 75 mesi (57% versus 49%) e TTnT mediano (66 mesi versus 47 mesi). Pertanto, il trattamento con ASCT ha determinato un controllo più duraturo della malattia, indipendentemente dalle terapie proposte alla ricaduta e senza indurre particolari resistenze.

Relativamente al corretto timing della chemioterapia ad alte dosi nell'era dei nuovi farmaci, l'esecuzione di ASCT upfront si è confermato come la strategia terapeutica ottimale per pazienti giovani all'esordio di MM, rispetto al trapianto rimandato alla prima ricaduta di malattia. Infatti, per i pazienti che hanno ricevuto un ASCT di salvataggio si è registrata una significativa riduzione della PFS2 mediana (51 mesi versus 85 mesi) e del TTnT mediano (29 mesi versus 59 mesi).

In aggiunta, una parte considerevole di pazienti ha perso l'eleggibilità al trapianto al momento della ricaduta, come dimostrato dalla percentuale di pazienti sottoposti ad ASCT di salvataggio (63%) nel gruppo di randomizzazione a VMP.

L'analisi della tossicità ha rilevato come essa sia stata accettabile in entrambi i bracci di terapia; come atteso, ASCT è stato gravato da una maggiore incidenza di tossicità ematologica severa, mucosite ed infezioni legate al regime di condizionamento submieloablativo, mentre i pazienti trattati con VMP hanno presentato una incidenza superiore di polineuropatia periferica relata a Bortezomib. Invece, non sono emerse differenze significative nell'incidenza di SPMs tra i due trattamenti.

In considerazione dei pochi e discordanti risultati disponibili sul valore aggiuntivo del doppio ASCT soprattutto nell'era dei nuovi farmaci (126; 127; 129; 130; 131), nel trial EMN02 è stata effettuata una comparazione prospettica in termini di efficacia tra il singolo e il doppio ASCT. I risultati dell'analisi finale per quanto concerne tale obiettivo secondario dello studio, hanno dimostrato un vantaggio significativo di ASCT-2 rispetto ad ASCT-1 sia in termini di PFS (HR 0.74) sia di OS (HR 0.62). Tale beneficio appare particolarmente evidente in sottogruppi di pazienti a rischio prognostico sfavorevole per la presenza di stadio R-ISS avanzato ed anomalie citogenetiche ad alto rischio. In particolare, i pazienti portatori di del(17)p sottoposti ad ASCT-2 rispetto ad ASCT-

I hanno presentato un significativo miglioramento degli outcomes di sopravvivenza, come evidenziato dall'HR per progressione (0.24) o morte (0.30).

In aggiunta, l'esecuzione del doppio trapianto sembrerebbe mitigare l'impatto prognostico negativo conferito dalla positività per del(17p); infatti, nel braccio ASCT-2, non sono state rilevate differenze significative tra i pazienti portatori di del(17p) e quelli con un profilo citogenetico a rischio standard, né in termini di PFS (p=0.44) né di OS (p=0.53).

Nel modello di regressione multivariata di Cox, l'assegnazione al gruppo ASCT-2 è risultata tra le variabili indipendenti predittive di una più prolungata PFS e OS, insieme all'ottenimento di una best response \geq VGPR, al rischio citogenetico standard e allo stadio R-ISS 1.

Dunque, i risultati dello studio EMN02 sul confronto tra il singolo e il doppio ASCT appaiono in linea con quanto riportato nella recente metanalisi di tre trials randomizzati europei, in cui sono stati impiegati regimi di induzione con tripletta Bortezomib-based (VTD o PAD) seguiti da singolo o doppio ASCT, sulla base dei disegni degli studi (134; 148; 192; 281); infatti, l'esecuzione del doppio ASCT si è associata ad un vantaggio di PFS e OS, maggiormente evidente nei pazienti ad alto rischio, definiti sia sulla base di uno stadio ISS II/III e citogenetica positiva per t(4;14) e/o del(17p).

I dati emersi dal trial EMN02 sono invece discordanti rispetto a quelli ottenuti dallo studio di fase III "StaMINA", condotto in USA: il doppio ASCT, o la terapia di consolidamento comprensiva di nuovi farmaci, non hanno apportato alcun beneficio rispetto ad un trattamento con singolo trapianto autologo e mantenimento con Lenalidomide (177). Occorre tuttavia considerare che le notevoli differenze tra i disegni dei due studi rendono i risultati difficilmente confrontabili. Infatti, nello studio EMN02 è stata impiegata una terapia di induzione Bortezomib-based comune per tutti i pazienti e con un numero fisso di cicli, mentre nel trial americano sono stati utilizzati regimi di induzione eterogenei sia per tipo e numero di farmaci associati che per durata (fino a un anno). Inoltre, si è rilevata una diversa aderenza al secondo ASCT tra i due studi: oltre l'80% dei pazienti ha ricevuto il secondo ASCT pianificato nel trial EMN02 versus il 68% nello studio StaMINA. Anche la differente definizione di malattia ad alto rischio può aver contribuito sui risultati contrastanti osservati nelle analisi per sottogruppi prognostici.

Il trial EMN02 ha inoltre raggiunto un altro *endpoint* primario dello studio ovvero la valutazione dell'effetto, in termini di PFS, del consolidamento con VRD versus no-consolidamento e, a seguire, mantenimento con Lenalidomide. I risultati della seconda analisi ad interim, coordinata da un altro centro investigatore per quanto riguarda tale obiettivo, hanno evidenziato come la terapia di consolidamento con VRD correli con una significativa riduzione della probabilità di recidiva di malattia. A follow-up mediano di 42.1 mesi, la PFS mediana è risultata di 58.9 mesi nel gruppo VRD versus 45.5 mesi nel gruppo no consolidamento mentre non sono emerse differenze significative in

termini di OS (stimata a 5 anni pari a 77.2% e 72.2%). Trattandosi in ogni caso di un'analisi preliminare, sarà necessario un follow up più prolungato per validare tali risultati.

Relativamente alla terapia di mantenimento, la durata mediana (34 mesi) e la PFS mediana dall'inizio della terapia con Lenalidomide (50.4 mesi) sono in linea con quanto riportato in letteratura (190; 191).

Una delle criticità di questo studio può essere rappresentata dall'utilizzo di un regime di induzione non ottimale, che potrebbe aver influito sulla qualità delle risposte ottenute. Quando il trial EMN02 è stato disegnato, VCD era uno degli schemi di induzione più utilizzati per i pazienti eleggibili ad ASCT mentre successivamente la combinazione di Bortezomib ed IMiD è divenuta il *backbone* della terapia di induzione.

Ancora più recentemente, analisi preliminari di regimi di combinazione a 4 farmaci (inclusi gli anticorpi monoclonali) hanno mostrato risultati di efficacia molto promettenti, mettendo nuovamente in discussione il ruolo del trapianto autologo in un'era di nuovi farmaci di ultima generazione (165; 166).

Inoltre, le dimensioni dei sottogruppi di pazienti con o senza anomalie citogenetiche nella comparazione di ASCT-1 versus ASCT-2 rendono necessarie ulteriori conferme per poter definire l'appropriatezza del doppio trapianto come procedura standard per tutti i pazienti giovani con malattia all'esordio o riservata solo a determinate categorie di pazienti con caratteristiche di alto rischio.

In conclusione, dai risultati emersi dall'analisi finale, la terapia con alte dosi di Melphalan e successivo ASCT rimane a tutt'oggi lo standard di cura dei pazienti giovani con MM di nuova diagnosi, in quanto è in grado di garantire una migliore qualità di risposta e una prolungata sopravvivenza libera da malattia, anche in sottogruppi di pazienti considerati ad alto rischio.

A un follow-up prolungato di oltre 6 anni, ASCT si è associato a un significativo prolungamento della sopravvivenza e a un controllo più duraturo della malattia rispetto alla terapia di intensificazione con nuovi farmaci. L'esecuzione di ASCT *upfront* si conferma la strategia terapeutica ottimale rispetto ad ASCT differito alla ricaduta di malattia.

Il confronto tra ASCT singolo e tandem ha evidenziato inoltre come il doppio trapianto garantisca un miglioramento prognostico in termini di PFS ed OS, con beneficio particolarmente evidente nei pazienti portatori di del(17p).

Se l'ASCT resta uno *standard* nell'era delle triplette Bortezomib-based, l'integrazione nel programma trapiantologico di sempre più nuovi e promettenti agenti di seconda e terza generazione, quali Carfilzomib, MLN e Daratumumab, attualmente in sperimentazione, rende nuovamente necessario definire il ruolo della chemioterapia ad alte dosi e il valore aggiuntivo del doppio ASCT nel contesto di studi prospettici.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Tura S. *Corso di malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici*. s.l. : Società Editrice Esculapio, 2020.
2. *Linee guida Mieloma AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica)*. 2017.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics*. *Cancer Journal for Clinicians*. 2019. 69, p. 7-34.
4. Serghianis TN, Zagouri F, Tsimilimos G, et al. *Risk Factors for Multiple Myeloma: A Systematic Review of Meta-Analyses*. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2015, Vol. 15, 10, p. 563-577.
5. Jameson JL, Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 20. s.l.: McGraw-Hill Education, 2018.
6. Landgren O, et al. *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study*. *Blood*. 2009;113(22):5412-5417.
7. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, et al. *Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study*. *Lancet Lond Engl*. . 2010, Vol. 375(9727):1721-8.
8. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al., *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study*. s.l. : *Blood* 2009 Vol. 113, 22, p. 5412-5417.
9. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al., *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *The New England Journal of Medicine*. 2002, Vol. 346, 8, p. 564-569.
10. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al. *Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma*. *The New England journal of medicine*. 2007;356(25):2582-2590.
11. Lakshman A1, Rajkumar SV1, Buadi FK et al. *Risk stratification of smoldering multiple myeloma incorporating revised IMWG diagnostic criteria*. *Blood cancer journal*. 2018, Vol. 6, 59.
12. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. *Smoldering Multiple Myeloma*. *Blood*. 2015, Vol. 125, 20, p. 3069-3075.
13. Rajkumar SV et al. *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. *The Lancet Oncology*. 2014, Vol. 15, 12, p. 538-548.
14. Hallek M, Leif Bergsagel P, Anderson KC. *Multiple Myeloma: Increasing Evidence for a Multistep Transformation Process*. *Blood*. 1998, Vol. 91, 1, p. 3-21.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S et al. *Cellular and Molecular Immunology*. 9. s.l. : Elsevier, 2017.
16. Podar K, Chauhan D, Anderson KC. *Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy*. *Leukemia*. 2009;23(1):10-24.
17. Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, et al. *The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: Interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions*. s.l. : *European Journal of Cancer*. 2006, 42, p. 1564-1573.
18. Roy P, Sarkar UA, Basak S. *The NF-kB Activating Pathways in Multiple Myeloma*. *Biomedicines*. 2018.
19. Paiva B, Puig N, Cedena MT et al. *Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance*. *Leukemia*. 382-392, 2017, 31.
20. Chaidos A, Barnes CP, Cowan G et al. *Clinical drug resistance linked to interconvertible phenotypic and functional states of tumor-propagating cells in multiple myeloma*. *Blood*. 2013, Vol. 121, 2, p. 318-328.
21. Hanahan D, Weinberg RA *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*. 2011, Vol. 144, 5, p. 646-674.
22. Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. *The role of angiogenesis in solid tumours: An overview*. *European Journal of Internal Medicine*. 2009, 20, p. 663-671.
23. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins & Cotran: Pathologic Basis of Disease*. 9. s.l. : Elsevier, 2014.

24. Kranenburg O, Gebbink MFBG, Voest EE. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004, Vol. 1654, 1, p. 23-37.
25. Kumar R, Yarmand-Bagheri R. The role of HER2 in angiogenesis. *Seminars in Oncology*. 2001, Vol. 28, 5, p. 27-32.
26. Pfaff MJ, Mukhopadhyay S, Hoofnagle M, et al. Tumor suppressor protein p53 negatively regulates ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Journal of Vascular Surgery*. 2018, Vol. 68, 6, p. 2225-2335.
27. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999, Vol. 399, 6733, p. 271-275.
28. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *Journal of Pathology*. 2002, 196, p. 254-265.
29. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M, et al. Angiogenesis and Multiple Myeloma. *Cancer Microenvironment*. 2011, 4, p. 325-337.
30. Kumar S, Rajkumar SV, Kimlinger T, et al. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical. *Leukemia*. 2005, 19, p. 1466-1470.
31. Kimlinger T, Kline M, Kumar S, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factors and their receptors in multiple myeloma. *Haematologica*. 2006, Vol. 91, 8, p. 1033-1040.
32. Ria R, Reale A, De Luisi A, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *American Journal of Blood Research*. 2011, Vol. 1, 1, p. 76-89.
33. Ribatti D, Vacca A. Role of Endothelial Cells and Fibroblasts in Multiple Myeloma Angiogenic Switch. *Cancer treatment and research*. 2016, 169, p. 51-61.
34. Munshi NC, Wilson C. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Seminars in oncology*. 2001, Vol. 28, 6, p. 565-569.
35. Rajkumar SV, Fonseca R, Witzig TE, et al. Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia*. 1999, Vol. 13, 3, p. 469-472.
36. Ferrarini M, Ferrero E. Proteasome inhibitors and modulators of angiogenesis in multiple myeloma. *Current Medical Chemistry*. 2011, Vol. 18, 34, p. 5185-5195.
37. Roodman GD. Pathogenesis of Myeloma Bone Disease. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010, 109, p. 283-291.
38. Sezer O, Heider U, Zavrski I, et al. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood*. 2003, Vol. 101, 6, p. 2094-2098.
39. Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002, Vol. 100, 8, p. 3002-3007.
40. EMA. Prolia, INN-denosumab. [Online] 2015. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/prolia-epar-product-information_it.pdf.
41. —. Xgeva, INN-denosumab. [Online] 2016. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xgeva-epar-product-information_it.pdf.
42. Parrondo RD, Sher T. Prevention Of Skeletal Related Events In Multiple Myeloma: Focus On The RANK-L Pathway In The Treatment Of Multiple Myeloma. *OncoTargets and Therapy*. 2019, 12, p. 8467-8478.
43. FDA. Xgeva (denosumab) injection, for subcutaneous use. [Online] 2018. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125320s182lbl.pdf.
44. Terpos E, Politou M, Szydlo R, et al. Serum levels of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) correlate with the extent of bone disease and survival in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2003, Vol. 123, 1, p. 106-109.
45. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou I, et al. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer Journal*. 2018, Vol. 8, 7.

46. Vallet S, Mukherjee S, Vaghela N, et al. Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, Vol. 107, 11, p. 5124-5129.
47. Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2003, Vol. 349, 26, p. 2483-2494.
48. Panaroni C, Yee AJ, Raje NS. Myeloma and Bone Disease. *Current osteoporosis reports*. 2017, Vol. 15, 5, p. 483-498.
49. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist UH, et al. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2015, Vol. 100, 1, p. 107-113.
50. Zamagni E, Tacchetti P, Cavo M. Imaging in multiple myeloma: How? When? *Blood*. 14 2019;133(7):644–51.
51. Zamagni E, Cavo M. The role of imaging techniques in the management of multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2012, 2012, Vol. 159, 5, p. 499-513.
52. Hillengass J, Usmani S, Rajkumar SV et al. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. *The Lancet Oncology*. 2019, Vol. 20, 6, p. 302-312.
53. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975;36(3):842-854.
54. Greipp PR, et al. International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(15):3412-3420.
55. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2015, Vol. 33, 26, p. 2863-2869.
56. Jung SH, Kim K, Kim JS, et al. A prognostic scoring system for patients with multiple myeloma classified as stage II with the Revised International Staging System. *British Journal of Haematology*. 2018, Vol. 181, 5, p. 707-710.
57. González-Calle V, Slack A, Keane N, et al. Evaluation of Revised International Staging System (R-ISS) for transplant-eligible multiple myeloma patients. *Annals of Hematology*. 2018, Vol. 97, 8, p. 1453-1462.
58. Ozaki S, Handa H, Saitoh T, et al. Evaluation of the Revised International Staging System (R-ISS) in Japanese patients with multiple myeloma. *Annals of Hematology*. 2019, Vol. 98, 7, p. 1703-1711.
59. Albarracin F, Fonseca R. Plasma cell leukemia. *Blood reviews*. 2011, Vol. 25, 3, p. 107-112.
60. Usmani SZ, Heuck C, Mitchell A, et al. Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica*. 2012, Vol. 97, 11, p. 1761-1767.
61. Barley K, Tindle S, Bagiella E, et al. Serum Free Light Chain Assessment Early After Stem Cell Transplantation as a Prognostic Factor in Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2015, Vol. 15, 9, p. 541-545.
62. Tacchetti P, Pezzi A, Zamagni E, et al. Role of serum free light chain assay in the detection of early relapse and prediction of prognosis after relapse in multiple myeloma patients treated upfront with novel agents. *Haematologica*. 2017, Vol. 102, 3, p. 104-107.
63. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia*. 2019, Vol. 33, 1, p. 159-170.
64. Manier S, Salem KZ, Park J, et al. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nature Reviews, Clinical Oncology*. 2017, Vol. 14, 2, p. 100-113.
65. Tabernero D, San Miguel JF, Garcia-Sanz M, et al. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *The American Journal of Pathology*. 1996, Vol. 149, 1, p. 153-161.
66. Barilà G, Bonaldi L, Grassi A, et al. Identification of the true hyperdiploid multiple myeloma subset by combining conventional karyotyping and FISH analysis. *Blood cancer journal*. 2020, Vol. 10, 2, p. 18.

67. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, et al. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best practice & research. Clinical hematology*. 2007, Vol. 20, 4, p. 571-596.
68. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood cancer journal*. 2015, 5.
69. Hoyer JD, Hanson CA, Fonseca R, Greipp PR, Dewald GW, Kurtin PJ. The (11;14)(q13;q32) translocation in multiple myeloma. A morphologic and immunohistochemical study. *American Journal of Clinical Pathology*. 2000, Vol. 113, 6, p. 831-837.
70. Avet-Loiseau H, Hulin C, Campion L et al. Chromosomal abnormalities are major prognostic factors in elderly patients with multiple myeloma: the intergroupe francophone du myélome experience. *Journal of Clinical Oncology*. 2013, Vol. 31, 22, p. 2806-2809.
71. Cavo M, Terragna C, Renzulli M, et al. Poor outcome with front-line autologous transplantation in t(4;14) multiple myeloma: low complete remission rate and short duration of remission. *Journal of Clinical Oncology*. 2006, Vol. 24, 3.
72. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009, Vol. 23, 12, p. 2210-2221.
73. Perrot A, Lauwers-Cances V, Tournay E et al. Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2019, Vol. 37, 19, p. 1657-1665.
74. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016, Vol. 127, 24, p. 2955-2962.
75. Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008, Vol. 22, 12, p. 2280-2284.
76. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer cell*. 2007, Vol. 12, 2, p. 131-144.
77. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007, Vol. 109, 6, p. 2276-2284.
78. Egan JB, Shi CX, Tembe W, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. 2012, Vol. 120, 5, p. 1060-1066.
79. Laubach JP, Richardson PG, Anderson KC. The evolution and impact of therapy in multiple myeloma. *Medical Oncology*. 2010, p. S1-S6.
80. Alexanian R, Haut A, Khan AU, et al. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Journal of American Medical Association*. 1969, Vol. 208, 9, p. 1680-1685.
81. Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Oncol* 16, 3832-3842 (1998).
82. Samson D, et al. Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma. *Lancet (London, England)*. 1989;2(8668):882-885.
83. Cavo M., et al. Melphalan-prednisone versus alternating combination VAD/MP or VND/MP as primary therapy for multiple myeloma: final analysis of a randomized clinical study. *Haematologica*. 2002;87(9):934-942.
84. Attal M, Harousseau JL. Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 1997, Vol. 11, 1, p. 133-147.
85. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. Medical Research Council Adult Leukaemia Working. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2003, Vol. 348, 19, p. 1875-1883.
86. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994, Vol. 91, 9, p. 4082-4085.

87. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *The journal of experimental medicine*. 1993, Vol. 177, 6, p. 1675-1680.
88. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *The journal of experimental medicine*. 1998, Vol. 187, 11, p. 1885-1892. Haslett PA, Corral LG, Albert M, et al.
89. Mercurio A, Adriani G, Catalano A, et al. A Mini-Review on Thalidomide: Chemistry, Mechanisms of Action, Therapeutic Potential and Anti-Angiogenic Properties in Multiple Myeloma. *Current Medicinal Chemistry*. 2017, Vol. 24, 25, p. 2736-2744.
90. Plasmati R, Pastorelli F, Cavo M, et al. Neuropathy in multiple myeloma treated with thalidomide: a prospective study. *Neurology*. 2007, Vol. 69, 6, p. 573-581.
91. Consensus guidelines for the optimal management of adverse events in newly diagnosed, transplant-ineligible patients receiving melphalan and prednisone in combination with thalidomide (MPT) for the treatment of multiple myeloma. Palumbo A, Davies F, Kropff M, et al. *s.l. : Annals of hematology*. , 2010, Vol. 89, 8, p. 803-811.
92. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010, Vol. 24, 1, p. 22-32.
93. González Rodríguez AP. Management of the adverse effects of lenalidomide in multiple myeloma. *Advances in therapy*. 2011, p. 1-10.
94. Chen N, Zhou S, Palmisano M. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lenalidomide. *Clinical pharmacokinetics*. 2017, Vol. 56, 2, p. 139-152.
95. Li Y, Xu Y, Liu L, et al. Population pharmacokinetics of pomalidomide. *Journal of clinical pharmacology*. 2015, Vol. 55, 5, p. 563-572.
96. Dimopoulos MA, Palumbo A, Corradini P et al. Safety and efficacy of pomalidomide plus low-dose dexamethasone in STRATUS (MM-010): a phase 3b study in refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016, Vol. 128, 4, p. 497-503.
97. Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*. 2009, Vol. 85, 1, p. 12-36.
98. Moreau P, Richardson PG, Cavo M, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*. 2012, Vol. 120, 5, p. 947-959.
99. Meister S, Schubert U, Neubert K, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer research*. 2007, Vol. 67, 4, p. 1783-1792.
100. Moreau P, Pylypenko H, Grosicki S, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *The Lancet Oncology*. 2011, Vol. 12, 5, p. 431-440.
101. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The journal of biological chemistry*. 2002, Vol. 277, 19, p. 16639-16647.
102. Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000, Vol. 275, 28, p. 21648-21652.
103. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*. 2003, Vol. 101, 6, p. 2377-2380.
104. Mohty M, Malard F, Mohty B, et al. The effects of bortezomib on bone disease in patients with multiple myeloma. *Cancer*. 2014, Vol. 120, 5, p. 618-623.
105. Zhu W, Chen W. Bortezomib-based treatment for multiple myeloma patients with renal impairment: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Medicine*. 2016, Vol. 95, 46.

106. Field-Smith A, Morgan GJ, Davies FE. Bortezomib (Velcade™) in the Treatment of Multiple Myeloma. *Therapeutics and clinical risk management*. 2006, Vol. 2, 3, p. 271-279.
107. Muchtar E, Gertz MA, Magen H. A practical review on carfilzomib in multiple myeloma. *European Journal of Haematology*. 2016, Vol. 96, 6, p. 564-577.
108. Harvey RD. Incidence and management of adverse events in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma receiving single-agent carfilzomib. *Clinical pharmacology*. 2014, Vol. 8, 6, p. 87-96.
109. Bringhen S, Milan A, D'Agostino M et al. Prevention, monitoring and treatment of cardiovascular adverse events in myeloma patients receiving carfilzomib A consensus paper by the European Myeloma Network and the Italian Society of Arterial Hypertension. *Journal of internal medicine*. 2019, Vol. 286, 1, p. 63-74.
110. Kumar S, Moreau P, Hari P, et al. Management of adverse events associated with ixazomib plus lenalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2017, Vol. 178, 4, p. 571-582.
111. van de Donk NW, Moreau P, Plesner T, et al. Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma. *Blood*. 2016, Vol. 127, 6, p. 681-695.
112. Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, et al. Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical cancer research*. 2015, Vol. 21, 21, p. 4767-4773.
113. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 9. s.l. : Elsevier, 2017.
114. COMU. *Manuale di Oncologia Medica*. 1. s.l. : Edizioni Minerva Medica, 2018.
115. Jelinek T, Paiva B, Hajek R. Update on PD-1/PD-L1 Inhibitors in Multiple Myeloma. *Frontiers in immunology*. 2018.
116. Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood*. 2017, Vol. 130, 22, p. 2401-2409.
117. Vaxman I, Sidiqi MH1, Gertz M. Venetoclax for the treatment of multiple myeloma. *Expert review of hematology*. 2018, Vol. 11, 12, p. 915-920.
118. Chen C, Siegel D, Gutierrez M, et al. Safety and efficacy of selinexor in relapsed or refractory multiple myeloma and Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2018, Vol. 131, 8, p. 855-863.
119. Barlogie B, Hall R, Zander A, et al. High-dose melphalan with autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma. *Blood*. 1986;67(5):1298-1301.
120. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe Francais du Myelome*. *N Engl J Med*, 1996. 335(2): p. 91-7.
121. Ferman J, Ravaut P, Chevret S, et al. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 1998. 92(9): p.3131-3136.
122. Barlogie B, et al, Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol*, 2006. 24(6): p. 929-36.
123. Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, et al. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 1999;93(1):55-65.
124. Blade J, et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood*. 2005, Vol. 106(12): p. 3755-9.
125. Palumbo A, et al, Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial. *Blood*, 2004. 104(10): p. 3052-7.

126. Attal M, et al, *Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. N Engl J Med, 2003. 349(26): p. 2495-502.*
127. Cavo M, et al, *Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. J Clin Oncol, 2007. 25(17): p. 2434-41.*
128. Naumann-Winter F, Greb A, Borchmann P, et al. *First-line tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation versus single high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in multiple myeloma, a systematic review of controlled studies. The Cochrane database of systematic reviews. 2012.*
129. Femand J, et al,. *Single versus tandem high dose therapy (HDT) supported with autologous blood stem cell (ABSC) transplantation using unselected or CD34-enriched ABSC: Results of a two by two designed randomized trial in 230 young patients with multiple myeloma (MM). Haematologica, 2003. 2003.*
130. Goldschmidt H., *Single vs double high-dose therapy in multiple myeloma: second analysis of the GMMG-HD2 trial. Haematologica, 2005.*
131. Sonneveld P, et al, *Intermediate-dose melphalan compared with myeloablative treatment in multiple myeloma: long-term follow-up of the Dutch Cooperative Group HOVON 24 trial. Haematologica, 2007. 92(7): p. 928-35.*
132. Palumbo A, Cavallo F, Gay F et al. *Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. The New England Journal of Medicine. 2014, Vol. 371, 10, p. 895-905.*
133. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C et al. *Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. The New England Journal of Medicine. 2017, Vol. 376, 14, p. 1311-1320.*
134. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al. *Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3. Lancet. 2010, Vol. 376, 9758, p. 2075-2085.*
135. Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI et al. *Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. Blood. 2012, Vol. 120, 8, p. 1589-1596.*
136. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B et al. *Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. Journal of Clinical Oncology. 2012, Vol. 30, 24, p. 2946-2955.*
137. Cavo M, Goldschmidt H, Rosinol L et al. *Double Vs Single Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Long-Term Follow-up (10-Years) Analysis of Randomized Phase 3 Studies. Blood. 2018, Vol. 132, Suppl1, p. 124.*
138. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B et al. *Autologous Transplantation, Consolidation, and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma: Results of the BMT CTN 0702 Trial. Journal of clinical oncology. 2019, Vol. 37, 7, p. 589-597.*
139. Cavo M, Zamagni E, Tosi P, et al. *Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma. Blood. 2005, Vol. 106, 1, p. 35-39.*
140. Lokhorst HM, van der Holt B, Zweegman S et al. *A randomized phase 3 study on the effect of thalidomide combined with adriamycin, dexamethasone, and high-dose melphalan, followed by thalidomide maintenance in patients with multiple myeloma. s.l. : Blood, 2010, Vol. 115, 6, p. 1113-1120.*
141. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, et al. *Cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone as induction therapy for newly diagnosed multiple myeloma patients destined for autologous stem-cell transplantation: MRC Myeloma IX randomized trial results. s.l. : Haematologica, 2012, Vol. 97, 3, p. 442-450.*

142. Harousseau JL, et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol*, 2010;28:4621-4629.
143. Sonneveld P, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON65/GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*, 2012; 30(24):2946-2955.
144. Popat R, et al. Bortezomib, Doxorubicin and Dexamethasone (PAD) front-line treatment of multiple myeloma: updated results after long term follow-up. *Br J Haematol*, 2008; 141(4):512-516.
145. Reeder CB, et al. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia*. 2009, Vol. 23, 1337-1341 .
146. Jakubowiak AJ, et al. Phase II trial of combination therapy with Bortezomib, pegylated liposomal doxorubicin, and dexamethasone in patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol*,2009; 27(30):5015-5022.
147. Tacchetti P, Dozza L, Di Raimondo F, et al. Bortezomib-Thalidomide-Dexamethasone Versus Thalidomide-Dexamethasone before and after Double Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed MM: Final Analysis of Phase 3 Gimema-MMY-3006 Study and Prognostic Score for Survival Outcomes. *Blood*. 2018, Vol. 132, S1.
148. Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. 8, s.l. : American Society of Hematology, 2012, Vol. 120, p. 1589-1596.
149. Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, et al. VTD (Bortezomib/Thalidomide/Dexamethasone) As Pretransplant Induction Therapy for Multiple Myeloma: Definitive Results of a Randomized Phase 3 Pethema/GEM Study. Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI et al. *Suppl1, s.l. : American Society of Hematology*, 2018, Vol. 132.
150. Pineda-Roman M, Zangari M, Haessler J, et al. Sustained complete remissions in multiple myeloma linked to bortezomib in total therapy 3: comparison with total therapy 2. *British Journal of Haematology*. 2008, Vol. 140, 6, p. 625-634.
151. Cavo M, Pantani L, Pezzi A, et al. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD) is superior to bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone (VCD) as induction therapy prior to autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015, Vol. 29, 12, p. 2429-2431.
152. Moreau P, Hulin C, Macro M et al. VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood*. 2016, Vol. 127, 21, p. 2569-2574.
153. Sonneveld P, Goldschmidt H, Rosiñol L, et al. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *Journal of Clinical Oncology*. 2013, Vol. 31, 26, p. 3279-3287.
154. Richardson PG, Weller E, Lonial S et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2010, Vol. 116, 5, p. 679-686.
155. Roussel M, Lauwers-Cances V, Robillard N, et al. Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the IFM). *Journal of Clinical Oncology*. 2014, Vol. 32, 25, p. 2712-2717.
156. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2017, Vol. 376, 14, p. 1311-1320.
157. Rosiñol L, Oriol A, Rios R et al. Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone as induction therapy prior to autologous transplant in multiple myeloma. *Blood*. 2019, Vol. 134, 16, p. 1337-1345.
158. Kumar SK, Flinn I, Noga SJ, et. Bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide and lenalidomide combination for newly diagnosed multiple myeloma: phase 1 results from the multicenter EVOLUTION study. *Leukemia*. 2010, Vol. 24, 7, p. 1350-1356.

159. Rosiñol L, Hebraud B, Oriol A et al. *Integrated Analysis of Randomized Controlled Trials Evaluating Bortezomib + Lenalidomide + Dexamethasone or Bortezomib + Thalidomide + Dexamethasone Induction in Transplant-Eligible Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. *Blood*. 2018, Vol. 132, Suppl1, p. 3245.
160. Sonneveld P, Asselbergs E, Zweegman S, et al. *Phase 2 study of carfilzomib, thalidomide, and dexamethasone as induction/consolidation therapy for newly diagnosed multiple myeloma*. *Blood*. 2015, Vol. 125, 3, p. 449-456.
161. Jakubowiak AJ, Dytfeld D, Griffith KA, et al. *A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma*. *Blood*. 2012, Vol. 120, 9, p. 1801-1809.
162. Mikhael JR, Reeder CB, Libby EN, et al. *Phase Ib/II trial of CYKLONE (cyclophosphamide, carfilzomib, thalidomide and dexamethasone) for newly diagnosed myeloma*. Mikhael JR1, Reeder CB, Libby EN, Costa LJ, Bergsagel PL, Buadi F, Mayo A, Nagi Reddy SK, Gano K, Dueck AC, Stewart AK. 2015, Vol. 169, 2, p. 219-227.
163. Wester R, van der Holt B, Asselbergs E, et al. *Phase II study of carfilzomib, thalidomide, and low-dose dexamethasone as induction and consolidation in newly diagnosed, transplant eligible patients with multiple myeloma; the Carthadex trial*. *Haematologica*. 2019, Vol. 114, 11, p. 2265-2273.
164. Gay F, Cerrato C, Maria Teresa Petrucci MT, et al. *Efficacy of carfilzomib lenalidomide dexamethasone (KRd) with or without transplantation in newly diagnosed myeloma according to risk status: Results from the FORTE trial*. *Journal of Clinical Oncology*. 2019, Vol. 37, 15, p. 8002.
165. Moreau P, Attal M, Hulin C et al. *Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study*. *Lancet*. 2019, Vol. 394, p. 29-38.
166. Voorhees PM, Kaufman JL, Laubach JP et al. *Daratumumab, lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone for transplant-eligible newly diagnosed multiple myeloma: the GRIFFIN trial*. *Blood*. 2020, Vol. 136(8): 936–945., p. 691.
167. Sonneveld P, Broijl A, Gay F, et al. *Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone (VRd) ± daratumumab (DARA) in patients (pts) with transplant-eligible (TE) newly diagnosed multiple myeloma (NDMM): A multicenter, randomized, phase III study (PERSEUS)*. *Journal of Clinical Oncology*. 2019, Vol. 37, 15.
168. Giralt S, Stadtmauer EA, Harousseau JL et al. *International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100)*. *Leukemia*. 2009, Vol. 23, 10, p. 1904-1912.
169. DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, et al. *Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma*. *Blood*. 2009, Vol. 113:5720–6.
170. Moreau P, Facon T, Attal M, et al. *Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the IFM9502*. *Blood*. 2002, Vol. 99, 731-735.
171. Bashir Q, Thall PF, Milton DR, et al. *plus melphalan versus melphalan alone before autologous haemopoietic cell transplantation for multiple myeloma: an open-label, randomised, phase 3 trial*. *Lancet Haematol* 2019. 2019, Vol. 6:e266–75.
172. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. *Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines*. *Annals of Oncology*. 2017, 28.
173. Mellqvist UH, Gimsing P, Hjertner O et al. *Bortezomib consolidation after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a Nordic Myeloma Study Group randomized phase 3 trial*. *Blood*. 2013, Vol. 121, 23, p. 4647-4654.
174. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, et al. *Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma*. *Journal of Clinical Oncology*. 2010, Vol. 28, 12, p. 2077-2084.

175. Leleu X, Fouquet G, Hebraud B, et al. Consolidation with VTd significantly improves the complete remission rate and time to progression following VTd induction and single autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia*. 2013, Vol. 27, 11, p. 2242-2244.
176. Cavo M, Pantani L, Petrucci MT et al. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone is superior to thalidomide-dexamethasone as consolidation therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2012, Vol. 120, 1, p. 9-19.
177. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B et al. Autologous Transplantation, Consolidation, and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma: Results of the BMT CTN 0702 Trial. *Journal of clinical oncology*. 2019, Vol. 37, 7, p. 589-597.
178. Gavriatopoulou M, Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, et al. Consolidation with carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone (KRd) following ASCT results in high rates of minimal residual disease negativity and improves bone metabolism, in the absence of bisphosphonates, among newly diagnosed patients with MM. *Blood Cancer Journal*. 2020, Vol. 10, 25.
179. Vij R, Nathwani N, Martin TG, et al. Ixazomib-Lenalidomide-Dexamethasone (IRd) Consolidation Following Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Large Multi-Center Phase II Trial. *Blood*. 2018, Vol. 132, Suppl1, p. 123.
180. Ludwig H, Durie BG, McCarthy P et al. IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood*. 2012, Vol. 119, 13, p. 3003-3015.
181. Lipe B, Vukas R, Mikhael J. The role of maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*. 2016, Vol. 6, 10, p. 485.
182. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, Doyen C, Hulin C, Benboubker L, Yakoub Agha I, Bourhis JH, Garderet L, Pegourie B, Dumontet C, Renaud M, Voillat L, Berthou C, Marit G, Monconduit M, Caillot D, Grobois B, Avet-Loiseau H, Moreau P, Facon T e IFM. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006, Vol. 108, 10, p. 3289-3294.
183. Spencer A, Prince HM, Roberts AW, et al. Consolidation therapy with low-dose thalidomide and prednisolone prolongs the survival of multiple myeloma patients undergoing a single autologous stem-cell transplantation procedure. *Journal of Clinical Oncology*. 2009, Vol. 27, 11, p. 1788-1793.
184. Lokhorst HM, van der Holt B, Zweegman S et al. A randomized phase 3 study on the effect of thalidomide combined with adriamycin, dexamethasone, and high-dose melphalan, followed by thalidomide maintenance in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2010, Vol. 115, 6, p. 1113-1120.
185. Morgan GJ, Gregory WM, Davies FE, et al. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC Myeloma IX results and meta-analysis. *Blood*. 2012, Vol. 119, 1, p. 7-15.
186. Kagoya Y, Nannya Y, Kurokawa M. Thalidomide maintenance therapy for patients with multiple myeloma: meta-analysis. *Leukemia research*. 2012, Vol. 36, 8, p. 1016-1021.
187. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2012, Vol. 366, 19, p. 1782-1791.
188. Palumbo A, Cavallo F, Gay F et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2014, Vol. 371, 10, p. 895-905.
189. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2012, Vol. 366, 19, p. 1770-1781.
190. McCarthy PL, Holstein SA, Petrucci MT, et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2017, Vol. 35, 29, p. 3279-3289.

191. Jackson GH, Davies FE, Pawlyn C, et al. Lenalidomide maintenance versus observation for patients with newly diagnosed multiple myeloma (Myeloma XI): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2019, Vol. 20, 1, p. 57-73.
192. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2012, Vol. 30, 24, p. 2946-2955.
193. Goldschmidt H, Lokhorst HM, Mai EK et al. Bortezomib before and after high-dose therapy in myeloma: long-term results from the phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Leukemia*. 2018, Vol. 32, 2, p. 383-390.
194. Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI et al. Bortezomib and thalidomide maintenance after stem cell transplantation for multiple myeloma: a PETHEMA/GEM trial. *Leukemia*. 2017, Vol. 31, 9, p. 1922-1927.
195. Dimopoulos MA, Gay F, Schjesvold F et al. Oral ixazomib maintenance following autologous stem cell transplantation (TOURMALINE-MM3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019, 393, p. 253-264.
196. Sengsayadeth S, Malard F, Savani BN, et al. Posttransplant maintenance therapy in multiple myeloma: the changing landscape. *Blood Cancer Journal*. 2017, Vol. 7, 3, p. e545.
197. Gay F, Jackson G, Rosiñol L et al. Maintenance Treatment and Survival in Patients With Myeloma: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *JAMA Oncology*. 2018, Vol. 4, 10, p. 1389-1397.
198. Palumbo A, Bringhen S, Mateos MV et al. Geriatric assessment predicts survival and toxicities in elderly myeloma patients: an International Myeloma Working Group report. *Blood*. 2015, Vol. 125, 13, p. 2068-2074.
199. Fayers PM, Palumbo A, Hulin C, et al. Thalidomide for previously untreated elderly patients with multiple myeloma: meta-analysis of 1685 individual patient data from 6 randomized clinical trials. *Blood*. 2011, Vol. 118, 5, p. 1239-1247.
200. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2014, Vol. 371, 10, p. 906-917.
201. Facon T, Dimopoulos MA, Dispenzieri A et al. Final analysis of survival outcomes in the phase 3 FIRST trial of up-front treatment for multiple myeloma. *Blood*. 2018, Vol. 131, 3, p. 301-310.
202. Magarotto V, Bringhen S, Offidani M et al. Triplet vs doublet lenalidomide-containing regimens for the treatment of elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2016, Vol. 127, 9, p. 1102-1108.
203. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2008, Vol. 359, 9, p. 906-917.
204. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2013, Vol. 31, 4, p. 448-455.
205. Bringhen S, Larocca A, Rossi D et al. Efficacy and safety of once-weekly bortezomib in multiple myeloma patients. *Blood*. 2010, Vol. 116, 23, p. 4745-4753.
206. Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017, Vol. 389, p. 519-527.
207. Durie BMG, Hoering A, Sexton R, et al. Longer Term Follow up of the Randomized Phase III Trial SWOG S0777: Bortezomib, Lenalidomide and Dexamethasone Vs. Lenalidomide and Dexamethasone in Patients (Pts) with Previously Untreated Multiple Myeloma without an Intent for Immediate ASCT. *Blood*. 2018, Vol. 132, Suppl1, p. 1992.
208. Yokoyama A, Kada A, Saito AM, et al. Phase II Study of Treatment for Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients Over 75 Years Old with Alternating Bortezomib/dexamethasone and Lenalidomide/dexamethasone: the MARBLE Trial. *Acta medica Okayama*. 2019, Vol. 73, 6, p. 547-552.

209. O'Donnell EK, Laubach JP, Yee AJ, et al. A phase 2 study of modified lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in transplant-ineligible multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2018, Vol. 182, 2, p. 222-230.
210. Isa R, Uoshima N, Takahashi R et al. Sequential therapy of four cycles of bortezomib, melphalan, and prednisolone followed by continuous lenalidomide and dexamethasone for transplant-ineligible newly diagnosed multiple myeloma. *Annals of hematology*. 2020, Vol. 99, 1, p. 137-145.
211. Brinchen S, Petrucci MT, Larocca A, et al. Carfilzomib, cyclophosphamide, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a multicenter, phase 2 study. *Blood*. 2014, Vol. 124, 1, p. 63-69.
212. Jakubowiak AJ, Dytfeld D, Griffith KA, et al. A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma. *Blood*. 2012, Vol. 120, 9, p. 1801-1809.
213. Zweegman S, Stege CAM, Haukas E et al. Safety and tolerability of ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with previously untreated multiple myeloma: an open-label phase 1/2 study. *Haematologica*. 2020.
214. Kumar SK, Berdeja JG, Niesvizky R, Lonial S, Laubach JP, Hamadani M, Stewart AK, Hari P, Roy V, Vescio R, Kaufman JL, Berg D, Liao E, Di Bacco A, Estevam J, Gupta N, Hui AM, Rajkumar V, Richardson PG. Safety and tolerability of ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with previously untreated multiple myeloma: an open-label phase 1/2 study. *The Lancet Oncology*. 2014, Vol. 15, 3, p. 1503-1512.
215. Facon T, Kumar S, Plesner T et al. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2019, Vol. 380, 22, p. 2104-2115.
216. Mateos MV, Dimopoulos MA, Cavo M et al. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2018, Vol. 378, 6, p. 518-528.
217. Mateos MV, Cavo M, Blade J et al. Overall survival with daratumumab, bortezomib, melphalan, and prednisone in newly diagnosed multiple myeloma (ALCYONE): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2020, Vol. 395, 10218, p. 132-141.
218. Ocio EM, Rodriguez Otero P, Brinchen S, et al. Preliminary Results from a Phase I Study of Isatuximab (ISA) in Combination with Bortezomib, Lenalidomide, Dexamethasone (VRd), and in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma (NDMM) Non-Eligible for Transplant. *Blood*. 2018, Vol. 132, Suppl1, p. 595.
219. Orlowski RZ, Goldschmidt H, Cavo M, et al. Phase III (IMROZ) study design: Isatuximab plus bortezomib (V), lenalidomide (R), and dexamethasone (d) vs VRd in transplant-ineligible patients (pts) with newly diagnosed multiple myeloma (NDMM). *Journal of Clinical Oncology*. 2018, Vol. 36, Suppl15.
220. Kubo K, Hori M, Ohta K, et al. Elotuzumab plus lenalidomide and dexamethasone for newly diagnosed multiple myeloma: a randomized, open-label, phase 2 study in Japan. *International Journal of Hematology*. 2020, Vol. 111, 1, p. 65-74.
221. Bristol Myers Squibb Company. Bristol Myers Squibb Reports Primary Results of ELOQUENT-1 Study Evaluating Emlipicit (elotuzumab) Plus Revlimid (lenalidomide) and Dexamethasone in Patients with Newly Diagnosed, Untreated Multiple Myeloma. Phase 3 trial did not meet primary endpoint of progression-free survival in patients not eligible for transplant. [Online] 2020. <https://news.bms.com/press-release/corporatefinancial-news/bristol-myers-squibb-reports-primary-results-eloquent-1-study->
222. Laubach J, Garderet L, Mahindra A et al. Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia*. 2016, Vol. 30, 5, p. 1005-1017.
223. Chim CS, Kumar SK, Orlowski RZ, et al. Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. *Leukemia*. 2018, Vol. 32, 2, p. 252-262.
224. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2003, Vol. 348, 26, p. 2609-2617.

225. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. Extended follow-up of a phase II trial in relapsed, refractory multiple myeloma: final time-to-event results from the SUMMIT trial. *Cancer*. 2006, Vol. 106, 6, p. 1316-1319.
226. Jagannath S, Barlogie B, Berenson JR, et al. Updated survival analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2008, Vol. 143, 4, p. 537-540.
227. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2005, Vol. 352, 24, p. 2487-2498.
228. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood*. 2007, Vol. 110, 10, p. 3557-3560.
229. Orlowski RZ, Nagler A, Sonneveld P, et al. Final overall survival results of a randomized trial comparing bortezomib plus pegylated liposomal doxorubicin with bortezomib alone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer*. 2016, Vol. 122, 13, p. 2050-2056.
230. Palumbo A, Gay F, Brinchen S, et al. Bortezomib, doxorubicin and dexamethasone in advanced multiple myeloma. *Annals of Oncology*. 2008, Vol. 19, 6, p. 1160-1165.
231. Offidani M, Corvatta L, Maracci L et al. Efficacy and tolerability of bendamustine, bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed-refractory multiple myeloma: a phase II study. *Blood Cancer Journal*. 2013, Vol. 3, p. e162.
232. Rodon P, Hulin C, Pegourie B et al. Bendamustine, Bortezomib and Dexamethasone (BVD) in Elderly Patients with Multiple Myeloma in First Relapse: Updated Results of the Intergroupe Francophone Du Myelome (IFM) 2009-01 Trial. *Blood*. 2012, Vol. 120, 21, p. 4044.
233. Ludwig H, Kasparu H, Leitgeb C, et al. Bendamustine-bortezomib-dexamethasone is an active and well-tolerated regimen in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2014, Vol. 123, 7, p. 985-991.
234. Garderet L, Iacobelli S, Moreau P et al. Superiority of the triple combination of bortezomib-thalidomide-dexamethasone over the dual combination of thalidomide-dexamethasone in patients with multiple myeloma progressing or relapsing after autologous transplantation: the MMVAR/IFM 2005-04 [...]. *Journal of Clinical Oncology*. 2012, Vol. 30, 20, p. 2475-2482.
235. Weber DM, Chen C, Niesvizky R, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *The New England Journal of Medicine*. 2007, Vol. 357, 21, p. 2133-2142.
236. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2007, Vol. 357, 21, p. 2123-2132.
237. Dimopoulos MA, Chen C, Spencer A, et al. Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Leukemia*. 2009, Vol. 23, 11, p. 2147-2152.
238. Morgan GJ, Schey SA, Wu P, et al. Lenalidomide (Revlimid), in combination with cyclophosphamide and dexamethasone (RCD), is an effective and tolerated regimen for myeloma patients. *British Journal of Haematology*. 2007, Vol. 137, 3, p. 268-269.
239. Palumbo A, Larocca A, Falco P, et al. Lenalidomide, melphalan, prednisone and thalidomide (RMPT) for relapsed/refractory multiple myeloma. *Leukemia*. 2010, Vol. 24, 5, p. 1037-1042.
240. Lentzsch S, O'Sullivan A, Kennedy RC, et al. Combination of bendamustine, lenalidomide, and dexamethasone (BLD) in patients with relapsed or refractory multiple myeloma is feasible and highly effective: results of phase 1/2 open-label, dose escalation study. *Blood*. 2012, Vol. 119, 20, p. 4608-4613.
241. Richardson PG, Weller E, Jagannath S, et al. Multicenter, phase I, dose-escalation trial of lenalidomide plus bortezomib for relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2009, Vol. 27, 34, p. 5713-5719.

242. Richardson PG, Xie W, Jagannath S et al. A phase 2 trial of lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone in patients with relapsed and relapsed/refractory myeloma. *Blood*. 2014, Vol. 123, 10, p. 1461-1469.
243. Richardson PG, Siegel DS, Vij R, et al. Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. *Blood*. 2014, Vol. 123, 12, p. 1826-1832.
244. Miguel JS, Weisel K, Moreau P et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013, Vol. 14, 11, p. 1055-1066.
245. Dimopoulos MA, Palumbo A, Corradini P, et al. Safety and efficacy of pomalidomide plus low-dose dexamethasone in STRATUS (MM-010): a phase 3b study in refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016, Vol. 128, 4, p. 497-503.
246. Leleu X, Karlin L, Macro M et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone in multiple myeloma with deletion 17p and/or translocation (4;14): IFM 2010-02 trial results. *Blood*. 2015, Vol. 15, 9, p. 1411-1417.
247. Weisel KC, Scheid C, Zago M, et al. Addition of cyclophosphamide on insufficient response to pomalidomide and dexamethasone: results of the phase II PERSPECTIVE Multiple Myeloma trial. *Blood Cancer Journal*. 2019, Vol. 9, 4, p. 45.
248. Richardson PG, Oriol A, Beksac M et al. Pomalidomide, bortezomib, and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma previously treated with lenalidomide (OPTIMISMM): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2019, Vol. 20, 6, p. 781-794.
249. Mushtaq A, Iftikhar A, Hassan H, et al. Pomalidomide-Based Regimens for Treatment of Relapsed and Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Systematic Review and Meta-analysis of Phase 2 and 3 Clinical Trials. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2019, Vol. 19, 7, p. 447-461.
250. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *The Lancet Oncology*. 2016, Vol. 17, 1, p. 27-38.
251. Dimopoulos MA, Goldschmidt H, Niesvizky R, et al. Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2017, Vol. 18, 10, p. 1327-1337.
252. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2015, Vol. 372, 2, p. 142-152.
253. Siegel DS, Dimopoulos MA, Ludwig H, et al. Improvement in Overall Survival With Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2018, Vol. 36, 8, p. 728-734.
254. Moreau P, Masszi T, Grzasko N et al. Oral ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2016, Vol. 374, 17, p. 1621-1634.
255. Krishnan A, Kapoor P, Palmer JM, et al. Phase I/II trial of the oral regimen ixazomib, pomalidomide, and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leukemia*. 2018, Vol. 32, 7, p. 1567-1574.
256. Dhakal B, D'Souza A, Hamadani M, et al. Phase I/II trial of bendamustine, ixazomib, and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*. 2019, Vol. 9, 8, p. 56.
257. Chari A, Richardson PG, Romanus D, et al. Real-world outcomes and factors impacting treatment choice in relapsed and/or refractory multiple myeloma (RRMM): a comparison of VRd, KRd, and IRd. *Expert Review of Hematology*. 2020, p. 1-13.
258. Usmani SZ, Weiss BM, Plesner T, et al. Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016, Vol. 128, 1, p. 37-44.
259. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2016, Vol. 375, 14, p. 1319-1331.

260. Kaufman JL, Usmani SZ, San-Miguel JS, et al. Four-Year Follow-up of the Phase 3 Pollux Study of Daratumumab Plus Lenalidomide and Dexamethasone (D-Rd) Versus Lenalidomide and Dexamethasone (Rd) Alone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (RRMM). *Blood*. 2019, Vol. 134, Suppl1, p. 1866.
261. Bahlis NJ, Dimopoulos MA, White DJ, et al. Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: extended follow-up of POLLUX, a randomized, open-label, phase 3 study. *Leukemia*. 2020.
262. Sonneveld P, Terpos E, Dimopoulos MA, et al. Pomalidomide and dexamethasone (pom-dex) with or without daratumumab (DARA) in patients (pts) with relapsed or refractory multiple myeloma (RRMM): A multicenter, randomized, phase 3 study (APOLLO). *Journal of Clinical Oncology*. 2018, Vol. 36, 15.
263. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2016, Vol. 375, 8, p. 754-766.
264. Spencer A, Lentzsch S, Weisel K et al. Daratumumab plus bortezomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: updated analysis of CASTOR. *Haematologica*. 2018, Vol. 103, 12, p. 2079-2087.
265. Usmani SZ, Quach H, Mateos MV, et al. Carfilzomib, Dexamethasone, and Daratumumab Versus Carfilzomib and Dexamethasone for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (RRMM): Primary Analysis Results from the Randomized, Open-Label, Phase 3 Study Candor. *Blood*. 2019, Vol. 134, Suppl2.
266. Martin T, Strickland S, Glenn M, et al. Phase I trial of isatuximab monotherapy in the treatment of refractory multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*. 2019, Vol. 9, 4, p. 41.
267. Martin T, Baz R, Benson DM, et al. A phase 1b study of isatuximab plus lenalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017, Vol. 129, 25, p. 3294-3303.
268. Mikhael J, Richardson P, Usmani SZ, et al. A phase 1b study of isatuximab plus pomalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*. 2019, Vol. 134, 2, p. 123-133.
269. Richardson PG, Attal M, Campana F, et al. Isatuximab plus pomalidomide/dexamethasone versus pomalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: ICARIA Phase III study design. *Future Oncology*. 2018, Vol. 14, 11, p. 1035-1047.
270. Moreau P, Dimopoulos MA, Yong K, et al. Isatuximab plus carfilzomib/dexamethasone versus carfilzomib/dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: IKEMA Phase III study design. *Future Oncology*. 2020, Vol. 16, 2, p. 4347-4358.
271. Zonder JA, Mohrbacher AF, Singhal S, et al. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood*. 2012, Vol. 120, 3, p. 552-559.
272. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2015, Vol. 373, 7, p. 621-631.
273. Lonial S, Dimopoulos MA, Weisel KC et al. Phase 3 ELOQUENT-2 study: Extended four year follow-up (FU) of elotuzumab plus lenalidomide/dexamethasone (ELd) vs Ld in relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM). *Journal of Clinical Oncology*. 2017, Vol. 35, 15, p. 8028.
274. Dimopoulos MA, Dytfeld D, Grosicki S, et al. Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2018, Vol. 379, 19, p. 1811-1822.
275. Kumar S, Paiva B, Anderson KC et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. 2016, Vol. 17, 8, p. 328-346.
276. Cavo M, Palumbo A, Zweegman S, et al. Upfront autologous stem cell transplantation (ASCT) versus novel agent-based therapy for multiple myeloma (MM): a randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM trial). *Proc Am Soc Clin Oncol*; . 2016, 34: 8000 (abstr).

277. Sonneveld P, Beksac M, van der Holt B, et al. Consolidation followed by maintenance therapy versus maintenance alone in newly diagnosed, transplant eligible patients with multiple myeloma (MM): a randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95MM Trial). *Blood* 2016. 2016, Vol. 128 (suppl 11): 242 (abstr).
278. Cavo M, Hájek R, Pantani L, et al. Autologous stem cell transplantation versus bortezomib-melphalan-prednisone for newly diagnosed multiple myeloma: second interim analysis of the phase 3 EMN02/HO95 study. *Blood*. 2017, Vol. 130 (suppl 1): 397 (abstr).
279. Sonneveld P, Beksac M, van derHolt B, et al. Consolidation followed by maintenance vs maintenance alone in newly diagnosed, transplant eligible multiple myeloma: a randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM TRIAL). *HemaSphere*. 23rd Congress of the European Hematology Association. 2 (suppl 1): 5 (abstr), 2018.
280. Perrot A, Lauwers-Cances V, Cazaubiel T, et al. Early Versus Late Autologous Stem Cell Transplant in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Long-Term Follow-up Analysis of the IFM 2009 Trial. 62nd ASH annual meeting, 2020; Oral Abstract 143, session 731.
281. Cavo M, Goldschmidt H, Rosinol L et al. Double Vs Single Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Long-Term Follow-up (10-Years) Analysis of Randomized Phase 3 Studies. *Blood*. 2018, Vol. 132, Suppl1, p. 124.