

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA

Ciclo 35

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

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 – Malattie del sangue

IDENTIFICAZIONE DI NUOVE STRATEGIE PER LA
VALUTAZIONE DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA NEL
MIELOMA MULTIPLO: LA BIOPSIA LIQUIDA

Presentata da: Ilaria Rizzello

Coordinatore Dottorato

Manuela Ferracin

Supervisore

Michele Cavo

Esame finale anno 2023

Sommario

1. IL MIELOMA MULTIPLO.....	4
1.1. Epidemiologia	4
1.2. Eziologia	5
1.3. Patogenesi	5
1.3.1. Patogenesi molecolare	6
1.3.2. Microambiente midollare	8
1.4. Storia Naturale	9
1.5. Sintomi e segni clinici	14
2. METODOLOGIE DIAGNOSTICHE.....	17
2.1. Indagini di laboratorio	17
2.2. Metodiche di analisi molecolare	18
2.3. Indagini strumentali.....	20
3. STADIAZIONE E FATTORI PROGNOSTICI.....	23
3.1. Sistemi di stadiazione	23
3.2. Prognosi	26
3.2.1. Ruolo prognostico della citogenetica e dell'espressione genica	26
3.2.2. Ruolo prognostico di risposta alla terapia	30
3.3. Malattia minima residua (MRD)	33
3.3.1. Nuove frontiere: la biopsia liquida	38
4. TERAPIA.....	41
4.1. TERAPIA DI PRIMA LINEA	43
4.1.1. Pazienti candidabili a trapianto autologo (ASCT)	44
4.1.2. Pazienti non candidabili a trapianto autologo (ASCT)	49
4.2. TERAPIA DEL MIELOMA MULTIPLO RICADUTO-REFRATTARIO (RRMM)	51
5. RAZIONALE DELLO STUDIO.....	60
6. OBIETTIVI DELLO STUDIO	61
7. DISEGNO DELLO STUDIO	61
8. MATERIALI E METODI.....	63
8.1. CRITERI DI ELEGGIBILITÀ.....	63
8.2. CRITERI DI ESCLUSIONE	63
8.3. CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA	63
8.4. DEFINIZIONE DEGLI ENDPOINTS “TIME-TO-EVENT”	65
9. ANALISI STATISTICA.....	66
10. RISULTATI.....	67
10.1. CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI.....	67
10.2. CARATTERISTICHE BIOLOGICHE BASALI.....	70
10.2.1. Divisione dei pazienti sulla base di un <i>cut-off</i> di cfDNA TF	71
10.3. TERAPIA, RISPOSTA E MONITORAGGIO MRD.....	75
10.4. OUTCOMES	81

	10.5. ESEMPI DI MONITORAGGIO COMPLETO CON TRE METODICHE	83
11.	DISCUSSIONE	87
12.	BIBLIOGRAFIA	91

1. IL MIELOMA MULTIPLO

Il Mieloma Multiplo (MM) è una neoplasia ematologica maligna appartenente al gruppo delle discrasie plasmacellulari o gammopatie monoclonali caratterizzata dalla proliferazione e dall'accumulo di un clone plasmacellulare maligno a livello midollare o, più raramente (in una percentuale variabile tra il 7 e il 15% dei casi), nei tessuti extramidollari (*extramedullary disease*). Tali plasmacellule (PC) tipicamente sintetizzano un'abnorme quantità di immunoglobuline complete o parte di esse (incomplete), altrettanto clonali, che prendono il nome di componente monoclonale (CM)^{1,2}. Le immunoglobuline monoclonali sono dunque caratterizzate da *identità isotipica*, ovvero appartenenti alla stessa classe di catena pesante (in ordine di frequenza: G, A, M, D o E) e di catena leggera (κ o λ), e da *identità idiotipica*, ossia aventi la stessa regione ipervariabile (CDR III) della catena pesante e leggera. Le immunoglobuline clonali sono rilevabili nel siero e/o nelle urine con l'ausilio di metodiche di elettroforesi e immunofissazione sierica ed urinaria.

Con il dosaggio delle catene leggere libere sieriche (*serum free light chain assay, sFLC*) è possibile identificare e valutare quantitativamente le catene κ e λ circolanti nel siero non legate a catene pesanti e valutare la sFLC κ/λ ratio (valore normale 0,26-1,65) che stabilisce l'eventuale monoclonalità della produzione immunoglobulinica: se il rapporto risulta inferiore a 0,26 è presente un eccesso di produzione di catene λ , mentre quando il rapporto è superiore a 1,65 si ha eccesso di produzione di catene κ ³. Il *serum free light chain assay* ha vari impieghi clinici anche nei pazienti con MM secernente solo catene leggere (15% dei casi) o nell'amiloidosi AL. Nell'1-2% dei pazienti, tuttavia, pur essendo presenti le caratteristiche cliniche del MM, la CM non è rilevabile nel siero o nelle urine; in questi casi si parla di MM non secernente^{2,4}.

1.1. Epidemiologia

Il Mieloma rappresenta circa l'1-2% di tutte le neoplasie maligne e circa il 10% delle neoplasie ematologiche⁵ (secondo per frequenza ai linfomi), con una incidenza stimata di 4.5-6 casi/100000 abitanti all'anno negli Stati Uniti⁵ e in Europa⁶ (8/100000 in Italia, secondo l'Istituto Superiore di Sanità).

Il MM è una patologia che più tipicamente colpisce pazienti con età avanzata, difatti l'età mediana alla diagnosi è di 68 anni, circa il 2% dei pazienti all'esordio ha meno di 40 anni mentre il 38% dei pazienti ha un'età superiore a 70 anni. Il sesso maschile presenta un'incidenza leggermente superiore a quello femminile e l'etnia afroamericana presenta un'incidenza doppia rispetto a quella dell'etnia caucasica⁷.

1.2. Eziologia

Ad oggi l'eziologia del Mieloma Multiplo resta ignota, sebbene siano stati identificati una lunga serie di fattori che, in varia misura, incrementano il rischio di sviluppare questa neoplasia.

Dal punto di vista epidemiologico è stata osservata 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 (difatti, nei familiari di primo grado dei pazienti affetti da MM il rischio di sviluppare una gammopatia monoclonale è da 2 a 4 volte superiore⁸), ma non esiste una vera e propria ereditarietà della patologia^{9,10}.

Il sovrappeso e l'obesità correlano a un'aumentata incidenza e mortalità per mieloma e a un aumentato tasso di progressione della gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS) in MM. Non è stata invece dimostrata alcuna associazione tra fumo e rischio di sviluppare mieloma¹¹⁻¹³.

Le uniche patologie che hanno dimostrato una correlazione significativa con l'insorgenza di MM sono l'anemia perniciosa, probabilmente per l'interferenza del deficit di vitamina B12 con la sintesi e la replicazione del DNA, e la spondilite anchilosante, associazione attribuita sia alla stimolazione del sistema immunitario sia ai trattamenti¹².

1.3. Patogenesi

Il mieloma multiplo ha origine da un linfocita B naïve che va incontro a trasformazione neoplastica all'interno del centro germinativo dei follicoli degli organi linfoidi secondari, principalmente i linfonodi, durante lo switch isotipico (o di classe) e la maturazione dell'affinità. Nella fase post centro germinativo, le cellule B si trovano negli stadi terminali di differenziamento, ovvero le cellule della memoria e le cellule a lunga sopravvivenza, non più capaci di variare la propria produzione di anticorpi e con un'emivita di mesi-anni. Mentre le cellule della memoria rimangono in circolo, pronte ad attivarsi rapidamente a plasmacellule in caso di riesposizione all'antigene, quelle a lunga sopravvivenza migrano nel midollo osseo.

Lo scambio di classe avviene grazie all'azione di citochine rilasciate dai linfociti T helper e consente la sintesi di anticorpi di isotipi non-IgM. Esso si verifica per delezioni in corrispondenza della regione di DNA che codifica per la catena pesante dell'Ig (IGH). La maturazione dell'affinità, invece, permette la produzione di anticorpi specifici e avidi e avviene grazie all'ipermutazione somatica delle regioni ipervariabili di IGH. È proprio la presenza di queste ipermutazioni somatiche che suggerisce l'origine della patologia da

linfociti B post centro germinativo, terminalmente differenziati. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, lo studio fenotipico delle cellule neoplastiche ha evidenziato l'espressione delle molecole di superficie CD19 e CD27, sarebbero quindi più simili a cellule B della memoria piuttosto che a plasmacellule, suggerendo una possibile origine del clone neoplastico da tale compartimento.

I meccanismi di switch isotipico e di ipermutazione somatica necessitano entrambi dell'enzima citidina deamidasi indotta dall'attivazione (AID), il quale porta alla rottura del DNA a doppia catena in più punti che verranno poi ricongiunti a livello di terminazioni non omologhe da enzimi di riparazione del DNA. Punti di rottura non causati dall'AID possono favorire traslocazioni cromosomiche aberranti, che insieme all'iperdiploidia, rappresentano un evento citogenetico primario della mielomagenesi.¹⁴⁻¹⁶

Le cellule neoplastiche, dagli organi linfoidei secondari, migrano quindi nel midollo osseo tramite il processo di homing e differenziano in plasmacellule. All'esordio di malattia il midollo osseo è occupato da plasmacellule mature non proliferanti, in seguito possono comparire plasmablasti proliferanti che incrementano progressivamente fino alla possibile disseminazione extramidollare. La fase iniziale di malattia corrisponde a una MGUS, che si ritiene precedere tutti i mielomi anche quando non clinicamente rilevata, la disseminazione extramidollare, invece, corrisponde alla leucemia plasmacellulare (LPC).^{17,18}

Il differenziamento a plasmacellula è regolato da fattori di trascrizione quali IRF4 (fattore di regolazione dell'interleuchina-4), BLIMP1 (proteina di maturazione indotta dai linfociti B-1) e XBP1 (proteina legante X box-1), coinvolti nel corretto ripiegamento anticorpale. IRF4 inibisce l'espressione di BCL6, portando a una maggiore sintesi di BLIMP1, che a sua volta determina un'espressione ridotta di PAX5 e aumentata di XBP1. È stato dimostrato come la sopravvivenza delle plasmacellule, soprattutto nel MM, richiede l'espressione continua di BLIMP1 e XBP1 e la continua assenza di PAX5 e BCL6.¹⁹

1.3.1. Patogenesi molecolare

Le alterazioni citogenetiche-molecolari che si verificano nel centro germinativo sono necessarie ma non sufficienti allo sviluppo del MM, esse sono riscontrabili, infatti, anche in pazienti con MGUS e/o mieloma multiplo smouldering (SMM, ovvero il MM asintomatico). A sostegno di ciò, studi di ibridazione genomica comparativa su microarray hanno evidenziato come i livelli di eterogeneità intraclonale e complessità genetica aumentino progressivamente dalla MGUS, allo SMM, al MM fino alla LPC.²⁰

Le anomalie citogenetiche acquisite durante le reazioni del centro germinativo, presenti quindi già allo stadio di MGUS, sono definite primarie e sono mutualmente esclusive fra loro, permettendo di classificare MGUS e MM in sottotipi distinti. Le alterazioni secondarie si verificano successivamente e definiscono la progressione a MM.

Anomalie citogenetiche primarie

Le anomalie primarie che guidano lo sviluppo del mieloma sono le traslocazioni, che comprendono il locus del gene della catena pesante delle immunoglobuline (14q32), e l'iperdiploidia. Tutte queste traslocazioni determinano una iper-espressione degli oncogeni coinvolti poiché risultano essere sotto il controllo dell'enhancer del gene delle catene pesanti delle Ig, molto attivo nelle cellule della B linfocitopoiesi.

La traslocazione più frequente è la t(11;14), presente nel 15-20% dei casi e coinvolgente il gene che codifica per la ciclina D1, proteina regolatrice del ciclo cellulare che accelera il passaggio dalla fase G1 alla fase S. Altre anomalie frequentemente riscontrabili, associate entrambe a una ridotta sopravvivenza, sono la t(4;14), rinvenuta nel 15% dei pazienti, che determina un'aumentata espressione di MMSET (appartenente al gruppo delle istone metiltransferasi) e FGFR3 (recettore per il fattore di crescita fibroblastico-3) e la t(14;16), nel 5-10% dei casi, che coinvolge c-MAF (fattore di trascrizione che in ultimo porta a un'aumentata attività della ciclina D2). Infine, in circa il 5% dei casi è presente la t(6;14) che interessa la ciclina D3 e, in un altro 5% dei pazienti, la t(14;20) che coinvolge MAFB.

L'iperdiploidia, che si riscontra nel 40-60% dei pazienti, consiste nella trisomia di alcuni cromosomi, nel MM tipicamente il 3, il 5, il 7, il 9, l'11, il 15, il 19 e il 21, con un cariotipo generalmente composto da 47-75 cromosomi e rarissime traslocazioni, la cui implicazione neoplastica potrebbe essere correlata all'espressione di oncogeni all'interno dei cromosomi duplicati. Questo cariotipo generalmente si associa a una prognosi più favorevole, un'età più avanzata alla diagnosi e una maggiore incidenza di malattia ossea. Quando il cariotipo è "non iperdiploide", è composto da meno di 46 cromosomi o più di 75, ed è più frequentemente associato a traslocazioni coinvolgenti il locus 14q32 e a monosomie o delezioni del cromosoma 13. ^{14,17,21}

Anomalie citogenetiche secondarie

La progressione a MM è favorita da eventi genetici secondari definiti sub-clonali, in quanto colpiscono solo una sottopopolazione di cellule tumorali a livello del midollo osseo.

Nel 40% dei MM sono presenti alterazioni a carico del braccio lungo del cromosoma 1, quali l'acquisizione 1q (2-3 copie dell'1q) e l'amplificazione 1q (4 o più copie dell'1q), che portano a un'aumentata espressione di oncogeni quali CKS1B, ANP32E, BCL9 e PDZK1.

Rappresentano un fattore prognostico indipendente e correlano con una prognosi tanto più negativa quante più sono le copie^{22,23}.

Nel 30% dei casi può essere presente la delezione del braccio corto del cromosoma 1, correlata a una prognosi sfavorevole. Possono essere coinvolti il gene che codifica per l'oncosoppressore FAM46C, o il gene per CDKN2 e FAF1, rispettivamente un inibitore della ciclina chinasi dipendente-4 e una proteina pro-apoptotica^{23,24}.

In circa il 50% dei pazienti affetti da mieloma è presente la delezione del braccio lungo del cromosoma 13, del(13q), che causa una ridotta espressione dell'oncosoppressore pRb. È difficile definire il valore prognostico di questa alterazione in quanto, con elevata frequenza, si associa ad altre anomalie ad elevato rischio, come la t(4;14)^{21,23}.

Infine, nel 10% dei casi alla diagnosi, ma con una percentuale maggiore nelle successive fasi di ricaduta, può essere presente la delezione del braccio corto del cromosoma 17, la quale determina più spesso la perdita del locus per p53, il più importante regolatore della riparazione del DNA e induttore di apoptosi. Tale alterazione definisce una patologia più aggressiva, con più frequente interessamento extramidollare e una ridotta sopravvivenza^{23,25}.

1.3.2. Microambiente midollare

Il microambiente midollare svolge un ruolo chiave nella trasformazione maligna e nella progressione del MM, è fondamentale, infatti, per la crescita, la proliferazione, l'adesione e la migrazione delle cellule neoplastiche, alle quali, inoltre, fornisce sostegno strutturale e nutrizione, essenziali per la loro sopravvivenza²⁶.

Funzionalmente risulta essere suddiviso in due compartimenti, quello cellulare, che comprende cellule ematopoietiche (quali cellule mieloidi, linfociti B e T, natural killer, osteoclasti) e non ematopoietiche (rappresentate da cellule stromali, mesenchimali, fibroblasti, osteoblasti, adipociti, cellule endoteliali e vasi sanguigni), e quello non-cellulare, che include la matrice extracellulare e diverse citochine, chemochine, fattori di crescita ed esosomi prodotti dal compartimento cellulare²⁷.

L'interazione tra le cellule del MM e il microambiente midollare avviene grazie a molecole di superficie e può verificarsi per contatto diretto cellula-cellula, o attraverso la secrezione di citochine e chemochine, con conseguente attivazione di una complessa rete di vie di trasduzione del segnale intracellulari²⁷.

Mediante questa interazione, le plasmacellule mielomatose rendono il microambiente favorevole alla loro sopravvivenza e proliferazione, stimolano l'angiogenesi e l'attività degli osteoclasti e innescano un meccanismo di tolleranza da parte del sistema immunitario

riducendo così la sorveglianza antitumorale che i farmaci quali gli immunomodulanti, gli anticorpi monoclonali e i CAR-T cercano di ripristinare.

Figura 1: Ruolo del microambiente nella patogenesi del mieloma

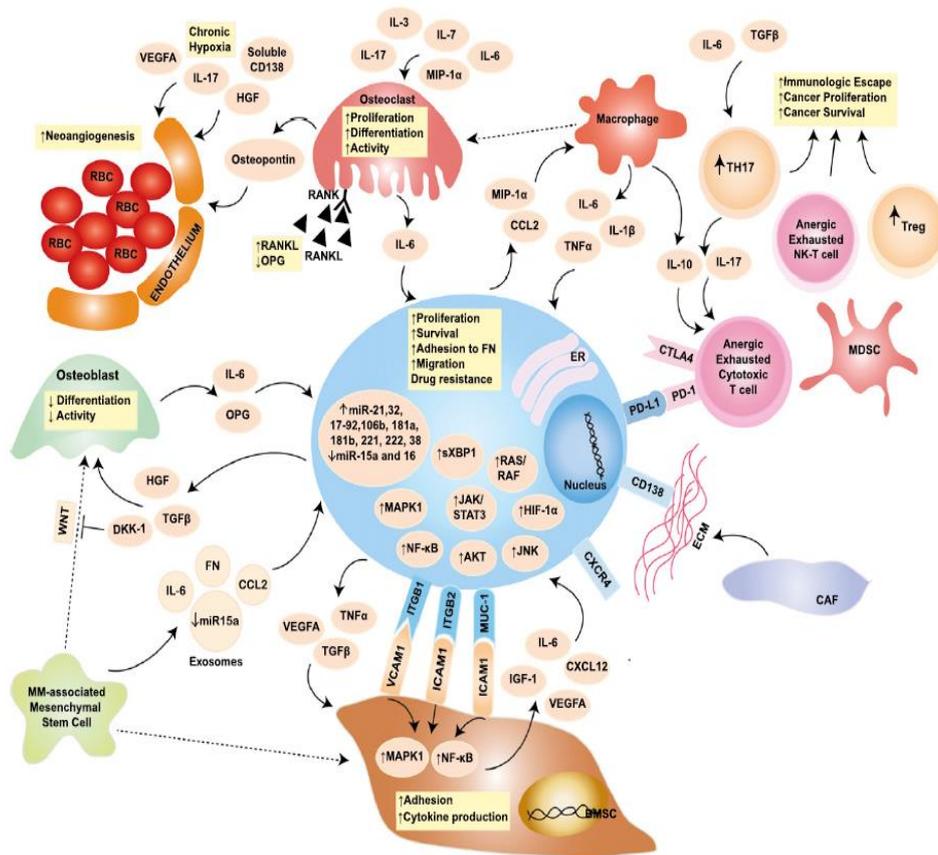


Figure 1 Role of the BM niche in MM pathogenesis. The blue oval in the center is the MMC, with its close interplay with cellular and acellular components of the BM. The pale orange ovals represent relevant cytokines/chemokines in the BM milieu. Dotted arrows indicate differentiation, whereas solid arrows indicate secretion and/or effect on a target cell. Yellow squares contain a synopsis of the overall effect of cytokines and cell-to-cell contact on the target cell. Key signaling cascades, transmembrane proteins, and intracellular organelles, which are of interest for molecularly targeted therapies, are represented. BMSC, BM stromal cell; CAF, cancer-associated fibroblast; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; CXCL12, chemokine (C-X-C motif) ligand 12; CXCR4, chemokine (C-X-C motif) receptor 4; DKK-1, dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1; ER, endoplasmic reticulum; FN, fibronectin; HGF, hepatocyte growth factor; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; IGF-1, insulinlike growth factor 1; ITGB1, integrin β 1; ITGB2, integrin β 2; JNK, c-JUN N-terminal kinase; MAPK1, mitogen-activated protein kinase 1; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein 1 α ; MUC-1, mucin 1; NK-T cells, natural killer T cells; OPG, osteoprotegerin; PD-1, programmed cell death 1; PD-L1, programmed ligand death 1; RANK, receptor activator of NF- κ B; RANKL, RANK ligand; RBC, red blood cell; TGF- β , transforming growth factor β ; TH17, T helper 17 cell; Treg, regulatory T cell; VCAM1, vascular cell adhesion molecule 1; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; WNT, wingless-type. Adapted from Bianchi and Anderson⁴⁷ with permission.

Figura tratta da: Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015 May 14;125(20):3049-58

1.4. Storia Naturale

MGUS

Il MM può essere preceduto da una manifestazione preneoplastica chiamata gammopatia monoclonale di incerto significato (*Monoclonal Gammopathy of undetermined significance*,

MGUS), presente in circa il 3% delle persone sopra i 50 anni e fino al 5% sopra i 70 anni²⁸. Nella MGUS le PC clonali costituiscono meno del 10% delle cellule del midollo osseo, sono quiescenti e non producono danni d'organo; è infatti una condizione clinicamente silente. È stato dimostrato che la MGUS può progredire verso il mieloma con un rischio annuo di circa l'1% e con una probabilità del 25% in un periodo di 20 anni^{29,30}. Le MGUS-IgM più frequentemente si associano a disordini linfoproliferativi diversi dal mieloma e solo raramente evolvono in mieloma multiplo pertanto nella seguente trattazione con il termine di MGUS si farà riferimento alle MGUS non-IgM.

Tra i pazienti con MGUS è presente una certa eterogeneità, per cui sono stati identificati alcuni fattori di rischio indipendentemente associati alla progressione verso la malattia conclamata:

- un alterato rapporto delle catene leggere libere sieriche (<0.26 o >1.65);
- la concentrazione della componente monoclonale maggiore di 1,5 g/dL;
- l'isotipo della CM (non IgG);
- l'immunoparesi, cioè la riduzione dei livelli di 1 o 2 isotipi di immunoglobuline non implicate nella proliferazione clonale³¹.

I pazienti con MGUS possono essere sottoposti a *follow-up* clinico-laboratoristico ogni 6/12 mesi, senza necessità di intraprendere alcuna terapia.

Mieloma smouldering

Una fase intermedia tra MGUS e MM è rappresentata dal mieloma *smouldering*, **asintomatico** (SMM), che è caratterizzato da una percentuale di PC midollari superiori al 10%, una CM sierica ≥ 30 g/L o urinaria ≥ 500 mg/24h e dall'assenza di sintomi e danni d'organo. Il rischio di evoluzione a malattia attiva è maggiore rispetto alla MGUS (10% all'anno nei primi 5 anni dalla diagnosi, 3% all'anno nei successivi 5 anni e 1.5% all'anno negli anni a seguire), per cui questi pazienti vengono sottoposti ad un *follow-up* a 3/6 mesi. Anche in questo caso, ci sono fattori che determinano un'aumentata probabilità di progressione a MM sintomatico sono:

- componente M di tipo IgA;
- immunoparesi con riduzione dei livelli dei due isotipi di Ig non coinvolti;
- sFLC ratio (coinvolta/non coinvolta) ≥ 8 (ma < 100);
- incremento progressivo dei livelli sierici di CM;
- infiltrazione midollare del 50-60%;

- anomalie citogenetiche ad alto rischio rilevabili alla *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH); in particolare la traslocazione t(4;14), la delezione del braccio corto del cromosoma 17 [del(17p)] e/o l'amplificazione del braccio lungo del cromosoma 1 [ampl(1q)];
- presenza di PC circolanti;
- presenza di *pattern* diffuso alla risonanza magnetica nucleare (RMN);
- lesioni focali ipercaptanti visibili alla *Positron Emission Tomography-Computed Tomography* (PET-CT), senza segni di osteolisi e danno osseo³².

In realtà, tra i pazienti con SMM, il rischio di progressione è molto variabile, pertanto, sono stati definiti modelli di stratificazione che permettono di stimare quale sia il rischio di progressione a MM. Il modello originale proposto dalla Mayo Clinic nel 2008 definiva tre gruppi di rischio sulla base dei criteri diagnostici del SMM. Negli anni è stato sottoposto a diverse modifiche fino all'ottenimento della versione più recente, ultimata dall'International Myeloma Working Group (IMWG) e definita "2/20/20", in grado di identificare pazienti con un rischio di progressione fino a 50% entro 2 anni. I pazienti con SMM ad alto rischio (HR-SMM), secondo questa classificazione, devono presentare due tra i tre seguenti fattori³³:

- componente monoclonale sierica >2 g/dL;
- infiltrazione midollare >20%;
- sFLC ratio (coinvolta/non coinvolta) ≥ 20 ;

È stato dimostrato come forme di SMM le cui plasmacellule non esprimono il CD56 tendano a progredire senza un aumento della CM.³⁴ Al contrario, alcuni pazienti con un SMM a rischio elevato non sviluppano mai un MM e predire quali siano tra questi non è ancora possibile. Sulla base di ciò, è possibile definire tra i pazienti con SMM almeno due entità biologiche distinte, l'"MGUS ad alto volume" che ha un decorso sostanzialmente indolente e il "mieloma pre-sintomatico", patologia propriamente maligna con rischio imminente di progressione a forma attiva. Questo sottolinea come, mentre i modelli clinici permettono una buona stima del rischio per la maggior parte dei pazienti, basare le decisioni soltanto su questi modelli può portare al sotto-trattamento o al sovra-trattamento di alcuni pazienti. Pertanto, è fondamentale evitare l'uso di terapie inutili e potenzialmente tossiche che possono danneggiare la qualità della vita e in realtà ridurre la sopravvivenza di tali pazienti. Allo stesso tempo, però, con una corretta diagnosi e categorizzazione dei rischi, il trattamento precoce dei pazienti con "mieloma pre-sintomatico" può portare a un grande beneficio, non solo riducendo la probabilità di sviluppo dei sintomi, ma anche potenzialmente prolungando la sopravvivenza. È stato dimostrato come anomalie citogenetiche quali t(4;14), t(14;16), +1q, del(13q)/monosomia del 13 aumentino il rischio di progressione, come anche le mutazioni e

traslocazioni coinvolgenti MYC. Tali anomalie sono già state integrate al “2/20/20” in un unico modello di rischio che permette di stratificare in maniera più sensibile i pazienti con SMM, definendo 4 classi di rischio: basso (assenza di tutte le variabili), intermedio-basso (1 sola variabile), intermedio (2 variabili) e alto (3 o 4 variabili). Tuttavia, è ancora dibattuto quale sia l’approccio terapeutico migliore a questi pazienti, che ad ora resta ancora quello del “wait and watch” con un follow up clinico e laboratoristico eseguito a una cadenza determinata dal rischio di progressione della malattia: ogni 6 mesi nei soggetti a rischio intermedio, ogni 2-3 mesi in quelli ad alto.³⁵

Mieloma Multiplo attivo

Infine, la diagnosi di **MM attivo sintomatico** si basa sui criteri diagnostici, rivisti dall’IMWG (*International Myeloma Working Group*) nel 2014²⁸, riassunti nella tabella 1.

Tabella 1: Criteri IMWG (2014)

MIELOMA MULTIPLO	
1	Plasmacellule midollari $\geq 10\%$ e/o presenza di plasmocitoma confermato istologicamente
2	Presenza di uno o più dei seguenti <i>Myeloma Defining Events</i> (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: <i>clearance</i> creatinina < 40 ml/min o creatinina sierica > 2 mg/dl* - [A] anemia (Hb < 10 g/dl o 2 g $<$ normale) - [B] <i>bone</i>: 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 $\geq 60\%$ - sFLC <i>ratio</i> (<i>involved/uninvolved</i>) > 100 - > 1 lesione focale alla Risonanza Magnetica (diametro almeno 5 mm)

*La clearance della creatinina è calcolata secondo le formule modification of diet in renal disease [MDRD] or chronic kidney disease epidemiology collaboration [CKD-EPI].

Plasmocitoma solitario

Il plasmocitoma solitario (PS) è una neoplasia plasmacellulare che si presenta con una singola lesione ossea (PS osseo), o più raramente una lesione che si riscontra nel contesto di altri tessuti molli (PS extraosseo), in assenza di altre lesioni o segni attribuibili a MM. Per

porre diagnosi di PS, deve esserci evidenza radiologica di una lesione osteolitica ossea isolata o osservazione all'*imaging* di una massa viscerale, assenza di segni di coinvolgimento sistemico quali anemia, ipercalcemia e danno renale, infiltrato plasmacellulare midollare inferiore al 10% e presenza di plasmacellule clonali nel tessuto osseo o molle, opportunamente prelevato mediante biopsia chirurgica della lesione solitaria^{36,37}.

Il trattamento del PS prevede intervento chirurgico (ove indicato) e trattamento radioterapico localizzato, indipendentemente dal fatto che si tratti di PS osseo od extraosseo³⁸. La progressione a mieloma multiplo è più frequente nei pazienti con plasmocitoma osseo solitario mentre i plasmocitomi extra ossei danno disseminazione solo in una bassa percentuale di pazienti, ed hanno dunque una prognosi migliore.

Leucemia plasmacellulare (LPC)^{39,40}

Nelle fasi avanzate il MM può progredire verso una forma di **leucemia plasmacellulare (PCL)**, con fuoriuscita delle PC dal midollo al sangue periferico, anche se talvolta essa può manifestarsi come entità primaria senza un precedente riscontro di MM. Si tratta di una patologia rara ma molto aggressiva appartenente sia al gruppo delle discrasie plasmacellulari sia a quello delle leucemie e, tra le gammopatie monoclonali, è la forma più aggressiva. Storicamente la LPC primaria è sempre stata la forma più comune, tuttavia, grazie al miglioramento delle tecniche diagnostiche e delle terapie che hanno aumentato la sopravvivenza dei pazienti con MM, i casi di LPC secondaria sono aumentati e il rapporto si sta invertendo. L'incidenza varia dal 2 al 4% dei pazienti con mieloma con un'età media di insorgenza di 61 anni. È più frequente negli afroamericani rispetto ai caucasici.

La definizione diagnostica di LPC si basa sui criteri di Kyle pubblicati nel 1974: presenza di almeno il 20% di plasmacellule circolanti e un numero totale di plasmacellule nel sangue periferico $\geq 2 \times 10^9/L^{41}$. Questa definizione, ormai utilizzata da lungo tempo, è ancora oggetto di discussione e dati recenti hanno dimostrato che la presenza di più del 5% di plasmacellule circolanti in pazienti con mieloma alla diagnosi è associata a un impatto prognostico negativo paragonabile alla LPC, indicando che probabilmente in futuro il *cut-off* per la diagnosi andrà ridefinito^{42,43}.

Clinicamente la LPC si può manifestare con sintomi dovuti ad anemia severa, ipercalcemia o diatesi emorragica a causa di trombocitopenia, organomegalia con coinvolgimento di fegato, milza, linfonodi, versamento pleurico, deficit neurologici dovuti al coinvolgimento del sistema nervoso centrale, pallore, petecchie e plasmocitomi extramidollari palpabili dei tessuti molli. Al contrario, la presenza di lesioni ossee litiche è inferiore a quella osservata nel MM.

Da un punto di vista citogenetico, il cariotipo è spesso complesso e dimostra ipodiploidia, le alterazioni più frequentemente riscontrabili con l'analisi FISH sono la t(11;14) e anomalie dei cromosomi 1 e 17, in particolare 1q+ e del(17p).

Il trattamento della LPC è simile a quello del MM sia in termini di associazioni tra farmaci che di schemi terapeutici, tuttavia, i risultati ottenuti sono inferiori e l'incidenza di eventi avversi/mortalità precoci e complicanze è maggiore.

1.5. Sintomi e segni clinici

Nel **MM sintomatico**, le manifestazioni cliniche principali sono determinate da diversi fattori, tra cui l'incontrollata proliferazione midollare delle plasmacellule neoplastiche, l'aumentata produzione di immunoglobuline monoclonali e le loro peculiari caratteristiche chimico-fisiche e la produzione autocrina e paracrina di citochine².

- **Lesioni osteolitiche:** le lesioni ossee sono presenti in circa il 70% dei casi alla diagnosi, sono tipicamente osteolitiche, e non mostrano segni di neoapposizione ossea, caratteristica utile a distinguerle da altre lesioni scheletriche maligne. Possono colpire tutto lo scheletro, prevalentemente le aree fisiologicamente ricche di midollo emopoietico: vertebre, coste, bacino, cranio. Determinano dolore e fratture patologiche, che rappresentano la principale causa di morbilità per il paziente.

Nei criteri IMWG aggiornati²⁸ è specificato che per soddisfare il criterio diagnostico di “*bone lesions*” si deve trattare di lesioni osteolitiche (≥ 5 mm di diametro) visibili in TC o PET-TC; la radiografia tradizionale dello scheletro non è più considerata una metodica adeguata a causa della sua scarsa sensibilità). Per quanto riguarda la PET-TC, non è sufficiente la sola incrementata captazione del FDG per la diagnosi di lesione da mieloma, ma è necessaria la presenza di una sottostante lesione osteolitica in TC, dal momento che un'aumentata captazione può essere dovuta anche a sottostanti fenomeni degenerativi-infiammatori. La presenza di osteoporosi o di cuneizzazioni/crolli vertebrali, per altro frequenti nei pazienti anziani, non è per sé un criterio di lesione ossea e non soddisfa i criteri CRAB⁴⁴.

La presa in carico del paziente con patologia scheletrica da mieloma si basa su una stretta collaborazione con gli ortopedici, sull'uso di ortesi (busto in caso di crolli/cuneizzazioni vertebrali, collare in caso di lesioni cervicali) e di interventi chirurgici di stabilizzazione preventivi per ridurre il rischio di frattura. In alcuni casi e/o in sedi in cui la chirurgia sia

particolarmente difficile o in pazienti anziani fragili, la radioterapia può essere un ulteriore strumento per ridurre il dolore e il rischio di frattura associato alle lesioni scheletriche⁴⁵

In alcuni casi la massa neoplastica si estende oltre i confini della corticale ossea (malattia paramidollare, PMD) e può comprimere le radici nervose o più raramente il midollo spinale, causando sintomi neurologici che richiedono un intervento immediato chirurgico/radioterapico di decompressione.

Infine, per favorire la ricalcificazione, almeno parziale, delle lesioni osteolitiche, in tutti i pazienti vengono somministrati i bifosfonati (in particolare, acido zoledronico), in assenza di controindicazioni.

- **Ipercalcemia:** è dovuta all'aumentato riassorbimento della matrice minerale dell'osso e si associa alla presenza di lesioni scheletriche, più spesso estese. L'ipercalcemia può a sua volta peggiorare l'insufficienza renale e richiede un trattamento immediato con idratazione e bifosfonati ev. Si distingue dall'ipercalcemia da iperparatiroidismo perché i livelli di paratormone sono soppressi.

- **Anemia:** è secondaria all'infiltrazione midollare da parte delle plasmacellule e quasi sempre si associa ad un infiltrato midollare cospicuo. È normo/macrocitica, normocromica⁴⁶.

In un paziente con MGUS ed anemia è sempre indicato un work up diagnostico basale per verificare con non si tratti di anemia multifattoriale o da carenza di ferro o vitamine emoaattive (B12, folati), soprattutto se in assenza di un infiltrato midollare significativo e se questo rappresenta l'unico criterio di sintomaticità.

- **Insufficienza renale (IR):** è presente alla diagnosi nel 20-30% dei pazienti, talvolta con necessità di un trattamento dialitico sostitutivo. L'IR è una grave complicanza del MM, con un impatto prognostico negativo, in quanto riflette solitamente un'alta taglia di malattia^{47,48}. La patogenesi del danno renale da MM è complessa e multifattoriale, legata all'eccesso di catene leggere monoclonali che possono danneggiare vari segmenti del nefrone attraverso meccanismi quali precipitazione intratubulare, danno diretto (o mediato da enzimi lisosomiali) sull'epitelio tubulare, deposizione lungo la membrana basale dei tubuli e dei glomeruli, dando origine a quadri clinici ed istopatologici differenti. Tra i fattori che concorrono a precipitare l'insorgenza del danno renale vi possono inoltre essere l'ipercalcemia, l'assunzione di farmaci nefrotossici e le infezioni delle vie urinarie. L'IMWG specifica che solo l'insufficienza renale da *light-chain cast nephropathy* (identificata sulla

base dei tipici reperti istologici se si effettua la biopsia renale o diagnosticata in maniera presuntiva se il livello di catene leggere coinvolto è alto, tipicamente >1500 mg/L), in cui il danno renale è prevalentemente tubulare, dovuto all'accumulo e alla precipitazione endoluminale delle catene leggere in eccesso, con conseguente ostruzione, infiammazione e fibrosi tubulo-interstiziale^{49,50}, è un *myeloma-defining event*²⁸.

Altre forme di danno renale associate alla presenza di un sottostante clone plasmacellulare (la Sindrome di Fanconi, l'amiloidosi AL, la malattia da deposito di catene leggere, la malattia da deposito di catene pesanti), oggi sono classificate nell'ampio capitolo delle MGRS (*gammopathies of renal significance*) e non sono considerate *myeloma-defining*, ma possono coesistere nell'ambito di un mieloma diagnosticato in base ad altri criteri di sintomaticità.

Ovviamente è necessario escludere altre cause di danno renale acuto e/o cronico quali ipertensione, diabete, sindrome metabolica, tossicità da farmaci, disidratazione (favorita dall'ipercalemia), soprattutto in presenza di un basso livello di catene leggere libere. Nei casi dubbi è raccomandata la biopsia renale per una diagnosi corretta.

- **Altre manifestazioni cliniche:** tipicamente i pazienti possono presentare un'aumentata suscettibilità alle infezioni a causa dello stato di immunoparesi presente al basale e della neutropenia, ipogammaglobulinemia e linfopenia indotte dalle terapie. Le infezioni rappresentano la principale causa di morte nel paziente con MM, difatti è raccomandata una profilassi antibiotica durante tutte le fasi di trattamento, più o meno intensiva a seconda del regime terapeutico e dello status di malattia. Sono inoltre raccomandate le principali vaccinazioni (eccetto quelle costituite da virus vivi attenuati) e, nei pazienti con infezioni ricorrenti, la terapia di supporto con immunoglobuline sostitutive⁵¹.

Circa l'1-2% dei pazienti presenta **malattia extramidollare** (EMD) al momento della diagnosi mentre circa il 5-10% la sviluppa successivamente nel corso della malattia⁵². La presenza di EMD è un fattore prognostico estremamente sfavorevole.

2. METODOLOGIE DIAGNOSTICHE

2.1. Indagini di laboratorio

Di fronte a un paziente in cui si sospetta un MM è necessario effettuare sia esami generali, per valutarne lo stato di salute, sia esami più specifici volti a individuare e caratterizzare la CM.

Gli esami generali comprendono l'esecuzione di un emocromo completo, che in caso di insufficienza midollare mostrerà la presenza di anemia normocitica e normocromica e/o piastrinopenia e/o neutropenia, la valutazione della creatinina e della velocità di filtrazione glomerulare, che in caso di coinvolgimento renale risulteranno alterati, della funzionalità epatica, degli indici di flogosi, della glicemia ed eventuali altri esami per indagare sintomi o segni concomitanti.

Per quanto riguarda gli esami per lo studio della CM, secondo le linee guida pubblicate nel 2017 dall'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), devono essere eseguiti l'elettroforesi e l'immunofissazione sieriche delle proteine, la proteinuria delle 24 ore con elettroforesi ed immunofissazione e il dosaggio delle catene leggere libere sieriche.

La CM può essere quantificata tramite l'elettroforesi sierica e caratterizzata mediante l'immunofissazione sierica. La proteinuria delle 24 ore, invece, consente sia di valutare la funzionalità renale, sia di individuare l'eventuale presenza di catene leggere libere urinarie mediante elettroforesi ed immunofissazione urinaria^{17,53}. Infine, il dosaggio delle FLC è utile in quanto permette non solo di determinare il valore assoluto delle catene κ e λ , ma anche di definire il rapporto κ/λ . Quest'ultimo è fondamentale per capire se, di fronte a elevati valori assoluti di κ o λ , si tratti effettivamente di una gammopatia monoclonale, poiché in questi casi risulta alterato ($<0,26$ per eccessiva produzione di λ o $>1,65$ per eccessiva produzione di κ). Se invece l'eziologia è legata a una ridotta funzionalità renale o a ipergammaglobulinemia policlonale, con superamento della capacità renale di eliminare le FLC (in condizioni normali il rene è in grado di metabolizzare 10-30g di FLC a fronte di una produzione plasmacellulare di 0,5-1g/die), il rapporto κ/λ tendenzialmente risulta normale⁵⁴.

Nella maggior parte dei casi la CM è costituita da immunoglobuline intere, più frequentemente di isotipo IgG e a seguire di isotipo IgA, e più raramente IgM o IgD e il tracciato elettroforetico avrà un tipico aspetto definito a "guglia di duomo". Come già detto precedentemente, nel 15% dei pazienti la CM è formata da sole catene leggere, evidenziabili come catene leggere libere sieriche e nelle urine come proteinuria monoclonale (o di Bence Jones). In questi casi l'elettroforesi sierica mostra spesso un'ipogammaglobulinemia. Infine,

esiste un 3% di casi in cui il MM non secerne, quindi la componente monoclonale è assente e tutti gli esami utili allo studio della CM risulteranno negativi.

A completamento di questi esami è necessaria con la quantificazione di IgG, IgA e IgM totali.^{17,53}

Dopo aver individuato e caratterizzato la CM è necessario confermare la plasmacitosi e la monoclonalità tramite un aspirato midollare o una biopsia osteo-midollare. Tipicamente il grado di infiltrazione di plasmacellule neoplastiche è >10% e può arrivare alla completa sostituzione dell'emopoiesi. In caso vengano effettuati sia l'aspirato che la biopsia e la percentuale di plasmacellule non coincida deve essere considerato il valore più alto. Le plasmacellule neoplastiche possono essere indistinguibili morfologicamente dalle normali plasmacellule o, più spesso, presentare numerose atipie citologiche, fino all'acquisizione di caratteri francamente anaplastici. Il campione midollare viene utilizzato per effettuare l'analisi FISH che permette il riconoscimento di specifiche alterazioni citogenetiche utili per la caratterizzazione prognostica. Mediante tecnica FISH è possibile studiare cellule in interfase e dimostrare alterazioni clonali nell'80-90% dei casi. A differenza della FISH, l'esame del cariotipo convenzionale mostra anomalie clonali nel 30-50% dei pazienti alla diagnosi; le plasmacellule neoplastiche hanno un basso indice proliferativo e quest'esame è in grado di analizzare solamente le cellule in metafase, sottostimando la reale incidenza delle alterazioni genetiche^{17,55}. Sul campione midollare, inoltre, è possibile eseguire metodiche di biologia molecolare per identificare il clonotipo caratteristico del singolo paziente.

2.2. Metodiche di analisi molecolare

Le tecnologie *Next Generation Sequencing* (NGS) sono metodiche di sequenziamento massivo parallelo, ovvero in grado di amplificare numerosi frammenti, anche di regioni genomiche diverse, contemporaneamente e con cicli ripetuti di estensione, garantendo l'ottenimento di una mole di dati in *output* pari a Mb o Gb per singola corsa. Le tre principali piattaforme di sequenziamento di "seconda generazione" sono Roche/454, Illumina/Solexa, Solid/AppliedBiosystems; tutte le tre piattaforme non richiedono l'elettroforesi su gel o l'elettroforesi capillare poiché la lettura della sequenza viene fatta passo per passo durante la stessa reazione.

La piattaforma Roche/454 consiste di una tecnologia di sequenziamento che si basa sul pirosequenziamento, ovvero sul dosaggio del pirofosfato inorganico (Ppi) che viene liberato come prodotto di "scarto" in seguito all'attacco di un dNTP (deossinucleoside trifosfato) al filamento polimerizzato; il Ppi viene trasformato in un segnale luminoso rilevato da una

fotocamera fotosensibile⁵⁶. La piattaforma Roche/454 viene utilizzata principalmente nei casi in cui sia necessaria la lettura di sequenze molto lunghe in quanto permette la lettura multipla e parallela di milioni di singoli filamenti di dimensioni molto maggiori rispetto i 100-200 nucleotidi con una singola corsa. Tale piattaforma presenta però un elevato tasso di errore (1,07%) nella lettura di sequenze contenenti omopolimeri, e un costo per nucleotide sequenziato più elevato rispetto a quello garantito da altre piattaforme⁵⁷.

La seconda piattaforma di tecnologie di “seconda generazione” commercializzata è Illumina/Solexa che opera previa frammentazione del DNA da sequenziare. Tale tecnologia utilizza l'azione della DNA polimerasi unita a quella di ancoraggio dei frammenti di Dna al supporto denominato “*flow cell*”, costituito da adattatori legati alle loro estremità che fanno sì che i *primer* della reazione possano legarsi più saldamente. L'amplificazione avviene attraverso una *bridge-PCR* che porta alla formazione di un *cluster* di filamenti clonali di DNA, indispensabili per garantire un segnale sufficientemente elevato da poter essere rilevato da una fotocamera digitale. Illumina/Solexa si serve di una “sintesi sequenziale”, dove i quattro nucleotidi sono aggiunti contemporaneamente sulla *flow cell* insieme alla polimerasi^{58,59}. Questa tecnologia, inoltre, utilizza terminatori reversibili associati a coloranti scindibili che possono essere riattivati, in modo da poter monitorare la reale aggiunta di tutti i nucleotidi su ogni frammento da sequenziare⁵⁹. Il sequenziamento realizzato tramite la piattaforma Illumina/Solexa, consente la produzione di dati fino a 600 Gb per corsa, ottenibili in dieci giorni, e un costo inferiore rispetto alle altre piattaforme presenti sul mercato⁵⁷.

La più recente piattaforma sviluppata è la Solid/Applied Biosystem che si distingue dalle altre in quanto sfrutta l'azione della DNA ligasi senza necessitare di una polimerasi per la fase di amplificazione. Successivamente alla PCR in emulsione, il frammento di DNA amplificato, che viene portato da delle biglie, viene messo in contatto con la ligasi che lega al frammento da sequenziare una sonda lunga 8 paia di basi che contiene un sito di legame per l'enzima, un sito di taglio e quattro diversi fluorocromi legati all'ultima base. Il segnale emesso è prodotto durante il legame della sonda al filamento stampo. La piattaforma prevede infine un sistema che consenta di leggere due volte lo stesso nucleotide al fine di limitare gli errori⁵⁷.

Ad oggi, le piattaforme Roche 454 e Solid/Applied Biosystem sono state praticamente abbandonate a favore dell'utilizzo su scala globale della tecnologia Illumina, nonché delle più recenti metodiche di sequenziamento basate sull'utilizzo di nanopori, caratterizzate da un'elevata processività senza l'utilizzo di passaggi di amplificazione.

L'introduzione del sequenziamento di nuova generazione ha permesso l'identificazione di varianti a singolo nucleotide e cambiamenti strutturali più ampi, tra cui traslocazioni e

anomalie del numero di copie, in modo più rapido e più economico. Alcune di queste nuove tecnologie sono ora certificate e disponibili per uso diagnostico mentre tecniche aggiuntive, come la metilazione del DNA, rimangono limitate ai laboratori di ricerca. I numerosi studi condotti negli ultimi anni e il deposito di dati di NGS in banche dati mondiali stanno portando ad un rinnovamento e ad una ridefinizione dei fattori di rischio prognostici associati alla malattia. Infatti, ad oggi nel panorama di alterazioni genomiche cruciali per la patologia rientrano anche: le mutazioni identificate mediante studi *Whole Genome Sequencing*, *Whole Exome Sequencing* o *Targeted sequencing*, come per esempio le mutazioni dei geni *KRAS*, *NRAS* che caratterizzano insieme circa il 50% dei pazienti con MM; nuove traslocazioni identificate mediante l'impiego di RNA-Seq, come per esempio le traslocazioni sul gene *MYC*; *copy number variations* (CNAs) analizzate globalmente sul genoma, come per esempio la delezione a livello del braccio lungo del cromosoma 16 coinvolta in meccanismi di instabilità genomica.

2.3. Indagini strumentali

Gli obiettivi dell'*imaging* sono molteplici ma primo fra tutti è l'identificazione di lesioni litiche, le quali rientrano tra i principali biomarcatori di malignità che definiscono la necessità di trattamento immediato, essendo una causa maggiore di morbilità e mortalità^{60,61}. Inoltre, le indagini strumentali sono utili alla rilevazione di potenziali aree di fragilità che potrebbero andare incontro a frattura. Al contempo, permettono di evidenziare un'eventuale localizzazione extramidollare di malattia, fare diagnosi differenziale tra plasmocitoma solitario dell'osso e MM e predire il rischio di una progressione precoce da MMS a MM attivo. Infine, l'*imaging* consente anche di fare diagnosi di ricaduta e di valutare la risposta alla malattia, soprattutto nelle forme di MM non secernente e con un sFLCR normale⁶⁰.

Storicamente, la principale tecnica di diagnostica strumentale utilizzata era la radiografia convenzionale (**whole-body X-ray, WBXR**). Tale metodica, tuttavia, presentava una scarsa sensibilità, permettendo di rilevare unicamente lesioni osteolitiche con interessamento di più del 30% dell'osso trabecolare e non consentiva di differenziare fratture vertebrali conseguenti a mieloma da quelle dovute a osteoporosi non maligna, ritardando talvolta la diagnosi e l'inizio del trattamento. Inoltre, aree anatomiche come pelvi e colonna vertebrale non erano facilmente accessibili e la valutazione della risposta alla terapia non era soddisfacente.⁶²

A causa di questi importanti limiti è stata ampiamente superata da whole-body low dose CT (WBLDCT), whole-body MRI (WBRM) e PET/TC, che secondo le principali linee guida sono le tecniche di *imaging* indicate per lo studio di un paziente con sospetto MM^{53,63,64}.

La **WBLDCT** è una tecnica dotata di una maggiore sensibilità nel rilevare le lesioni osteolitiche, che infatti possono già essere individuate quando hanno interessato meno del 5% dell'osso trabecolare. Permette di studiare in maniera più accurata la colonna vertebrale e la pelvi, stimare il rischio di frattura vertebrale, programmare radioterapia o interventi chirurgici e guidare biopsie. Tutto ciò con una quantità di radiazioni paragonabili a quelle della radiografia standard (3,2-4,8 mS), senza necessità di utilizzo del mezzo di contrasto e in tempi molto brevi (40-60s) ^{62,65}.

La **WBMRI** ha una minore sensibilità rispetto alla WBLDCT nell'identificare le lesioni osteolitiche, ma ha la maggiore sensibilità nell'evidenziare l'infiltrazione del midollo osseo (con tipico pattern focale o diffuso), visualizzabile ancora prima che si siano formate lesioni scheletriche ^{62,66}.

La MRI trova le principali indicazioni nello studio di lesioni dolorose, soprattutto localizzate alla colonna vertebrale o al bacino, l'identificazione di eventuali aree di compressione del midollo spinale o la diagnosi differenziale tra una frattura spontanea su base neoplastica e una secondaria su base osteoporotica benigna. Rispetto alla WBLDCT, i tempi di acquisizione dell'immagine sono maggiori, non può essere utilizzata in presenza di dispositivi metallici impiantati e l'uso può essere limitato in chi soffre di claustrofobia.

Il funzionamento della WBMRI si basa sull'esaminazione della composizione di acqua e grassi dei tessuti: l'infiltrazione plasmacellulare neoplastica determina un aumento della cellularità diminuendo la componente lipidica midollare, con un conseguente segnale ipointenso nelle sequenze pesate in T1 e iperintenso in quelle pesate in T2. Affinché siano evidenziabili è necessario, però, che abbiano uno spessore di almeno 5 mm. Possono essere distinti cinque pattern di infiltrazione del midollo osseo alla RM: normale, focale, diffuso, combinato focale e diffuso, e variegato o "sale e pepe." Un basso grado di infiltrazione tumorale è di solito associato ad un pattern normale o variegato, mentre un alto grado di infiltrazione è di solito sospettato quando c'è coinvolgimento focale o diffuso.

L'acquisizione delle immagini può non richiedere l'utilizzo del mezzo di contrasto, in quanto la risoluzione dell'osso alla RM è alta. Se necessario però, come nei casi dubbi di estensione extramidollare della malattia con compressione midollare o fratture patologiche, viene utilizzato il gadolinio ⁶⁵.

Un recente studio ha evidenziato come l'acquisizione di immagini pesate in diffusione (DWI) abbia la sensibilità maggiore nel rilevare sia lesioni focali (FLs) che diffuse di infiltrazione midollare ⁶⁷. La **DWI-MRI** misura il movimento delle molecole d'acqua nei tessuti: tanto maggiore è la cellularità, tanto minore è il grado di libertà delle molecole di

acqua e il segnale è pertanto ridotto. La restrizione nella diffusione delle molecole di acqua è misurata mediante il coefficiente apparente di diffusione (ADC) e tramite la DWI-MRI è possibile calcolarlo in maniera automatica e creare una mappa quantitativa di ADC del MM⁶⁸.

La PET/CT combina la capacità della PET di individuare in differenti zone del midollo osseo aree ad aumentata attività metabolica, utilizzando solitamente il fluorodesossiglucosio (¹⁸FDG) come radiotracciante, permettendo di distinguere le cellule neoplastiche (a maggiore captazione del radiofarmaco) dalle cellule benigne, e la capacità della CT di localizzarle anatomicamente.⁶⁹ La sensibilità e la specificità nel rilevare lesione ossee intramidollari vanno dall'80 al 100%⁷⁰⁻⁷³ ed è la tecnica più efficace nell'identificare eventuali sedi extramidollari di malattia.⁷⁴ Tuttavia, è da sottolineare che in un gruppo ristretto di pazienti con bassa espressione dell'esochinasi 2 (enzima implicato nel metabolismo del glucosio e quindi del suo analogo modificato ¹⁸FDG) sono possibili falsi negativi⁷⁵, per questo sono stati sviluppati nuovi traccianti PET, tra cui il principale è il ⁶⁸Ga-CXCR4⁷⁶. Numerosi studi hanno messo in luce come la presenza di malattia extramidollare, così come il numero di lesioni focali e la loro avidità nel captare il mezzo di contrasto (quantificato come SUV, *standardized uptake value*) prima del trattamento siano importanti fattori prognostici. Infatti, la presenza di più di tre lesioni captanti rappresenta un fattore di rischio indipendente che correla con ridotte PFS e OS^{71,77,78}. L'IMWG ha pubblicato un *consensus statement* al fine di interpretare correttamente la PET/CT; In particolare, sono considerate FLs le lesioni che hanno una captazione del FDG maggiore rispetto a quella del midollo osseo e del fegato e con un diametro di almeno 5mm⁶⁹. Oltre al suo ruolo primario nell'evidenziare lesioni intra ed extra midollari, è anche il *gold standard* per valutare e monitorare l'effetto della terapia (aspetto che verrà approfondito nel paragrafo dedicato alla malattia minima residua), in quanto in grado di distinguere lesioni attive da lesioni inattive^{53,79}. La PET/TC è quindi considerata la tecnica *imaging* di prima scelta per la valutazione ed il monitoraggio della risposta metabolica e dovrebbe essere eseguita in tutti i pazienti che hanno raggiunto MRD negatività dopo la terapia^{62,69}.

In considerazione del fatto che tutte queste tecniche di *imaging* hanno vantaggi e svantaggi differenti, nella pratica clinica la scelta di quale metodica utilizzare è spesso influenzata dalla loro disponibilità, dall'esperienza dei singoli centri e dalle linee guida nazionali circa la rimborsabilità. Alcune delle principali linee guida, in particolare l'European Myeloma Network (EMN)⁸⁰ e l'European Society for Medical Oncology (ESMO)⁵³, suggeriscono l'utilizzo della WBLDCT come tecnica di prima scelta per l'individuazione iniziale delle

lesioni litiche. Se la CT non ha evidenziato lesioni ossee dovrebbe essere eseguita una MRI per valutare la presenza di almeno una lesione focale (elemento che imporrebbe l'inizio della terapia)⁸¹. La PET/CT è raccomandata in caso di elevato sospetto di malattia extramidollare e nei pazienti con MM iposecernente con un normale sFLC ratio. L'*imaging* ha un ruolo centrale anche nei pazienti con MMS, secondo le linee guida IMWG, infatti, dovrebbe essere eseguita una WBLDCT in tutti questi pazienti: la rilevazione di una eventuale lesione litica, anche asintomatica, sposta la diagnosi verso un MM attivo, con necessità di trattamento immediato⁸¹.

3. STADIAZIONE E FATTORI PROGNOSTICI

Il decorso clinico nei pazienti con MM può essere estremamente eterogeneo, con una sopravvivenza ampiamente variabile, da meno di sei mesi dalla diagnosi, nelle forme più severe, a più di dieci anni; per questo motivo, si è reso necessario individuare specifici parametri che permettano di distinguere una malattia aggressiva ad alto rischio da una relativamente indolente e definire modelli prognostici in grado di predire la sopravvivenza e stimare la risposta alle terapie⁸².

La prognosi dei pazienti con mieloma multiplo è il risultato dell'interazione di fattori paziente-specifici quali età, *performance status* e comorbidità, e le caratteristiche della malattia quali lo stadio, l'aggressività e la risposta alle terapie.

3.1. Sistemi di stadiazione

Il primo sistema, introdotto nel 1975, è la **stadiazione secondo Durie e Salmon**, che si basa sulla misurazione della componente monoclonale, il livello di emoglobina, calcemia e l'estensione delle lesioni scheletriche. Sulla base di questi parametri, è possibile suddividere i pazienti in tre categorie in grado di rispecchiare una bassa, intermedia o alta massa tumorale (rispettivamente stadio I, II e III); in base alla presenza o meno di insufficienza renale, tali categorie vengono ulteriormente suddivise in sottogruppi A e B⁸³. Tale sistema attualmente non viene però più usato.

Il principale sistema di stadiazione utilizzato per determinare la prognosi dei pazienti con MM alla diagnosi è l'**International Staging System (ISS)**, introdotto nel 2005. Si tratta di un algoritmo di stratificazione del rischio che permette di definire tre stadi sulla base dei livelli di β_2 microglobulina e albumina, che si sono rivelati essere i fattori con maggiore impatto

prognostico, facilmente ottenibili e a basso costo. I livelli di $\beta 2$ microglobulina oltre a riflettere la massa tumorale e la funzione renale, possono essere legati anche ad altri fattori non ancora del tutto noti, tra cui probabilmente la funzione immunitaria. Il calo dell'albumina, invece, può riflettere gli effetti sul fegato da parte dell'IL6 prodotta dal microambiente delle plasmacellule neoplastiche.

Più nello specifico, i tre stadi sono:

- Stadio I: $\beta 2$ microglobulina sierica $<3,5\text{mg/dL}$ e albumina sierica $>3,5\text{g/dL}$
- Stadio II: non stadio I o III. Comprende due possibilità, $\beta 2$ microglobulina sierica $<3,5\text{mg/L}$ ma albumina sierica $<3,5\text{g/dL}$; o $\beta 2$ microglobulina compresa tra 3,5 e 5,5mg/L, indipendentemente dai livelli di albumina
- Stadio III: $\beta 2$ microglobulina sierica $>5,5\text{mg/L}$

Questa stadiazione ha mostrato di stratificare in modo particolarmente efficace i pazienti. Lo stadio ISS è risultato essere pari a I nel 28%, II nel 33% e III nel 39% dei casi e la mediana di sopravvivenza è risultata pari a 62 mesi, 44 mesi e 29 mesi, rispettivamente ⁸⁴.

Più recentemente all'ISS sono stati integrati ulteriori fattori prognostici, ovvero anomalie cromosomiche identificate tramite FISH e la concentrazione sierica dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH), che hanno permesso la creazione di un sistema di stadiazione più accurato e sensibile nel definire il rischio dei pazienti con MM. È nato così nel 2015 il **Revised ISS (R-ISS)**, ad oggi accettato come modello prognostico standard per i pazienti con MM.

Le anomalie cromosomiche ad alto rischio considerate nell'R-ISS sono la del(17p), la t(4;14) e la t(14;16), in quanto sono le più frequenti. Quando possibile, però, andrebbero ricercate anche la t(11;14), la t(14;20), il gain dell'1q, la delezione dell'1p e la delezione del 13q, in quanto, seppure meno frequenti, sono anch'esse associate a un rischio elevato. Inoltre, la combinazione di due alterazioni citogenetiche ad alto rischio e/o la presenza della del(17p) e mutazione di TP53 e/o l'associazione delle precedenti, definiscono il cosiddetto mieloma double hit, correlato a una prognosi particolarmente sfavorevole, con sopravvivenza libera da malattia (PFS) a 18 mesi del 35% e sopravvivenza complessiva (OS) a 18 mesi del 37%.

Elevati valori di LDH, invece, riflettono una maggiore aggressività tumorale e suggeriscono un alto grado proliferativo e/o la presenza di un elevato *burden* tumorale, in particolare di malattia extramidollare ed extraossea.

Tabella 2: Stadiazione R-ISS

Fattori prognostici		Criteri
Stadio ISS	I	$\beta 2m < 3.5 \text{ mg/l}$ e albumina sierica $\geq 3.5 \text{ g/dl}$
	II	Non soddisfatti i criteri per I o III
	III	$\beta 2m \geq 5.5 \text{ mg/l}$
Alterazioni citogenetiche (CA) in FISH	High-risk	Presenza di del(17p) e/o t(4;14) e/o t(14;16)
	Standard-risk	Non anomalie citogenetiche ad alto rischio
LDH	Normale	Livelli < limite normale di riferimento
	Alto	Livelli > limite normale di riferimento
Stratificazione del rischio secondo il modello R-ISS		
Stadio R-ISS	I	ISS I, Standard-risk CA, normali livelli di LDH
	II	Non soddisfatti i criteri per I o III
	III	ISS 3 e High-risk CA o alti livelli di LDH

L'OS a 5 anni e la PFS a 5 anni sono rispettivamente dell'82% e del 55% nei pazienti R-ISS I, del 62% e del 36% nei pazienti R-ISS II e del 40% e del 24% nei pazienti R-ISS III.⁸⁵

Tuttavia, nella pratica clinica il MM rivela la sua eterogeneità e anche questa classificazione non tiene in considerazione tutti i parametri che possono essere considerati nella definizione della prognosi e nella pianificazione di uno schema terapeutico personalizzato per ogni tipologia di paziente.

L'importanza della sFLC *ratio* nel predire la prognosi dei pazienti è stata messa in luce recentemente, tanto da essere stata inserita sia tra i criteri diagnostici di MM attivo sia tra i criteri di risposta stringente alla terapia nei casi in cui il rapporto sia fortemente alterato al *baseline* (≥ 100)^{86,87}.

Anche la presenza di plasmacellule circolanti nel sangue periferico (leucemia plasmacellulare) e la localizzazione extra-midollare di malattia sono caratteristiche rilevanti che identificano un MM ad alto rischio, entrambe indicative di una malattia aggressiva che diventa indipendente dal microambiente midollare^{88,89}.

Due aspetti molto importanti nel predire la sopravvivenza sono sicuramente rappresentati dalla risposta alla terapia di induzione e/o la ricaduta precoce e dalla presenza di specifiche anomalie citogenetiche e di caratteristici *patterns* di *gene expression*.

3.2. Prognosi

Nel MM i fattori prognostici sono numerosi, possono essere correlati direttamente alla taglia neoplastica o essere espressione dell'intrinseca malignità del clone tumorale, oppure possono dipendere dalle caratteristiche del paziente o dalla risposta alla terapia:

- fattori legati al paziente: età, *performance status*, presenza di comorbidità;
- fattori legati alla massa neoplastica: β 2-microglobulina, grado e tipo di infiltrazione midollare, funzionalità renale, numero di lesioni focali alla PET/CT o RMN;
- fattori legati a caratteri biologici: alterazioni citogenetiche, albumina, presenza di plasmacellule circolanti, attività proliferativa plasmacellulare, malattia extramidollare, LDH;
- fattori legati alla terapia: qualità della risposta.¹⁷

Quelli con maggior significato prognostico sono stati inseriti all'interno degli algoritmi di stadiazione ISS e R-ISS, ma è importante tenere in considerazione anche quelli non inclusi, in quanto, anch'essi, hanno un impatto rilevante nella determinazione della sopravvivenza di un paziente con MM.

In particolare, essendo il mieloma una patologia che più spesso colpisce il paziente anziano, l'età, le comorbidità e il *performance status* influiscono notevolmente sulla prognosi.

Al fine di valutare al meglio l'impatto di questi fattori sui singoli pazienti, per i soggetti anziani è stato elaborato dall'IMWG uno score di fragilità (*IMWG Frailty Index*), che tiene conto di età, comorbidità valutate attraverso il *Charlson comorbidity index* (CCI) e capacità di eseguire le attività della vita quotidiana, attraverso l'*activities daily life* (ADL) e l'*instrumental activities daily life* (IADL). I pazienti vengono distinti, sulla base del punteggio ottenuto, in fit (punteggio = 0), intermedi (punteggio = 1) e fragili (punteggio > 1), con una sopravvivenza a tre anni rispettivamente di 84%, 76% e 57%.

Stratificando ulteriormente questo score di fragilità con l'integrazione dello score ISS, l'OS a 3 anni è del 55% nei pazienti a rischio molto elevato, ovvero fragili ISS-3, mentre sale al 94% nei pazienti a rischio particolarmente basso, ovvero fit ISS-1⁹⁰.

3.2.1. Ruolo prognostico della citogenetica e dell'espressione genica

Lo studio citogenetico-molecolare è importante nel definire la prognosi del paziente. Sono stati identificati infatti, sulla base del profilo di espressione genica, diversi sottotipi di mieloma

che differiscono in termini di *outcome*. Questo studio viene sempre condotto all'esordio di malattia, ma andrebbe incluso anche nelle rivalutazioni da effettuarsi alla ricaduta, poiché le alterazioni possono evolvere e sommarsi nel tempo.

Come già specificato in precedenza, nella patogenesi del MM ci sono due tipi di alterazioni genetiche sequenziali definite primarie e secondarie. Le primarie, iperdiploidia e traslocazioni coinvolgenti il dominio IgH, sono già presenti negli stadi MGUS e sono coinvolte nello sviluppo del tumore; le secondarie sono alterazioni che portano alla progressione del tumore, presenti nello stadio MM e assenti nella MGUS e tra queste ci sono: la delezione 17p (p53), le alterazioni del cromosoma 1, le traslocazioni coinvolgenti C-MYC e l'attivazione NF- κ B⁹¹.

Identificare con precisione i pazienti con malattia ad alto rischio e con prognosi sfavorevole alla diagnosi, tuttavia, rimane una sfida. Infatti, nonostante siano state studiate diverse mutazioni utili per definire la prognosi, non è ancora stato definito un approccio globale in grado di integrare tali marcatori in un modello unico di stratificazione del rischio.

Walker e colleghi hanno utilizzato tecniche di sequenziamento del DNA di nuova generazione e un modello *recursive-partitioning* per identificare *markers* clinici e genetici associati ad un aumentato rischio prognostico, hanno così individuato il *Double-Hit* MM, una nuova categoria di pazienti ad alto rischio con prognosi estremamente negativa. Il *Double-Hit* MM è definito dalla presenza della mutazione bi-allelica del cromosoma TP53 associata all'amplificazione (≥ 4 copie) di CKS1B(1q21) nel contesto di uno stadio ISS3. È stato fatto un confronto tra la categoria *Double-Hit* MM (identificata dal modello *recursive-partitioning*) e la classificazione tradizionale secondo i criteri di stratificazione del rischio dell'IMWG. Da questo paragone è emerso come gli *scores* prognostici utilizzati nella pratica clinica non riescano ad individuare parte dei pazienti con *outcome* estremamente negativo; infatti, la classificazione secondo i criteri IMWG include i pazienti *Double-Hit* talora negli HR (*High-Risk*) e talora negli SR (*Standard-Risk*), nonostante questi abbiano sempre una prognosi molto negativa⁹².

Un'altra classificazione è stata proposta da Perrot e colleghi, che hanno analizzato simultaneamente l'impatto prognostico di diverse mutazioni genetiche (del(17p), t(4;14), del(1p32), ampl(1q21), trisomia dei cromosomi 3, 5 e 21) in un gruppo di pazienti con MM di nuova diagnosi. Sono state identificate sei anomalie citogenetiche clinicamente rilevanti ed è stato calcolato un indice prognostico per tutti i pazienti, all'aumentare del quale peggiora la prognosi. Sulla base di tale indice prognostico citogenetico possono essere individuate tre categorie di rischio: alto, intermedio e basso⁹³.

L'alterata espressione di singoli geni, coinvolti nella sopravvivenza e proliferazione cellulare, può avere un impatto prognostico. Queste alterazioni non vengono ricercate nella pratica clinica ma possono essere oggetto di studi sperimentali.

L'oncogene **c-MYC** è iper-espresso nella malattia in fase avanzata e determina una maggiore capacità proliferativa e minore dipendenza dal microambiente midollare, conferendo una cattiva prognosi⁹⁴.

Il *pathway***NF-kB** può risultare costitutivamente attivato a causa di mutazioni che silenziano le molecole inibitrici (TRAF3, TRAF2, CYLD) o amplificano le proteine attivatrici (NIK, CD40, TACI, LTBR); sta rivestendo sempre maggiore importanza per le sue implicazioni prognostico-terapeutiche, in considerazione dell'impiego nella pratica clinica degli inibitori del proteasoma (PIs)⁹⁵.

Infine le mutazioni N- o K-**RAS**, riscontrate frequentemente nei pazienti con t(11;14), hanno una prevalenza del 20-30% circa nel MM di nuova diagnosi e sono spesso associate ad aumento della Ciclina D1; allo stadio di MGUS, invece, l'incidenza delle mutazioni RAS è di meno del 5%, suggerendo l'ipotesi che queste mutazioni possano segnare, se non mediare, la transizione da MGUS a MM⁹⁴. È interessante notare che, analizzando separatamente l'impatto delle mutazioni di KRAS e NRAS sulla sopravvivenza, solo le mutazioni di KRAS risultano significativamente associate ad una OS e PFS più brevi ⁹⁶.

Nella pratica clinica attuale solo alcune alterazioni citogenetiche vengono prese in considerazione per la loro valenza prognostica ed hanno effettivamente un impatto nella gestione del paziente e sono quelle individuate con la tecnica FISH. Questa metodica è in grado di indagare soltanto la macrostruttura del DNA e non l'alterazione di singoli geni; sono infatti necessari ulteriori studi per definire più accuratamente le caratteristiche prognostiche della patologia.

Studi recenti si sono focalizzati su un'analisi più approfondita grazie anche all'avvento di nuove metodologie quali la GEP (*Gene Expression Profiling*), l'aCGH (*array Comparative Genomic Hybridization*), l'analisi dei polimorfismi dei singoli nucleotidi o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism array*) ed il sequenziamento del DNA di nuova generazione NGS (*Next Generation Sequencing*)⁹⁷.

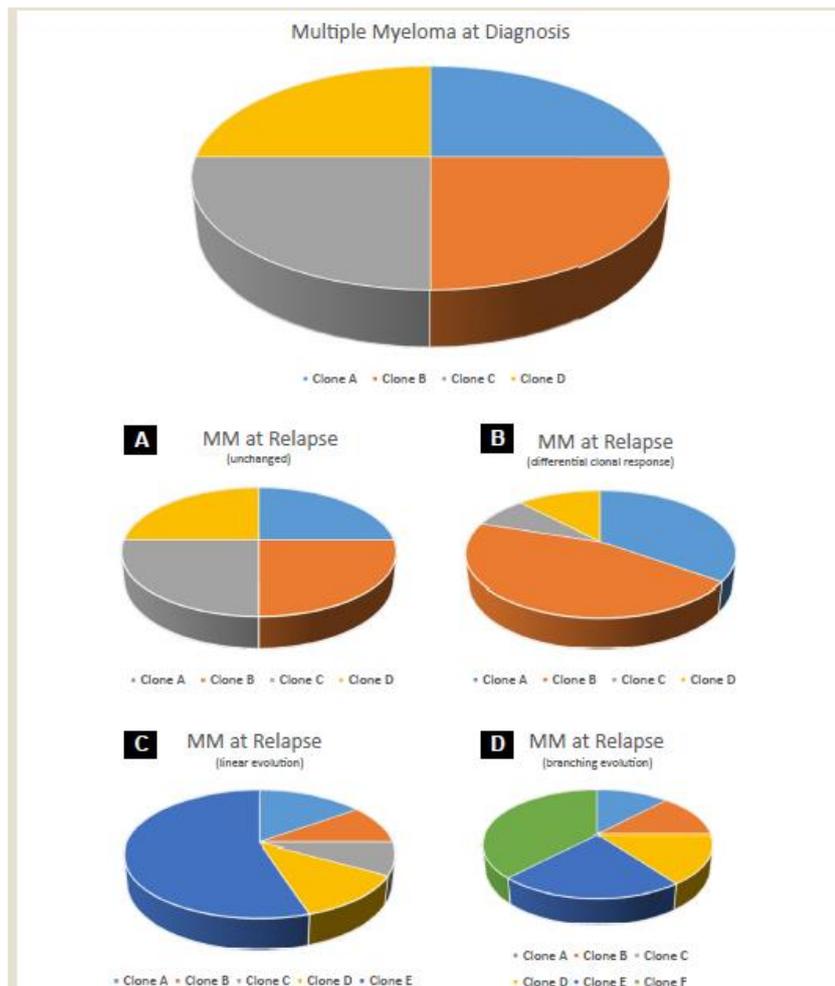
La GEP è una tecnica basata sulla tecnologia dei microarray e usata in ambito di ricerca, analizza il profilo di espressione dell'intero genoma delle cellule tumorali del paziente per creare un'immagine globale della funzione cellulare. La *University of Arkansas Medical Sciences* (UAMS) ha sviluppato il primo modello di classificazione genetica, che

comprendeva il profilo di espressione di 70 geni (GEP 70), il 30% dei quali localizzati sul cromosoma 1 (1p e 1q). Il significato prognostico del modello UAMS GEP70 è stato validato poi da diversi studi eseguiti in modo indipendente^{98,99}. La compresenza di più alterazioni a cattiva prognosi determina una riduzione della sopravvivenza; sono state studiate altre classificazioni, tra cui quella sviluppata da Boyd e colleghi nell'ambito del *trial* Myeloma IX, in cui vengono definite tre categorie di pazienti a rischio favorevole, intermedio o alto, sulla base del numero di lesioni avverse¹⁰⁰. Sebbene la GEP possa essere un potenziale metodo per la valutazione del rischio nel MM, è ancora necessario definire parametri standardizzati che ne permettano un utilizzo diffuso nella pratica clinica.

In aggiunta alla complessità genetica descritta, il MM si caratterizza per un ulteriore livello di complessità rappresentato dall'eterogeneità intra-clonale. La tecnologia NGS è stata utilizzata per studiare campioni seriali di uno stesso paziente e dimostrare come all'esordio della malattia vi sia la compresenza di differenti cloni neoplastici che, sotto la pressione selettiva della terapia, possono dare origine a linee subclonali distinte; ogni clone può estinguersi oppure dare vita a nuovi cloni che abbiano acquisito mutazioni vantaggiose^{101,102}.

Per concludere, questa eterogeneità clonale genetica ha importanti implicazioni sul trattamento nell'era delle terapie mirate ed è altrettanto importante per lo sviluppo di nuovi biomarcatori⁹⁸. La conoscenza delle alterazioni genetico-molecolari e del loro impatto sull'andamento della malattia potrà in un prossimo futuro essere utile non solo per predire la prognosi ma per guidare le scelte terapeutiche.

Figura 2: *Patterns* di relapse sulla base della evoluzione clonale.



3.2.2. Ruolo prognostico di risposta alla terapia

Avere criteri di risposta alla terapia standardizzati è fondamentale in quanto permette di confrontare l'efficacia delle diverse strategie terapeutiche a disposizione, anche in considerazione del fatto che l'approccio terapeutico ai pazienti con MM è in continua evoluzione ed è cambiato radicalmente negli ultimi anni, consentendo il raggiungimento di risposte più profonde.

Tradizionalmente si prendeva in considerazione la concentrazione di proteine monoclonali nel siero e nelle urine mediante elettroforesi proteica e/o immunofissazione, a cui sono stati aggiunti nel tempo il grado di infiltrazione di plasmacellule neoplastiche nel midollo, le lesioni ossee e gli eventuali plasmocitomi dei tessuti molli. L'ultimo aggiornamento è quello del 2016 dell'IMWG, in cui è stato inserito il dosaggio delle sFLC, utile per lo studio delle forme oligosecernenti e per le forme secernenti solo catene leggere.

Nella tabella sottostante sono riassunte le categorie di risposta standard identificate dall'IMWG:

Tabella 3: Criteri di risposta alle terapie.

Stringent Complete Response (sCR)
CR (come definita sotto) <i>più</i> FLC ratio normale <i>e</i> assenza di plasmacellule clonali nel midollo in immunistochimica o immunofluorescenza
Complete Response (CR)
Immunofissazione sierica ed urinaria negativa <i>e</i> scomparsa di qualunque plasmocitoma dei tessuti molli <i>e</i> < 5% di plasmacellule midollari. Nei pazienti in cui l'unico metodo per misurare la malattia è attraverso i livelli di sFLC la risposta completa è definita da un normale sFLCR (da 0,26 a 1,65)
Very Good Partial Response (VGPR)
CM sierica e urinaria rilevabile con immunofissazione ma non con elettroforesi <i>o</i> riduzione della CM sierica $\geq 90\%$ <i>più</i> urinaria < 100 mg/24h. Nei pazienti in cui l'unico metodo per misurare la malattia è attraverso i livelli di sFLC è definita da una diminuzione >90% nella differenza tra la catena leggera coinvolta e la catena leggera non coinvolta
Partial Response (PR)
Riduzione della CM sierica $\geq 50\%$ ed urinaria $\geq 90\%$ o <200 mg/24h <i>Se</i> la CM sierica ed urinaria non sono misurabili, è richiesta una riduzione > 50% della differenza fra i livelli di FLC coinvolte e non coinvolte <i>Se</i> la CM sierica ed urinaria e FLC non sono misurabili, è richiesta una riduzione $\geq 50\%$ delle plasmacellule midollari (purchè l'infiltrazione midollare al baseline fosse > 30%) In aggiunta ai criteri sopra elencati, è richiesta una riduzione > 50% delle dimensioni dei plasmocitomi dei tessuti molli se presenti al baseline
Stable Disease (SD)
Non soddisfatti i criteri per le altre categorie di risposta
Minimal Response (MR)
Riduzione della CM sierica $\geq 25\%$ ma < 50% e Riduzione della CM urinaria del 50-89% Se presente Plasmocitoma: riduzione della massa del 25-49% Non aumento delle dimensioni e del numero di lesioni litiche ossee (aumento della frattura da compressione non esclude risposta)
Progressive Disease (PD) †

Aumento del 25% del valore più basso raggiunto di:

- CM sierica (con aumento assoluto di almeno 500 mg/dL, o 1g/dL se la CM minima era ≥ 5 g/dL) e/o
- CM urinaria (con aumento assoluto di almeno 200 mg/24h)
- Se CM non misurabile, differenza tra le sFLC (di almeno 100 mg/dL)
- Se anche le sFLC non sono dosabili, percentuale di plasmacellule midollari (l'aumento assoluto deve essere $\geq 10\%$)

Comparsa di nuove lesioni ossee o di plasmocitoma o aumento delle lesioni preesistenti
Aumento della calcemia (Ca^{2+} sierico corretto $>11,5$ mg/dL) attribuibile unicamente al disturbo proliferativo delle plasmacellule

Note

Tutte le categorie di risposta richiedono due valutazioni consecutive. Non sono richieste indagini radiologiche per soddisfare questi criteri. Non è necessaria la conferma della risposta attraverso biopsie midollari ripetute. VGPR e CR richiedono valutazione sierica e urinaria indipendentemente dal fatto che la malattia all'inizio fosse dosabile nel siero, nelle urine, in entrambi o in nessuno dei due. Per PD un aumento di CM sierica ≥ 1 g/dL è sufficiente a definire una ricaduta se CM di partenza era ≥ 5 g/dL.

† Chiarimenti sui criteri IMWG per codificare PD: i criteri midollari devono essere usati solo nei pazienti nei quali la malattia non è misurabile con la CM sierica o urinaria o con i livelli di sFLC.

Per quanto riguarda la ricaduta, è opportuno riportare anche le seguenti precisazioni:

- ricaduta clinica in presenza di uno dei seguenti criteri:
 - indicatori diretti dell'incremento di malattia e/o di disfunzione d'organo (criteri CRAB) correlati al mieloma (questo criterio non è utilizzato per calcolare il *time to progression* o il PFS ma può essere utile nella pratica clinica);
 - sviluppo di nuovi plasmocitomi dei tessuti molli o lesioni ossee (non sono segni di progressione le fratture osteoporotiche);
 - aumento delle dimensioni di plasmocitomi preesistenti o lesioni ossee $>50\%$ (e di 1cm);
 - ipercalcemia (>11 mg/dL);
 - calo dell'emoglobina ≥ 2 g/dL non correlata alla terapia o ad altre condizioni non mieloma relate;
 - aumento della creatinina sierica >2 mg/dL dall'inizio della terapia e attribuibile al mieloma;
 - iperviscosità correlata alla CM sierica;
- ricaduta dalla CR (utilizzato solo come *end point* della sopravvivenza libera da malattia), in presenza di uno o più dei seguenti criteri:
 - ricomparsa della CM sierica all'immunofissazione o all'elettroforesi;

- presenza di una percentuale di plasmacellule midollari >5%;
- comparsa di ogni altro segno di progressione, quali nuovi plasmocitomi, lesioni ossee litiche, ipercalcemia;
- ricaduta dalla MRD negativa (utilizzato solo come *end point* della sopravvivenza libera da malattia), in presenza di uno o più dei seguenti criteri:
 - perdita dello stato di MRD negativa (evidenza di plasmacellule clonali tramite *next generation flow* (NGF) o *next generation sequencing* (NGS) o *imaging* positivo per ricorrenza del mieloma);
 - ricomparsa della CM sierica o urinaria all'immunofissazione o all'elettroforesi;
 - presenza di una percentuale di plasmacellule midollari >5%;
 - comparsa di ogni altro segno di progressione, quali nuovi plasmocitomi, lesioni ossee litiche, ipercalcemia ¹⁰³.

3.3. Malattia minima residua (MRD)

Un'ulteriore modifica, apportata nel 2016 dall'IMWG ai criteri di risposta alla terapia e che ha rappresentato una vera e propria novità nella definizione prognostica dei pazienti con MM, è stata l'introduzione della categoria di risposta con malattia minima residua negativa. Questa categoria è nata dall'evidenza che nonostante la maggior parte dei pazienti raggiungessero una remissione completa, o addirittura una remissione completa stringente, molti tendessero comunque a ricadere, a sottolineare la presenza di una quota di cellule neoplastiche persistenti, intra o extramidollari, non rilevabili mediante le tecniche standard. Infatti, è stato dimostrato che, indipendentemente dal metodo utilizzato per individuare la MRD, tra i pazienti che raggiungono una risposta completa, quelli con anche una minima MRD positiva hanno una PFS inferiore rispetto a quelli con MRD negativa. Inoltre, la MRD è una delle caratteristiche più importanti che contribuiscono al legame tra la profondità di risposta e l'OS ¹⁰³.

Numerosi studi hanno dimostrato come l'ottenimento della MRD negatività rappresenti uno dei fattori prognostici più importanti nel definire la prognosi dei pazienti; questo è stato confermato anche da una importante metanalisi, che ha valutato oltre 8000 pazienti da 25 studi. In questa metanalisi è stato dimostrato che la negatività della MRD è in grado di conferire un miglioramento della prognosi in tutti i contesti clinici (pazienti di nuova diagnosi, ricaduti/refrattari, ad alto rischio citogenetico), mentre, al contrario, mantenere una MRD positiva determina una prognosi negativa, indipendentemente da tutti i fattori di rischio standard¹⁰⁴.

Al momento non è ancora stato definito in modo adeguato quali siano i momenti più informativi e più significativi in cui valutare la MRD e in che modo essa possa influenzare le scelte terapeutiche.

Nei pazienti che non hanno ottenuto una negatività alle prime valutazioni, la MRD può negativizzarsi anche in corso di terapia di mantenimento, come dimostrato nel *trial* Myeloma XI, con un prolungamento significativo dell'*outcome* rispetto ai pazienti che rimangono persistentemente MRD positivi. Valutando il sottogruppo dei pazienti MRD positivi, è stato evidenziato anche che una quantità inferiore di malattia misurata nelle fasi di mantenimento rispetto alle fasi precedenti, correla con prognosi migliori¹⁰⁵.

Un altro aspetto importante che sta emergendo da numerosi studi è l'importanza del mantenimento nel tempo della MRD negativa, una volta ottenuta (*sustained MRD-negative*). In uno studio pubblicato dal gruppo francese è stato dimostrato che i pazienti che raggiungono e mantengono una MRD-negatività hanno una sopravvivenza significativamente più lunga rispetto ai pazienti che ottengono una MRD negatività e successivamente la perdono¹⁰⁶. Secondo i criteri IMWG di risposta, si parla di *sustained MRD-negativity* in caso di MRD negativa a livello midollare e mediante *imaging* per almeno un anno⁶⁴.

Questo aspetto sottolinea come la MRD-negatività valutata in un singolo *timepoint* potrebbe non essere adeguata a definire l'*outcome* dei pazienti, mentre una MRD mantenuta nel tempo potrebbe essere più efficace nell'identificare i pazienti a prognosi migliore. In un recente studio retrospettivo dell'Università della California è stata valutata la determinazione della MRD di 234 pazienti con MM in diverse fasi di malattia. I pazienti sono stati divisi in tre gruppi: nel primo gruppo i pazienti con MRD negativa per almeno 3 determinazioni successive, nel secondo gruppo i pazienti con MRD positiva ma progressivamente in riduzione, nel terzo i pazienti con MRD positiva stabile o in crescita nel tempo. I primi due gruppi hanno mostrato una PFS significativamente più elevata rispetto al terzo, dimostrando come sia importante non solo ottenere una MRD negativa ma anche l'andamento temporale valutato in più determinazioni successive¹⁰⁷.

Al momento sono in corso alcuni studi, detti *MRD driven*, che hanno l'obiettivo di verificare la possibilità di intensificare la terapia nei pazienti MRD positivi dopo un trattamento standard o ridurre l'intensità del trattamento nei pazienti con una MRD negativa sostenuta¹⁰⁸.

Le tecniche per la ricerca della MRD intramidollare si sono evolute nel corso degli anni raggiungendo sempre una maggiore sensibilità. Ad oggi, le metodiche più utilizzate sono l'NGF e l'NGS¹⁰³.

L'**NGF** è una tecnica citofluorimetrica automatizzata che utilizza due pannelli da otto colori per rilevare e quantificare le cellule neoplastiche: essa combina l'identificazione di antigeni di superficie delle plasmacellule aberranti (CD138, CD27, CD38, CD56, CD45, CD19, CD117, CD81, CD27, CD19) con l'analisi delle catene leggere κ e λ espresse nel citoplasma per confermarne la clonalità ¹⁰⁹. Uno dei principali svantaggi è la necessità di utilizzare un campione di midollo fresco, prelevato al massimo 24-48 ore prima ¹¹⁰. Rappresenta un'evoluzione della MFC (*Multiparameter Flow Citometry*), anch'essa una tecnica cellulare basata sugli stessi principi, rispetto alla quale, però, la NGF è più sensibile e standardizzata ¹⁰³.

L'**NGS**, invece, è una tecnica di sequenziamento genico, utilizzabile anche su campione di midollo congelato, che comprende diverse metodiche, quali la reazione a catena della polimerasi (PCR) a lungo raggio, la PCR multipla, il *whole-exome sequencing* e il *whole-genome sequencing*, permettendo il sequenziamento e l'amplificazione simultanea di milioni di frammenti di DNA. Ciò è reso possibile grazie all'utilizzo di primer multipli, in questo caso per i geni che codificano per le immunoglobuline, in particolare IGH-VDJ_H, IGH-DJ_H o IGK, determinandone la clonalità.

Il riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline espressi dalle plasmacellule tumorali è il marcatore che viene utilizzato per lo studio MRD: ha il vantaggio di essere sensibile e specifico.

Il metodo richiede due passaggi: il primo per identificare il clonotipo paziente-specifico («screening»), il secondo è il vero e proprio studio della MRD, ovvero la ricerca del clonotipo identificato nel campione di sangue midollare del paziente in risposta alla terapia.

Una delle caratteristiche importanti di questa metodica è che il clonotipo identificato non cambia in caso di progressione della malattia, al contrario di quanto può avvenire in altre patologie linfoproliferative quali la leucemia acuta linfoblastica, dove è presente un elevato rischio di evoluzione del riarrangiamento in corso di terapia, con conseguente rischio di risultati falsi negativi.

L'**NGS**, rispetto all'**NGF**, necessita di un campione alla diagnosi per identificare la sequenza tumore-specifica e i tempi di esecuzione sono più lunghi (almeno una settimana *versus* 3-4 ore), inoltre, i costi sono maggiori; l'**NGF**, d'altra parte, necessita di un campione fresco ed è una metodica operatore-dipendente. Per il resto, è stata dimostrata una buona concordanza tra le due metodiche, raggiungendo entrambe una sensibilità elevata, di 10^{-5} l'**NGF** e 10^{-6} l'**NGS** ^{103,109}.

La sensibilità raggiunta, inoltre, rappresenta un importante valore prognostico. Difatti, è stato dimostrato come i pazienti che ottengono una MRD negativa con sensibilità pari a 10^{-6} hanno una PFS maggiore rispetto a quelli che la ottengono con una sensibilità pari a 10^{-5} ¹⁰⁷.

Per una corretta valutazione della MRD a livello midollare, indipendentemente dalla tecnica utilizzata, è fondamentale la qualità del campione in analisi. Difatti, il campione ottenuto mediante aspirato midollare può essere contaminato da un'elevata quantità di cellule ematiche (emodiluizione), con una conseguente sottostima della quantità di plasmacellule clonali presenti. Per questo è molto importante che il primo campione aspirato venga utilizzato proprio per la valutazione della MRD ¹¹¹.

Tipicamente, l'infiltrazione neoplastica a livello midollare è eterogenea, valutare quindi la MRD solo sulla base di un campione prelevato in un unico punto (solitamente la cresta iliaca posteriore) può causare falsi negativi, per questo è molto importante associare la ricerca di MRD attraverso metodiche in grado di valutare la malattia al di fuori del midollo, come ad esempio metodiche di *imaging*. ^{103,112} La possibilità che vi sia una discrepanza tra il prelievo di midollo osseo e l'*imaging* è maggiore nei pazienti con plasmocitomi, in caso di ricaduta e nelle fasi tardive di malattia ¹¹³.

La principale tecnica di diagnostica strumentale utilizzata è la **PET-CT** con ¹⁸FDG, che consente di individuare eventuali residui di plasmacellule clonali attive all'interno delle lesioni ossee litiche ma soprattutto di rilevare possibili localizzazioni extramidollari di MRD ⁶⁹.

Diversi studi hanno dimostrato che i pazienti con PET-CT negativa dopo la terapia di induzione hanno un importante vantaggio in termini di PFS e OS ^{71,77,114}.

La problematica maggiore, finora, è stata quale *cut-off* di *uptake* delle lesioni residue dovesse essere utilizzato per la definizione di risposta completa metabolica. A tal proposito, è stato pubblicato nel 2020, da Zamagni e colleghi, uno studio in cui si proponeva di adottare, come criterio standardizzato di risposta completa alla PET, una captazione inferiore rispetto a quella di riferimento del fegato ¹¹⁵ e per il quale, attualmente, sono in corso studi prospettici di validazione ¹¹⁶. In particolare, è stata utilizzata la scala di Deauville (DS) a cinque punti (tabella 4), già validata per la PET nei linfomi, e ne è stata dimostrata l'applicabilità anche nel MM, con un netto vantaggio in termini di PFS e OS in caso di captazione, dopo trattamento, inferiore rispetto a quella del fegato (DS <4) ¹¹⁵.

Tabella 4. Criteri di Deauville ¹¹⁷

Punteggio	Risultato PET
1	No uptake superiore al background
2	Uptake minore o uguale a quello mediastinico
3	Uptake maggiore di quello mediastinico ma inferiore a quello epatico
4	Uptake moderatamente superiore rispetto a quello del fegato
5	Uptake notevolmente superiore rispetto a quello del fegato

Sono destinati a ricoprire un ruolo sempre più rilevante nel valutare la risposta alla terapia anche gli approcci funzionali di MRI, in particolare la **DWI-MRI**, per la quale è già stata dimostrata una elevata sensibilità e un alto valore prognostico. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, è stato condotto uno studio retrospettivo⁶⁸ con lo scopo di validare i criteri RAC (Response Assessment Category) proposti con le raccomandazioni *imaging* MY-RADS (Myeloma Response Assessment and Diagnosis System) ¹¹⁸. I criteri RAC, che consistono in una scala a 5 punti, dalla risposta completa (RAC1) fino alla progressione di malattia (RAC5), si sono dimostrati in grado di stratificare in maniera indipendente i pazienti con differenti *outcomes* ⁶⁸.

In base alle informazioni ottenute tramite NGF, NGS e *imaging*, è possibile definire la MRD come descritto nella seguente tabella:

Tabella 5: Criteri per definire la MRD (in pazienti con una risposta almeno pari alla CR)

103

MRD negativa citofluorimetrica	Assenza di plasmacellule clonali con fenotipo aberrante a livello midollare mediante NGF, utilizzando la procedura standard EuroFlow (o metodo equivalente validato), con una sensibilità minima pari o superiore a 1 su 105 cellule nucleate
MRD negativa al sequenziamento	Assenza di plasmacellule clonali a livello midollare mediante NGS ottenute dal sequenziamento del DNA midollare) utilizzando la piattaforma LymphoSIGHT (o metodo equivalente validato) con una sensibilità minima pari o superiore a 1 su 105 cellule nucleate
MRD negativa anche all'imaging	MRD-negatività mediante NGF o NGS associata alla scomparsa di ogni area di aumentata captazione del radiotracciante riscontrata alla diagnosi o ad una PET/CT precedente, con un SUV inferiore a quello riscontrato nel mediastino o nei tessuti normali
MRD negativa sostenuta	MRD negatività a livello midollare (mediante NGF o NGS o entrambi) e all'imaging, confermata per almeno 1 anno. Ulteriori valutazioni possono essere usate per specificare la durata della MRD-negatività

3.3.1. Nuove frontiere: la biopsia liquida

Come già specificato nel capitolo precedente, a causa dell'elevata eterogeneità clonale spaziale tipica del MM, la valutazione midollare “*single site*” della MRD può essere imprecisa e non completamente rappresentativa della malattia. Inoltre, la biopsia midollare è una metodica invasiva e dolorosa e non sempre accettata dai pazienti. Per questi motivi si sta rendendo sempre più importante lo sviluppo di metodiche alternative, non invasive e possibilmente più rappresentative dell'intera massa tumorale.

Una nuova tecnica che si sta sviluppando per la rilevazione della MRD è la **biopsia liquida**. Si tratta di una tecnica non invasiva che si basa sulla ricerca nel sangue periferico di particolari *markers*, come ad esempio le vescicole extracellulari, il DNA libero tumorale (ctDNA) e le cellule neoplastiche circolanti (CTCs o CMMCs). I più recenti dati della letteratura sul MM hanno posto particolare attenzione soprattutto su CTCs e ctDNA.

Le CTCs sono cellule intatte e vitali rilasciate dal midollo osseo o da sedi extramidollari. Tra i meccanismi che ne favoriscono la circolazione sembrerebbe esservi una ridotta adesione alla nicchia midollare, suggerendo un'associazione tra il loro aumento e il rischio di trasformazione maligna da MGUS a SMM fino alla malattia sintomatica, e una ridotta sopravvivenza dei pazienti con nuova diagnosi o ricaduti/refrattari. La loro rilevazione permette quindi di avere un quadro più completo circa la MRD sia midollare che extramidollare^{119,120}. È stato dimostrato come la quantità di CMMCs è in grado di correlare sia con lo stadio alla diagnosi, sia con le fasi di malattia¹²¹.

Il ctDNA, invece, è il DNA delle cellule tumorali andate incontro ad apoptosi o necrosi. Il ctDNA ha un'emivita di circa due ore, per cui, data la sua rapida eliminazione ematica, può essere considerato un ottimo indicatore del *burden* tumorale e della risposta alla terapia in tempo reale. La presenza frammenti di DNA libero circolante (*cell-free* DNA, cfDNA) è stata descritta per la prima volta nel 1948 da Mandel e Metais¹²² e nel 1977 è stata riscontrata la presenza di ctDNA nel siero di pazienti con patologia neoplastica¹²³. Recenti studi hanno dimostrato la possibilità di utilizzare questo parametro per valutare la presenza di clonalità e identificare la taglia di malattia nei pazienti con MM^{124,125}. Rispetto ad altre neoplasie, la concentrazione di ctDNA nei pazienti con MM è maggiore, e c'è un'elevata concordanza tra le mutazioni riscontrate a livello midollare e nella biopsia liquida (pari al 96% circa)^{126,127}. Inoltre, è stato dimostrato che elevati livelli di cfDNA correlano con una peggiore prognosi nei pazienti con MM¹²⁸. Alcuni studi hanno anche dimostrato che i livelli ctDNA correlano con lo stadio ISS e R-ISS, la β 2-microglobulina, e l'LDH^{129,130}. Monitorando i livelli di ctDNA in corso di terapia è stato visto che questo parametro tende a subire un'importante riduzione, fino a raggiungere livelli inferiori alla soglia di rilevabilità nel 32.6% e nel 47.6% dei pazienti dopo terapia di induzione e ASCT, rispettivamente¹³¹.

Il cfDNA può essere utilizzato anche nei pazienti con SMM, nei quali una minor taglia di malattia corrisponde a più bassi livelli di ctDNA e a un minor numero di mutazioni¹³².

Questa metodica può assumere un ruolo ancora più importante nei pazienti con malattia extramidollare, nei quali, in considerazione dell'indipendenza delle plasmacellule clonali dal microambiente midollare, l'aspirato del midollo è ancora meno attendibile per una corretta valutazione dello stato di malattia. Secondo quanto riportato recentemente dal gruppo Cinese, nei pazienti con EMD i livelli di cfDNA risultano essere significativamente superiori rispetto ai pazienti senza malattia extramidollare. In questi pazienti, il ctDNA ha mostrato una forte concordanza con le biopsie tissutali di plasmocitoma extramidollare acquisite nello stesso momento, dimostrandosi un buon surrogato di valutazione della taglia di malattia al posto

delle biopsie tissutali; l'aspirato midollare, invece, come atteso, non si è dimostrato adeguato a causa dell'elevata discordanza con la biopsia tissutale ¹²⁵.

Tuttavia, questo parametro è ancora molto sperimentale perché non è ancora chiaro quanti marcatori sia necessario valutare per avere una sensibilità accettabile e quali siano i *time-point* più strategici per la ottenere le informazioni più importanti dal punto di vista prognostico ^{130,133}.

Nonostante l'elevata specificità, le mutazioni nel ctDNA sono infatti specifiche per ogni forma di neoplasia, la biopsia liquida ha ancora una sensibilità non adeguata e un'assenza di criteri universali per l'interpretazione che non ne consentono, ad oggi, l'utilizzo quale tecnica standard per lo studio della MRD ¹²⁰.

Un ulteriore strumento che potrebbe essere utile nella valutazione della MRD e quindi del suo impatto sulla PFS e OS è la **spettrometria di massa**. Essa è in grado di rilevare bassi livelli di CM, riconoscendo la sequenza della regione legante l'antigene (CRD), unica per ciascun clone plasmacellulare. Questa tecnica potrebbe svolgere un ruolo nel determinare lo stato dell'MRD, determinando il *timing* appropriato per l'aspirato midollare o rilevare la presenza di una ricaduta precoce. Inoltre, presenta una migliore specificità rispetto alle tecniche attuali, permettendo la distinzione tra la CM e gli anticorpi monoclonali terapeutici, è stata infatti già validata come alternativa all'utilizzo di immunofissazione ed elettroforesi sieriche sia nella pratica clinica che nel contesto di studi clinici ¹³⁴.

4. TERAPIA

Il trattamento del MM è stato rivoluzionato nel corso degli ultimi decenni: sebbene si consideri ancora oggi una patologia inguaribile, l'aspettativa di vita dei pazienti è significativamente aumentata rispetto al passato. I primi risultati nella terapia del Mieloma Multiplo si sono avuti negli anni '50-'60, con l'introduzione dei farmaci alchilanti (Melphalan e Ciclofosfamide), delle nitrosouree, degli alcaloidi della Vinca (Vincristina) e delle antracicline (Doxorubicina). La chemioterapia intermittente per via orale con Melphalan/Prednisone è stata per lungo tempo il trattamento di riferimento per il mieloma multiplo. Essa è in grado di indurre una risposta in circa la metà dei pazienti, ma solo nel 5-10% determina una remissione completa, con una durata media di 1-2 anni. Diversi studi cercarono di migliorare i risultati ottenuti con questo schema attraverso lo sviluppo di nuovi programmi terapeutici che impiegavano associazioni chemioterapiche, tra le quali: VBMCP (Vincristina, Carmustina, Melphalan, Ciclofosfamide e Prednisone), BMCP (Carmustina, Melphalan, Ciclofosfamide e Prednisone) e VAD (Vincristina, Adriamicina, Desametasone). Queste erano scarsamente efficaci nell'eradicare la malattia, inoltre le cellule neoplastiche sviluppavano precocemente meccanismi di resistenza ai farmaci¹³⁵.

Agli inizi degli anni '80 si è assistito ad un netto miglioramento nella sopravvivenza di pazienti affetti da MM, a seguito dell'introduzione della chemioterapia con Melphalan ad alte dosi con successivo trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (ASCT). A metà degli anni '90, con il tentativo di migliorare ulteriormente il controllo della malattia, venne poi introdotto il concetto di "doppio trapianto autologo", cioè l'esecuzione sequenziale di due ASCT, con l'ottenimento di un prolungamento significativo della durata della remissione e della sopravvivenza libera da eventi (EFS), soprattutto in quei pazienti per cui non c'era stata risposta a chemioterapie convenzionali di prima linea e/o non avevano raggiunto remissione completa dopo trapianto autologo. Diversi studi hanno documentato la superiorità del trapianto autologo rispetto alla chemioterapia tradizionale in termini di percentuale e durata della risposta ed esso rappresenta tuttora la principale terapia di prima linea per pazienti con MM ed età inferiore a 65-70 anni. Il trapianto allogenico di cellule staminali da donatore familiare o da registro è, invece, meno utilizzato nel MM ed è riservato a pazienti molto giovani con presentazione aggressiva di malattia alla diagnosi (alto rischio citogenetico, leucemia plasmacellulare e malattia extramidollare) in quanto gravato da un'elevata tossicità, non garantendo in ogni caso la guarigione.

La vera rivoluzione nella terapia del MM è avvenuta però nelle ultime decadi, con l'introduzione dei cosiddetti "nuovi farmaci" (*novel agents*): farmaci non chemioterapici, in

grado di esercitare la propria attività oltre che sulle cellule neoplastiche, anche sull'interazione di queste con le cellule del microambiente midollare, interferendo con processi cruciali ai fini della crescita e progressione del tumore¹³⁶.

Tali farmaci possono essere suddivisi nelle seguenti categorie:

- Immunomodulatori (IMiDs): il primo farmaco di questa categoria fu la Talidomide, seguita poi da Lenalidomide e Pomalidomide;
- inibitori del proteasoma (PIs): il capostipite è il Bortezomib, a seguire sono stati sviluppati Carfilzomib e Ixazomib;
- anticorpi monoclonali, quali Daratumumab, Isatuximab (anti CD-38) e Elotuzumab (anti-SLAMF7);
- anticorpi monoclonali farmaco-coniugati, quali Belantamab-mafodotin (anti-BCMA coniugato a monometilauristatinaF, MMAF)
- Anticorpi bispecifici (o BIspecific T cell Engagers, BiTes), quali Teclistamab, Elranatamab (anti BCMA-CD3), Talquetamab (anti GPRC5D-CD3), Cevostamab (FcRH5-CD3)
- Cellule CAR-T anti-BCMA

Ulteriori classi di farmaci studiati nel MM, ma che non hanno ancora trovato spazio nella pratica clinica:

- inibitori dell'istone deacetilasi (HDACIs), alcuni dei quali sono approvati FDA e EMA nell'ambito del paziente ricaduto/refrattario;
- inibitori del *check-point* immunitario, i quali appartengono alle famiglie dei PD1 e PDL1 inibitori, non ancora ufficialmente entrati nella pratica clinica¹³⁷;
- inibitori di bcl-2 (Venetoclax);
- inibitori di XPO1 (Selinexor).

Il proteasoma è una struttura cellulare deputata alla degradazione delle proteine ubiquitinate mal-ripiegate o al termine del loro ciclo funzionale (es. cicline). Gli inibitori del proteasoma bloccano la funzione di questa struttura dalla quale le plasmacellule sono particolarmente dipendenti a causa dell'elevata sintesi proteica, portando ad un accumulo di proteine mal-ripiegate, all'arresto del ciclo cellulare e all'induzione dell'apoptosi¹³⁸.

Gli immunomodulatori esercitano una attività anti-angiogenetica, immunostimolante e anti-proliferativa diretta nei confronti delle plasmacellule, attraverso meccanismi molecolari solo in parte chiariti. Essi legano e attivano cereblon, una ubiquitina-ligasi, portando alla

ubiquitinazione e alla degradazione dei fattori trascrizionali Ikaros (IKZF1) e Aiolos (IKZF3), essenziali per la differenziazione terminale dei linfociti. La degradazione di Ikaros e Aiolos risulta nell'arresto della crescita cellulare delle cellule mielomatose, così come nell'attivazione dei linfociti T, nei quali viene stimolata la produzione di IL2 (il promotore del gene dell'IL2 è inibito da IKZF3, la sua degradazione porta all'attivazione del promotore e alla sintesi di IL2) ¹³⁹.

Gli anticorpi monoclonali riconoscono e legano target espressi sulla superficie delle plasmacellule e attraverso la loro porzione effettrice inducono la citotossicità complemento-dipendente (CDC), la citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC)¹⁴⁰ mediata dai linfociti NK, e la fagocitosi anticorpo-dipendente (ADCP) mediata dai macrofagi ¹⁴¹

Queste 3 classi di farmaci sono combinate assieme ai corticosteroidi (desametasone, prednisone) nella terapia di prima linea, sia nel paziente eleggibile a trapianto autologo che non, e nella terapia del paziente con mieloma multiplo ricaduto-refrattario.

Ad esse si aggiungono le altre classi di farmaci sopra citate, tra cui le nuove immunoterapie, usate attualmente soprattutto nel setting del mieloma ricaduto-refrattario.

4.1. TERAPIA DI PRIMA LINEA

Secondo le indicazioni dell'IMWG, quando viene posta la diagnosi di mieloma attivo per la presenza di danno d'organo (CRAB) o almeno uno dei cosiddetti MDE (*Myeloma Defining Events*: infiltrato plasmacellulare $\geq 60\%$, sFLC ratio ≥ 100 , e/o 2 o più lesioni focali identificate alla RMN), è consigliabile iniziare subito la terapia²⁹.

Gli obiettivi del trattamento sono il controllo della patologia e l'ottenimento di una risposta più profonda possibile, associati al miglioramento della qualità della vita e della sopravvivenza. Questi risultati si possono ottenere mediante la combinazione di trattamenti efficaci con una adeguata terapia di supporto. Il tipo di trattamento viene scelto sulla base delle caratteristiche del paziente (età, comorbidità, *performance status*) e delle evidenze disponibili¹:

- i pazienti giovani ($\leq 65-70$ anni) e senza rilevanti comorbidità sono candidati ad ASCT, preceduto da un regime di induzione (generalmente 4 cicli) comprensivo di “nuovi farmaci” (associati o meno a chemioterapia) e seguito da un'eventuale terapia di consolidamento e da un mantenimento post-trapianto;
- i pazienti di età superiore a 70 anni e quelli che per altri motivi non sono candidabili al trapianto autologo, sono candidati a terapie con nuovi farmaci, associati o meno alla chemioterapia convenzionale;

- i pazienti di età compresa tra i 65 e 70 anni vanno valutati singolarmente: se hanno una buona funzionalità d'organo e assenza di problematiche respiratorie vengono considerati *fit* e quindi candidabili al trapianto.

Alla ricaduta, vengono impiegate le combinazioni di farmaci disponibili, alternando le classi di farmaci, o applicati protocolli sperimentali con nuove molecole/combinazioni.

4.1.1. Pazienti candidabili a trapianto autologo (ASCT)

La terapia di prima linea nei pazienti con di età $\leq 65-70$ anni senza importanti comorbidità è incentrata sulla chemioterapia ad alte dosi (HDT, high dose chemotherapy) seguita da trapianto autologo di cellule staminali. Il farmaco chemioterapico usato a dosi mieloablativa è il Melfalan (200 mg/mq), agente alchilante, mentre la reinfusione delle cellule staminali non ha un valore anti-mieloma, ma serve unicamente ad accorciare il periodo di pancitopenia severa che segue la chemioterapia mieloablativa al fine di ridurre la tossicità.

Nonostante l'avvento di nuovi farmaci, l'ASCT rimane al giorno d'oggi un punto fermo della terapia di prima linea, in quanto si associa a un prolungamento significativo della PFS, come dimostrato da due studi randomizzati ^{142,143}.

Il primo lavoro (IFM 2009 Study) ¹⁴², condotto dal gruppo francese, ha incluso circa 700 pazienti, trattati con 3 cicli di Bortezomib-Lenalidomide-Desametasone (VRd) e successivamente randomizzati a ricevere o 5 cicli VRd di consolidamento senza trapianto oppure ASCT seguito da altri 2 cicli addizionali di VRd. Entrambi i gruppi ricevevano in seguito terapia di mantenimento con lenalidomide per 1 anno. A un follow-up mediano di circa 4 anni, la PFS mediana è risultata superiore nel gruppo ASCT (50 mesi vs 35 mesi; $p < 0.001$) e questo beneficio si è osservato in tutti i sottogruppi inclusi i pazienti con R-ISS alto e citogenetica sfavorevole. La OS a 4 anni invece non è risultata significativamente diversa tra i due gruppi (81-82%).

Il secondo lavoro (EMN02-HO95) ¹⁴³ del gruppo europeo, ha incluso circa 1500 pazienti, che hanno ricevuto una terapia di induzione con 3-4 cicli di Bortezomib-Ciclofosfamide-Desametasone (VCd) seguiti da una prima randomizzazione tra Bortezomib-Melfalan-Prednisone (VMP) vs ASCT, e una seconda randomizzazione tra 2 cicli di consolidamento VRd vs non consolidamento e infine terapia di mantenimento con lenalidomide fino a progressione o tossicità inaccettabile per entrambi i bracci.

A un follow-up mediano di 60.3 mesi dalla prima randomizzazione, la PFS mediana è risultata significativamente superiore nel braccio con trapianto autologo (56.7 vs 41.9 mesi; $p = 0.0001$).

Sulla base di queste evidenze, le linee-guida EHA-ESMO 2021 raccomandano che i pazienti con mieloma multiplo di nuova diagnosi (NDMM), con <70 anni e senza significative comorbidità, siano candidati a una terapia di induzione, seguita da chemioterapia ad alte dosi (HDT) e trapianto autologo (ASCT), e lenalidomide di mantenimento.

Nel paziente candidabile a trapianto autologo, quindi, la terapia si compone di 4 fasi:

- Induzione
- ASCT
- Consolidamento
- Mantenimento.

Terapia di induzione

Alcuni studi hanno sancito la superiorità dei regimi a tre farmaci rispetto ai regimi a due farmaci, e inoltre una metanalisi di Sonneveld e colleghi, che ha valutato i risultati di tre studi europei, ha determinato la superiorità in termini di risposta, PFS e OS^{144,145}. Per questi motivi, la terapia di induzione, fino al 2020, si basava su una tripletta di farmaci comprensiva di bortezomib.¹⁴⁴

In Italia e in Europa la prima scelta era rappresentata da Bortezomib-Talidomide-Desametasone (**VTd**) e la seconda da Bortezomib-Ciclofosfamide-Desametasone (**VCd**), in quanto la combinazione VTd si era dimostrata più efficace rispetto al VCd in termini di risposta, con minore tossicità ematologica ma a spese di una maggior tasso di neuropatia periferica¹⁴⁶. In considerazione del rischio trombotico legato a talidomide, inoltre, lo schema VCd era impiegato nei pazienti con elevato rischio, o nei pazienti che sviluppavano neuropatia severa in corso dei primi cicli di VTd.

Anche la combinazione Bortezomib, Lenalidomide e Desametasone (**VRD**) è stata ampiamente indagata. In un importante *trial* randomizzato di fase III condotto da Attal e colleghi, dove i pazienti ricevevano terapia di induzione secondo schema VRD seguita o meno da trapianto e consolidamento sempre con VRD, ne è stata confermata l'efficacia¹⁴². Rosinol e colleghi hanno condotto un'analisi integrata di più studi con l'obiettivo di mettere a confronto le triplette VRD e VTD nella terapia di induzione; i risultati hanno evidenziato una minore tossicità, a fronte di una risposta uguale o superiore, dello schema VRD¹⁴⁷.

Un altro farmaco studiato per la terapia di induzione è il **Carfilzomib**; diversi *trials* ne hanno sperimentato l'impiego in associazione con ImiDs o Ciclofosfamide¹⁴⁸⁻¹⁵⁰; i risultati

attualmente disponibili dimostrano che regimi di induzione a base di Carfilzomib sono assai efficaci e ben tollerati, ma sono necessari altri studi, di fase III, per confermare tali dati.

Nello studio di fase II FORTE, Gay e colleghi stanno valutando e mettendo a confronto tre trattamenti di prima linea *Carfilzomib-based*: il primo prevede Carfilzomib, Lenalidomide, Desametasone (**KRd**) seguito da ASCT e consolidamento con KRd, il secondo una terapia di 12 cicli con KRd e il terzo induzione con Carfilzomib, Ciclofosfamide, Desametasone (**KCd**), ASCT e consolidamento con KCd; in seguito ad un *follow-up* di 12 mesi i risultati, in termini di sCR e MRD negatività, hanno dimostrato una superiorità dei due regimi con Carfilzomib e Lenalidomide rispetto a KCd-ASCT-KCd¹⁵¹.

Data l'efficacia degli anticorpi monoclonali nel setting ricaduto/refrattario, questi sono stati testati anche in prima linea cambiando di recente il paradigma di trattamento del NDMM.

In particolare, il *trial* di fase III CASSIOPEIA ha sancito un nuovo *gold standard* nella terapia di induzione pre-trapianto: la combinazione a 4 farmaci Daratumumab-Bortezomib-Talidomide-Desametasone (**DaraVTd**). Nello studio CASSIOPEIA 1085 pazienti in 111 centri europei sono stati arruolati e randomizzati 1:1 a ricevere 4 cicli di DaraVTd vs 4 cicli di VTd come terapia di induzione pre ASCT (seguiti da 2 cicli di consolidamento post ASCT) e a 100 giorni dal trapianto il tasso di remissioni complete e remissioni complete stringenti è risultato significativamente superiore nel braccio con il Daratumumab (39% vs 26%). La PFS a 18 mesi è risultata anche essa migliorata significativamente dal regime a 4 farmaci (93% DaraVTd vs 85% VTd, $p < 0.0001$)¹⁵².

I dati favorevoli di questo studio hanno portato all'approvazione da parte dell'EMA (Agenzia Europea dei Medicinali) e dell'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) del Daratumumab in associazione a Bortezomib-Talidomide-Desametasone nel trattamento di prima linea dei pazienti con NDMM eleggibili a trapianto autologo, e questo rappresenta al 2022 il *gold standard* in Italia.

Ci sono ulteriori *trial* in corso che hanno l'obiettivo di valutare quale sia il miglior regime di induzione in termini di efficacia e tossicità prima del trapianto autologo.

Tra questi, l'EMN17 (PERSEUS), uno studio randomizzato di fase III che sta indagando combinazione Daratumumab, Bortezomib, Lenalidomide, Desametasone (**Dara-VRd**), i cui risultati preliminari mostrano come il profilo di tossicità Dara-VRD sia in linea con quelli di Daratumumab e VRD e come tale combinazione sia risultata particolarmente promettente¹⁵³

Mobilizzazione delle cellule staminali emopoietiche e ASCT

La fase di induzione è seguita, nei pazienti che ottengono almeno una risposta parziale, dalla mobilizzazione delle cellule staminali autologhe da sangue periferico (PBSC), usando come fattore di mobilizzazione il G-CSF preceduto generalmente da una chemioterapia citoriduttiva e mobilizzante a base di Ciclofosfamide 2-3 g/m². Nei pazienti che hanno fallito la mobilizzazione è disponibile, in associazione a G-CSF, anche l'utilizzo di Plerixafor, un nuovo farmaco che agisce antagonizzando CXCR4 sulle CSE e impedendo quindi il legame tra CXCR4 e SDF1.

La chemioterapia mieloablattiva del trapianto autologo prevede l'utilizzo di Melfalan 200 mg/m².

Tentativi di migliorarne l'efficacia con l'aggiunta del busulfano o del bortezomib non si sono tradotti in un beneficio sulla sopravvivenza. Lavori precedenti l'epoca dei nuovi farmaci avevano dimostrato la superiorità del doppio trapianto autologo rispetto al trapianto singolo in termini di sopravvivenza libera da recidiva, soprattutto nei pazienti che avevano fallito l'ottenimento di una risposta di elevata qualità (CR o VGPR) dopo il primo trapianto autologo^{154,155}. Il ruolo del secondo trapianto autologo è stato quindi indagato anche in seguito all'avvento dei nuovi farmaci. Nello studio EMN02, nei centri che seguivano la policy del doppio ASCT, i pazienti sono stati assegnati a ricevere o VMP o un singolo ASCT (ASCT-1) o un doppio ASCT (ASCT 2, a circa 3 mesi di distanza) per paragonare in maniera prospettica il trapianto singolo vs doppio. È emerso che i pazienti che ricevevano un doppio ASCT avevano una prolungata PFS rispetto a quelli che ricevevano un trapianto singolo (probabilità di PFS a 3 anni 53.5% vs 44.9%, p=0.036) e, dato rilevante, il doppio trapianto migliorava l'*outcome* dei pazienti con citogenetica ad alto rischio (PFS mediana 46 vs 26.7 mesi, p=0.062, HR 0.59). Dallo stesso lavoro è emerso anche un beneficio sulla OS derivante dal doppio trapianto (a 3 anni: 89% versus 82%; HR 0.52; P=0.011), anche nei pazienti con stadio ISS avanzato e citogenetica sfavorevole¹⁵⁶. Nella metanalisi pubblicata da Sonneveld e colleghi, nei pazienti sottoposti a due ASCT dopo regimi comprensivi di Bortezomib è stato dimostrato un incremento della PFS e dell'OS, soprattutto nel sottogruppo di pazienti ad alto rischio citogenetico e che non avevano ottenuto almeno una CR al termine dell'induzione¹⁵⁷. Nello studio StaMINA, i pazienti venivano randomizzati a ricevere singolo ASCT *versus* singolo ASCT seguito da terapia di consolidamento con Lenalidomide-Bortezomib-Desametasone (VRD) *versus* doppio ASCT; tutti e tre i bracci venivano seguiti da terapia di mantenimento con Lenalidomide. In questo studio i pazienti venivano arruolati dopo aver eseguito una

terapia di induzione, che poteva essere quindi di vario genere e durata (fino a 12 mesi). I risultati di questo studio dopo un *follow up* mediano di 38 mesi non hanno mostrato alcuna differenza in termini di *outcome* tra i tre gruppi, riportando una PFS pari a 53.9% vs 57.8% vs 58.5% rispettivamente, e una OS stimata pari a 83.7% vs 85.4% vs 81.8%. Nel valutare questi dati, però, bisogna tenere in considerazione il fatto che i regimi di induzione potevano essere molto variabili, rendendo questo studio difficilmente confrontabile con il *trial* EMN02/HO95. Allo stesso tempo, nello studio StaMINA una grossa percentuale di pazienti aveva ricevuto un regime di induzione comprensivo di IMiDs, in particolare il 55% dei pazienti aveva ricevuto VRD, mentre nello studio EMN02/HO95 la terapia di precedente al trapianto era costituita da VCD, per cui si potrebbe ipotizzare che l'utilizzo *up-front* di un regime più efficace e comprensivo di IMiDs possa non determinare un vantaggio nel secondo trapianto autologo¹⁵⁸. Tutti questi risultati, tuttavia, risultano ancora preliminari, e non consentono di prendere una posizione univoca nei confronti del doppio trapianto autologo; inoltre, non ci sono dati sul beneficio di un doppio ASCT con l'uso delle quadruplette in prima linea. In base ai dati attualmente a disposizione, si può prendere in considerazione di effettuare un secondo ASCT, a distanza di 3-6 mesi dal primo, nei pazienti che presentano un alto rischio alla diagnosi.

Terapia di consolidamento

La fase di consolidamento, che inizia circa 2-3 mesi dopo il trapianto autologo, si basa in genere sulla stessa combinazione di farmaci usata in induzione.

Lo studio EMN02/H095 ha mostrato un beneficio sulla PFS derivante dal consolidamento; al follow up mediano di 42 mesi, la terapia di consolidamento con 2 cicli VRd migliorava la PFS mediana rispetto al braccio senza consolidamento (58.9 vs 45.5 mesi, $p=0.014$). È necessario sottolineare però che la terapia di induzione in questo studio era basata su 4 cicli di VCd e non VRd o DaraVTd come avviene nella pratica clinica attuale¹⁴³.

Anche nel disegno dello studio CASSIOPEIA era prevista una fase di consolidamento post ASCT con 2 cicli di Dara-VTd e pertanto la pratica clinica attuale è di somministrare 2 cicli di consolidamento Dara-VTd post ASCT ai pazienti che hanno ricevuto 4 cicli di induzione Dara-VTd.

Terapia di mantenimento

Nei pazienti che ottengono almeno una risposta parziale, la fase finale della terapia di prima linea è il mantenimento con lenalidomide (unico farmaco approvato in Italia per questa

indicazione) fino a progressione o tossicità inaccettabile. La terapia di mantenimento con lenalidomide offre un vantaggio rispetto al placebo in termini di sopravvivenza libera da progressione e globale, come dimostrato in 2 grandi *trials* randomizzati^{160,161}

I principali effetti collaterali della lenalidomide sono le citopenie, la diarrea e l'aumentato rischio trombotico. Le citopenie, in particolare la neutropenia e la piastrinopenia, vengono gestite attraverso una riduzione del dosaggio ed eventualmente il ricorso alla stimolazione con fattore di crescita granulocitario (G-CSF) e raramente portano alla sospensione del farmaco. La diarrea, cronica, da malassorbimento dei sali biliari, può essere un effetto collaterale invalidante per la qualità di vita del paziente e spesso rappresenta la causa per cui il trattamento viene interrotto.

4.1.2. Pazienti non candidabili a trapianto autologo (ASCT)

Anche nel paziente non eleggibile a trapianto, l'avvento degli anticorpi monoclonali, e in particolare del Daratumumab ha significativamente migliorato l'efficacia delle combinazioni terapeutiche disponibili.

Fino a qualche anno (2019) fa i regimi terapeutici standard per il paziente con NDMM non eleggibile ad ASCT erano costituiti dalle associazioni Bortezomib-Melfalan-Prednisone (**VMP**), terapia a durata fissa di 9 cicli, o Lenalidomide-Desametasone (**Rd**), terapia continuativa fino a progressione o tossicità inaccettabile.

La tripletta VMP era stata valutata nello studio di fase III "VISTA" e si era dimostrata superiore in termini di efficacia alla storica terapia del mieloma nell'anziano basata sulla doppietta melfalan-prednisone, consentendo di ottenere risposte più profonde e durature e un prolungamento sia della PFS che della OS (a 3 anni 68.5% versus 54.0%)¹⁶²

La doppietta Lenalidomide-desametasone fino a progressione o tossicità inaccettabile era invece risultata superiore, in termini di PFS e OS, sia alla combinazione MPT (Melfalan-Prednisone-Talidomide) che alla stessa Lenalidomide-Desametasone ma per una durata fissa di 18 cicli¹⁶³.

In seguito, sono stati pubblicati diversi *trial* di fase III che hanno permesso di ampliare l'armamentario terapeutico con combinazioni più efficaci. Un *trial* di fase III (SWOG S0777) ha confrontato la combinazione **VRd** (Bortezomib-Lenalidomide-Desametasone) vs Rd in circa 500 pazienti con NDMM, dimostrando una superiorità del regime a 3 farmaci in termini di PFS (PFS mediana 41 mesi vs 29 mesi, p=0.003) e OS (OS mediana NR vs 69 mesi; p=0.0114)¹⁶⁴.

In base a questi risultati la tripletta VRd è stata approvata dall'EMA nell'aprile 2019 per il trattamento dei pazienti con MM di nuova diagnosi non eleggibili ad ASCT.

Più recentemente 2 *trials* di fase III hanno valutato l'aggiunta del Daratumumab alle combinazioni standard VMP ed Rd in prima linea.

Il *trial* di fase III ALCYONE ha confrontato, in maniera randomizzata, la tripletta VMP x 9 cicli da sola con la quadrupletta **Daratumumab-VMP** x 9 cicli seguiti da mantenimento mensile con Daratumumab fino a progressione. La PFS è risultata significativamente migliore nel braccio sperimentale con Daratumumab (PFS a 18 mesi pari a 71.6% vs 50.2%, HR 0.50, $p < 0.001$), con una tossicità ematologica simile e un lieve aumento del tasso di infezioni¹⁶⁵

Un'analisi successiva dello stesso studio, a un follow up mediano di 40 mesi, ha documentato un beneficio anche in termini di sopravvivenza globale (OS stimata a 36 mesi 78% con DaraVMP vs 67.9% con VMP) e ha confermato la prolungata PFS (PFS mediana 36.4 vs 19.3 mesi per DaraVMP e VMP rispettivamente), senza aumento significativo della tossicità¹⁶⁶.

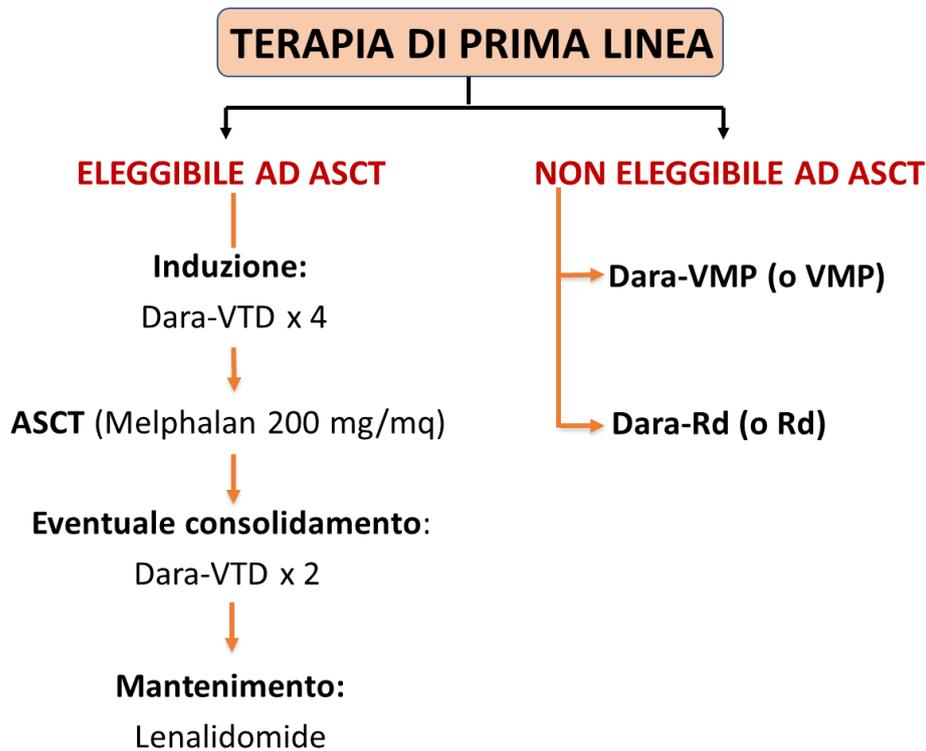
Analogamente è stato condotto un *trial* randomizzato, MAIA, il quale ha confrontato il trattamento standard con lenalidomide e desametasone con il trattamento sperimentale con Daratumumab, Lenalidomide, Desametasone (**DaraRd**), entrambi somministrati fino a progressione o tossicità inaccettabile. Anche in questo caso l'aggiunta del Daratumumab si è tradotta in un netto beneficio sulla PFS (PFS stimata a 30 mesi 70.6% vs 55.6%, HR 0.56, $p < 0.001$)¹⁶⁷. L'aggiornamento dei dati ad un follow-up mediano di 56.2 mesi ha confermato il prolungamento della PFS derivante dall'aggiunta del Daratumumab (PFS mediana non raggiunta NR nel gruppo Dara vs 34.4 mesi nel braccio standard, HR 0.53, $p < 0.0001$). La OS mediana non è stata raggiunta in nessuno dei due gruppi di trattamento. Non sono emerse particolari tossicità aggiuntive, eccetto un maggior tasso di neutropenia nel braccio sperimentale¹⁶⁸.

Sulla base di queste evidenze favorevoli, anche le combinazioni Daratumumab-VMP e DaraRd sono state approvate dall'EMA (ottobre 2019) e successivamente dall'AIFA nel trattamento dei pazienti con mieloma di nuova diagnosi non candidabili a trapianto autologo e rappresentano ad oggi le combinazioni più utilizzate nella pratica clinica.

In considerazione dei dati emersi dalla letteratura, le linee-guida EHA-ESMO 2021 raccomandano come standard of care (IA) le combinazioni DaraRd, DaraVMP e VRd (quest'ultima non disponibile in Italia in quanto non approvata AIFA).

Nei pazienti anziani, fragili, difficili da mobilitare la terapia Lenalidomide-Desametasone, con farmaci assunti per os a domicilio, rappresenta una valida alternativa.⁵³

Figura 3: Trattamento del Mieloma Multiplo di nuova diagnosi al 2022



4.2. TERAPIA DEL MIELOMA MULTIPLO RICADUTO-REFRATTARIO (RRMM)

Nonostante l'introduzione dei "nuovi farmaci" abbia incrementato notevolmente la qualità della risposta e la durata della remissione, la storia naturale del MM continua ad essere caratterizzata da inevitabile ripresa di attività della malattia, che entra nella fase definita ricaduta/refrattaria, con una progressiva insorgenza di resistenze ai trattamenti farmacologici.

Per MM refrattario si intende una malattia che non ha presentato almeno una risposta parziale a 3 o più cicli di terapia anti-mieloma o che è progredita entro 60 giorni dall'ultimo trattamento. Per MM ricaduto si intende un MM precedentemente trattato che richiede una nuova terapia di salvataggio dopo un intervallo di remissione parziale o completa di almeno 60 giorni¹.

In presenza di una ricaduta/progressione solo laboratoristica senza criteri di danno d'organo criteri (CRAB o slim-CRAB), il paziente viene seguito con una stretta osservazione nei primi mesi e il nuovo trattamento viene iniziato quando c'è un aumento rapido o significativo dei parametri laboratoristici di malattia, o alla comparsa di segni molto iniziali di danno d'organo

(quali riduzione dei livelli sierici di emoglobina o comparsa di lesioni focali alla PET o alla risonanza magnetica).

Nel mieloma ricaduto/refrattario (RRMM) è importante scegliere la strategia terapeutica migliore fra le diverse disponibili, tenendo in considerazione tutti i fattori malattia-relati, tra i quali: qualità e durata della risposta alla precedente terapia, presenza di anomalie citogenetiche come t(4;14), del(17p) o ampl(1q21), caratteristiche cliniche di alto rischio della ricaduta e presenza di eventuali tossicità residue dopo la precedente terapia, con particolare attenzione alla persistenza di neuropatia periferica, trombosi recidivanti e citopenia¹⁶⁹.

Come terapia di salvataggio è possibile eseguire *re-treatment* con la stessa molecola utilizzata nel precedente schema di trattamento, oppure di scegliere tra le numerose strategie terapeutiche disponibili, e, in alcuni casi, il trapianto autologo di salvataggio.

Fino al 2015, lo *standard of care* per i pazienti con RRMM dopo almeno una prima linea era rappresentato dalla combinazione del bortezomib o della lenalidomide con il desametasone (**Vd** e **Rd** rispettivamente).

Tra il 2015 e il 2016 sono stati pubblicati diversi studi di fase III, prospettici randomizzati, che hanno dimostrato la superiorità rispetto alla doppietta Rd di uno schema a 3 farmaci comprendente il *backbone* Rd e un terzo agente rappresentato da un anticorpo monoclonale: Elotuzumab (anti-SLAMF7, Elo)^{170,171}, Daratumumab (anti-CD38, Dara)^{172,173}, o un inibitore del proteasoma di nuova generazione: Carfilzomib (K)¹⁷⁴ o Ixazomib (Ixa)¹⁷⁵.

Come riassunto nella tabella 6, tutti gli studi hanno dimostrato una superiore efficacia, sia in termini di ORR che di PFS mediana, senza un aumento significativo della tossicità, delle triplette **EloRd**, **DaraRd**, **KRd** e **IxaRd**. Per le combinazioni con Elotuzumab e Carfilzomib è riportato un beneficio anche sulla OS, mentre non è stato dimostrato con l'Ixazomib (per il Daratumumab non ci sono ancora dati maturi). La mediana di linee precedenti era di 2 per Elo-Rd e KRd e di 1 per DaraRd.

Tabella 6: principali dati di sopravvivenza e di risposta degli studi ELOQUENT-2, ASPIRE, TOURMALINE e POLLUX.

	ELOQUENT-2 ELO-Rd vs Rd,	ASPIRE KRd vs Rd	TOURMALINE Ixa-Rd vs Rd	POLLUX Dara-Rd vs Rd
PFS mediana (mesi)	19.4 vs 14.9 HR 0.72, p=0.0005	26.3 vs 17.6 HR 0.69, p=0.0001	20.6 vs 14.7 HR 0.74 p=0.01	44.5 vs 17.5 HR 0.44 p<0.0001
OS mediana (mesi o %)	48.3m vs 39.6m HR 0.82, p=0.04	73.3% vs 65% @ 24m HR 0.79, p=0.04	NR	65% vs 57% @ 42 m
ORR (%)	79% vs 66%	87.1% vs 66.7%	78% vs 72%	92.9% vs 76.4%
Pz esposti a Lenalidomide (%)	5%-6%	19%	12%	18%

Dara: daratumumab, Elo: elotuzumab, HR: hazard ratio, Ixa: ixazomib, K: carfilzomib, NR: non raggiunta, ORR: *overall response rate*, OS: *overall survival*, PFS: *progression free survival*, pz: pazienti, Rd: lenalidomide-desametasone

Sulla base di queste evidenze, le linee-guida EHA-ESMO 2021, raccomandano come terapia di 2^a linea uno tra questi schemi Rd-based nei pazienti che in prima linea hanno ricevuto una terapia bortezomib-based senza lenalidomide e senza daratumumab (es. VMP o VTD/VCD+ASCT).

Considerando sia la PFS mediana sia l'Hazard Ratio, la combinazione con il daratumumab sembra essere la più efficace (con i limiti di una comparazione tra studi diversi su popolazioni differenti) e, anche in considerazione della buona tolleranza e della facilità di somministrazione (il daratumumab è mensile dopo i primi 6 mesi e da poco è disponibile la formulazione sottocutanea, mentre elotuzumab e carfilzomib sono disponibili unicamente per via endovenosa) è di fatto la combinazione di scelta e più utilizzata nella pratica clinica.

La limitazione principale di queste combinazioni è che la maggior parte dei pazienti candidabili a trapianto riceve la lenalidomide di mantenimento e molti pazienti *unfit* per trapianto vengono trattati in prima linea con lo schema Dara-Rd, rendendo di fatto sempre più numerosa la popolazione di pazienti che progredisce in corso di terapia con lenalidomide, ossia la popolazione di pazienti "Lenalidomide-refrattari".

Al di fuori dei *trials* clinici, le opzioni terapeutiche per i pazienti lenalidomide-refrattari erano rappresentate fino al 2019 dalle combinazioni **Kd** (Carfilzomib-Desametasone) e **DaraVd** (Daratumumab-Bortezomib-Desametasone), preferite al Vd (Bortezomib-Desametasone) sulla base di due trial randomizzati, ENDEAVOR¹⁷⁶ e CASTOR¹⁷⁷ rispettivamente, che ne avevano dimostrato la superiorità in termini di PFS rispetto al Vd (18.7 vs 9.4 nel Kd vs Vd e 16.7 vs 7.1 nel DaraVd vs Vd). Va sottolineato che questi studi erano

per pazienti con RRMM, esposti a una mediana di 2 linee precedenti di terapia, e non rivolti nello specifico alla popolazione dei refrattari alla lenalidomide. Una analisi per sottogruppi del CASTOR ha riportato una PFS mediana di soli 7.8 mesi con DaraVd (vs 4.9 mesi con Vd) nei pazienti refrattari alla lenalidomide ¹⁷⁸.

Negli ultimi 3 anni sono stati pubblicati 3 *trials* di fase III, rivolti a pazienti già esposti ed eventualmente refrattari alla lenalidomide, che hanno dato risultati incoraggianti, configurandosi come nuove opzioni terapeutiche di scelta in questo nel setting, al di fuori dei *trial* clinici.

Il primo studio, OPTIMISM ha confrontato, in maniera randomizzata, la tripletta Pomalidomide-Velcade-Desametasone (**PVd**) con la doppietta Vd. I pazienti arruolati avevano ricevuto una mediana di 2 linee precedenti di terapia, tutti erano stati già esposti alla lenalidomide e circa il 70% era lenalidomide-refrattario. La combinazione con la pomalidomide è risultata superiore con una PFS mediana di 11.2 mesi vs 7.1 mesi per la combinazione Vd, a spese di un aumentato tasso di neutropenia. Nella popolazione di pazienti refrattari alla lenalidomide, la PFS mediana è stata 9.5 mesi vs 5.6 mesi, e nei pazienti lenalidomide-refrattari che ricevevano PVd (o Vd) in seconda linea la PFS mediana è stata di 17.8 mesi vs 9.5 mesi ¹⁷⁹. Sulla base dei risultati incoraggianti di questo, studio la combinazione PVd è stata approvata dall'EMA nel 2019.

Gli altri 2 studi hanno valutato la doppietta Kd (Carfilzomib-Desametasone) o in associazione ad un anti-CD38, ovvero Daratumumab nello studio CANDOR ed Isatuximab nello studio IKEMA.

Nello studio multicentrico di fase III CANDOR, 466 pazienti, con una mediana di 2 linee precedenti di terapia (range 1-3), sono stati randomizzati (2:1) a ricevere **DaraKd** vs Kd e ad un follow-up mediano di circa 17 mesi la PFS mediana è risultata non raggiunta nel gruppo DaraKd vs 15.8 mesi nel braccio standard Kd (HR 0.63; P=0.0027), senza aumentare in maniera significativa la tossicità. È da sottolineare che la combinazione DaraKd è risultata superiore in termini di PFS anche nei pazienti esposti (HR 0.52) o refrattari alla lenalidomide (HR 0.45). Questa combinazione non è ancora approvata in Italia ¹⁸⁰.

Nello studio multicentrico di fase III IKEMA, 302 pazienti, con una mediana di 2 linee precedenti di terapia (range 1-3), sono stati randomizzati (3:2) a ricevere la terapia sperimentale Isatuximab-Carfilzomib-Desametasone (**IsaKd**) vs terapia standard Carfilzomib-Desametasone (Kd), con risultati simili: anche in questo caso, con un follow-up mediano di 20.7 mesi, la PFS mediana è stata non raggiunta nel braccio IsaKd vs 19.15 mesi nel gruppo di controllo (HR 0.53, p=0.0007), senza un incremento significativo degli eventi

avversi severi. In questo studio circa 1/3 dei pazienti era refrattario alla lenalidomide, 1/3 era refrattario al bortezomib e il 20% circa era refrattario ad entrambi. L'analisi per sottogruppi ha confermato il vantaggio di IsaKd rispetto a Kd anche nei pazienti refrattari a lenalidomide (HR 0.6) ¹⁸¹.

Sulla base dei dati favorevoli dello studio IKEMA, nel gennaio 2022 l'AIFA ha approvato la combinazione Isatuximab-Carfilzomib-Desametasone per il trattamento di pazienti adulti con mieloma multiplo che hanno ricevuto almeno una terapia precedente.

Le linee guida ESMO-EHA2021 raccomandano come terapia per i pazienti lenalidomide-refrattari: Pvd, DaraKd, IsaKd. Le combinazioni Dara-Kd e Isa-Kd possono essere utilizzate anche nei pazienti refrattari al bortezomib; come già specificato, al momento in Italia è possibile utilizzare solo la seconda combinazione.

Nelle ricadute successive alla prima (terza linea e oltre di terapia) valgono considerazioni analoghe a quelle fatte in precedenza per la scelta del regime terapeutico da impiegare, è intuibile che in questo contesto il determinante principale diventa la sensibilità/refrattarietà ai trattamenti precedenti e le opzioni terapeutiche potenzialmente efficaci diminuiscono.

In particolare, per i pazienti che sono stati esposti o sono refrattari sia al bortezomib che alla lenalidomide (doppi-refattari, *double-refractory*) ma che non hanno ricevuto un anti-CD38, le combinazioni IsaKd e DaraKd (laddove approvato) sono ancora scelte possibili (questa popolazione era rappresentata negli studi CANDOR e IKEMA).

A queste si aggiungono, dalla terza linea in poi, le combinazioni basate sull'associazione di un anticorpo monoclonale alla doppietta pomalidomide-desametasone: EloPd (Elotuzumab-Pomalidomide-desametasone), DaraPd (Daratumumab-Pomalidomide-desametasone) ed IsaPd (Isatuximab-Pomalidomide-Desametasone); in Italia sono disponibili EloPd ed IsaPd ma non DaraPd.

La combinazione **EloPd** è stata testata nello studio di fase II ELOQUENT-3, rivolto a pazienti con RRMM refrattari sia alla lenalidomide che a un inibitore del proteasoma, che sono stati randomizzati a ricevere EloPd vs Pd. Ad un follow-up di 9.1 mesi, la PFS mediana è risultata superiore nel braccio sperimentale con Elotuzumab (10.3 mesi vs 4.7 mesi, HR 0.54, p=0.008) ¹⁸².

L'Elotuzumab è stato quindi approvato dall'EMA, anche in associazione con pomalidomide e desametasone per il trattamento di pazienti adulti con mieloma multiplo recidivato e refrattario che hanno ricevuto almeno due linee di terapia precedenti comprendenti

lenalidomide e un inibitore del proteasoma e con progressione della malattia durante l'ultima terapia.

L'associazione **IsaPd** è stata invece valutata nello studio ICARIA, randomizzato (1:1), multicentrico di fase III, in cui sono stati inclusi 307 pazienti con RRMM, esposti ad almeno 2 linee precedenti di terapia comprendenti lenalidomide ed un inibitore del proteasoma e refrattari a lenalidomide e agli inibitori del proteasoma, da soli o in combinazione. A un follow-up mediano di 35.3 mesi, la PFS mediana è stata 11.1 mesi nel braccio IsaPd vs 5.9 mesi nel braccio standard Pd (HR 0.60, $p < 0.0001$); anche l'OS mediana è risultata significativamente superiore nel braccio con isatuximab, pari a 24.6 mesi versus 17.7 mesi (HR 0.76, $p = 0.028$). Da questo studio erano esclusi i pazienti refrattari ad un anti-CD38.¹⁸³

Sulla base di questi dati favorevoli, nel 2022 anche la combinazione IsaPd è stata approvata dall'EMA (e dall'AIFA), per il trattamento di pazienti adulti con mieloma multiplo recidivato e refrattario che hanno ricevuto almeno due terapie precedenti, tra cui lenalidomide e un inibitore del proteasoma, e con progressione della malattia durante l'ultima terapia.

La combinazione **DaraPd** ha invece ottenuto l'approvazione FDA per i pazienti che hanno fallito ≥ 2 linee precedenti di terapia, comprensive della lenalidomide e di un inibitore del proteasoma, sulla base di uno studio non randomizzato di fase II¹⁸⁴. Recentemente sono stati pubblicati i primi risultati dello studio di fase III APOLLO, multicentrico, randomizzato (1:1), di confronto tra la tripletta DaraPd e la doppietta Pd. Lo studio ha incluso pazienti che avessero ricevuto almeno una linea di terapia precedente, comprendente lenalidomide e un inibitore del proteasoma, e che in caso di 1 sola linea fossero refrattari alla lenalidomide, mentre sono stati esclusi i pazienti esposti in precedenza ad un anti-CD38. A un follow-up mediano di 16.9 mesi, la PFS mediana è stata 12.4 mesi nel braccio DaraPd vs 6.9 mesi nel gruppo Pd (HR 0.63)¹⁸⁵. Sia nell'IKEMA che nell'APOLLO non erano inclusi pazienti esposti ad un anti-CD38, mentre nell'ICARIA non erano inclusi pazienti refrattari all'anti-CD38.

Sulla base dei dati sopra riportati, le combinazioni Elo-Pd, Isa-Pd, e (laddove approvata) Dara-Pd, rappresentano dei regimi terapeutici testati ed efficaci nei pazienti con RRMM *double-refractory* (refrattari alla lenalidomide e a un inibitore del proteasoma).

TRIPLO-REFRATTARI E PENTA-REFRATTARI

I pazienti che diventano refrattari a un inibitore del proteasoma, un immunomodulante e un anti-CD38, cioè le 3 principali classi di farmaci utilizzate nel trattamento del MM, sono definiti "triplo-refrattari" (*triple-refractory*) e rappresentano una popolazione difficile da trattare e una sfida terapeutica aperta, con un *outcome* sfavorevole. Ancor più complessa, e

dai risultati spesso deludenti, è la terapia dei pazienti “penta-refrattari” cioè i pazienti refrattari a bortezomib, carfilzomib, lenalidomide, pomalidomide e daratumumab.

I due principali filoni di ricerca si sono concentrati sulla ricerca di nuovi meccanismi d’azione intracellulari e sulla ricerca di nuovi target espressi sulla superficie delle plasmacellule.

Il primo ha portato alla sperimentazione del **Selinexor**, un inibitore dell’esportina, (XPO-1), una proteina che trasporta altre proteine tra il nucleo e il citoplasma, la cui inibizione farmaco-mediata trattiene proteine con funzione di oncosoppressori nel nucleo. Selinexor è stato testato nella popolazione di pazienti triplo-refrattari nello studio STORM, in associazione al desametasone, e ha consentito di ottenere una ORR del 26%, con una durata mediana di 4.4 mesi, una PFS mediana di 3.7 mesi e una OS mediana di 8.6 mesi. L’efficacia è risultata essere modesta, ma è necessario sottolineare che il 68% dei pazienti di questo studio erano anche penta-refrattari e pesantemente pretrattati (mediana di 7 linee precedenti). La tossicità extraematologica principale è risultata essere quella gastrointestinale (nausea, vomito, alterazioni dell’alvo)¹⁸⁶. Selinexor è stato approvato dall’EMA (non ancora dall’AIFA) in associazione a desametasone per il trattamento del mieloma multiplo in pazienti adulti sottoposti ad almeno quattro terapie precedenti e la cui malattia è refrattaria ad almeno due inibitori del proteasoma, a due agenti immunomodulatori e a un anticorpo monoclonale anti-CD38, che abbiano dimostrato progressione di malattia durante l’ultima terapia.

La ricerca di nuovi target si è invece concentrata su marcatori espressi selettivamente dalle plasmacellule, tra i quali è stata rivolta particolare attenzione a BCMA (*B cell maturation antigen*), un recettore extracellulare, espresso quasi esclusivamente dalle plasmacellule sia normali che mielomatose.

Il primo agente anti-BCMA, introdotto nella pratica clinica è **Belantamab Mafodotin**. Si tratta di un immuno-coniugato ossia un anticorpo monoclonale anti-BCMA, legato a una tossina, la monometil-auristatina F (MMAF) che viene veicolata selettivamente alle cellule bersaglio dalla porzione anticorpale e ne induce la morte cellulare per apoptosi, per interferenza con l’assemblaggio dei microtubuli. Lo studio DREAMM-2 ha mostrato una risposta in circa il 30% dei pazienti e una PFS mediana di circa 3-4 mesi (2 coorti), anche in questo caso (come per il Selinexor) in pazienti esposti a una mediana di 7 linee precedenti, tutti *triple-refractory* e per la maggior parte anche *penta-refractory*. La tossicità principale del Belantamab, oltre a quella ematologica (soprattutto piastrinopenia) è una cherato-congiuntivite secca, per cui i pazienti vengono sottoposti a controlli oftalmologici regolari¹⁸⁷. Recentemente, nel luglio 2022, il Belantamab ha ottenuto l’approvazione dall’AIFA come

monoterapia per il trattamento del mieloma multiplo nei pazienti adulti che hanno ricevuto almeno quattro terapie precedenti e la cui malattia risulta refrattaria ad almeno un inibitore del proteasoma, un agente immunomodulatore e un anticorpo monoclonale anti-CD38, e che hanno mostrato progressione della malattia durante l'ultima terapia.

Nel trattamento dei pazienti triplo- e penta-refrattari i risultati più incoraggianti si sono avuti con i linfociti CAR-T (*Chimeric Antigen Receptors T cells*) anti-BCMA¹⁸⁸ e gli anticorpi bispecifici o BiTEs (Bispecific T Cell Engagers).

Le cellule **CAR-T** sono cellule T autologhe o allogeniche progettate geneticamente per esprimere un recettore chimerico specifico per un antigene associato al tumore espresso sulla superficie cellulare neoplastica. I recettori CARs sono proteine di fusione artificiali e comprendono un dominio extracellulare di riconoscimento dell'antigene (scFv) e un dominio intracellulare di *T-cell signaling*; a sua volta, il dominio intracellulare comprende una porzione di attivazione (CD3Zeta) del linfocito T ingegnerizzato e una porzione di co-stimolazione (CD28, 4-1BB, OX40). Le cellule T prelevate, in seguito a coltura e proliferazione, vengono modificate geneticamente tramite sistemi retrovirali o lentivirali o transposomici per esprimere il recettore CAR. Questi linfociti ingegnerizzati, le CAR-Ts, vengono poi reinfusi nel paziente previa somministrazione di una chemioterapia linfo-depletiva (in genere Ciclofosfamide e Fludarabina). Questo trattamento è però spesso gravato da un'importante tossicità, in genere legata alla sindrome da rilascio citochinico (CRS) o ad una sintomatologia neurologica. L'incontro tra CAR-Ts e l'antigene specifico espresso dalle cellule tumorali determina una massiccia attivazione T linfocitaria, con elevato rilascio di IL-6 e IFN- γ , provocando ipotensione, iperpiressia, tachicardia, fino allo shock. La CRS va gestita rapidamente e può essere trattata con un antagonista del recettore dell'IL-6, Tocilizumab, e corticosteroidi¹⁸⁹. Sono state sperimentate CAR-Ts dirette contro diversi antigeni, ma in questo momento nel MM sono in fase avanzata di sperimentazione quelle dirette contro l'antigene BCMA (*B-cell maturation antigen*) o CD269, il quale non è espresso dalle cellule staminali ematopoietiche e dai tessuti sani ma solo dalle plasmacellule. È stato condotto da Raje e colleghi uno studio di fase I che si è posto come *end point* primario la valutazione della sicurezza della terapia con CAR-Ts diretti contro l'antigene BCMA, sono stati arruolati in tale studio pazienti con MMRR che avevano ricevuto almeno tre precedenti linee di terapia. Nei primi 33 pazienti trattati, la tossicità ematologica è stata il più comune effetto avverso di grado III osservato, tra cui neutropenia (85%), leucopenia (58%), anemia (45%) e trombocitopenia (45%); la CRS è stata osservata nel 76% dei pazienti, la tossicità neurologica nel 42%. Il *rate* di risposta è stato dell'85%, con l'ottenimento di una CR nel 45%

dei pazienti, la PFS media di 11,8 mesi. Tutti i pazienti che avevano avuto una risposta e in cui è stato possibile valutare l'MRD si sono dimostrati MRD-negativi^{190,191}. Un ulteriore studio di fase I condotto da Cohen e colleghi ha testato l'utilizzo di CAR-Ts diretti contro l'antigene BCMA; come effetti avversi sono stati osservati CRS e neurotossicità di grado 3 e 4 nel 32% e 12% dei pazienti rispettivamente. Un paziente è deceduto al giorno 24 per candidosi e progressione del MM, in seguito al trattamento per CRS ed encefalopatia. È stata osservata una riduzione dell'espressione di BCMA nelle cellule mielomatose residue dei pazienti che hanno risposto alla terapia e, al contrario, un loro incremento alla progressione. La terapia si è dimostrata efficace in pazienti trattati con diverse precedenti linee di terapia¹⁹². Per concludere, l'utilizzo dei CAR-Ts risulta essere estremamente promettente, e in futuro sarà necessario effettuare studi di fase III, valutarne l'impiego anche in fasi meno avanzate di malattia, per esempio in pazienti ad alto rischio o con ricadute precoci dopo le prime linee di terapia, e testare CARTs diretti verso differenti antigeni.

Gli **anticorpi bispecifici** hanno mostrato ottimi risultati sia in termini di risposte profonde, con tassi di risposte globali (ORR) variabili dal 65% al 79%, sia in termini di sicurezza con limitata tossicità^{193,194}. La caratteristica degli anticorpi bispecifici è la doppia specificità antigenica, in modo da favorire l'interazione cellula-cellula; il loro meccanismo d'azione si basa sul legame tra l'antigene CD3, espresso dai linfociti T del paziente ed un antigene di superficie espresso dalle cellule neoplastiche mielomatose, creando una sinapsi immunologica. Questa interazione cellulare porta all'attivazione delle cellule T, le quali rilasciano sostanze citotossiche, tra cui il granzima B e le perforine, che, a loro volta, portano all'attivazione della cascata apoptica all'interno delle PC neoplastiche e, di conseguenza, alla morte cellulare.

Gli anticorpi bispecifici ad oggi sviluppati e studiati sono diretti sia contro il BCMA (Teclistamab, Elranatamab)¹⁹³, sia contro nuovi target, quali GPRC5D¹⁹¹ (Talquetamab) e FcRH5 (Cevostamab).

5. RAZIONALE DELLO STUDIO

Una condizione che caratterizza il Mieloma Multiplo e le altre discrasie plasmacellulari è quella di presentare una elevata eterogeneità intraclonale. I diversi cloni, che presentano differenti anomalie genomiche, competono tra di loro per le risorse limitate del microambiente midollare, il quale svolge un ruolo cruciale nel supporto della crescita tumorale, nell'acquisizione di meccanismi di resistenza all'apoptosi e nella farmacoresistenza. Tali subcloni presentano un'eterogeneità genomica spaziale, che tende a modificarsi con l'evoluzione del Mieloma Multiplo¹⁹⁵. Il MM è considerato ancora oggi una patologia incurabile, e la sua storia naturale è caratterizzata dall'alternanza di periodi di remissione seguiti inevitabilmente da ricaduta di malattia. Negli ultimi 15 anni il trattamento del MM è stato rivoluzionato, aumentando significativamente l'aspettativa di vita dei pazienti, grazie all'introduzione dei *novel agents*, ovvero nuove classi di farmaci che agiscono sui subcloni nel loro microambiente midollare. In considerazione della loro efficacia, tali farmaci sono stati combinati tra di loro, determinando un drammatico miglioramento del *rate* di risposte alle terapie e della loro profondità, fino a portare all'ottenimento di una negatività della malattia minima residua (MRD) a livello del midollo osseo, valutato con aspirato "single site" testato con *next generation flow cytometry* (NGF) o tecniche di sequenziamento (NGS), e a livello osseo o extramidollare, valutato con la diagnostica per immagini. La necessità di ricercare la MRD è nata dall'evidenza che nonostante la maggior parte dei pazienti raggiungessero una remissione completa, o addirittura una risposta completa stringente, molti tendessero comunque a ricadere, a sottolineare la presenza di una quota di cellule neoplastiche persistenti, intra o extramidollari, non rilevabili mediante le tecniche standard.

Determinare una negatività della MRD dentro e fuori dal midollo è attualmente considerato il più potente predittore di un *outcome* favorevole a lungo termine, e probabilmente rappresenterà la principale guida alle scelte terapeutiche in un prossimo futuro. La valutazione mediante aspirato midollare "single site", però, presenta alcuni limiti, tra cui il fatto che si tratti di una manovra invasiva e che possa non essere rappresentativo della reale massa neoplastica, considerando la nota eterogeneità spaziale che caratterizza il MM. Sulla base di questo, attualmente sono in corso numerose ricerche volte ad esplorare metodi alternativi per testare la malattia minima residua nel MM. Queste tecniche, per poter essere utilizzate con questo scopo, devono essere semplici, facilmente ripetibili, affidabili, e in grado di rappresentare l'eterogeneità spaziale. Una strategia potenzialmente promettente, ma ancora scarsamente esplorata nel Mieloma Multiplo, è rappresentata dalla biopsia liquida (o *liquid biopsy*). Tale tecnica sarebbe potenzialmente in grado di superare un'eventuale discordanza

tra campioni tissutali (come la biopsia midollare) e di ridurre la necessità di eseguire esami invasivi. La fattibilità di tale tecnica nel Mieloma Multiplo è già stata precedentemente dimostrata, ma il suo ruolo nel determinare l'MRD rimane ancora poco indagato. L'obiettivo del presente progetto è stato quello di valutare il ruolo della biopsia liquida nel caratterizzare la malattia alla diagnosi da un punto di vista qualitativo e quantitativo e nell'identificare la presenza di una malattia minima residua, mettendola a confronto con le metodiche attualmente validate, ovvero la biopsia midollare e le metodiche di *imaging* quali la PET-CT.

6. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il presente studio si pone l'obiettivo di fornire i fondamenti per impostare una strategia diagnostica innovativa e non invasiva per monitorare la MRD, basata sull'impiego di biopsie liquide. Lo studio include pazienti di nuova diagnosi, sia con Mieloma Multiplo attivo, che con HR-SMM (MM *smouldering* ad alto rischio), come definito dall'International Myeloma Working Group¹⁹⁶.

OBIETTIVI PRIMARI

- Verificare la fattibilità di una metodica di monitoraggio innovativa e non invasiva: la biopsia liquida.

OBIETTIVI SECONDARI

- Monitorare la taglia di malattia nel midollo e nel sangue periferico
- Migliorare la conoscenza delle caratteristiche del MM tramite informazioni qualitative e quantitative

7. DISEGNO DELLO STUDIO

Il presente è uno studio prospettico interventistico che prevede la raccolta di campioni biologici e dati clinici nell'ambito del progetto di ricerca AIRC IG2018 dal titolo "StreamMMing: the dynamics of Multiple Myeloma minimal residual disease in the peripheral blood stream". Il progetto si divide in tre fasi: una descrittiva, una applicativa ed una analitica.

- Nella fase descrittiva sono stati identificati i pazienti con MM attivo di nuova diagnosi candidati ad un trattamento di prima linea comprensivo di chemioterapia ad alte dosi, e con

MM *smouldering* ad alto rischio candidati unicamente a monitoraggio clinico. Per definire la malattia dal punto di vista qualitativo e quantitativo al momento dell'ingresso nello studio, è stato prelevato sia il midollo che il sangue periferico, per valutare il numero di sequenze di geni delle catene pesanti delle immunoglobuline monoclonali specifiche (IgH), da utilizzare come riferimento comparativo per il monitoraggio successivo della malattia residua. La quota di malattia è stata definita in ciascun paziente mediante le seguenti analisi:

- analisi molecolare del riarrangiamento del gene delle IgH eseguendo uno screening mediante *Next Generation Sequencing* (NGS) del clone midollare
- stimando la frazione tumorale di cfDNA (DNA libero circolante) valutando la presenza di alterazioni del numero di copie (CNA) all'interno di cfDNA, valutato mediante *Ultra Low Pass Whole Genome Sequencing* (ULP-WGS).

- Nella fase applicativa ci si è concentrati sulla valutazione dell'evoluzione dinamica delle cellule patologiche, correlata o meno al trattamento, sia nel midollo che nel flusso sanguigno, monitorando i pazienti identificati nella prima fase. Tutti i pazienti con MM attivo inclusi nella prima fase sono stati monitorati longitudinalmente sia in corso di induzione e intensificazione, sia in corso di terapia di mantenimento, con lo scopo di identificare la strategia più affidabile per rilevare la malattia residua nel midollo e nel sangue periferico, e per identificare i *timepoints* più informativi per la valutazione della MRD. Questi pazienti sono stati sottoposti a prelievo di sangue periferico ogni mese e biopsia midollare prima del trapianto autologo di cellule staminali, prima della terapia di mantenimento, e successivamente ogni 6 mesi fino a progressione; nei pazienti che non sono stati sottoposti ad ASCT è stata eseguita una biopsia midollare ogni 6 mesi fino a progressione. Per quanto riguarda i pazienti con HR-SMM, è stato intrapreso un monitoraggio ogni tre mesi sul sangue periferico per indagare l'utilizzo della biopsia liquida eseguita in modo seriato per prevedere la progressione a MM. Il monitoraggio della frazione tumorale di cfDNA è avvenuto mediante ULP-WGS, il monitoraggio su biopsia midollare è avvenuto mediante analisi NGS del gene delle IgH, utilizzando il marcatore paziente-specifico identificato al *baseline*.

- La fase analitica prevedeva l'integrazione dei risultati derivati dalle precedenti fasi al fine di valutare la presenza di una concordanza generale tra le due diverse biopsie (ovvero BM o PB), oppure una significativa discordanza. Riscontrare una concordanza generale potrebbe supportare l'impiego di solo una delle due tecniche, e in questo caso la *liquid biopsy* potrebbe essere favorita in considerazione della maggior fattibilità e minor invasività; in caso

di discordanza tra i risultati si potrebbe pensare alla necessità di integrare i due tipi di indagini, che potrebbero dimostrarsi complementari e insieme fornire una valutazione più completa del quadro della malattia del singolo paziente.

8. MATERIALI E METODI

8.1. CRITERI DI ELEGGIBILITÀ

I criteri di inclusione erano i seguenti:

1. Pazienti con MM attivo
 - Età ≥ 18 anni;
 - MM attivo di nuova diagnosi e mai trattato precedentemente;
 - MM sintomatico⁸¹ e misurabile agli esami di laboratorio (CM sierica $\geq 0.5-1$ g/dL o urinaria ≥ 200 mg/24 ore o rapporto delle catene leggere libere sieriche sbilanciato con catena coinvolta >100 mg/L);
 - Karnofsky performance status maggiore o uguale a 60% o ECOG minore o uguale a 2;
2. Pazienti con HR-SMM
 - Età ≥ 18 anni;
 - SMM di nuova diagnosi mai trattato precedentemente
 - Assenza di criteri di sintomaticità secondo la definizione dell'IMWG del 2014⁸¹
 - SMM ad alto rischio secondo la definizione dell'IMWG del 2020³³

8.2. CRITERI DI ESCLUSIONE

- Pazienti non in grado di comprendere e firmare il Consenso Informato;
- Diagnosi di Amiloidosi AL o leucemia plasmacellulare;
- Positività per HIV o epatite A attiva, o infezione da epatite B o C;
- Plasmacellule $< 3\%$ a livello midollare, valutate con citometria a flusso (per assicurare la raccolta di campioni di buona qualità);

8.3. CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA

La risposta al trattamento viene valutata mediante i criteri dell'International Myeloma Working Group (IMWG) aggiornati da Kumar e Colleghi⁶⁴.

Remissione completa (CR):

Immunofissazione sierica ed urinaria negativa e scomparsa di qualunque plasmocitoma dei tessuti molli e $< 5\%$ di plasmacellule midollari. Nei pazienti in cui l'unico metodo per misurare la malattia è attraverso i livelli di sFLC la risposta completa è definita da un normale sFLCR (da 0,26 a 1,65)

Remissione completa stringente (sCR):

CR (come definita sopra) *più* FLC ratio normale e assenza di plasmacellule clonali nel midollo in immunistochemica o immunofluorescenza)

Very good partial response (VGPR):

CM sierica e urinaria rilevabile con immunofissazione ma non con elettroforesi o riduzione della CM sierica $\geq 90\%$ *più* urinaria < 100 mg/24h. Nei pazienti in cui l'unico metodo per misurare la malattia è attraverso i livelli di sFLC è definita da una diminuzione $>90\%$ nella differenza tra la catena leggera coinvolta e la catena leggera non coinvolta.

Risposta parziale (PR):

Riduzione della CM sierica $\geq 50\%$ ed urinaria $\geq 90\%$ o < 200 mg/24h
Se la CM sierica ed urinaria non sono misurabili, è richiesta una riduzione $> 50\%$ della differenza fra i livelli di FLC coinvolte e non coinvolte

Se la CM sierica ed urinaria e FLC non sono misurabili, è richiesta una riduzione $\geq 50\%$ delle plasmacellule midollari (purché l'infiltrazione midollare al baseline fosse $> 30\%$)

In aggiunta ai criteri sopra elencati, è richiesta una riduzione $> 50\%$ delle dimensioni dei plasmocitomi dei tessuti molli se presenti al baseline

Risposta minima (MR):

Riduzione della CM sierica $\geq 25\%$ ma $< 50\%$ e Riduzione della CM urinaria del 50-89%

Se presente Plasmocitoma: riduzione della massa del 25-49%.

Non aumento delle dimensioni e del numero di lesioni litiche ossee (aumento della frattura da compressione non esclude risposta)

Progressione (PD):

Aumento del 25% del valore più basso raggiunto di:

- CM sierica (con aumento assoluto di almeno 500 mg/dL, o 1g/dL se la CM minima era ≥ 5 g/dL) e/o
- CM urinaria (con aumento assoluto di almeno 200 mg/24h)
- Se CM non misurabile, differenza tra le sFLC (di almeno 100 mg/dL)

Se anche le sFLC non sono dosabili, percentuale di plasmacellule midollari (l'aumento assoluto deve essere $\geq 10\%$).

Comparsa di nuove lesioni ossee o di plasmocitoma o aumento delle lesioni preesistenti
Aumento della calcemia (Ca²⁺ sierico corretto >11,5 mg/dL) attribuibile unicamente al disturbo proliferativo delle plasmacellule.

Anche la malattia minima residua viene definita mediante i criteri dell'International Myeloma Working Group (IMWG) aggiornati da Kumar e Colleghi ⁶⁴; il presente studio prevedeva una valutazione della MRD a livello midollare mediante *next generation sequencing* (NGS).

MRD negativa al sequenziamento:

Assenza di plasmacellule clonali a livello midollare mediante NGS ottenute dal sequenziamento del DNA midollare) utilizzando la piattaforma LymphoSIGHT (o metodo equivalente validato) con una sensibilità minima pari o superiore a 1 su 10⁵ cellule nucleate.

MRD negativa anche all'imaging:

MRD-negatività mediante NGF o NGS associata alla scomparsa di ogni area di aumentata captazione del radiotracciante riscontrata alla diagnosi o ad una PET/CT precedente, con un SUV inferiore a quello riscontrato nel mediastino o nei tessuti normali (DS<4).

MRD negativa sostenuta:

MRD negatività a livello midollare (mediante) e alla PET-CT total body con FDG, confermata per almeno 1 anno.

8.4. DEFINIZIONE DEGLI ENDPOINTS “TIME-TO-EVENT”

Come variabili *time-to-event* sono state valutate¹⁹⁷:

- PFS (*progression free survival*, sopravvivenza libera da progressione): intervallo tra l'inizio della terapia e la progressione di malattia o la morte;
- OS (*overall survival*, sopravvivenza globale): definito come tempo tra l'inizio del trattamento e la morte.

9. ANALISI STATISTICA

La presente analisi è stata condotta per intenzione di trattamento (*intention to treat*: ITT) e mediante R-Studio (versione R v.3.3 e versione R-Studio 4.3) o successiva (R *Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria).

Per l'analisi descrittiva le variabili numeriche sono state riportate attraverso la mediana e il relativo *range* interquartile (IQR), mentre le variabili qualitative o categoriche sono state espresse con la loro frequenza assoluta e percentuale.

La relazione tra le variabili categoriche come le risposte e le terapie è stata valutata mediante l'uso del test di indipendenza Chi-22 o Fisher-Exact test come più appropriato. Inoltre, per il confronto delle mediane tra gruppi è stato utilizzato il test non-parametrico Kruskal Wallis.

Per l'analisi di sopravvivenza sono state prodotte le curve di sopravvivenza Kaplan-Meier per osservare graficamente le differenze tra gruppi per *endpoints time to event*. Le differenze sono state testate attraverso il Log-Rank test per identificare differenze significative tra le sopravvivenze dei gruppi confrontati.

Con il modello di regressione semi-parametrica di Cox sono stati prodotto gli Hazard Ratio (HR), per poter quantificare il rischio relativo di un gruppo rispetto al *baseline*.

Per tutti i test e le analisi statistiche il limite di significatività è stato fissato a 0.05.

10. RISULTATI

10.1. CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Nel presente studio sono stati sottoposti a *screening* 73 pazienti, 14 sono stati esclusi dal protocollo per *screening failure*; di questi, 4 pazienti sono stati esclusi a causa di un campione midollare o di sangue periferico non valutabile (4/73, 5%).

Sono stati arruolati 59 pazienti, di cui 52 con MM attivo e 7 con HR-SMM. Nel corso del follow-up, 4 pazienti con HR-SMM hanno mostrato una progressione di malattia e sono quindi stati inclusi, a partire da quel momento, tra i pazienti con MM attivo, che di conseguenza in totale risultano essere 56. Per quanto riguarda i pazienti con MM attivo, 32 sono di sesso maschile e 24 di sesso femminile, l'età mediana è pari a 63 anni. L'isotipo del MM è risultato essere IgG in 40 pazienti, IgA in 8 pazienti e bence jones in 8 pazienti. Lo stadio ISS è risultato essere pari a 1 in 30 pazienti, 2 in 17 pazienti e 3 in 8 pazienti. L'analisi FISH è risultata valutabile in 48 pazienti, e in 14 è risultata ad alto rischio per la presenza di t(4;14) o t(14;16) e/o di del(17). Lo stadio R-ISS è stato valutabile in 50 pazienti, ed è risultato pari a 1 in 23 pazienti, 2 in 25 pazienti e 3 in 2 pazienti. Per quanto riguarda l'*imaging*, la PET-CT total body con FDG è stata eseguita in tutti i pazienti al *baseline*, ed è risultata positiva in 42 pazienti (75%); la MRI del rachide in toto con mdc è stata eseguita in 49 pazienti, ed è risultata positiva in 37 pazienti (76%). Relativamente alla PET-CT, undici pazienti (pari a 20%) hanno mostrato delle lesioni paramidollari, mentre in 5 pazienti (9%) sono state riscontrate lesioni extramidollari.

Per quanto riguarda i 7 pazienti con HR-SMM, 5 sono di sesso maschile e 2 di sesso femminile, l'età mediana è di 66 anni. In 5 pazienti l'isotipo è IgG, in 1 paziente IgA e in 1 paziente bence jone. Lo stadio ISS e lo stadio R-ISS sono risultati valutabili in 5 e 4 pazienti, rispettivamente, ed in tutti i casi è risultato pari a 1. La FISH è risultata valutabile in 6 pazienti ed ha mostrato alterazioni ad alto rischio in 1 paziente per la presenza di t(4;14).

Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti sono riassunte nelle tabelle 7A e 7B, nella tabella 8 sono riassunte le principali caratteristiche relative alla PET-CT total body con FDG nei pazienti con MM attivo.

Tabella 7: A. Caratteristiche dei pazienti con MM Attivo; B. caratteristiche dei pazienti con HR-SMM

A.

Pazienti con MM Attivo (pts)	Numero (%)
N° pazienti	56
Età (anni) mediana [IQR]	63 [59-66]
Sesso: M/F	32 (57) / 24 (43)
Isotipo MM	- IgG - IgA - BJ
	40 (72) 8 (14) 8 (14)
Hb (g/dL), mediana [IQR]	12.05 [10.28-13.35]
Plt (x10⁹/L), mediana [IQR]	242 [180-284]
Creat (mg/dL), mediana [IQR]	0.86 [0.72-1.11]
Clearance creat (ml/min), mediana [IQR]	87.5 [68.8-98]
LDH (U/L), mediana [IQR]	167 [143-194]
Beta2m (mg/L), mediana [IQR]	2.85 [2-4.18]
Calcio (mg/dL), mediana [IQR]	9.5 [9-9.9]
ISS (valutabile in 55 pts)	- I - II - III
	30 (55) 17 (30) 8 (15)
R- ISS (valutabile in 50 pts):	- I - II - III
	23 (46) 25 (50) 2 (4)
FISH (valutabile in 48 pts):	- Standard - Alto rischio* - t(4;14) - t(14;16) - Del(17p) - t(14;16) + Del(17p)
	34 (71) 14 (29) 9 (19) 2 (4) 2 (4) 1 (2)
PET-CT con FDG: positiva/negativa	42 (75) / 14 (25)
MRI del rachide con gadolinio (valutabile in 49 pts): positiva/negativa	37 (76) / 12 (24)

Beta2m: beta2microglobulina, Creat: creatinina, F: femminile, Hb: emoglobina, ISS: International Staging System, M: maschile, MM: mieloma multiplo, MRI: risonanza magnetica nucleare, N: numero, Plt: piastrine, pts: pazienti, R-ISS: Revised International Staging System. *: presenza di del(17p) e/o t(4;14) e/o t(14;16).

B.

Pazienti con HR-SMM (pts)	Numero (%)
N° pazienti	7
Pazienti evoluti a MM attivo	4 (57)
Età (anni) mediana [IQR]	66 [61.5-70.5]
Sesso: M/F	5 (71) / 2 (39)
Isotipo MM	
- IgG	5 (71)
- IgA	1 (14)
- BJ	1 (14)
Hb (g/dL), mediana [IQR]	13.9 [12.4-14.2]
Plt (x10⁹/L), mediana [IQR]	260 [153-268]
Creat (mg/dL), mediana [IQR]	0.77 [0.7-0.95]
Clearance creat (ml/min), mediana [IQR]	90 [76-95.5]
LDH (U/L), mediana [IQR]	171 [146-180]
Beta2m (mg/L), mediana [IQR]	3.0 [2.1-3.1]
Calcio (mg/dL), mediana [IQR]	9.7 [9.4-9.4]
ISS (valutabile in 5 pts)	- I 5 (100)
R- ISS (valutabile in 4 pts):	- I 4 (100)
FISH (valutabile in 6 pts):	- Standard 5 (83)
	- Alto rischio*
	- t(4;14) 1 (17)
	1 (17)
PET-CT con FDG: positiva/negativa	0 / 7 (100)
MRI del rachide con gadolinio : positiva/negativa	0 / 7 (100)

Beta2m: beta2microglobulina, Creat: creatinina, F: femminile, Hb: emoglobina, ISS: International Staging System, M: maschile, MM: mieloma multiplo, MRI: risonanza magnetica nucleare, N: numero, Plt: piastrine, pts: pazienti, R-ISS: Revised International Staging System. *: presenza di del(17p) e/o t(4;14) e/o t(14;16).

Tabella 8: PET-CT total body con FDG nei pazienti con MM attivo

PET-CT con FDG in pts con MM Attivo	Numero (%)
PET-CT con FDG: positiva/negativa	42 (75) / 14 (25)
N° di lesioni focali	-1-5 -6-10 >10
	19 (45) 4 (10) 19 (45)
BM DS, mediana [IQR]	3 (2 - 4)
BM Suv max, mediana [IQR]	3.5 (1 – 4.2)
FL DS, mediana [IQR]	4 (4 – 5)
FL Suv max, mediana [IQR]	5.2 (4.6 – 7.5)
Lesioni Paramidollari si/no	11 (20) / 45 (80)
Lesioni Extramidollari si/no	5 (9) / 51 (91)

BM: midollo osseo, BM DS: Deauville score midollare, FL: lesioni focali, FL DS: Deauville score a livello delle lesioni focali, N: numero, Pts: pazienti, SUV max: standardized uptake value massimo

10.2. CARATTERISTICHE BIOLOGICHE BASALI

Per definire la malattia al momento dell'ingresso nello studio, a tutti i pazienti è stato prelevato un campione di aspirato midollare, che rappresenta il *gold standard* per l'identificazione e il monitoraggio della MRD, dal quale sono state isolate le plasmacellule CD138+.

Su questa popolazione cellulare, è stato possibile identificare con successo il clonotipo paziente-specifico mediante il sequenziamento dei geni IGH e IGK delle immunoglobuline in 54/56 pazienti con MM attivo e in 7/7 pazienti con HR-SMM, che permetterà di monitorare la MRD nei successivi *time-points* (ogni 6 mesi su BM per i pazienti con MM attivo che iniziano un trattamento). Parallelamente, è stato analizzato anche un campione di sangue periferico con l'obiettivo di caratterizzare la biopsia liquida come DNA libero circolante (cfDNA).

La caratterizzazione genomica del cfDNA è avvenuta mediante *Ultra Low Pass-Whole Genome Sequencing* (ULP-WGS) che permette di identificare le alterazioni di *copy number* (CNAs) sia nel clone plasmacellulare midollare che nel cfDNA. Per creare le librerie da sequenziare mediante Illumina NextSeq 500, è stato utilizzato un range tra 1 e 10 ng sia per il clone midollare che per il cfDNA. Per tutti i pts con MM attivo e con HR-SMM è stato

possibile determinare la frazione tumorale (TF) (soglia minima di identificazione prevista dal software di analisi: 3%). Dal punto di vista quantitativo la TF del cfDNA (cfDNA TF) nel sangue periferico è risultata significativamente inferiore rispetto al DNA plasmacellulare a livello midollare (gDNA TF), con una mediana nei pazienti con MM attivo di 4.64% vs 58.0% ($p < 0.0001$), rispettivamente, e nei pazienti con HR-SMM di 3.63% e 53.66% ($p = 0.025$), rispettivamente.

Dal punto di vista qualitativo, i profili genomici nei due compartimenti, periferico e midollare, hanno mostrato una concordanza nelle alterazioni di *copy number* (CNAs) nella maggior parte dei pazienti (48/56; 86%). Tuttavia, in 8 pazienti (8/56; 14%) con MM attivo abbiamo riscontrato un profilo genomico differente tra cfDNA e plasmacellule midollari; infatti, la sovrapposizione dei loro profili genomici ha messo in evidenza una serie di CNA, sia delezioni che amplificazioni, presenti esclusivamente nel cfDNA oppure nel midollo.

10.2.1. Divisione dei pazienti sulla base di un *cut-off* di cfDNA TF

Analizzando un gruppo più ampio di 105 pazienti con MM attivo all'esordio, comprensivo anche dei pazienti del presente studio e con caratteristiche simili, è stato possibile identificare un valore di *cut-off* di TF del cfDNA, pari a 9%, in grado di predire in modo statisticamente significativo la PFS (*progression free survival*). Dei 105 pazienti analizzati, 39 avevano una cfDNA TF $\geq 9\%$ e 66 una cfDNA TF $< 9\%$; la PFS mediana è risultata pari a 21 *versus* 42 mesi ($p = 0,0005$), rispettivamente. Le principali caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella tabella sottostante.

Tabella 9: Caratteristiche dei pazienti analizzati per identificare il *cut-off* di TF cfDNA

Pazienti con MM Attivo (pts)	Numero (%)
N° pazienti	105
Età (anni) mediana [IQR]	66 [60.5-72]
Sesso: M/F	63 (60) / 42 (40)
Isotipo MM	- IgG - IgA - BJ - IgD / IgM
Hb (g/dL), mediana [IQR]	11.5 [9-13]
Plt ($\times 10^9/L$), mediana [IQR]	236 [177-288]
Creat (mg/dL), mediana [IQR]	5 [2.5-5.5]
LDH (U/L), mediana [IQR]	169 [143-211]
Beta2m (mg/L), mediana [IQR]	3 [2-4]
Albumina (g/dL), mediana [IQR]	4 [4-4]
ISS (valutabile in 95 pts)	- I - II - III
R- ISS (valutabile in 84 pts):	- I - II - III
FISH (valutabile in 88 pts):	- Standard - Alto rischio* - t(4;14) - t(14;16) - Del(17p)

Beta2m: beta2microglobulina, Creat: creatinina, F: femminile, Hb: emoglobina, ISS: International Staging System, M: maschile, MM: mieloma multiplo, N: numero, Plt: piastrine, pts: pazienti, R-ISS: Revised International Staging System. *: presenza di del(17p) e/o t(4;14) e/o t(14;16).

Figura 4: Distribuzione dei valori di TF per categorie ottenute dall'analisi di 105 pazienti e grafico della statistica di Log-Rank per tutti i valori di TF, massimizzata per un *cutpoint* pari a 9%.

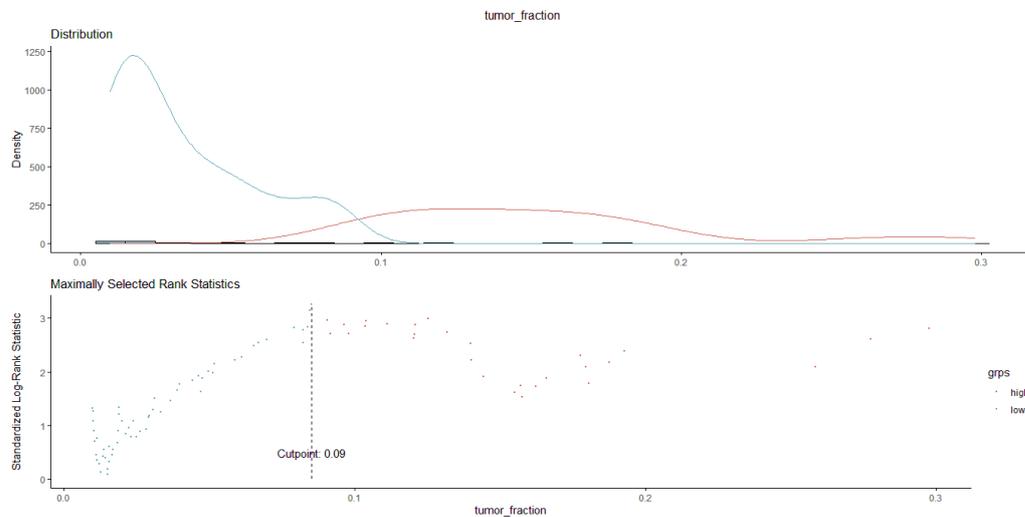
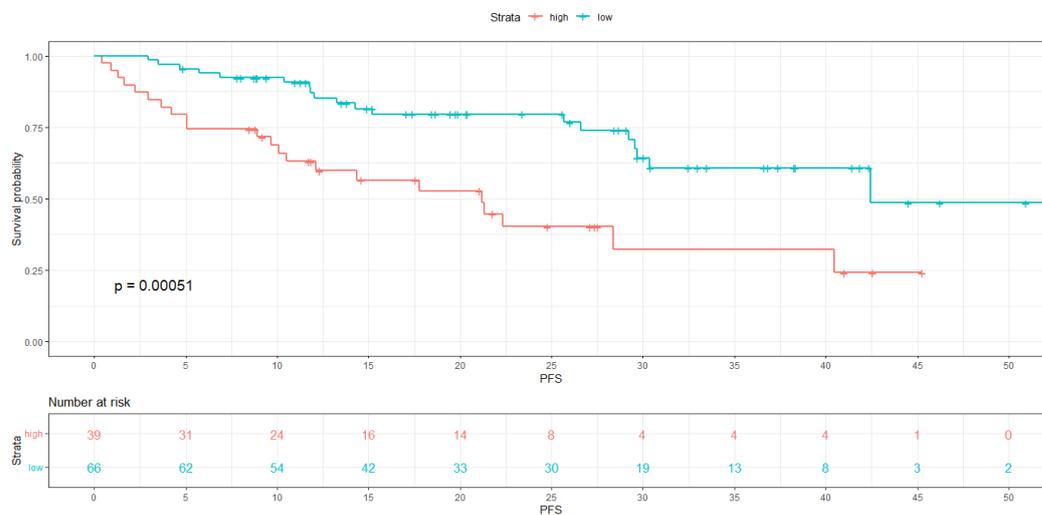


Figura 5: Curve di PFS nei pazienti analizzati per identificare il *cut-off* con cfDNA TF elevata ($\geq 9\%$) o bassa ($<9\%$)



Per quanto riguarda i pazienti del presente progetto, 20 pazienti (36%) con MM attivo e 1 paziente (14%) con HR-SMM hanno mostrato una cfDNA TF elevata secondo questo *cut-off*.

Nelle tabelle 10A e 10B sono riassunte le principali caratteristiche biologiche al basale dei pazienti con MM attivo (A) e HR-SMM (B).

Tabella 10: Caratteristiche biologiche basali dei pazienti con MM Attivo (A) e con HR-SMM (B)

A.

Pazienti con MM Attivo (pts)	
gDNA TF Basale, Mediana [IQR]	58.0 [30.91-76.75]
cfDNA TF Basale, Mediana [IQR]	4.64 [1.93-12.3]
cfDNA TF Basale alto/basso, N (%)	20 (36) / 35 (64)
Profilo genomico discordante/concordante, N (%)	8 (14) / 48 (86)

cfDNA; DNA libero circolante, gDNA: DNA genomico midollare, N: numero

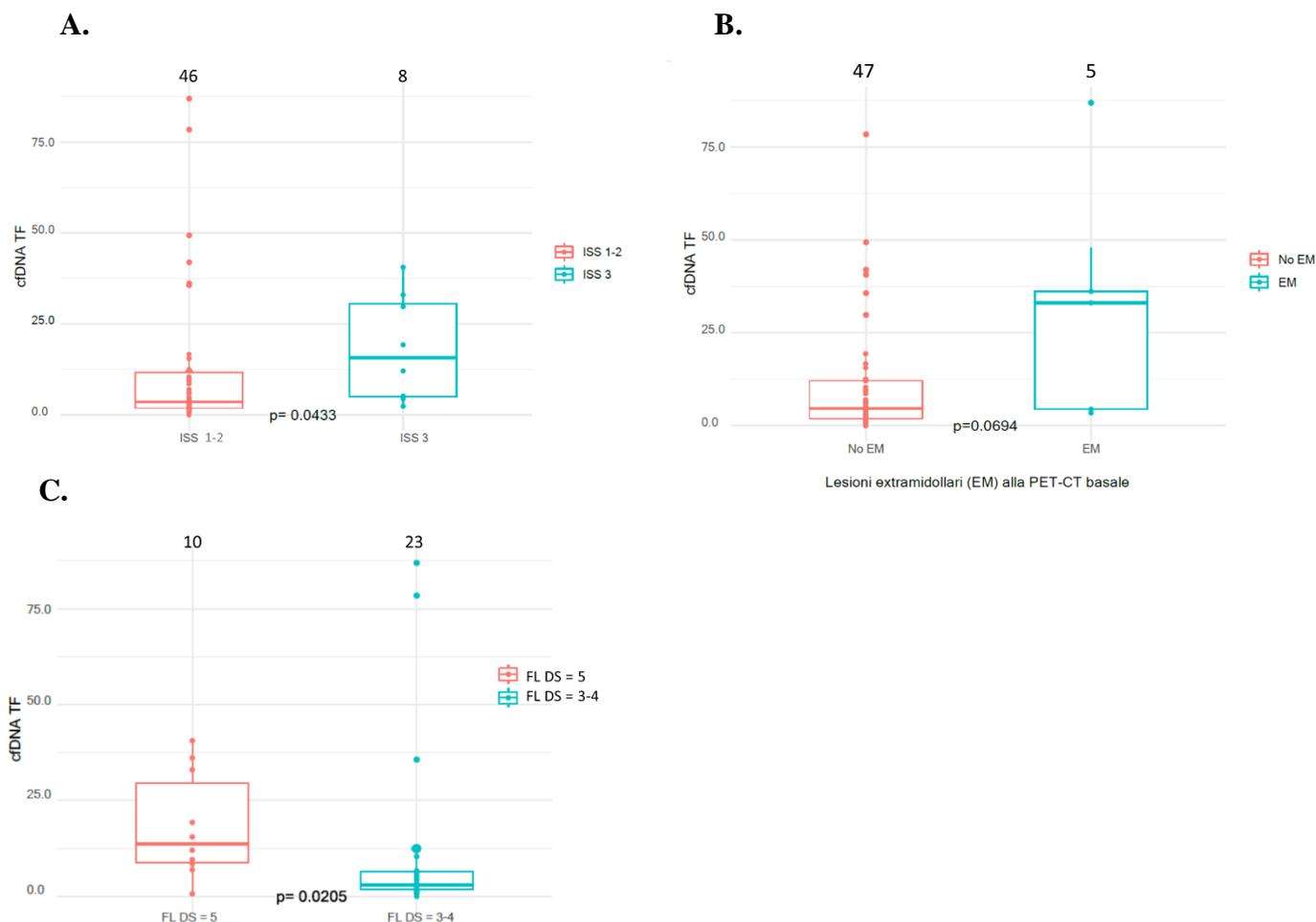
B.

Pazienti con HR-SMM (pts)	
gDNA TF Basale, Mediana [IQR]	53.66 [30.99-66.75]
cfDNA TF Basale, Mediana [IQR]	3.63 [1.15-4.22]
cfDNA TF Basale alto/basso, N (%)	1 (14) / 6 (86)
Profilo genomico discordante/concordante, N (%)	0 (0) / 7 (100)

cfDNA; DNA libero circolante, gDNA: DNA genomico midollare, N: numero

La cfDNA TF è risultata essere più elevata in modo statisticamente significativo nei pazienti con ISS3 rispetto ai pazienti con ISS1 o 2, con una mediana pari a 15.68% vs 4.58%, rispettivamente ($p=0.043$). Tutte le altre caratteristiche di rischio al basale non si sono dimostrate correlate con la frazione tumorale a livello periferico, né a livello midollare. La cfDNA TF è risultata sovrapponibile nei pazienti senza lesioni focali alla PET-CT rispetto ai pazienti che presentavano lesioni focali, ma si è evidenziata una cfDNA TF mediana significativamente più elevata nei pazienti con DS delle lesioni focali pari a 5 rispetto a DS pari a 3 o 4 (TF mediana 13.78% vs 3.0%, $p=0.020$). Si è evidenziata anche una correlazione tra cfDNA TF e Deauville Score a livello midollare ($p=0.020$). Inoltre, è stata riscontrata una cfDNA TF mediana tendenzialmente più elevata nei pazienti con malattia extramidollare, pari a 33.02% vs 4.64% ($p=0.69$), seppur in assenza di una significatività statistica a causa della piccola numerosità del campione.

Figura 6: A. cfDNA TF nei pazienti con stadio ISS 1 e 2 vs ISS 3; B. cfDNA TF nei pazienti con presenza lesioni extramidollari alla PET-CT rispetto ai pazienti con assenza di lesioni extramidollari; C. cfDNA TF nei pazienti con DS a livello delle lesioni focali pari a 5 vs 3-4.



Analizzando la distribuzione dei pazienti con cfDNA TF superiore o inferiore al *cut-off* di 9% relativamente alle caratteristiche cliniche basali, non sono emerse differenze statisticamente significative.

10.3. TERAPIA, RISPOSTA E MONITORAGGIO MRD

I pazienti con MM attivo hanno iniziato un trattamento di prima linea con differenti schemi terapeutici: trattamenti standard (tripletta bortezomib-based o tripletta comprensiva di anticorpo monoclonale anti-CD38 daratumumab) o sperimentali all'interno di protocolli clinici (triplette basate sull'inibitore del proteasoma di prima o seconda generazione, bortezomib o carfilzomib, o quadruplette con l'aggiunta di anticorpo monoclonale anti-CD38, all'interno dei protocolli EMN17/PERSEUS, EMN18 e EMN24/ISKIA). Le terapie intraprese nello specifico sono riassunte nella tabella sottostante.

Tabella 11: Terapia nei pazienti con MM attivo

TERAPIA	Numero (%)
Terapia di Induzione	56 (100)
VTD	21 (37)
VCD	2 (4)
VRD	4 (7)
KRD	3 (5)
DaraVTD	2 (4)
DaraVRD	3 (5)
DaraVCD	16 (29)
IsaKRD	2 (4)
DaraRd (terapia continuativa)	3 (5)
N cicli mediano (range)	4 (3 – 6)
ASCT	42 (75)
ASCT singolo	32 (76)
ASCT doppio	10 (24)
Terapia di Consolidamento	22 (39)
VTD	4 (18)
VRD	3 (14)
KRD	3 (14)
DaraVRD	3 (14)
DaraVCD	8 (36)
IsaKRD	1 (4)
N cicli mediano (range)	2 (1 – 4)
Terapia di mantenimento	37 (66)
Lenalidomide	9 (24)
Dara-lenalidomide	3 (8)
Bortezomib	1 (3)
Ixazomib	9 (24)
Dara-ixazomib	11 (30)
IsaKRD ligh	1 (3)
KRD light	3 (8)
Durata mediana, mesi [IQR]	10.9 [3.7-18.9]

ASCT: trapianto autologo di cellule staminali, Dara: daratumumab, DaraRd: daratumumab – lenalidomide – desametasone, DaraVCD: daratumumab – bortezomib – ciclofosfamide – desametasone, DaraVRD: daratumumab – bortezomib –

lenalidomide – desametasone, DaraVTD: daratumumab – bortezomib – talidomide – desametasone, IsaKRD: isatuximab – carfilzomib – lenalidomide – desametasone, IsaKRD light: IsaKRD a dosaggio alleggerito, KRD: carfilzomib – lenalidomide – desametasone, KRD light: KRD a dosaggio alleggerito, N: numero, VCD: bortezomib - ciclofosfamide – desametasone, VRD: bortezomib – lenalidomide – desametasone, VTD: bortezomib – talidomide – desametasone.

Ventitre pazienti sono stati trattati con una tripletta standard bortezomib-based, ovvero secondo schema VTD (bortezomib – talidomide - desametasone) o VCD (bortezomib – ciclofosfamide – desametasone); 4 pazienti sono stati trattati con tripletta sperimentale bortezomib-based, ovvero schema VRD (bortezomib – lenalidomide - desametasone); 3 pazienti sono stati trattati con tripletta basata sull'inibitore del proteasoma di seconda generazione carfilzomib, ovvero schema KRD (carfilzomib – lenalidomide – desametasone); 2 pazienti sono stati trattati con quadrupletta standard secondo schema Dara-VTD (daratumumab – bortezomib – talidomide - desametasone), 3 pazienti con quadrupletta secondo schema Dara-VRD (daratumumab – bortezomib – lenalidomide - desametasone), 16 pazienti con quadrupletta secondo schema Dara-VCD (daratumumab – bortezomib – ciclofosfamide - desametasone), 2 pazienti sono stati trattati con quadrupletta secondo schema Isa-KRD (isatuximab - carfilzomib – lenalidomide – desametasone) e 3 pazienti sono stati trattati con terapia continuativa standard secondo schema Dara-Rd (daratumumab – lenalidomide – desametasone). Attualmente 2 pazienti sono in corso di terapia di induzione, 51 hanno terminato la fase di induzione, di cui 42 sono stati sottoposti a trapianto autologo di cellule staminali (32 pazienti hanno ricevuto singolo trapianto, 10 pazienti hanno ricevuto doppio trapianto). Tre pazienti stanno ricevendo una terapia continuativa che non prevede il trapianto autologo. Ventidue pazienti hanno ricevuto la terapia di consolidamento con lo stesso schema della terapia di induzione e 37 hanno iniziato la terapia di mantenimento. Il mantenimento è stato standard (con lenalidomide) in 9 pazienti, mentre 3 pazienti hanno ricevuto lenalidomide associata a daratumumab, 10 pazienti hanno ricevuto un inibitore del proteasoma (bortezomib o ixazomib), 11 pazienti hanno ricevuto ixazomib associato a daratumumab, 3 pazienti stanno proseguendo con un consolidamento alleggerito con KRD a dosaggio ridotto, 1 paziente con Isa-KRD a dosaggio ridotto. La durata mediana della terapia di induzione e consolidamento è stata di 4 e 2 cicli, rispettivamente. La durata mediana della terapia di mantenimento al momento risulta essere di 10.9 mesi. Al momento della presente analisi, 13 pazienti hanno dovuto iniziare una terapia di seconda linea, 9 per riscontro di una progressione di malattia e 4 per risposta insoddisfacente alla terapia di induzione (\leq PR, risposta parziale).

Relativamente alle risposte ematologiche, l'ORR (*overall response rate*) e il tasso di risposte \geq VGPR (*very good partial response*) sono state pari a 89% e 55% dopo l'induzione, 100% e

81% dopo il trapianto autologo (singolo o doppio, in base a quanto previsto per ogni paziente), 100% e 86% dopo il consolidamento e 93% e 72% globalmente, rispettivamente.

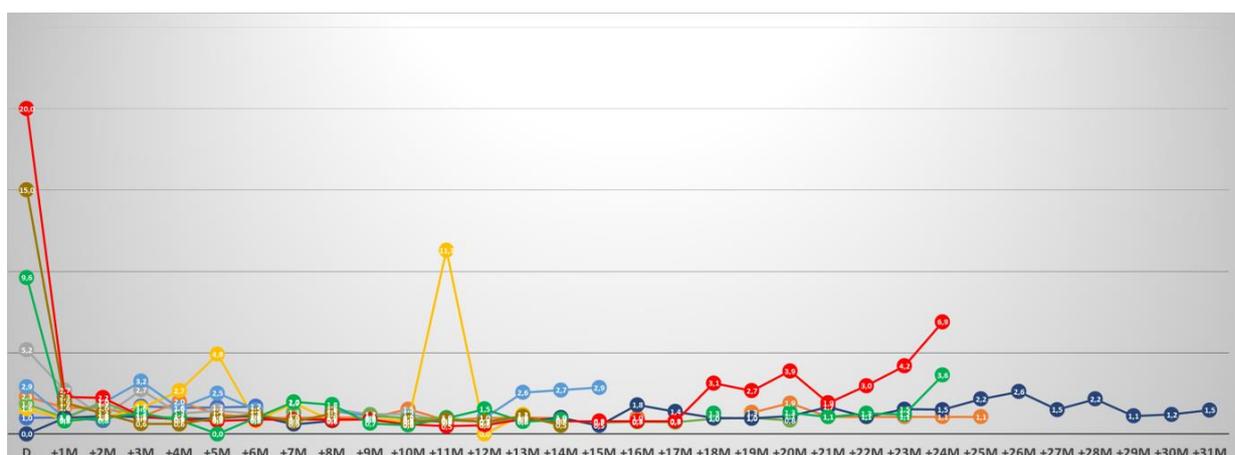
Nella fase applicativa del progetto, lo schema di *biobanking* prevedeva lo studio qualitativo e quantitativo sia nel BM che nel PB. In questa fase ci si è concentrati sulla valutazione dell'evoluzione dinamica delle cellule patologiche, correlata o meno al trattamento, sia nel midollo che nel sangue periferico. Tutti i pazienti con MM attivo inclusi nella prima fase hanno iniziato un monitoraggio longitudinale sia in corso di induzione ed eventuale intensificazione con trapianto autologo, sia in corso di terapia di consolidamento e mantenimento. In questi pazienti è stato effettuato un prelievo mensile di sangue periferico e un aspirato midollare a vari *timepoints*: prima del trapianto autologo di cellule staminali, prima della terapia di mantenimento, e successivamente ogni 6 mesi fino a progressione. I pazienti che hanno eseguito terapia continuativa non comprensiva di ASCT hanno eseguito un aspirato midollare ogni 6 mesi. Per quanto riguarda i pazienti con HR-SMM, è stato intrapreso un monitoraggio ogni tre mesi sul sangue periferico per indagare l'utilizzo della biopsia liquida eseguita in modo seriato.

I pazienti con MM attivo sono stati sottoposti a una mediana di 18 biopsie liquide e 2 aspirati midollari durante un follow-up mediano di 24 mesi, mentre i pazienti con HR-SMM sono stati sottoposti ad una mediana di 10 biopsie liquide durante un follow-up mediano di 30 mesi.

Al momento della presente analisi è stato possibile valutare il campione di sangue midollare mediante NGS per identificare la malattia minima residua in 31 pazienti dopo l'induzione (in 2 dei quali è risultata non valutabile), in 34 pazienti prima del mantenimento (in 2 dei quali è risultata non valutabile), in 21 pazienti dopo 6 mesi dall'inizio del mantenimento, in 13 pazienti a un anno dall'inizio del mantenimento (in 3 dei quali è risultata non valutabile), in 7 pazienti a 18 mesi dall'inizio del mantenimento e in 4 pazienti a 2 anni dall'inizio del mantenimento, con una sensibilità compresa fra 10⁻⁴ e 10⁻⁵. Successivamente all'induzione il tasso di positività dell'MRD è risultato essere dell'62% (18 pazienti su 29), prima del mantenimento il tasso di positività è stato del 53% (17 pazienti su 32), a 6 mesi è stato del 62% (13 pazienti su 21), a un anno è stato del 70% (7 pazienti su 10), a 18 mesi è stato del 57% (4 pazienti su 7), a 2 anni è stato del 25% (1 paziente su 4). Per quanto riguarda l'*imaging*, la PET-CT è stata eseguita in 39 pazienti dopo l'induzione e in 22 pazienti prima del mantenimento, ed è risultata ancora positiva nel 54% (21 pazienti) e nel 32% (7 pazienti) dei casi, rispettivamente. Otto pazienti hanno mostrato una MRD negativa sostenuta per più di un anno, di questi un solo paziente è andato incontro a successiva progressione di malattia.

Al momento della presente analisi è stato possibile analizzare mediante ULP-WGS l'andamento della TF nei primi mesi dalla diagnosi, osservando una certa linearità nella dinamica evolutiva della patologia dal punto di vista quantitativo. In particolare, abbiamo assistito ad un'importante riduzione quantitativa durante la terapia di induzione. Nella successiva fase di trapianto autologo e consolidamento tutti i pazienti hanno mantenuto bassi livelli di cfDNA TF, in alcuni casi abbiamo assistito al temporaneo incremento del valore di TF, non confermato ai controlli successivi. Nella fase di mantenimento, mentre nella maggior parte dei casi si sono mantenuti bassi livelli di TF, in alcuni pazienti abbiamo iniziato ad assistere ad un incremento della quota di cfDNA, soprattutto in pazienti che all'esordio presentavano valori particolarmente elevati di cfDNA TF, superiori al *cut-off* del 9%.

Figura 7: Rappresentazione grafica dell'andamento mensile della TF di cfDNA in corso di terapia nei pazienti con MM attivo



Andando a valutare la cfDNA TF nei primi tre *timepoints* identificati per la valutazione della MRD, la mediana è risultata essere pari a 1.5% al termine dell'induzione (valutata in 12 pazienti), 1.0% prima del mantenimento (valutata in 10 pazienti) e 1.3% dopo 6 mesi (valutata in 16 pazienti), mantenendosi quindi su dei valori al di sotto della soglia di sensibilità della metodica (pari al 3%). Non sono emerse differenze significative in termini di cfDNA tra pazienti con MRD positiva o negativa valutata con NGS a livello midollare nei tre *timepoints*. Non sono emerse differenze neanche tra i pazienti con PET-CT positiva ($DS \geq 4$) o negativa ($DS < 4$) al termine dell'induzione o prima del mantenimento.

Figura 8: cfDNA TF mediana all'esordio e a tre *timepoints*: al termine dell'induzione, prima del mantenimento e a 6 mesi dall'inizio del mantenimento

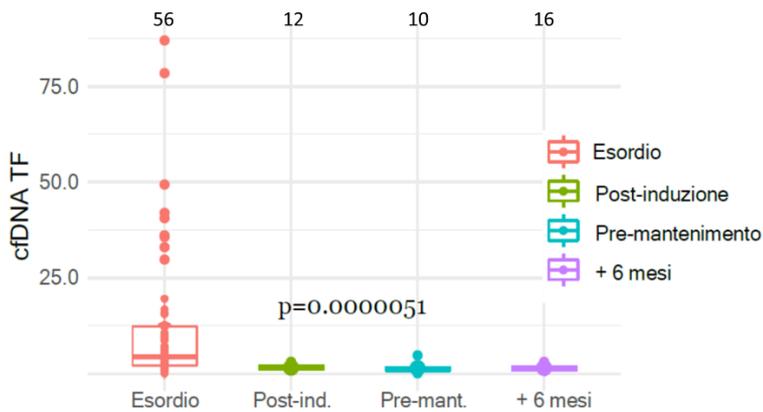
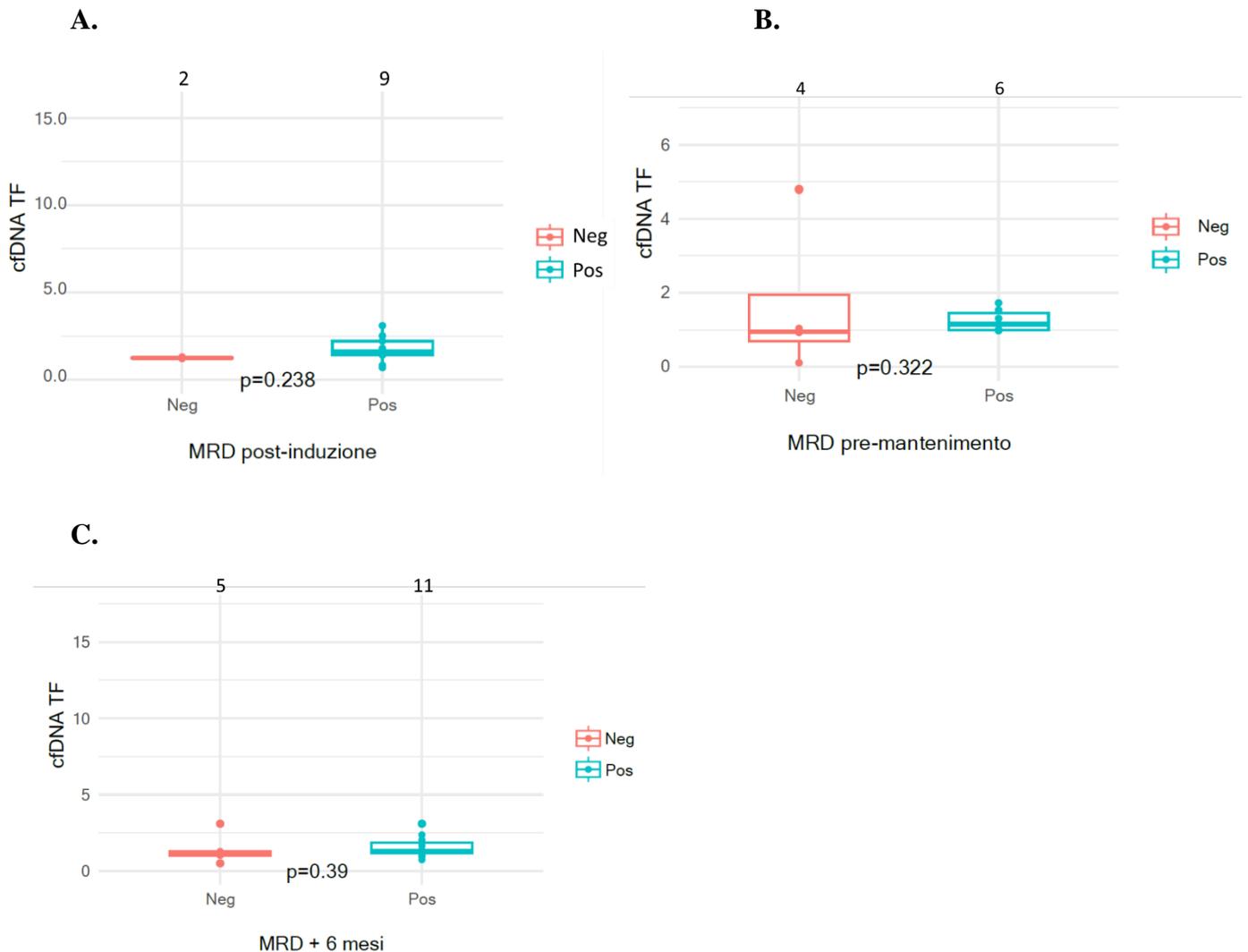


Figura 9: cfDNA TF mediana nei pazienti con MRD positiva o negativa a tre *timepoints*: post-induzione, pre-mantenimento, a 6 mesi dall'inizio del mantenimento (A, B, C); cfDNA TF mediana nei pazienti con PET-CT positiva e negativa a due *timepoints*: post-induzione e pre-mantenimento (D, E)



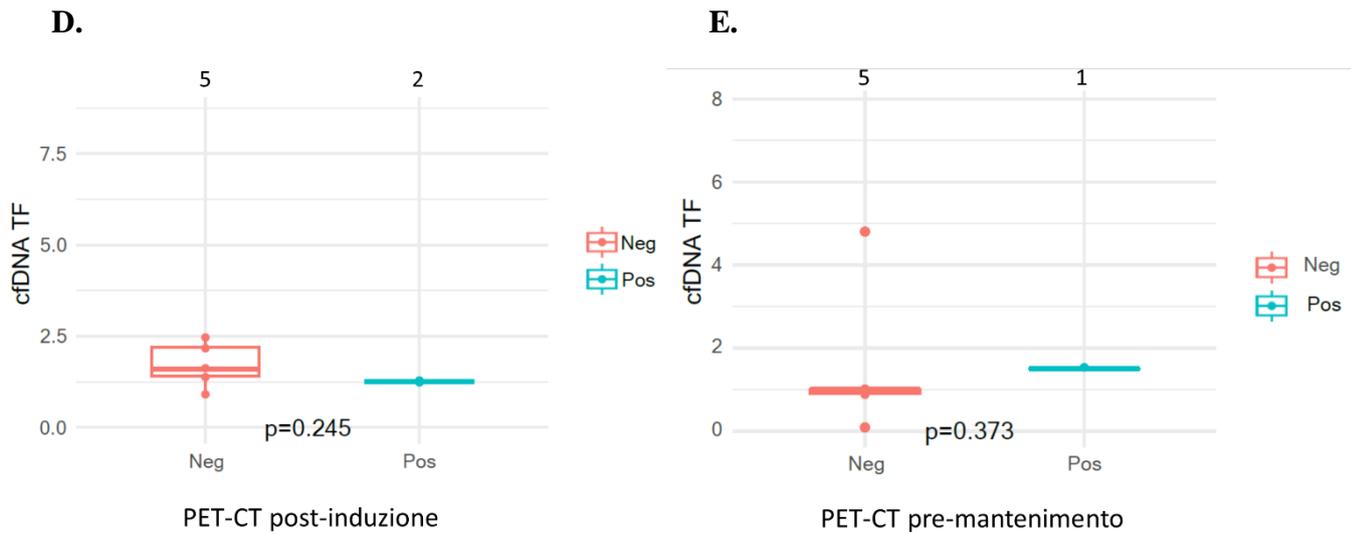


Tabella 12: Caratterizzazione tramite biopsia liquida nei pazienti con malattia minima residua positiva o negativa valutata con NGS a livello midollare e con PET-CT a tre *timepoints* (post-induzione, pre-mantenimento, 6 mesi dall’inizio del mantenimento)

		I timepoint (post-induzione)	p	II timepoint (pre-mant.)	p	III timepoint (+6 mesi)	p
BM MRD	Negativa, N (%)	11/29 (38%)	p=0.238	15/32 (47%)	p=0.322	8/21 (38%)	p=0.39
	- biopsia liquida, N	2		4		5	
	- cfDNA TF (%) Mediana [IQR]	1.25 [1.23-1.28]		0.95 [0.70-1.95]		1.2 [1.0-1.3]	
	Positiva, N (%)	18/29 (62%)		17/32 (53%)		13/21 (62%)	
	- biopsia liquida, N	9		6		11	
	- cfDNA TF (%) Mediana [IQR]	1.6 [1.4-2.2]		1.15 [1.0-1.45]		1.30 [1.15-1.85]	
PET-CT	Negativa, N (%)	18/39 (46%)	p=0.245	15/22 (68%)	p=0.373	nv	nv
	- biopsia liquida, N	5		5		nv	
	- cfDNA TF (%) Mediana [IQR]	1.6 [1.4-2.2]		1.0 [0.9-1.0]		nv	
	Positiva, N (%)	21/39 (54%)		7/22 (32%)		nv	
	- biopsia liquida, N	2		1		nv	
	- cfDNA TF (%) Mediana [IQR]	1.25 [1.23-1.28]		1.5 [1.5-1.5]		nv	

BM MRD: malattia minima residua a livello midollare, cfDNA TF: frazione tumorale del DNA libero circolante, mant.: mantenimento, N: numero di pazienti, p: p value.

10.4. OUTCOMES

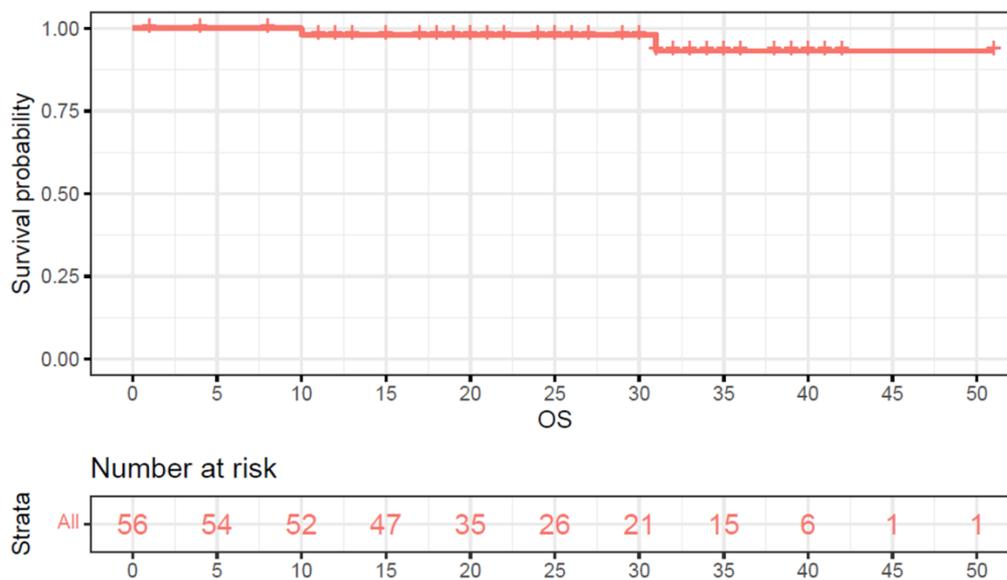
L'OS (*overall survival*) e la PFS (*progression free survival*) mediana risultavano essere non raggiunte al momento del follow-up mediano, pari a 24 mesi. Al momento dell'analisi 9

pazienti hanno sospeso la terapia di induzione per progressione di malattia e 2 pazienti sono deceduti.

Ad un'analisi univariata, la PFS non è risultata correlata alla presenza di un cfDNA superiore o inferiore al cut-off di 9% (HR 1.42, p=0.6). Nessuna delle caratteristiche di rischio basali dei pazienti, inoltre, ha mostrato di influenzare la PFS. Dato il basso numero di eventi (solo 2 decessi nel corso del follow-up), non è stato possibile eseguire analisi statisticamente attendibili relativamente alla sopravvivenza globale (OS).

Figura 10: Curve di OS (A) e PFS (B) globali

A.



B.

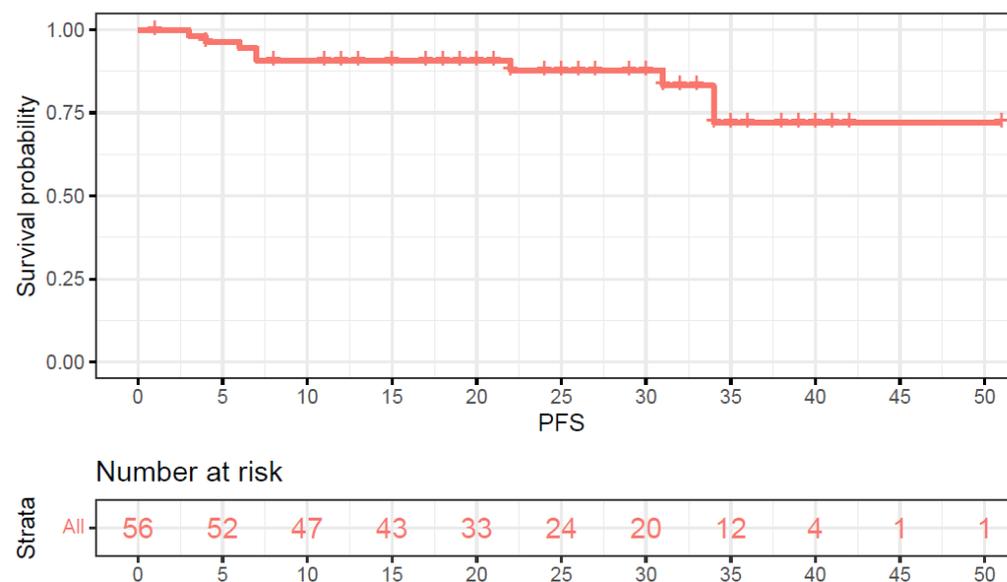
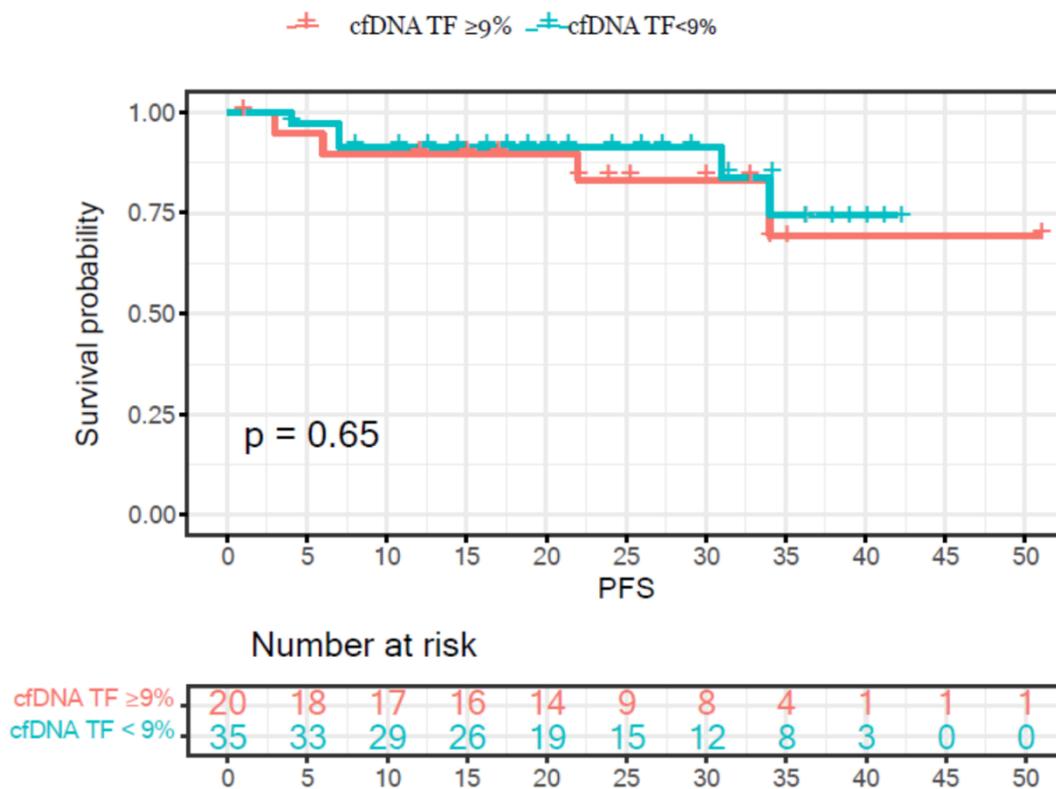


Figura 11: Curve di PFS nei pazienti con cfDNA TF elevata ($\geq 9\%$) o bassa ($< 9\%$)

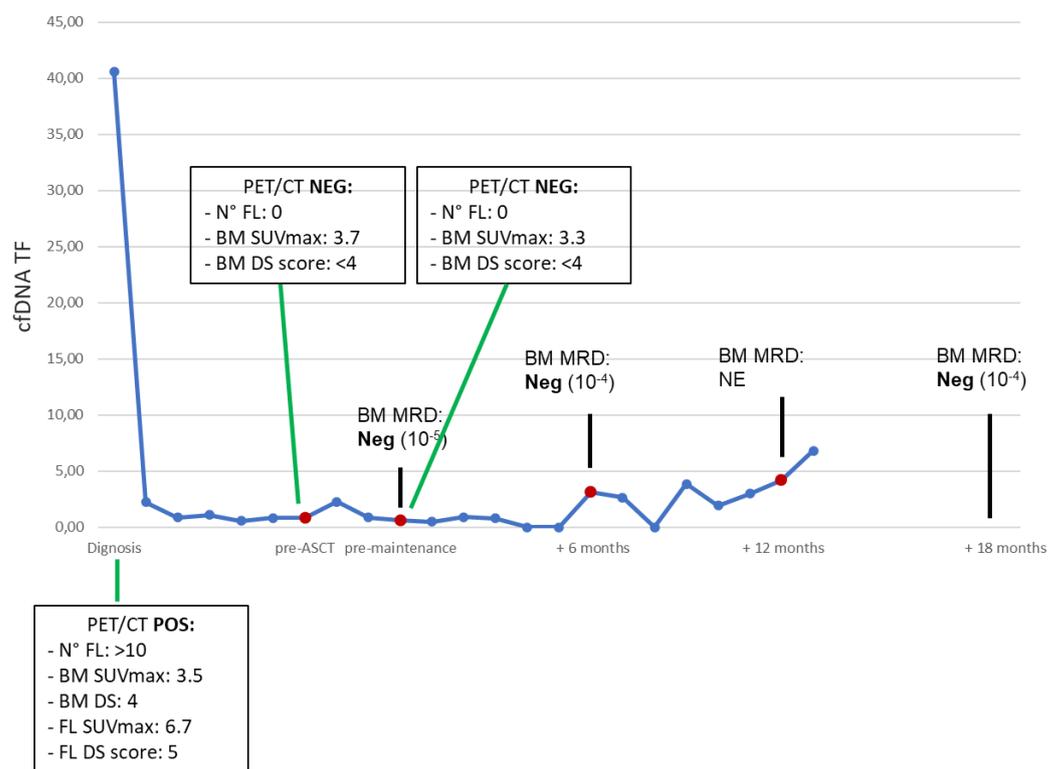


10.5. ESEMPI DI MONITORAGGIO COMPLETO CON TRE METODICHE

Come già specificato precedentemente, i pazienti con MM attivo inclusi nel presente studio sono stati sottoposti a monitoraggio nel corso delle varie fasi di trattamento mediante tre metodiche: biopsia liquida, aspirato midollare e PET-CT con FDG. Di seguito sono riportati alcuni esempi di come è stato possibile ricostruire il monitoraggio completo mettendo a confronto i tre differenti approcci.

- **PAZIENTE n°1**

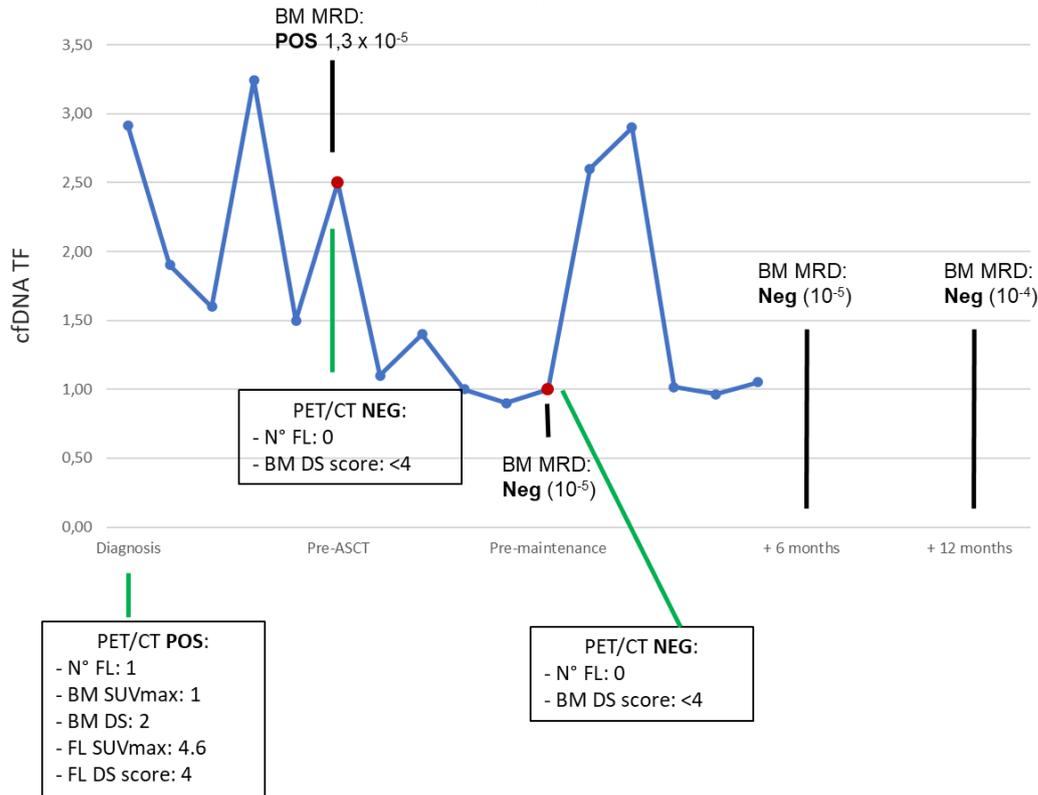
Figura 12: Rappresentazione del monitoraggio completo mediante tre metodiche (imaging, aspirato midollare, biopsia liquida) nel paziente n° 1



Nel primo paziente, al momento della diagnosi la frazione tumorale del DNA circolante era pari a 40.6%, la frazione tumorale midollare pari a 36.72% e la PET-CT era positiva con più di 10 lesioni focali (SUVmax mediano pari a 6.7), un Deauville Score (DS) midollare pari a 4 e un DS relativo alle lesioni focali pari a 5. Per quanto riguarda la TF del cfDNA, è stata riscontrata un'importante riduzione al momento dell'inizio della terapia e i valori si sono mantenuti inferiori alla soglia di sensibilità del 3% durante la fase di induzione, trapianto autologo e nei primi mesi dall'inizio del mantenimento. A partire da 6 mesi dopo l'inizio del mantenimento abbiamo assistito ad un progressivo lento incremento della frazione tumorale, fino all'ultimo valore riscontrato a 13 mesi dall'inizio del mantenimento, pari a 6.81%. Per quanto riguarda l'aspirato midollare, è stata eseguita una valutazione prima della terapia di mantenimento, risultata negativa con una sensibilità pari a 10^{-5} , a 6 mesi dall'inizio del mantenimento, risultata negativa con sensibilità 10^{-4} , a 12 mesi dall'inizio del mantenimento, risultata non valutabile, e a 18 mesi dall'inizio del mantenimento, risultata ancora negativa con sensibilità 10^{-4} nonostante il precedente iniziale incremento della cfDNA TF. Per quanto riguarda l'*imaging*, la PET-CT è stata ripetuta prima del trapianto autologo e prima dell'inizio del mantenimento, risultando in entrambi i casi negativa per assenza di lesioni focali e DS midollare inferiore a 4.

- **PAZIENTE n°2**

Figura 13: Rappresentazione del monitoraggio completo mediante tre metodiche (imaging, aspirato midollare, biopsia liquida) nel paziente n° 2



Nel secondo paziente riportato, al momento della diagnosi la frazione tumorale del DNA circolante era pari a 2.92%, la frazione tumorale midollare pari a 43.24% e la PET-CT era positiva con una lesione focale (SUVmax pari a 4.6), un Deauville Score (DS) midollare pari a 2 e un DS relativo alle lesioni focali pari a 4. Per quanto riguarda la TF del cfDNA, abbiamo assistito a un'oscillazione nei primi mesi di terapia con un valore minimo pari a 1.5% e un valore massimo pari a 3.25%. Al termine della terapia di induzione la cfDNA TF era pari a 2.5 % e la valutazione mediante NGS a livello midollare mostrava persistenza di malattia minima residua, pari a 1.3×10^{-5} , mentre la PET-CT risultava negativa per assenza di lesioni focali e DS midollare inferiore a 4. Nella seconda fase di terapia la cfDNA TF ha subito una progressiva riduzione e prima del mantenimento risultava pari a 1.0%; in questo *timepoint* anche la MRD a livello midollare risultava essere negativa con una sensibilità pari a 10^{-5} e la PET-CT si manteneva negativa. Nei due mesi successivi abbiamo assistito un un rapido incremento della cfDNA TF (2.6% e 2.9% a 1 mese e 2 mesi, rispettivamente), che non è stato confermato i tre mesi successivi (1.0%, 1.0% e 1.1% a 3 mesi, 4 mesi e 5 mesi,

rispettivamente). La valutazione della frazione tumorale circolante nei mesi successivi non è al momento disponibile per questo paziente, ma la valutazione mediante NGS a livello midollare è risultata negativa nei due successivi *timepoints* (a 6 mesi con una sensibilità pari a 10^{-5} e a 1 anno con una sensibilità pari a 10^{-4}).

11. DISCUSSIONE

Il Mieloma Multiplo (MM) è una discrasia plasmacellulare che tipicamente presenta un'elevata eterogeneità intra-clonale e spaziale, considerata ad oggi una patologia incurabile e con una storia naturale caratterizzata dall'alternanza di periodi di remissione seguiti inevitabilmente da ricaduta di malattia. Negli ultimi anni, tuttavia, il trattamento del MM è stato rivoluzionato grazie all'introduzione dei *novel agents*, che, combinati tra loro, sono stati in grado di aumentare significativamente l'aspettativa di vita dei pazienti portando ad un aumento del tasso di risposte alle terapie e della loro profondità, fino all'ottenimento di una negatività della malattia minima residua (MRD) valutata a livello midollare mediante aspirato testato con NGF o NGS, e a livello osseo o extramidollare mediante diagnostica per immagini. La negatività della MRD è attualmente considerata come il più potente predittore di esiti favorevoli a lungo termine e probabilmente rappresenterà il principale elemento per la scelta delle strategie terapeutiche nel prossimo futuro. L'aspirato midollare, però, è un'indagine invasiva e inoltre, essendo eseguito in un unico punto, può non rappresentare adeguatamente la reale massa neoplastica. Recenti studi hanno indagato l'utilizzo di una metodica innovativa e non invasiva ovvero la biopsia liquida, che si basa sulla ricerca nel sangue periferico di particolari *markers*, come ad esempio le vescicole extracellulari, il DNA libero circolante (cfDNA) e le cellule neoplastiche circolanti (CTCs o CMMCs), per monitorare la malattia minima residua. Al momento del presente studio, tuttavia, l'utilizzo di questa metodica per il monitoraggio della MRD è ancora in corso di sperimentazione e non rappresenta lo *standard of care*. Inoltre, attualmente non è ancora stato definito con chiarezza il suo ruolo nel predire l'*outcome* dei pazienti e la fattibilità di tale metodica su larga scala.

Il presente studio ha permesso di dimostrare la possibilità di utilizzare la biopsia liquida per caratterizzare i pazienti con MM attivo o con SMM ad alto rischio di evoluzione (HR-SMM) all'esordio e per determinare l'MRD nei pazienti sottoposti a terapia, andando ad integrare le metodiche attualmente validate.

In tutti i pazienti con MM attivo e con HR-SMM arruolati nel presente studio, difatti, è stato possibile analizzare il campione di sangue periferico all'esordio di malattia, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, grazie alla messa a punto del workflow di processamento dei plasmidi e sequenziamento del cfDNA. Infatti, essendo l'emivita del cfDNA particolarmente breve, è necessario prelevare il sangue periferico in appositi tubi addizionati di stabilizzatori oppure in tubi normali con EDTA come anticoagulante purchè vengano processati entro 2-3 ore dal prelievo. Questo previene il rilascio di cfDNA normale che interferirebbe con la

rilevazione della frazione tumorale oggetto di questo studio, rilevabile al di sopra del 3% di TF, soglia che rappresenta il limite tecnico della metodica.

Per quanto riguarda la valutazione quantitativa, è stata identificata, difatti, la frazione tumorale di DNA libero circolante (cfDNA TF) nel sangue periferico, la cui mediana è risultata essere significativamente inferiore rispetto alla TF di DNA a livello midollare (4.64% vs 58.0%, $p < 0.0001$, nei pazienti con MM e 3.63% vs 53.66%, $p = 0.025$, nei pazienti con HR-SMM, rispettivamente). È stato possibile caratterizzare la malattia mediante biopsia liquida anche da un punto di vista qualitativo, dimostrando un'elevata concordanza del profilo genomico tra DNA libero circolante e DNA midollare (100% nei pazienti con HR-SMM e 86% nei pazienti con MM attivo). La caratterizzazione della malattia al basale mediante biopsia liquida, quindi, è risultata fattibile e in grado di fornire informazioni sia qualitative che quantitative, al pari della valutazione midollare. Inoltre, come dimostrato dalla presenza di pazienti con MM attivo con profilo genomico discordante alle due differenti biopsie (pari a 14%), la biopsia liquida può permettere di caratterizzare in modo più completo la malattia, individuando la presenza di eventuali cloni differenti a livello midollare e periferico. Nei pazienti sottoposti a terapia di prima linea, inoltre, la biopsia liquida permette di monitorare la quota di malattia nel sangue periferico con una valutazione mensile, e quindi più ravvicinata rispetto alla valutazione midollare, che nella pratica clinica viene eseguita con una frequenza inferiore a causa della sua invasività. Valutando la TF di cfDNA in diversi pazienti, con un follow-up mediano di 24 mesi, è stato possibile determinarne l'andamento generale, riscontrando una tendenza ad una rapida e netta riduzione sostanzialmente in tutti i pazienti già nelle primissime fasi di terapia, indipendentemente dall'eventuale persistenza di malattia minima residua individuabile a livello midollare o mediante PET-CT. Al termine della terapia di induzione, infatti, la mediana di cfDNA TF risultava essere pari a 1.5%, mentre il tasso di positività della malattia minima residua valutata mediante NGS a livello midollare o PET-CT risultava essere ancora elevato, pari a 62% e 54%, rispettivamente. Nei mesi successivi, in alcuni pazienti sono stati riscontrati dei picchi isolati di cfDNA TF, tendenzialmente non confermati ai prelievi successivi. Escludendo queste eccezioni, in tutti i pazienti i valori si sono mantenuti bassi sia durante la fase di trapianto autologo che nei primi mesi della terapia di mantenimento. Prima del mantenimento, infatti, la cfDNA TF mediana è risultata essere pari a 1.0%, indipendentemente dalla persistenza di MRD misurabile a livello midollare o all'*imaging*, così come a 6 mesi dall'inizio della terapia di mantenimento, dove la cfDNA TF mediana è risultata essere pari a 1.3% (a questo *timepoint* non era prevista la valutazione mediante PET-CT ma solo mediante aspirato midollare). Nel corso dei mesi successivi in

alcuni pazienti, soprattutto coloro che all'esordio presentavano valori cfDNA TF superiori a 9%, ovvero al *cut-off* identificato per definire la TF elevata o bassa, abbiamo iniziato ad assistere ad un incremento della quota di cfDNA. È ipotizzabile che questo progressivo incremento della quota di cfDNA TF possa predire una successiva progressione di malattia, non ancora individuabile a livello sierologico o all'*imaging*, ma dato il breve follow-up mediano e la scarsa numerosità del campione in oggetto, al momento non è stato ancora possibile dimostrare questo aspetto. Dai dati riportati risulta evidente, però, che la biopsia liquida eseguita mensilmente è in grado di integrare la valutazione standardizzata della MRD mediante aspirato midollare e *imaging*, offrendo una valutazione più lineare e completa e talvolta aggiungendo informazioni. Questo risulta essere ancora più evidente nei due esempi sopra riportati di monitoraggio completo mediante le tre metodiche messe a confronto. In questi pazienti, difatti, viene sottolineato come le tre valutazioni possano dare informazioni differenti ai vari *timepoints* valutati, dimostrando come la ricerca della MRD mediante una sola metodica possa essere parziale e talvolta fuorviante. Relativamente ai pazienti con HR-SMM, non è ancora stato possibile trarre delle conclusioni sul monitoraggio, anche a causa della scarsa numerosità del campione in oggetto. I pazienti arruolati, difatti, sono stati solo 7 per diversi motivi: i pazienti con SMM ad alto rischio di evoluzione secondo la definizione dell'IMWG del 2020³³ rappresentano circa il 30% dei pazienti con SMM, si tratta quindi di un'entità poco frequente; inoltre, non dovendo ricevere un trattamento specifico per la patologia è più difficile eseguire un monitoraggio seriato in questi pazienti. In considerazione del fatto che il periodo di arruolamento dello studio ha coinciso con la presenza di pandemia da Covid19, non è stato possibile rendere lo studio multicentrico e arruolare in questo modo più pazienti.

In conclusione, quindi, il presente studio ha permesso di dimostrare la possibilità di utilizzare la biopsia liquida per identificare il profilo genomico delle cellule di MM e la frazione tumorale presente a livello periferico all'esordio di malattia. Inoltre, la biopsia liquida è un utile strumento da affiancare alla biopsia midollare e all'*imaging* nella valutazione della malattia minima residua in corso di terapia, in grado di fornire informazioni aggiuntive rispetto alle metodiche standardizzate e possibilmente di predire una progressione di malattia. Con un follow-up più lungo probabilmente sarà possibile stabilire con maggior certezza come questa metodica potrà essere inserita nella pratica clinica. Con una maggior standardizzazione verosimilmente la biopsia liquida potrà essere utilizzata per integrare le metodiche che attualmente rappresentano il *gold standard* nella valutazione dell'MRD, eventualmente alternando la biopsia midollare e l'*imaging* alla biopsia liquida, in quanto metodica non

invasiva e poco impegnativa per il paziente. Si può ipotizzare che in un futuro, una volta dimostrata la fattibilità di tale metodica su larga scala nella pratica clinica, possa essere addirittura in grado di sostituire la biopsia midollare nel monitoraggio della malattia minima residua.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Linee guida Mieloma Multiplo. Associazione Italiana Oncologia Medica. 2017.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008;111(6):2962-2972. doi:10.1182/blood-2007-10-078022
3. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly Sensitive, Automated Immunoassay for Immunoglobulin Free Light Chains in Serum and Urine. *Clin Chem*. 2001;47(4):673.
4. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2008;23:215.
5. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 2022;97(8):1086-1107. doi:10.1002/ajh.26590
6. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2021;32(3):309-322. doi:10.1016/j.annonc.2020.11.014
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016: Cancer Statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016;66(1):7-30. doi:10.3322/caac.21332
8. Altieri A, Chen B, Bermejo JL, Castro F, Hemminki K. Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma. *European Journal of Cancer*. 2006;42(11):1661-1670.
9. Sergeantanis TN, Zagouri F, Tsilimidos G, et al. Risk Factors for Multiple Myeloma: A Systematic Review of Meta-Analyses. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2015;15(10):563-577.e3. doi:10.1016/j.clml.2015.06.003
10. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *The Lancet*. 2009;374(9686):324-339. doi:10.1016/S0140-6736(09)60221-X
11. Mouhieddine TH, Weeks LD, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2019;133(23):2484-2494.
12. Sergeantanis TN, Zagouri F, Tsilimidos G, et al. Risk factors for multiple myeloma: a systematic review of meta-analyses. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2015;15(10):563-577.
13. Psaltopoulou T, Sergeantanis TN, Kanellias N, Kanavidis P, Terpos E, Dimopoulos MA. Tobacco smoking and risk of multiple myeloma: A meta-analysis of 40 observational studies. *International journal of cancer*. 2013;132(10):2413-2431.
14. KC A, Carrasco RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:249-274.
15. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone (s) in multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(20):3049-3058.

16. Ghosh N, Matsui W. Cancer stem cells in multiple myeloma. *Cancer letters*. 2009;277(1):1-7.
17. Tura S, Cavo M, Zinzani PL, Broccoli A. *Corso Di Malattie Del Sangue e Degli Organi Emolinfopoietici*. Società Editrice Esculapio; 2020.
18. Bolli N, Martinelli G, Cerchione C. The molecular pathogenesis of multiple myeloma. *Hematology Reports*. 2020;12(3).
19. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(5):335-348.
20. Mirabella F. Intracлонаl heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development o... *Leukemia*. 2014;28(2):384-390.
21. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-2221.
22. Shaughnessy J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27 Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology*. 2005;10(sup1):117-126.
23. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2010;116(15):e56-e65.
24. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467-472.
25. Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1998;92(3):802-809.
26. Fairfield H, Falank C, Avery L, Reagan MR. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016;1364(1):32-51.
27. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and diagnosis of multiple myeloma. In: Vol 33. Elsevier; 2017:225-236.
28. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. 2014;15(12):e538-e548. doi:10.1016/S1470-2045(14)70442-5
29. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2017;28(suppl_4):iv52-iv61. doi:10.1093/annonc/mdx096
30. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412. doi:10.1182/blood-2008-12-194241

31. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2002;346(8):564-569. doi:10.1056/NEJMoa01133202
32. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3069. doi:10.1182/blood-2014-09-568899
33. Mateos MV, Kumar S, Dimopoulos MA, et al. International Myeloma Working Group risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM). *Blood Cancer Journal*. 2020;10(10):102. doi:10.1038/s41408-020-00366-3
34. Notarfranchi L, Vescovini R, Segreto R, et al. Short-term risk for progression in patients with smoldering multiple myeloma: the impact of CD56 expression. *Blood*. 2020;136:11.
35. Schmidt TM, Callander NS. Progress in the management of smoldering multiple myeloma. *Current hematologic malignancy reports*. 2021;16(2):172-182.
36. Nahi H, Genell A, Wälinder G, et al. Incidence, characteristics, and outcome of solitary plasmacytoma and plasma cell leukemia. Population-based data from the Swedish Myeloma Register. *European Journal of Haematology*. 2017;99(3):216-222. doi:10.1111/ejh.12907
37. Caers J, Paiva B, Zamagni E, et al. Diagnosis, treatment, and response assessment in solitary plasmacytoma: updated recommendations from a European Expert Panel. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):10-10. doi:10.1186/s13045-017-0549-1
38. Pham A, Mahindra A. Solitary Plasmacytoma: a Review of Diagnosis and Management. Published online 2019. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00499-8>
39. Gundesen MT, Lund T, Moeller HE, Abildgaard N. Plasma cell leukemia: definition, presentation, and treatment. *Current oncology reports*. 2019;21(1):1-10.
40. Fernández de Larrea C, Kyle RA, Durie BG, et al. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia*. 2013;27(4):780-791.
41. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Plasma Cell Leukemia: Report on 17 Cases. *Archives of Internal Medicine*. 1974;133(5):813-818. doi:10.1001/archinte.133.5.813
42. Miquel Granell, Xavier Calvo, Antoni Garcia-Guiñón, et al. Prognostic impact of circulating plasma cells in patients with multiple myeloma: implications for plasma cell leukemia definition. *haematol*. 2017;102(6):1099-1104. doi:10.3324/haematol.2016.158303
43. Ravi P, Kumar SK, Roeker L, et al. Revised diagnostic criteria for plasma cell leukemia: results of a Mayo Clinic study with comparison of outcomes to multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*. 2018;8(12):116. doi:10.1038/s41408-018-0140-1
44. Terpos E, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Annals of Oncology*. 2005;16(8):1223-1231. doi:10.1093/annonc/mdi235
45. Tsang RW, Campbell BA, Goda JS, et al. Radiation Therapy for Solitary Plasmacytoma and Multiple Myeloma: Guidelines From the International Lymphoma Radiation Oncology Group. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 2018;101(4):794-808. doi:10.1016/j.ijrobp.2018.05.009

46. Bouchnita A, Eymard N, Moyo TK, Koury MJ, Volpert V. Bone marrow infiltration by multiple myeloma causes anemia by reversible disruption of erythropoiesis. *American Journal of Hematology*. 2016;91(4):371-378. doi:10.1002/ajh.24291
47. Dimopoulos MA, Sonneveld P, Leung N, et al. International Myeloma Working Group Recommendations for the Diagnosis and Management of Myeloma-Related Renal Impairment. *JCO*. 2016;34(13):1544-1557. doi:10.1200/JCO.2015.65.0044
48. Laing AA, Geddes C, Soutar R. Renal impairment at presentation in multiple myeloma continues to be associated with poor survival. *British Journal of Haematology*. 2015;169(6):901-902. doi:10.1111/bjh.13253
49. Dimopoulos MA, Kastiris E, Rosinol L, Bladé J, Ludwig H. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(8):1485-1493. doi:10.1038/leu.2008.131
50. Hutchison CA, Batuman V, Behrens J, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol*. 2011;8(1):43-51. doi:10.1038/nrneph.2011.168
51. Raje NS, Anaissie E, Kumar SK, et al. Consensus guidelines and recommendations for infection prevention in multiple myeloma: a report from the International Myeloma Working Group. *The Lancet Haematology*. 2022;9(2):e143-e161. doi:10.1016/S2352-3026(21)00283-0
52. Short KD, Rajkumar SV, Larson D, et al. Incidence of extramedullary disease in patients with multiple myeloma in the era of novel therapy, and the activity of pomalidomide on extramedullary myeloma. *Leukemia*. 2011;25(6):906-908. doi:10.1038/leu.2011.29
53. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2021;32(3):309-322.
54. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009;23(2):215-224.
55. 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. *Am J Pathol*. 1996;149(1):153-161.
56. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-380. doi:10.1038/nature03959
57. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Oefner PJ, ed. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012;2012:251364. doi:10.1155/2012/251364
58. Quail MA, Gu Y, Swerdlow H, Mayho M. Evaluation and optimisation of preparative semi-automated electrophoresis systems for Illumina library preparation. *ELECTROPHORESIS*. 2012;33(23):3521-3528. doi:10.1002/elps.201200128

59. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(1):31-46. doi:10.1038/nrg2626
60. Zamagni E, Cavo M. The role of imaging techniques in the management of multiple myeloma. *British journal of haematology*. 2012;159(5):499-513.
61. van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *The Lancet*. 2021;397(10272):410-427. doi:10.1016/S0140-6736(21)00135-5
62. Zamagni E, Tacchetti P, Cavo M. Imaging in multiple myeloma: How? When? *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2019;133(7):644-651.
63. Associazione italiana di oncologia medica (AIOM). Linee guida mieloma. Published online 2017.
64. 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;17(8):e328-e346. doi:10.1016/S1470-2045(16)30206-6
65. Ormond Filho AG, Carneiro BC, Pastore D, et al. Whole-body imaging of multiple myeloma: diagnostic criteria. *Radiographics*. 2019;39(4):1077-1097.
66. Pianko MJ, Terpos E, Roodman GD, et al. Whole-body low-dose computed tomography and advanced imaging techniques for multiple myeloma bone disease. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(23):5888-5897.
67. Kaiser MF, Porta N, Sharma B, et al. Prospective comparison of whole body MRI and FDG PET/CT for detection of multiple myeloma and correlation with markers of disease burden: Results of the iTIMM trial. *JCO*. 2021;39(15_suppl):8012-8012. doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.8012
68. Belotti A, Ribolla R, Cancelli V, et al. External Validation of Diffusion Weighted Whole Body MRI (DW-MRI) Response Assessment Category (RAC) Criteria Proposed By the Myeloma Response Assessment and Diagnosis System (MY-RADS) Imaging Recommendations: Prognostic Role of Imaging Response after Transplant in Multiple Myeloma and Comparison with MRD Evaluation By Flow Cytometry. *Blood*. 2020;136:41-42. doi:10.1182/blood-2020-135969
69. Cavo M, Terpos E, Nanni C, et al. Role of 18F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group. *The lancet oncology*. 2017;18(4):e206-e217.
70. Zamagni E, Nanni C, Patriarca F, et al. A prospective comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assessment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *haematologica*. 2007;92(1):50-55.
71. Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2011;118(23):5989-5995.
72. Moreau P, Attal M, Caillot D, et al. Prospective evaluation of magnetic resonance imaging and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography

at diagnosis and before maintenance therapy in symptomatic patients with multiple myeloma included in the IFM/DFCI 2009 trial: results of the IMAJEM study. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(25):2911.

73. van Lammeren-Venema D, Regelink JC, Riphagen II, Zweegman S, Hoekstra OS, Zijlstra JM. 18F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography in assessment of myeloma-related bone disease: A systematic review. *Cancer*. 2012;118(8):1971-1981.

74. Lu YY, Chen JH, Lin WY, et al. FDG PET or PET/CT for detecting intramedullary and extramedullary lesions in multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. *Clinical nuclear medicine*. 2012;37(9):833-837.

75. Rasche L, Angtuaco E, McDonald JE, et al. Low expression of hexokinase-2 is associated with false-negative FDG-positron emission tomography in multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2017;130(1):30-34.

76. Jamet B, Zamagni E, Nanni C, et al. Functional imaging for therapeutic assessment and minimal residual disease detection in multiple myeloma. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(15):5406.

77. Bartel TB, Haessler J, Brown TL, et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;114(10):2068-2076.

78. Patriarca F, Carobolante F, Zamagni E, et al. The role of positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose integrated with computed tomography in the evaluation of patients with multiple myeloma undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(6):1068-1073.

79. 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;20(6):e302-e312.

80. Terpos E, Kleber M, Engelhardt M, et al. European Myeloma Network guidelines for the management of multiple myeloma-related complications. *haematologica*. 2015;100(10):1254.

81. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-548. doi:10.1016/S1470-2045(14)70442-5

82. Bustoros M, Mouhieddine TH, Detappe A, Ghobrial IM. Established and Novel Prognostic Biomarkers in Multiple Myeloma. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2017;(37):548-560. doi:10.1200/EDBK_175175

83. Durie BGM, 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. doi:10.1002/1097-0142(197509)36:3<842::AID-CNCR2820360303>3.0.CO;2-U

84. Greipp PR, Miguel JS, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(15):3412-3420.
85. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863-2869. doi:10.1200/JCO.2015.61.2267
86. Barley K, Tindle S, Bagiella E, Jagannath S, Chari A. Serum Free Light Chain Assessment Early After Stem Cell Transplantation as a Prognostic Factor in Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2015;15(9):541-545. doi:10.1016/j.clml.2015.05.004
87. 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;102(3):e104-e107. doi:10.3324/haematol.2016.154070
88. van de Donk NWCJ, Lokhorst HM, Anderson KC, Richardson PG. How I treat plasma cell leukemia. *Blood*. 2012;120(12):2376-2389. doi:10.1182/blood-2012-05-408682
89. 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;97(11):1761-1767. doi:10.3324/haematol.2012.065698
90. 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, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(13):2068-2074.
91. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016;14:100.
92. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia*. 2019;33(1):159-170. doi:10.1038/s41375-018-0196-8
93. Perrot A, Lauwers-Cances V, Tournay E, et al. Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma. *JCO*. 2019;37(19):1657-1665. doi:10.1200/JCO.18.00776
94. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(4):571-596. doi:10.1016/j.beha.2007.08.004
95. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12(2):131-144. doi:10.1016/j.ccr.2007.07.003
96. Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(12):2280-2284. doi:10.1038/leu.2008.142

97. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-2221. doi:10.1038/leu.2009.174
98. Levin A, Hari P, Dhakal B. Novel biomarkers in multiple myeloma. *Translational Research*. 2018;201:49-59. doi:10.1016/j.trsl.2018.05.003
99. Shaughnessy JD, 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;109(6):2276. doi:10.1182/blood-2006-07-038430
100. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia*. 2012;26(2):349-355. doi:10.1038/leu.2011.204
101. 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;120(5):1060-1066. doi:10.1182/blood-2012-01-405977
102. de Mel S, Lim SH, Tung ML, Chng WJ. Implications of heterogeneity in multiple myeloma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:232546-232546. doi:10.1155/2014/232546
103. 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;17(8):e328-e346.
104. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Anderson KC, et al. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Advances*. 2020;4(23):5988-5999. doi:10.1182/bloodadvances.2020002827
105. de Tute RM, Pawlyn C, Cairns DA, et al. Minimal Residual Disease After Autologous Stem-Cell Transplant for Patients With Myeloma: Prognostic Significance and the Impact of Lenalidomide Maintenance and Molecular Risk. *JCO*. 2022;40(25):2889-2900. doi:10.1200/JCO.21.02228
106. Avet-Loiseau H, San-Miguel J, Casneuf T, et al. Evaluation of Sustained Minimal Residual Disease Negativity With Daratumumab-Combination Regimens in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma: Analysis of POLLUX and CASTOR. *JCO*. 2021;39(10):1139-1149. doi:10.1200/JCO.20.01814
107. Martinez-Lopez J, Wong SW, Shah N, et al. Clinical value of measurable residual disease testing for assessing depth, duration, and direction of response in multiple myeloma. *Blood Advances*. 2020;4(14):3295-3301. doi:10.1182/bloodadvances.2020002037
108. Bertamini L, D'Agostino M, Gay F. MRD assessment in multiple myeloma: Progress and challenges. *Current hematologic malignancy reports*. 2021;16(2):162-171.
109. Oliva S, D'Agostino M, Boccadoro M, Larocca A. Clinical applications and future directions of minimal residual disease testing in multiple myeloma. *Frontiers in oncology*. Published online 2020:1.

110. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2094-2103.
111. Bal S, Weaver A, Cornell RF, Costa LJ. Challenges and opportunities in the assessment of measurable residual disease in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2019;186(6):807-819. doi:10.1111/bjh.16130
112. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 2017;8(1):268-268. doi:10.1038/s41467-017-00296-y
113. Paiva B, Martinez-Martinez R, Maldonado R, et al. *Measurable Residual Disease by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma*.; 2020.
114. Usmani SZ, Mitchell A, Waheed S, et al. Prognostic implications of serial 18-fluoro-deoxyglucose emission tomography in multiple myeloma treated with total therapy 3. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121(10):1819-1823.
115. Zamagni E, Nanni C, Dozza L, et al. Standardization of 18F-FDG-PET/CT according to Deauville criteria for metabolic complete response definition in newly diagnosed multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(2):116-125.
116. Zamagni E, Nanni C, Gay F, et al. Impact of Imaging FDG-PET/CT Minimal Residual Disease Assessment on Outcomes and Matching with Bone Marrow Techniques in Newly Diagnosed Transplant Eligible Multiple Myeloma (MM) Patients: Results of the Phase II Randomized Forte Trial. *Blood*. 2020;136:27-28.
117. Associazione italiana oncologia medica. Linee guida linfomi. Published online 2017.
118. Messiou C, Hillengass J, Delorme S, et al. Guidelines for Acquisition, Interpretation, and Reporting of Whole-Body MRI in Myeloma: Myeloma Response Assessment and Diagnosis System (MY-RADS). *Radiology*. 2019;291(1):5-13. doi:10.1148/radiol.2019181949
119. Romano A, Palumbo GA, Parrinello NL, Conticello C, Martello M, Terragna C. Minimal residual disease assessment within the bone marrow of multiple myeloma: a review of caveats, clinical significance and future perspectives. *Frontiers in oncology*. Published online 2019:699.
120. Wallington-Beddoe CT, Mynott RL. Prognostic and predictive biomarker developments in multiple myeloma. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14(1):1-15.
121. Foulk B, Schaffer M, Gross S, et al. Enumeration and characterization of circulating multiple myeloma cells in patients with plasma cell disorders. *British Journal of Haematology*. 2018;180(1):71-81. doi:10.1111/bjh.15003
122. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil*. Published online 1948:142(3-4):241-243.
123. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. Published online 1977:37(3):646-650.

124. Guo G, Raje NS, Seifer C, et al. Genomic discovery and clonal tracking in multiple myeloma by cell-free DNA sequencing. *Leukemia*. 2018;32(8):1838-1841. doi:10.1038/s41375-018-0115-z
125. Long X, Xu Q, Lou Y, et al. The utility of non-invasive liquid biopsy for mutational analysis and minimal residual disease assessment in extramedullary multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2020;189(2):e45-e48. doi:10.1111/bjh.16440
126. Kis O, Kaedbey R, Chow S, et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nat Commun*. 2017;8:15086-15086. doi:10.1038/ncomms15086
127. Bernhard Gerber, Martina Manzoni, Valeria Spina, et al. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy in plasma cell dyscrasias. *haematol*. 2018;103(6):e245-e248. doi:10.3324/haematol.2017.184358
128. Ye X, Li W, Zhang L, Yu J. Clinical Significance of Circulating Cell-Free DNA Detection in Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*. 2022;12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.852573>
129. Deshpande S, Tytarenko RG, Wang Y, et al. Monitoring treatment response and disease progression in myeloma with circulating cell-free DNA. *European Journal of Haematology*. 2021;106(2):230-240. doi:10.1111/ejh.13541
130. Manier S, Park J, Capelletti M, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nature Communications*. 2018;9(1):1691. doi:10.1038/s41467-018-04001-5
131. Vrabel D, Sedlarikova L, Besse L, et al. Dynamics of tumor-specific cfDNA in response to therapy in multiple myeloma patients. *European Journal of Haematology*. 2020;104(3):190-197. doi:10.1111/ejh.13358
132. Manzoni M, Pompa A, Fabris S. Limits and Applications of Genomic Analysis of Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy in Asymptomatic Forms of Multiple Myeloma. *Hemasphere*. 2020;4(4):e402.
133. Waldschmidt JM, Vijaykumar T, Knoechel B, Lohr JG. Tracking myeloma tumor DNA in peripheral blood. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2020;33(1):101146.
134. Murray DL, Puig N, Kristinsson S, et al. Mass spectrometry for the evaluation of monoclonal proteins in multiple myeloma and related disorders: an International Myeloma Working Group Mass Spectrometry Committee Report. *Blood cancer journal*. 2021;11(2):1-6.
135. Cavo M, Benni M, Ronconi S, 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.
136. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2011;364(11):1046-1060. doi:10.1056/NEJMra1011442

137. Rajkumar SV. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol*. 2016;91(1):90-100. doi:10.1002/ajh.24236
138. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome Inhibition As a Novel Therapeutic Target in Human Cancer. *JCO*. 2005;23(3):630-639. doi:10.1200/JCO.2005.11.030
139. Krönke J, Udeshi ND, Narla A, et al. Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science*. 2014;343(6168):301-305. doi:10.1126/science.1244851
140. de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, et al. Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology*. 2011;186(3):1840-1848. doi:10.4049/jimmunol.1003032
141. Overdijk MB, Verploegen S, Bögels M, et al. Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *mAbs*. 2015;7(2):311-320. doi:10.1080/19420862.2015.1007813
142. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med*. 2017;376(14):1311-1320. doi:10.1056/NEJMoa1611750
143. Cavo M, Gay F, Beksac M, et al. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus bortezomib–melphalan–prednisone, with or without bortezomib–lenalidomide–dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma (EMN02/HO95): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet Haematology*. 2020;7(6):e456-e468. doi:10.1016/S2352-3026(20)30099-5
144. 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 study. *The Lancet*. 2010;376(9758):2075-2085. doi:10.1016/S0140-6736(10)61424-9
145. 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. *JCO*. 2013;31(26):3279-3287. doi:10.1200/JCO.2012.48.4626
146. 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;127(21):2569-2574. doi:10.1182/blood-2016-01-693580
147. Rosinol Dachs 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;132(Suppl 1):3245. doi:10.1182/blood-2018-99-112659

148. 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;120(9):1801-1809. doi:10.1182/blood-2012-04-422683
149. 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;125(3):449-456. doi:10.1182/blood-2014-05-576256
150. Mikhael JR, Reeder CB, Libby EN, et al. Phase Ib/II trial of CYKLONE (cyclophosphamide, carfilzomib, thalidomide and dexamethasone) for newly diagnosed myeloma. *Br J Haematol*. 2015;169(2):219-227. doi:10.1111/bjh.13296
151. Gay F, Cerrato C, Rota Scalabrini D, et al. Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone (KRd) Induction-Autologous Transplant (ASCT)-Krd Consolidation Vs KRd 12 Cycles Vs Carfilzomib-Cyclophosphamide-Dexamethasone (KCd) Induction-ASCT-KCd Consolidation: Analysis of the Randomized Forte Trial in Newly Diagnosed Multiple Myeloma (NDMM). *Blood*. 2018;132(Suppl 1):121. doi:10.1182/blood-2018-99-112093
152. 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. *The Lancet*. 2019;394(10192):29-38. doi:10.1016/S0140-6736(19)31240-1
153. Terpos E. Multiple Myeloma: Clinical Updates From the American Society of Hematology Annual Meeting, 2017. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2018;18(5):321-334. doi:10.1016/j.clml.2018.02.015
154. Attal M, Harousseau JL, Facon T, et al. Single versus Double Autologous Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2003;349(26):2495-2502. doi:10.1056/NEJMoa032290
155. Cavo M, Tosi P, Zamagni E, et al. Prospective, Randomized Study of Single Compared With Double Autologous Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma: Bologna 96 Clinical Study. *JCO*. 2007;25(17):2434-2441. doi:10.1200/JCO.2006.10.2509
156. Cavo M, Gay FM, Patriarca F, et al. Double Autologous Stem Cell Transplantation Significantly Prolongs Progression-Free Survival and Overall Survival in Comparison with Single Autotransplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: An Analysis of Phase 3 EMN02/HO95 Study. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):401.
157. Cavo M, Salwender H, Rosiñol L, et al. Double Vs Single Autologous Stem Cell Transplantation After Bortezomib-Based Induction Regimens For Multiple Myeloma: An Integrated Analysis Of Patient-Level Data From Phase European III Studies. *Blood*. 2013;122(21):767.
158. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B, et al. Autologous Transplantation, Consolidation, and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma: Results of the BMT CTN 0702 Trial. *J Clin Oncol*. 2019;37(7):589-597. doi:10.1200/JCO.18.00685
159. 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;130(Suppl 1):397.

160. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, et al. Lenalidomide Maintenance after Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2012;366(19):1782-1791. doi:10.1056/NEJMoa1114138
161. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2012;366(19):1770-1781. doi:10.1056/NEJMoa1114083
162. Mateos MV, Richardson PG, Schlag R, et al. Bortezomib Plus Melphalan and Prednisone Compared With Melphalan and Prednisone in Previously Untreated Multiple Myeloma: Updated Follow-Up and Impact of Subsequent Therapy in the Phase III VISTA Trial. *JCO.* 2010;28(13):2259-2266. doi:10.1200/JCO.2009.26.0638
163. 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;131(3):301-310. doi:10.1182/blood-2017-07-795047
164. 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. *The Lancet.* 2017;389(10068):519-527. doi:10.1016/S0140-6736(16)31594-X
165. Mateos MV, Dimopoulos MA, Cavo M, et al. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med.* 2018;378(6):518-528. doi:10.1056/NEJMoa1714678
166. 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. *The Lancet.* 2020;395(10218):132-141. doi:10.1016/S0140-6736(19)32956-3
167. Facon T, Kumar S, Plesner T, et al. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med.* 2019;380(22):2104-2115. doi:10.1056/NEJMoa1817249
168. Facon T, Kumar SK, Plesner T, et al. Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma (MAIA): overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2021;22(11):1582-1596. doi:10.1016/S1470-2045(21)00466-6
169. Sonneveld P. Management of multiple myeloma in the relapsed/refractory patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017;2017(1):508-517. doi:10.1182/asheducation-2017.1.508
170. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2015;373(7):621-631. doi:10.1056/NEJMoa1505654
171. Dimopoulos MA, Lonial S, White D, et al. Elotuzumab, lenalidomide, and dexamethasone in RRMM: final overall survival results from the phase 3 randomized

ELOQUENT-2 study. *Blood Cancer Journal*. 2020;10(9):91. doi:10.1038/s41408-020-00357-4

172. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-1331. doi:10.1056/NEJMoa1607751

173. 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;34(7):1875-1884. doi:10.1038/s41375-020-0711-6

174. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al. Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;372(2):142-152. doi:10.1056/NEJMoa1411321

175. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, et al. Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;374(17):1621-1634. doi:10.1056/NEJMoa1516282

176. 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;17(1):27-38. doi:10.1016/S1470-2045(15)00464-7

177. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(8):754-766. doi:10.1056/NEJMoa1606038

178. Mateos MV, Sonneveld P, Hungria V, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone Versus Bortezomib and Dexamethasone in Patients With Previously Treated Multiple Myeloma: Three-year Follow-up of CASTOR. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2020;20(8):509-518. doi:10.1016/j.clml.2019.09.623

179. 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;20(6):781-794. doi:10.1016/S1470-2045(19)30152-4

180. Dimopoulos M, Quach H, Mateos MV, et al. Carfilzomib, dexamethasone, and daratumumab versus carfilzomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CANDOR): results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2020;396(10245):186-197. doi:10.1016/S0140-6736(20)30734-0

181. Moreau P, Dimopoulos MA, Mikhael J, et al. Isatuximab, carfilzomib, and dexamethasone in relapsed multiple myeloma (IKEMA): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet*. 2021;397(10292):2361-2371. doi:10.1016/S0140-6736(21)00592-4

182. Dimopoulos MA, Dytfeld D, Grosicki S, et al. Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2018;379(19):1811-1822. doi:10.1056/NEJMoa1805762

183. Richardson PG, Perrot A, San-Miguel J, et al. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): follow-up analysis of a randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2022;23(3):416-427. doi:10.1016/S1470-2045(22)00019-5
184. Chari A, Suvannasankha A, Fay JW, et al. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017;130(8):974-981. doi:10.1182/blood-2017-05-785246
185. Dimopoulos MA, Terpos E, Boccadoro M, et al. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone versus pomalidomide and dexamethasone alone in previously treated multiple myeloma (APOLLO): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2021;22(6):801-812. doi:10.1016/S1470-2045(21)00128-5
186. Chari A, Vogl DT, Gavriatopoulou M, et al. Oral Selinexor–Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2019;381(8):727-738. doi:10.1056/NEJMoa1903455
187. Lonial S, Lee HC, Badros A, et al. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2020;21(2):207-221. doi:10.1016/S1470-2045(19)30788-0
188. Mikkilineni L, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood*. 2017;130(24):2594-2602. doi:10.1182/blood-2017-06-793869
189. Ali SA, Shi V, Maric I, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(13):1688-1700. doi:10.1182/blood-2016-04-711903
190. Raje N, Berdeja J, Lin Y, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2019;380(18):1726-1737. doi:10.1056/NEJMoa1817226
191. Stirrups R. CAR T-cell therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. 2019;20(6):e297. doi:10.1016/S1470-2045(19)30288-8
192. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest*. 2019;129(6):2210-2221. doi:10.1172/JCI126397
193. Moreau P, Garfall AL, van de Donk NWCJ, et al. Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2022;387(6):495-505. doi:10.1056/NEJMoa2203478
194. Lakshman A, Kumar SK. Chimeric antigen receptor T-cells, bispecific antibodies, and antibody-drug conjugates for multiple myeloma: An update. *American Journal of Hematology*. 2022;97(1):99-118. doi:10.1002/ajh.26379
195. Dutta AK, Hewett DR, Fink JL, Grady JP, Zannettino ACW. Cutting edge genomics reveal new insights into tumour development, disease progression and therapeutic impacts in

multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2017;178(2):196-208. doi:10.1111/bjh.14649

196. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3069. doi:10.1182/blood-2014-09-568899

197.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/01/WC500137126.pdf; Appendix 1 to the guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man: Methodological consideration for using progression-free survival (PFS) or disease-free survival (DFS) in confirmatory trials; 13 December 2012, EMA/CHMP/27994/2008/Rev.1.