

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA

Ciclo 34

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

**Settore Scientifico Disciplinare:** MED/15 - MALATTIE DEL SANGUE

L'IMMUNOTERAPIA IN ASSOCIAZIONE ALLA TERAPIA STANDARD PER I  
PAZIENTI CON MIELOMA MULTIPLO DI NUOVA DIAGNOSI CANDIDABILI  
ALLA CHEMIOTERAPIA AD ALTE DOSI

**Presentata da:** Serena Rocchi

**Coordinatore Dottorato**

Manuela Ferracin

**Supervisore**

Michele Cavo

**Esame finale anno 2022**

# INDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUZIONE.....  | 3  |
| 2. MIELOMA MULTIPLO.....  | 5  |
| 2.1 STORIA NATURALE E CRITERI DIAGNOSTICI.....  | 5  |
| 2.2 MIELOMAGENESI.....  | 7  |
| 2.2.1 MICROAMBIENTE MIDOLLARE.....  | 8  |
| 2.2.2 ANGIOGENESI.....  | 9  |
| 2.3 MANIFESTAZIONI CLINICHE.....  | 10 |
| 2.3.1 IL DANNO OSSEO.....   | 10 |
| 2.3.2 IPERCALCEMIA.....   | 12 |
| 2.3.3 INTERESSAMENTO RENALE.....  | 12 |
| 2.3.4 INSUFFICIENZA MIDOLLARE.....  | 13 |
| 2.3.5 MORBILITÀ INFETTIVA.....  | 13 |
| 2.4 METODICHE DIAGNOSTICHE.....   | 14 |
| 2.4.1 INDAGINI LABORATORISTICHE.....  | 14 |
| 2.4.2 INDAGINI STRUMENTALI.....   | 14 |
| 2.5 FATTORI PROGNOSTICI.....  | 16 |
| 2.5.1 STADIAZIONE.....  | 16 |
| 2.5.2 CITOGENETICA ED ESPRESSIONE GENICA.....   | 17 |
| 3. TERAPIA.....   | 20 |
| 3.1 I NUOVI FARMACI.....  | 21 |
| 3.1.1 IMMUNOMODULATORI.....   | 22 |
| 3.1.2 INIBITORI DEL PROTEASOMA.....   | 23 |
| 3.1.3 ANTICORPI MONOCLONALI.....  | 25 |
| 3.2 DARATUMUMAB.....  | 26 |
| 3.2.1 MECCANISMO D'AZIONE.....  | 26 |
| 3.2.2 MECCANISMI DI RESISTENZA.....   | 27 |
| 3.2.3 TOSSICITÀ.....  | 28 |
| 3.2.4 SOMMINISTRAZIONE.....   | 29 |
| 3.2.5 STUDI REGISTRATIVI.....   | 30 |
| 3.3 IMMUNOTERAPIA.....  | 33 |
| 3.4 TERAPIA DEL PAZIENTE CON NUOVA DIAGNOSI.....  | 34 |
| 3.4.1 TERAPIA DI PRIMA LINEA DEL PAZIENTE CANDIDATO A TRAPIANTO<br>AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI.....     | 34 |
| 3.4.2 TERAPIA DI PRIMA LINEA DEL PAZIENTE NON CANDIDATO A<br>TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI..... | 40 |
| 3.4.3 TERAPIA DEL PAZIENTE RICADUTO/REFRATTARIO.....  | 42 |
| 4. RAZIONALE DELLO STUDIO.....  | 46 |
| 5. OBIETTIVI DELLO STUDIO.....  | 47 |
| 6. MATERIALI E METODI.....  | 47 |
| 6.1 DISEGNO DELLO STUDIO E CRITERI DI INCLUSIONE ED<br>ESCLUSIONE.....                                    | 47 |
| 6.1.1 EMN17 (PERSEUS).....  | 47 |
| 6.1.2 EMN18.....  | 49 |
| 6.2 CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA.....   | 52 |
| 6.3 ANALISI CITOGENETICA-MOLECOLARE.....  | 53 |
| 6.4 ANALISI DELLA TOSSICITÀ.....  | 54 |
| 6.5 DEFINIZIONE DEGLI ENDPOINTS “TIME-TO-EVENT”.....  | 54 |
| 6.6 ANALISI STATISTICA.....   | 54 |
| 7. RISULTATI.....   | 55 |
| 7.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI.....   | 55 |
| 7.2 TOSSICITÀ.....  | 57 |
| 7.3 OUTCOMES.....   | 59 |
| 7.3.1 RISPOSTA EMATOLOGICA.....   | 59 |
| 7.3.2 SOPRAVVIVENZA.....  | 59 |

|   |    |
|---|----|
| 7.3.3 RACCOLTA DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE ..... | 60 |
| 8. DISCUSSIONE.....                                       | 62 |
| 9. BIBLIOGRAFIA.....                                      | 66 |

# 1. INTRODUZIONE

Lo scenario terapeutico del Mieloma Multiplo (MM) nelle ultime decadi si è progressivamente ampliato, rivoluzionando la prognosi dei pazienti.

Per molti anni la strategia terapeutica è stata finalizzata al semplice contenimento della taglia neoplastica attraverso l'impiego di un ristretto numero di farmaci chemioterapici, primi tra tutti gli agenti alchilanti in associazione ai corticosteroidi. Al fine di prolungare la sopravvivenza, a partire dagli anni '90 sono stati introdotti nella pratica clinica la chemioterapia ad alte dosi con successivo supporto di cellule staminali ematopoietiche (trapianto autologo, ASCT), prima, e, poi, i nuovi farmaci non chemioterapici in grado di esercitare la propria attività, oltre che sul clone neoplastico, anche a livello del microambiente midollare. Tale classe di molecole comprende gli inibitori del proteasoma (PI), di cui il capostipite è il bortezomib, gli immunomodulanti (ImiDs), quali talidomide, lenalidomide e pomalidomide e gli anticorpi monoclonali (moAbs).

Attualmente, lo *standard of care* per i pazienti giovani ( $\leq 65-70$  anni) e *fit* è rappresentato dal trapianto autologo preceduto e seguito, rispettivamente, da una terapia d'induzione e da una terapia di consolidamento comprensive di bortezomib, e, successivamente, da una terapia di mantenimento lenalidomide-*based*. Questo approccio ha portato ad un significativo incremento di risposte profonde e, conseguentemente, ad un prolungamento della sopravvivenza dei pazienti.

Recentemente, inoltre, tra le strategie terapeutiche efficaci per i pazienti con MM sono emersi gli moAbs, tra cui daratumumab (dara), che, primo tra tutti, ha mostrato ottimi risultati nel *setting* del paziente ricaduto/refrattario (RR); grazie a questi risultati, dara è stato approvato in pratica clinica prima come agente singolo e, poi, in combinazione con i nuovi farmaci lenalidomide e bortezomib per questa categoria di pazienti.

Considerando questi dati incoraggianti su dara, è stato posto il quesito se il suo impiego in una fase più precoce di malattia, quella della nuova diagnosi, potesse ulteriormente incrementare la profondità di risposta e, quindi, migliorare la prognosi dei pazienti con MM. A tal proposito, dara è stato studiato anche nel *setting* del paziente con MM di nuova diagnosi (NDMM); in particolare, i primi studi clinici, CASSIOPEIA e MAIA, hanno dimostrato ottimi dati di efficacia e *safety*, grazie ai quali dara è stato recentemente approvato in Europa, rispettivamente, per il paziente all'esordio di malattia sia candidabile che non candidabile alla chemioterapia ad alte dosi. In Italia, fino ad oggi, dara era approvato in pratica clinica solo per il paziente non candidabile a ASCT, mentre, per i pazienti giovani è stato studiato

nell'ambito di due *trials clinici* proposti dall'European Myeloma Network, uno di fase II (EMN18) ed uno di fase III (EMN17).

Lo scopo del seguente progetto di ricerca è stato quello di valutare l'efficacia, in termini di *rate* di risposte e sopravvivenza libera da malattia (PFS), ed il profilo di sicurezza di dara in associazione alla terapia standard nei pazienti con NDMM candidabili a ricevere ASCT, arruolati negli studi clinici EMN18 e EMN17 presso l'Istituto di Ematologia di Bologna "L. A. Seràgnoli".

Infine, considerando che dara è stato recentissimamente introdotto nell'iter terapeutico del paziente eleggibile a ASCT, i dati riguardanti il suo impatto sulla raccolta delle cellule staminali emopoietiche (PBSC) sono scarsi e prematuri. Pertanto, un particolare focus del presente progetto di ricerca è stato quello di valutare anche l'impatto di tale molecola sulla raccolta delle PBSC e, quindi, sul trapianto autologo.

## 2. MIELOMA MULTIPLO

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

In Italia, il MM rappresenta circa l'1% di tutte le neoplasie ed il 10% di quelle ematologiche. L'incidenza è lievemente superiore nell'uomo rispetto alla donna (incidenza annua pari a 9,5 casi/100.000 nell'uomo e 8,1 casi/100.000 nelle donne) ed è circa due volte superiore nei pazienti con etnia afro-americana rispetto a quelli caucasici. Esso rappresenta una patologia tipica dell'adulto-anziano; infatti, l'età mediana alla diagnosi è pari a 68 anni, solo il 2% dei pazienti ha un'età inferiore a 40 anni ed il 38% ha un'età superiore a 70 anni [2-3]. Secondo i dati epidemiologici riportati dall'AIRTUM (Associazione Italiana Registro Tumori), l'incidenza globale nel 2015 è rimasta stabile (8 casi per 100.000 abitanti) con una Overall Survival (OS) del 76% ad un anno e del 42% a cinque anni.

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

### 2.1 STORIA NATURALE E CRITERI DIAGNOSTICI

Il MM è una patologia incurabile, la cui storia naturale è caratterizzata da una serie di recidive di malattia e progressiva refrattarietà.

In circa un terzo dei pazienti il MM è preceduto da una fase pre-maligna, chiamata gammapatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS), clinicamente silente e riscontrata occasionalmente agli esami laboratoristici di routine [6]. La MGUS è presente in circa in oltre il 4% degli individui di età superiore ai 50 anni, nel 5% degli individui di età superiore a 70 anni e nel 7,5% degli individui di età superiore a 80 anni [7]. Il rischio annuo di progressione da MGUS a MM è pari a circa all'1% e si mantiene costante nel tempo. I principali fattori associati a un maggior rischio di progressione sono la concentrazione della CM sierica  $> 1.5$  g/dl, l'isotipo non IgG della CM (non IgG) ed un rapporto di catene leggere libere sieriche (*serum free light chains*, sFLC) kappa/lambda alterato  $> 8$ ; altri fattori di rischio per l'evoluzione in MM sono l'immunoparesi delle due classi immunoglobuliniche policlonali

ed il pattern evolutivo (aumento della CM pari al 25% o di 500 mg/dl nei primi 12 mesi) [8-9].

Lo stadio clinico intermedio tra la MGUS e il MM è il MM asintomatico o smouldering (SMM), caratterizzato da una più elevata quota di plasmacellule neoplastiche e quantità di componente monoclonale, in assenza tuttavia di danno d'organo. Nel SMM il rischio di progressione a MM attivo è maggiore rispetto all'MGUS ed è pari a circa il 10% annuo nei primi 5 anni successivi alla diagnosi ed al 3% all'anno per i successivi 5 anni [10]. Anche in questo caso vi sono fattori associati ad un maggior rischio di progressione: concentrazione della CM sierica > 3 g/dl, isotipo IgA, immunoparesi (soppressione di una o più Ig non coinvolta), pattern evolutivo (aumento  $\geq 25\%$  della CM sierica o delle catene leggere libere a 6 mesi dal precedente controllo), alterazioni citogenetiche ad alto rischio, plasmocitosi midollare del 50-60%, "pattern diffuso" o presenza di una lesione focale alla risonanza magnetica (RMN) e lesioni captanti alla PET-TC senza evidenza di lesioni osteolitiche sottostanti [11-12]. A partire dal 2014, sono stati proposti vari modelli di stratificazione del rischio di progressione dello SMM; in particolare, l'*International Myeloma Working Group* (IMWG) ha identificato un modello prognostico, noto come 20/20/20, che ha permesso di stratificare i pazienti con SMM sulla base di 3 criteri, quali l'infiltrazione plasmacellulare midollare > 20%, la concentrazione di CM sierica > 20 g/l, il rapporto delle sFLC (catena coinvolta/catena non coinvolta) > 20: i pazienti con 2 o 3 variabili rappresentano un gruppo ad alto rischio di progressione (81% a 5 anni), che è significativamente più elevato rispetto a quello dei pazienti a rischio intermedio (con 1 singolo criterio di rischio) ed a rischio basso (con nessuno dei 3 criteri), pari al 47% ed al 22%, rispettivamente [11]. Nei pazienti con SMM non vi è indicazione ad iniziare la terapia, ma è necessario programmare uno stretto monitoraggio longitudinale con esami laboratoristici e di imaging.

La diagnosi di Mieloma Multiplo attivo si basa, secondo le linee guida revisionate dall'IMWG nel 2014, sulla presenza di un infiltrato di plasmacellule clonali (dimostrate con tecniche di citofluorimetria o di immunohistochimica)  $\geq 10\%$  della cellularità totale alla biopsia osteo-midollare, oppure documentato istologicamente a seguito della biopsia di una lesione osteolitica o di una neoformazione solida para-scheletrica od extra-midollare, e di uno o più dei Myeloma Defining Events (MDE), rappresentati da un vero e proprio danno d'organo (criteri CRAB) oppure da biomarcatori di malignità (SLiM *criteria*), come riportato nella Tabella 1 [13].

Tabella 1: Criteri IMWG per la diagnosi delle discrasie plasmacellulari

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

## 2.2 MIELOMAGENESI

La trasformazione neoplastica delle plasmacellule nel MM è un processo le cui tappe patogenetiche non sono ancora completamente chiarite. Tuttavia, negli anni passati sono stati fatti dei progressi nell'identificazione di alcuni suoi punti chiave [14].

In condizioni normali, le cellule deputate alla B linfocitopoiesi vanno incontro ad un riarrangiamento di diversi segmenti genici delle sequenze V (“regione variabile”), D (“regione della diversità”) e J (“regione della ricongiunzione – joining) dei geni codificanti per le catene pesanti (IgH) e delle sequenze V e J dei geni codificanti per le catene leggere (IgL) delle immunoglobuline – processo pertanto definito “ricombinazione V(D)J”. Il risultato di questo processo è la formazione di cellule B naïve esprimenti Ig di superficie, le quali dal midollo osseo trasmigreranno agli organi linfoidi secondari, dove si realizzerà l'incontro con l'antigene. Il destino dei linfociti B potrà dunque essere duplice: da una parte, quello di differenziare in plasmacellule a breve sopravvivenza (*short-lived plasma cells*), caratterizzate principalmente da espressione di IgM nel corso di risposte T-indipendenti oppure nelle fasi precoci delle risposte T-dipendenti; dall'altra, quello di differenziare in linfociti B della memoria ed in plasmablasti a seguito dell'incontro con antigeni di natura proteica in corso di risposte T-dipendenti, che determinerà la maturazione dell'affinità recettoriale tramite

processi di ipermutazione somatica e *switch* isotipico delle catene pesanti (da IgM a IgG, IgA, IgD o IgE). I linfociti B della memoria andranno incontro al processo di *homing* verso il midollo osseo e lì differenzieranno, grazie all'interazione con il microambiente midollare, in plasmacellule a lunga sopravvivenza (*long-lived plasma cells*) [15].

Poiché le cellule mielomatose presentano le ipermutazioni somatiche a carico dei geni codificanti per le Ig, esse possono essere identificate come elementi neoplastici che originano durante la maturazione antigene-dipendente nel centro germinativo degli organi linfoidi secondari e che, previa migrazione a livello midollare, interagiscono con il microambiente, il quale ha un ruolo fondamentale di stimolo sul clone neoplastico.

### 2.2.1 MICROAMBIENTE MIDOLLARE

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

Come appena accennato, il microambiente midollare ha un ruolo chiave nel promuovere e mantenere uno stimolo sul clone neoplastico. Infatti, il MM si caratterizza per un'alterazione del complesso *signalling* tra le varie molecole di segnale e della fisiologica omeostasi relativa alle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, che porta non solo ad un'aumentata sopravvivenza e proliferazione del clone plasmacellulare maligno, ma anche ad un incremento dell'angiogenesi, alla formazione di lesioni litiche ossee ed all'acquisizione di resistenza ai farmaci da parte delle cellule tumorali. Le principali cellule del microambiente coinvolte sono rappresentate dalle cellule stromali midollari (BMSC) [17]. Questo complesso processo prende avvio quando le cellule neoplastiche circolanti trovano dei siti di ancoraggio tramite il legame delle loro molecole di adesione LFA-1 e VLA-4 con, rispettivamente, ICAM-1 e VCAM-1 (esposte dalle BMSC); questo comporta, in entrambe le popolazioni cellulari, l'attivazione di diverse vie intracellulari di trasduzione del segnale. Nelle BMSC sono attivati, ad esempio, MEK/MAPK e NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ , determinando un'aumentata espressione delle stesse molecole di adesione (e dunque un'amplificazione del segnale), ma anche di fattori di crescita quali IGF-1, TGF- $\beta$ , FGF e VEGF e, soprattutto, dell'IL-6. Tale

citochina, sia nella crescita in vitro che in vivo, esercita importanti effetti quali l'inibizione dell'apoptosi, lo stimolo alla proliferazione, l'angiogenesi e l'attivazione osteoclastica ma anche l'acquisizione di farmaco-resistenza da parte del clone neoplastico. Queste osservazioni hanno condotto al tentativo di impiego di farmaci aventi tale target (ad esempio anticorpi monoclonali anti IL-6 o anti IL6R) con scarsi risultati, dimostrando il ruolo fondamentale ma non esclusivo di questo pathway [16]. Le interazioni viste determinano invece nelle cellule mielomatose l'attivazione di vie di trasduzione del segnale quali PI-3K/Akt/mTor, Ras/Raf/MAPK, JAK/STAT3, Wnt/APC/ $\beta$ -catenina, Wnt/Rho e IKK/NF- $\kappa$ B (quest'ultimo divenuto importante oggetto di studio in quanto costituisce uno dei targets degli inibitori del proteasoma). Gli effetti di queste vie includono l'inibizione dell'apoptosi, lo stimolo alla proliferazione, il danno osseo e la farmaco-resistenza [16-18].

Il microambiente midollare sembra, inoltre, giocare un ruolo chiave nella ripresa di malattia.

Ancora oggi, non si conoscono i meccanismi chiave della ricomparsa e riespansione del clone tumorale. Alcuni studi hanno evidenziato che il clone tumorale MM potrebbe essere in realtà una miscela di popolazioni cellulari a diversi stadi di maturazione, tra cui le cosiddette "Myeloma Propagating Cell" (MPC), una sottopopolazione di cellule immature che potrebbero dar luogo alla recidiva di malattia [19]; al contrario, altri studi sostengono che le plasmacellule neoplastiche possono essere dotate di importante plasticità e dunque della capacità di "autosostenere" la malattia [20].

Tuttavia, la natura precisa ed il fenotipo cellulare che supporta la crescita del MM rimangono ancora controversi.

### 2.2.2 ANGIOGENESI

Un altro ruolo chiave nello sviluppo del MM e delle neoplasie in generale è quello dell'angiogenesi [21].

L'angiogenesi tumorale è un processo multistep che si sviluppa per la maggiore richiesta tissutale di ossigeno e nutrienti e si contraddistingue per la formazione di strutture vascolari aberranti, con vasi scarsamente organizzati ed immaturi, generalmente tortuosi, dilatati, fenestrati, con scarsa membrana basale e radi periciti – peculiarità che conferiscono una marcata permeabilità ed un flusso ematico anomalo. Tale processo è da imputare al fatto che, durante l'accrescimento e la progressione tumorale, si assiste ad uno squilibrio tra fattori anti-angiogenici e pro-angiogenici a favore di questi, con conseguente stimolo alla formazione di nuovi vasi [22-23]. I principali stimoli all'angiogenesi ad oggi individuati sono

rappresentati dalla crescita della massa neoplastica (che determina una condizione di ipossia relativa del clone in accrescimento), l'attivazione di alcuni oncogeni (riconosciuto è, ad esempio, il ruolo delle proteine Ras e di HER-2), l'inattivazione di alcuni oncosoppressori (quali p53 e VHL) e la presenza, nel microambiente, di alcuni tipi cellulari – un ruolo fondamentale sembra svolto dai macrofagi che si accumulano nelle aree poco vascolarizzate, ipossiche e necrotiche e qui secernono molecole pro-angiogeniche [24-28].

Anche nel MM è stato riscontrato un incremento dell'angiogenesi: il microambiente midollare si caratterizza per un'aumentata densità microvascolare rispetto ai soggetti sani.

Inoltre, la progressione del MM è caratterizzata da una fase pre-angiogenica, rappresentata dalle forme indolenti di MGUS e dallo SMM, seguita da un *angiogenic switch* indotto dalla progressiva crescita tumorale ed ipossia relativa con secrezione aberrante di VEGF da parte di plasmacellule CD45 negative [29-30]. Si viene a creare, così, un circolo vizioso nel quale le plasmacellule CD45- secernono VEGF, determinando un incremento dei processi di neo-vascolarizzazione, ma anche una chemiotassi delle BMSC; quest'ultime, interagendo con le plasmacellule neoplastiche, a loro volta, stimolano l'angiogenesi stessa ed inducono il reclutamento e l'attivazione di cellule stromali infiammatorie (specialmente macrofagi e mastociti), che contribuiscono ad amplificare il processo tramite diversi mediatori solubili [31-33].

Infine, il ruolo fondamentale dell'angiogenesi nel MM è stato ampiamente dimostrato dal fatto che diversi farmaci oggi impiegati nel trattamento (sia gli inibitori del proteasoma che gli immunomodulanti) presentino anche un'azione anti-angiogenica [34].

## 2.3 MANIFESTAZIONI CLINICHE

L'incontrollata proliferazione midollare delle plasmacellule neoplastiche, l'aumentata produzione di immunoglobuline monoclonali e le loro peculiari caratteristiche chimico-fisiche, la produzione autocrina e paracrina di citochine sono responsabili dei principali quadri clinici di presentazione della malattia, rappresentati dal danno osseo, l'insufficienza renale, l'ipercalcemia, l'insufficienza midollare e l'aumentata morbilità infettiva.

### 2.3.1 IL DANNO OSSEO

L'interessamento scheletrico, definito tale dalla presenza di una o più lesioni osteolitiche (con diametro pari o superiore a 5 mm), è la manifestazione clinica più frequente, con un'incidenza pari al 70% dei pazienti alla diagnosi e nella quasi totalità dei pazienti durante la progressione. La sua patogenesi è secondaria all'esaltata attività osteoclastica ed

alla ridotta azione osteoblastica, che portano ad un'alterazione del normale rimodellamento osseo (rimodellamento osseo *uncoupled*).

L'aumentata attività osteoclastica è un evento precoce ed è stata ricondotta a diversi meccanismi molecolari. In primis, a seguito dell'interazione delle BMSC con le cellule mielomatose, le prime aumentano la secrezione del RANK-L, con successivo legame a RANK e conseguente stimolo alla proliferazione ed alla maturazione dei precursori osteoclastici, all'attivazione degli osteoclasti maturi e alla loro ridotta apoptosi; inoltre, è stata dimostrata una riduzione di osteoprotegerina (OPG), antagonista fisiologico di RANK-L, a causa sia dell'interazione BMSC-cellule mielomatose sia per l'internalizzazione dell'OPG da parte delle PC mediante legame al Syndecan-1 (CD138) [35-37]. A tal proposito, è stato dimostrato come l'aggiunta di bifosfonati e Denosumab (anticorpo monoclonale diretto contro RANK-L) alla terapia standard del MM determini una riduzione degli *skeletal-related events* con conseguente beneficio in termini di sopravvivenza; in particolare, Denosumab determina un aumento della PFS rispetto ai bifosfonati a conferma del ruolo chiave di RANK-L nella patogenesi del MM [38]. Altri meccanismi che determinano un'iper-attivazione osteoclastica includono l'aumentata secrezione di MIP-1 $\alpha$  (che stimola sia l'attività degli osteoclasti – con meccanismi RANK-L dipendenti ed indipendenti – sia l'*homing* midollare delle cellule mielomatose e dunque l'interazione con le BMSC) [35, 39], di activina A ed IL-3 (entrambe correlate ad incremento della formazione di osteoclasti ed inibizione del differenziamento degli osteoblasti) [35, 40-41] e l'attivazione del pathway di Notch (con azione di incremento dell'osteoclastogenesi mediante lo stimolo alla secrezione di RANK-L non solo da parte delle BMSC, ma anche delle cellule neoplastiche) [40]. Anche la IL-6, oltre alle già descritte attività di stimolo al mantenimento e alla proliferazione del clone mielomatoso e all'aumento dell'angiogenesi, sembra correlata allo sviluppo delle lesioni ossee (mediante un incremento della secrezione di RANK-L ed una riduzione della secrezione di OPG) ed è stata valutata come bersaglio terapeutico [35, 40].

Per quanto riguarda, invece, la minore attività osteoblastica (evento tardivo), questa è stata ricondotta ad un'inibizione di Runx2, fattore necessario alla proliferazione ed attivazione delle cellule osteoprogenitrici ed alla secrezione di OPG, secondaria all'interazione tra VLA-4, molecola di adesione espressa dalle cellule mielomatose, e VCAM-1, espresso dagli osteoblasti [35]. Inoltre, un ruolo nella ridotta attività osteoblastica è stato riconosciuto ad alcuni fattori solubili secreti dalle PC neoplastiche e dalle cellule del microambiente in seguito ai processi di interazione, quali IL-3, IL-7 e DKK1 (inibitore del pathway di Wnt) [35].

Le principali metodiche diagnostiche per valutare la patologia scheletrica saranno descritte in seguito nel paragrafo 2.4.

Alla malattia scheletrica si associano manifestazioni clinico-laboratoristiche, quali severo dolore osseo, fratture patologiche, compressione del midollo spinale, ipercalcemia.

### 2.3.2 IPERCALCEMIA

L'ipercalcemia è una manifestazione clinico-laboratoristica, secondaria al riassorbimento osseo, che si verifica in un 30-40% dei pazienti con MM: in circa la metà di essi all'esordio di malattia e nel restante 50% durante il decorso di malattia. Le manifestazioni cliniche sono molto variabili: possono essere di entità sfumata come poliruria, polidipsia, anoressia, astenia e nausea fino ad arrivare a quadri clinici gravi e potenzialmente letali, quali aritmie cardiache, stato confusionale, delirio e coma.

### 2.3.3 INTERESSAMENTO RENALE

L'interessamento renale è presente in circa il 20-30% dei pazienti alla diagnosi e, di questi, circa il 10% necessita di trattamento dialitico; l'incidenza di insufficienza renale raggiunge il 50% in corso di progressione [42].

L'eziopatogenesi del danno renale è complessa ed associata a vari meccanismi sottostanti. Nella maggior parte dei casi, esso è dovuto all'iperproduzione ed alle peculiari caratteristiche di nefrotossicità delle catene leggere, che danneggiano in modo selettivo le varie strutture del nefrone; mentre, più raramente, il danno renale è indipendente dall'effetto tossico delle catene leggere monoclonali ed è legato ad altri meccanismi, quali la sepsi, l'ipercalcemia, la sindrome da lisi tumorale, farmaci (ad esempio, i farmaci anti-infiammatori non steroidei utilizzati in caso di sintomatologia dolorosa) od infiltrazione renale diretta da parte delle cellule mielomatose [43-44].

Nel caso in cui l'insufficienza renale sia dipendente dalle catene leggere, quest'ultime possono portare a danno renale tramite differenti meccanismi ed in diversi segmenti del nefrone: il danno renale più frequente (> 90% dei casi) è quello del rene da mieloma (*cast nephropathy*), in cui le catene leggere libere in eccesso si accumulano nel tubulo prossimale, dove fisiologicamente vengono filtrate e catabolizzate, e qui si legano alla glicoproteina di Tamm-Horsfall, formando dei precipitati che occludono il tubulo prossimale con conseguente infiammazione e fibrosi; altri rari (< 10%) quadri di danno renale tubulare e/o glomerulare includono la sindrome di Fanconi, l'amiloidosi AL, la malattia da deposito di catene leggere e la malattia da deposito di catene pesanti [43-44].

L'insufficienza renale è considerata un fattore prognostico sfavorevole, con un'aumentata incidenza di mortalità precoce (entro i 60 giorni dalla diagnosi) e correlata ad una ridotta sopravvivenza globale (OS) [45-46]. Pertanto, una diagnosi precoce ed un rapido trattamento sono fondamentali per ridurre velocemente la taglia di malattia e recuperare la funzione renale, migliorando la prognosi dei pazienti [47]. In particolare, a tal proposito, è stato dimostrato che, in caso di elevati valori di catene leggere libere sieriche, il trattamento dialitico con filtri più permeabili, simili a quelli renali (*high cut-off hemodialysis*), rimuova velocemente dal circolo tale eccesso, evitando, quindi, una loro ulteriore deposizione a livello tubulare renale ed aumentando significativamente il *rate* di recupero della funzione renale [47].

#### 2.3.4 INSUFFICIENZA MIDOLLARE

L'insufficienza midollare, presente in circa l'80% dei pazienti, si manifesta più comunemente con un quadro di anemia normocromica e normocitica, dovuta, in primis, alla sostituzione della normale emopoiesi da parte di un ricco infiltrato plasmacellulare, ma anche secondaria al rilascio di citochine pro-infiammatorie e di altri mediatori nel contesto del microambiente midollare, al deficit di eritropoietina conseguente alla malattia renale e agli effetti mielotossici delle terapie impiegate. All'anemia possono associarsi quadri di trombocitopenia e/o leucopenia.

#### 2.3.5 MORBILITA' INFETTIVA

Nei pazienti con MM si osserva una ridotta efficacia sia dell'immunità umorale sia dell'immunità cellulo-mediata per soppressione della normale produzione immunoglobulinica e della risposta anticorpale, riduzione del numero e dell'attività dei linfociti T CD4+ Th1, ridotta capacità citotossica dei linfociti T CD8+, disfunzione delle cellule NK e delle cellule dendritiche. Il risultato finale è un quadro di immunoparesi, la cui causa principale è da ricercarsi nella ricca produzione citochinica (TGF $\beta$ , IL10, IL6, VEGF) ad opera delle plasmacellule neoplastiche (PC) e delle cellule stromali del midollo osseo (BMSC).

Tale quadro si traduce in un'aumentata morbilità infettiva, che si manifesta in circa il 25% dei pazienti all'esordio. L'impatto clinico, però, delle infezioni aumenta progressivamente con la durata della malattia e con le terapie impiegate: oltre il 75% dei pazienti svilupperà un'infezione importante potenzialmente fatale durante il decorso della

malattia e fino al 50% dei decessi in pazienti affetti da MM (dato storico: studi più recenti propongono circa un 25%) sarebbe da imputare ad un evento infettivo [48].

## 2.4 METODICHE DIAGNOSTICHE

La diagnosi di MM attivo si basa sui criteri diagnostici elencati precedentemente nella Tabella 1 [13], i quali per essere valutati necessitano di specifiche indagini diagnostiche laboratoristiche e strumentali.

### 2.4.1 INDAGINI LABORATORISTICHE

Il biomarcatore della presenza di un clone plasmacellulare è rappresentato laboratoristicamente dalla CM, che può essere un'immunoglobulina (Ig) intera, costituita nella sua integrità da due catene pesanti (più frequentemente IgG e IgA, più raramente IgM o IgD) e due leggere, o un suo frammento, generalmente rappresentato dalla sola catena leggera. La presenza di una CM viene dimostrata mediante l'utilizzo di due metodiche laboratoristiche, che sono l'elettroforesi delle proteine (PEP) e l'immunofissazione (IFE), sieriche ed urinarie. A seconda della CM, il MM può essere classificato in secernente, con Ig intere (77% dei casi), Bence Jones (o "micromolecolare", a catene leggere urinarie, 22% dei casi) e non secernente (1% dei casi). Inoltre, grazie all'impiego del dosaggio delle sFLC, una clonalità evidenziabile come alterazione del rapporto  $\kappa/\lambda$  emerge nel 70% circa dei pazienti altrimenti identificati come non secernenti, nel 100% dei pazienti Bence Jones e nel 90% dei pazienti secernenti Ig intere.

Queste sono le prime indagini da eseguire nel sospetto di MM. Successivamente, la diagnosi si completa con l'esecuzione dell'aspirato midollare e/o della biopsia osteomidollare, al fine di confermare e quantificare la componente plasmacellulare midollare e di poter effettuare le valutazioni di carattere immunofenotipico, citogenetico e molecolare necessarie alla definizione della prognosi.

Per valutare la presenza di eventuale danno d'organo è poi necessaria la valutazione dell'esame emocromocitometrico completo, della calcemia e della funzionalità renale; la valutazione della concentrazione ematica di albumina e  $\beta$ 2-microglobulina risulta invece fondamentale per la stadiazione secondo l'*International Staging System* (ISS).

### 2.4.2 INDAGINI STRUMENTALI

Le metodiche strumentali di *imaging*, utilizzate per valutare la patologia scheletrica e l'eventuale diffusione extra-midollare, rivestono un ruolo fondamentale non solo nella

diagnosi, ma anche dal punto di vista prognostico e nella valutazione della risposta al trattamento [49-50].

Un tempo la valutazione della patologia scheletrica era basata sulla radiografia convenzionale (RX), la quale è in grado di evidenziare le lesioni ossee solo quando queste coinvolgono almeno il 50% della massa ossea locale. Pertanto, è un'indagine poco sensibile con il rischio di sottostimare la malattia scheletrica e questo ha fatto sì che tale metodica venisse sostituita da tecniche di *imaging* più sensibili e avanzate: ad oggi, infatti, è raccomandato l'uso di TC corporea a basse dosi (WBLDCT), risonanza magnetica nucleare (RMN) assiale/*whole body* e tomografia computerizzata ad emissione di positroni (PET-TC) con 18-FDG (fluorodesossiglucosio).

Le linee più recenti linee guida dell'IMWG e dell'*European Myeloma Network* (EMN) suggeriscono l'uso in prima istanza della WBLDCT, la quale rappresenta attualmente il *gold standard* nello studio delle lesioni osteolitiche, nella stima del rischio di fratture, ma anche come guida per l'esecuzione di biopsie e nella pianificazione di radioterapia ed interventi chirurgici [51].

Laddove la WBLDCT sia negativa, è consigliabile escludere la presenza di lesioni focali alla RMN assiale/*whole body* [51]. La RMN assiale con mezzo di contrasto al gadolinio è la metodica di elezione per lo studio del rachide, in quanto è in grado di riconoscere la diffusione tumorale a livello midollare nelle sequenze T1 e T2, in cui le lesioni si presentano ipointense e iperintense, rispettivamente e, quindi, di mostrare un'infiltrazione neoplastica prima della lisi ossea. La RMN *whole-body* rappresenta, invece, una versione più evoluta della RMN, che non necessita dell'impiego di mezzo di contrasto e con tempi di esecuzione più brevi (circa 20 minuti). Inoltre, la RMN permette lo studio di eventuali masse extra-ossee, di complicanze neurologiche (risultando ad esempio mandatoria nel sospetto di compressione del midollo spinale) e permette di differenziare le fratture benigne da osteoporosi da quelle maligne.

La PET-TC con 18-FDG è una valida alternativa rispetto alla WBLDCT, in quanto è una metodica che permette di distinguere lesioni metabolicamente attive da quelle inattive con un potere di risoluzione di 5 mm e questo fa sì che sia particolarmente utilizzata nello studio della risposta alla terapia [52]. Inoltre, è in grado di identificare la presenza di localizzazione di malattia para-scheletrica o extra-midollare [52].

## 2.5 FATTORI PROGNOSTICI

### 2.5.1 STADIAZIONE

La notevole eterogeneità del MM per presentazione e decorso clinico ha reso indispensabile l'individuazione di fattori prognostici che consentano di distinguere una malattia aggressiva ad alto rischio da una relativamente indolente, con lo scopo di predire la sopravvivenza dei pazienti e di stimare la risposta alle terapie.

Il primo sistema classificativo utilizzato fu quello introdotto da Durie e Salmon nel 1975, che identificava tre stadi clinici (I, II, III) corrispondenti ad una massa tumorale di taglia progressivamente maggiore e due varietà (A e B) a seconda della funzionalità renale (A: normale, B: creatinina > 2 mg/dL) [53]. Tuttavia, tale classificazione presentava vari limiti nel predire la prognosi dei pazienti, perciò oggi non viene più utilizzata ed è stata sostituita dal sistema classificativo ISS (*International Staging System*), che distingue tre stadi sulla base di due semplici parametri, come evidenziato in Tabella 2: i livelli sierici di albumina e di  $\beta 2$  microglobulina [54]. Questi due parametri esprimono indirettamente la taglia del clone neoplastico: infatti, la  $\beta 2$  microglobulina, essendo un dominio dell'MHC di classe I espresso dalle plasmacellule, correla con il burden di malattia; la riduzione dell'albumina riflette, invece, l'aumentata espressione di IL-6 da parte del clone neoplastico, che risulta in uno *shift* verso la produzione di proteine di fase acuta a livello epatico a discapito di quelle normalmente prodotte (l'albumina è la proteina plasmatica più rappresentata).

Tabella 2. Stadiazione ISS

|            |  |
|------------|--|
| Stadio I   | $\beta 2$ microglobulina < 3.5 mg/L e albumina $\geq$ 3.5 g/dl |
| Stadio II  | Non soddisfatti criteri per I e III*                           |
| Stadio III | $\beta 2$ microglobulina > 5.5 mg/L                            |

\* lo stadio II identifica pertanto due possibili situazioni:  $\beta 2$  microglobulina < 3.5 mg/L ma albumina < 3.5 g/dL; oppure  $\beta 2$  microglobulina compresa tra 3.5 e 5.5 mg/dL, indipendentemente dai valori di albumina sierica.

Negli ultimi anni, inoltre, sono stati eseguiti vari studi su un'ampia casistica di pazienti per perfezionare tale sistema classificativo e identificare ulteriori fattori prognostici. Nel 2015 l'IMWG ha revisionato l'ISS e ha definito un nuovo score prognostico, il *revised* ISS (R-ISS) che integra il classico ISS (albumina e  $\beta 2$  microglobulina) con altri due fattori: il valore sierico di LDH (la cui elevata concentrazione correla ad una malattia più aggressiva, ad un maggior indice proliferativo e può suggerire la presenza di malattia in sede extramidollare) e la

presenza di tre anomalie citogenetiche ad alto rischio, quali la delezione del cromosoma 17 (del17p13), la traslocazione (t) (4;14) e la t(14;16) [55].

Tabella 3. Stadiazione R-ISS

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

Questo nuovo sistema classificativo ha permesso di stratificare in modo più preciso i pazienti in diverse categorie con sopravvivenza differente: la PFS a 5 anni è del 55% per R-ISS I, del 36% per R-ISS II e del 24% per R-ISS III; la OS a 5 anni è dell'82% per R-ISS I, del 62% per R-ISS II e del 40% per R-ISS III. Sebbene il R-ISS rappresenti il sistema di stadiazione più completo tra quelli ad oggi proposti, diversi studi hanno mostrato una notevole eterogeneità relativa alla prognosi soprattutto nei pazienti in stadio R-ISS II [56-58]. A tal proposito, molto recentemente è stato proposto un R-ISS più aggiornato (R-ISS2) per stratificare in modo ancor più preciso i pazienti a rischio intermedio. Tale sistema di stratificazione assegna un diverso punteggio a ciascuna delle seguenti variabili: ISS2, ISS3, LDH, del17p13, t(4;14) ed amplificazione del cromosoma 1q; in questo modo, i pazienti vengono suddivisi in 4 categorie a differente rischio: basso, intermedio-basso, intermedio-alto, alto, con una PFS a 5 anni pari al 55%, 40%, 25% e 17%, rispettivamente [59].

### 2.5.2 CITOGNETICA ED ESPRESSIONE GENICA

Come già descritto nel paragrafo precedente, le mutazioni di tipo genomico e cromosomico hanno un impatto prognostico dimostrato, tale per cui esse sono state inserite nei modelli di stratificazione del rischio dei pazienti.

Le mutazioni citogenetiche vengono valutate tramite l'immunofluorescenza in situ (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH), la quale ha una sensibilità maggiore (pari all'80-90%) nel determinare la loro presenza, rispetto al solo studio del cariotipo, che rileva alterazioni nel 30-50%, con quindi notevole sottostima, poiché in grado di studiare unicamente cellule in metafase, a fronte di un basso indice proliferativo delle PC neoplastiche [60]. Inoltre, negli ultimi anni sta emergendo sempre più l'importanza dal punto di vista prognostico anche di singoli geni, che vengono identificati tramite indagini molecolari, quali il *Next Generation Sequencing* (NGS).

Le alterazioni genetiche vengono divise in:

- ❖ primarie, considerate come eventi inizianti e tendono a rimanere stabili con la progressione della malattia (anche durante la ricaduta e le fasi avanzate);
- ❖ secondarie, le quali non sono presenti nella MGUS (al contrario delle primarie), e per questo potrebbero avere un ruolo promuovente, e non sono presenti in tutte le PC neoplastiche, a conferma di un'evoluzione policlonale, rendendo il MM una malattia geneticamente complessa ed eterogenea [61-62].

A loro volta, le alterazioni citogenetiche primarie sono classificate in:

- ❖ mutazioni iperdiploidi (50-60% dei pazienti alla diagnosi): riguardano trisomie a carico dei cromosomi 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e/o 21 e sono associate alla presenza di traslocazioni primarie in meno del 10% dei casi (generalmente riguardanti IGH); esse correlano generalmente ad una malattia meno aggressiva (la cui prognosi sembra anche migliorare con l'aumento del numero di trisomie presenti) e ben responsiva ai farmaci di impiego comune come la lenalidomide [63];
- ❖ mutazioni non iperdiploidi (nella restante percentuale di casi): si caratterizzano per traslocazioni coinvolgenti il gene codificante per la catena pesante delle immunoglobuline IGH (sul cromosoma 14q32), che fanno sì che degli oncogeni vengano a trovarsi sotto il controllo del promotore di IGH (gene iperespresso nelle PC, deputate alla sintesi e secrezione anticorpale), risultando dunque iperespressi; le traslocazioni, a loro volta, come vedremo in seguito sono sub-classificate sulla base della famiglia di oncogeni coinvolti, appartenenti alla famiglia della ciclina D, ai fattori trascrizionali MAF, al pathway di MMSET/FGFR3 [64]; le mutazioni non iperdiploidi sono correlate generalmente ad una prognosi più severa.

Tra le traslocazioni ricorrenti con maggiore frequenza, occorre ricordare:

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

Le più frequenti alterazioni genetiche secondarie rilevate, invece, sono:

- ❖ delezione del cromosoma 13 (o del suo braccio lungo 13q o della sua regione 13q14): riscontrata in circa il 50% dei pazienti, coinvolge l'oncosoppressore RB1; il significato di questa anomalia risulta tuttora controverso: è considerata ad alto rischio quando identificata in citogenetica convenzionale mentre rappresenta un rischio standard se identificata in FISH;
- ❖ anomalie a carico del cromosoma 1, che comprendono:
  - duplicazione del braccio lungo 1q (presente in circa il 35-40% dei pazienti): coinvolge il gene CSK1B ed è correlata ad alto rischio (con prognosi che peggiora all'aumentare delle cellule con tale mutazione);
  - delezione del braccio corto 1p (presente in circa il 30% dei pazienti): coinvolge diversi geni e correla ad alto rischio;
- ❖ delezione di 17p13 e dunque dell'oncosoppressore p53 (presente in circa il 5-10% dei pazienti alla diagnosi e fino all'80% dei pazienti durante la progressione): correla ad un'importante aggressività e ad una significativa riduzione della sopravvivenza [65-66].

Tuttavia, bisogna considerare come, nonostante i diversi fattori genetici con ruolo prognostico ad oggi individuati, non esista un modello standardizzato di definizione della prognosi che integri tutti questi marcatori di rischio. Pertanto, sono state studiate alcune ipotesi, tra cui, ad esempio, quella del MM definito “*Double-Hit*” o “*Triple-Hit*”, caratterizzato dalla compresenza di 2 o  $\geq 3$  anomalie citogenetiche ad alto rischio secondo le ultime linee guida mSMART 3.0, rispettivamente, che ha una prognosi assolutamente negativa rispetto a quella dei pazienti che presentano 1 o nessuna anomalia citogenetica ad alto rischio [67]. Un ulteriore e più recente sistema proposto per la definizione prognostica è rappresentato invece da uno score, definito *Prognostic Index*, basato sulla valutazione di del(17p), t(4;14), del(1p32), ampl(1q21) e trisomia dei cromosomi 3, 5 e 21, con la possibilità di distinguere i pazienti in tre categorie di rischio (alto, intermedio o basso) [65].

Inoltre, nonostante non siano attualmente in valutazione nella routine clinica, è ormai validato da numerosi studi il potenziale impatto prognostico della presenza di mutazioni o dell'espressione relativa a singoli geni, tra cui: iper-espressione di MYC, che rappresenta un fattore prognostico sfavorevole [64], mutazioni di RAS, che correlano potenzialmente alla progressione da MGUS a MM [64], solo mutazioni di KRAS (ma non di NRAS), le quali sembrano correlare ad un notevole peggioramento prognostico [68], e l'attivazione costitutiva

del pathway di NF- $\kappa$ B, che ha assunto un ruolo sempre più importante per le sue implicazioni terapeutiche grazie all'impiego degli inibitori del proteasoma [69]. Grazie a queste scoperte, sono stati realizzati dei modelli di stratificazione prognostica, il cui impiego resta, però, ad oggi, solo sperimentale [70]. Inoltre, grazie all'utilizzo di metodiche di biologia molecolare, è emersa una maggior complessità della malattia mielomatosa, ossia l'eterogeneità intra-clonale: sotto la pressione selettiva delle terapie impiegate avrebbero origine diversi sub-cloni geneticamente differenti caratterizzati dallo sviluppo di mutazioni conferenti resistenza ai trattamenti [71].

Per concludere il presente paragrafo, quello che ad oggi rimane certo è che una stratificazione ottimale della prognosi dei pazienti con MM rappresenta un “*unmet clinical need*” e sono necessari ulteriori studi per poter predire in modo ancor più preciso la prognosi di questi pazienti.

### 3. TERAPIA

La terapia del MM ha una storia lunga ed inizialmente poco fruttuosa. I primi farmaci utilizzati nel trattamento del MM a partire dagli anni '50-'60 sono stati: farmaci chemioterapici, quali gli agenti alchilanti melphalan e ciclofosfamide (derivati di mostarde azotate), le antracicline (doxorubicina), gli alcaloidi della vinca (vincristina) e le nitrosuree, ed il cortisone a dosi pulsate (prednisone e desametasone), utilizzato sia in monoterapia che in combinazione alla chemioterapia. In particolare, la combinazione melphalan-prednisone (MP) ha rappresentato per molti decenni lo *standard of care* dei pazienti con MM [72], portando ad una risposta (*overall response rate*, ORR) in circa il 50-60% di essi ed a una remissione completa (CR) nel 5-10% dei casi. Altre combinazioni con farmaci chemioterapici utilizzate sono state VBMCP (vincristina, carmustina, melphalan, ciclofosfamide e prednisone), BMCP (carmustina, melphalan, ciclofosfamide e prednisone) e VAD (vincristina, adriamicina, desametasone), che hanno determinato un più alto *rate* di risposta, senza, però, aumentare la sopravvivenza globale dei pazienti, pari circa a 3 anni [73].

Un passo importante nella terapia del MM fu fatto agli inizi degli anni '80 con l'introduzione della chemioterapia ad alte dosi con melphalan seguita dalla reinfusione delle cellule staminali emopoietiche (trapianto autologo, ASCT), il quale ha permesso raggiungere nei pazienti di età inferiore ai 60 anni un significativo aumento della risposta ed un vantaggio in termini di sopravvivenza rispetto alla chemioterapia tradizionale [74-75].

La vera “rivoluzione terapeutica”, però, è iniziata a partire dal 2000, grazie all’introduzione dei “nuovi farmaci”, agenti non chemioterapici in grado di esercitare la propria attività, oltre che sul clone neoplastico, anche a livello del microambiente midollare, il cui ruolo nella crescita, sopravvivenza e resistenza alle chemioterapie convenzionali delle cellule mielomatose è ampiamente riconosciuto [76]. Tali agenti in combinazione tra loro o con chemioterapici convenzionali, hanno drasticamente migliorato l’*outcome* dei pazienti con MM, sia in termini di risposta che di sopravvivenza.

Infine, molto recentemente è stato introdotto un nuovo concetto tra le strategie terapeutiche del MM, che si sta sempre più espandendo grazie ai dati emergenti di efficacia: quello dell’immunoterapia, quali anticorpi bispecifici e terapia cellulare con cellule T CAR.

### 3.1 I NUOVI FARMACI

Nei prossimi paragrafi saranno analizzati i meccanismi d’azione ed il profilo di tossicità dei principali nuovi farmaci, con un particolare focus su daratumumab (paragrafo 3.2), e, successivamente, nei paragrafi 3.4 e 3.5 sarà illustrato il ruolo fondamentale che rivestono nella terapia del MM sia di nuova diagnosi che in fase di recidiva.

I principali nuovi farmaci utilizzati in pratica clinica sono suddivisi nelle seguenti 3 categorie:

- ❖ Immunomodulatori (IMiDs), quali Talidomide, Lenalidomide e Pomalidomide; oggi è in fase di studio un’ulteriore nuova generazione più potente che lega cereblon E3 (CELMoDs), costituita da Iberdomide e CC-92480;
- ❖ Inibitori del proteasoma (PIs), di cui il capostipite è il Bortezomib, seguito da Carfilzomib e Ixazomib;
- ❖ Anticorpi monoclonali (moAbs), rappresentati dagli anti-CD38 (Daratumumab ed Isatuximab), dall’anti-SLAMF7 (Elotuzumab) e l’anti-BCMA (Belantamab Mafodotin).

Altri agenti appartenenti alla famiglia dei nuovi farmaci, in fase di studio/approvazione, sono:

- ❖ Inibitori dell’istone deacetilasi (HDACi), di cui il principale è Panobinostat;
- ❖ Check-point *inhibitors*, costituiti dagli anticorpi anti-PD1 Nivolumab e Pembrolizumab;
- ❖ Inibitori di Bcl-2, quale Venetoclax;
- ❖ Inibitori dell’esportina nucleare XPO1, quale Selinexor;
- ❖ Farmaci alchilanti peptide-coniugati, di cui il capostipite è Melphalan flufenamide (o Melflufen).

### 3.1.1 IMMUNOMODULATORI

La storia degli agenti immunomodulanti parte con la scoperta delle proprietà antitumorali di Talidomide. La Talidomide è un derivato sintetico dell'acido glutammico, che veniva utilizzata negli anni '50 come sedativo-ipnotico ed antiemetico, ma poi fu ritirata dal commercio in seguito all'evidenza di teratogenesi (in particolare per focomelia, ma anche difetti uditivi, visivi, cardiaci e renali) nelle donne che ne fecero uso contro la nausea gestazionale. Successivamente, venne ufficialmente approvata per il trattamento del MM da FDA (Food and Drug Administration Agency) nel 2006 e da EMA (European Medicines Agency) nel 2008, grazie alla dimostrazione dei suoi effetti anti-angiogenici ed immunomodulatori. Sono stati, poi, sviluppati IMiDs di seconda e terza generazione, quali Lenalidomide (Revlimid®) e Pomalidomide (Imnovid®), rispettivamente. Lenalidomide è stata approvata ufficialmente nel 2006 da FDA e nel 2008 da EMA per la terapia del RRMM (in associazione a desametasone), mentre, più recentemente, l'indicazione è stata estesa a pazienti in prima linea non candidabili a ASCT, in associazione a solo desametasone o a desametasone-daratumumab, e come terapia di mantenimento dopo ASCT nei pazienti giovani. Pomalidomide, invece, è stata approvata in associazione a desametasone nel 2013 da FDA e poi da EMA per il trattamento del RRMM, dopo almeno due linee di terapia comprensive di Lenalidomide e Bortezomib, e, più recentemente, alla prima ricaduta in associazione a bortezomib e desametasone.

I farmaci immunomodulanti agiscono nel MM grazie ai seguenti meccanismi:

- inibizione dell'angiogenesi (mediante la riduzione dell'espressione di VEGF e altri fattori di crescita, l'inibizione del pathway di PI3K/Akt bFGF) [77];
- ridotta secrezione di citochine fondamentali nell'interazione tra le PC neoplastiche ed il microambiente (in primis IL-6, ma anche TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) [78];
- modulazione dell'attività del sistema immunitario (favorendo la proliferazione ed attivazione della linea linfocitaria T, soprattutto l'attivazione dei CD8<sup>+</sup> e delle cellule NK, ma anche la secrezione di IFN- $\gamma$  da parte dei Th1);
- stimolazione dell'apoptosi nelle PC neoplastiche (tramite l'attivazione della caspasi-8, la sensibilizzazione all'apoptosi Fas-mediata e la inibizione del pathway di NF- $\kappa$ B) [79];
- riduzione dell'interazione tra le cellule mielomatose ed il microambiente (specialmente tramite una ridotta espressione delle molecole di adesione) [80];

- effetti antinfiammatori degli IMiDs di seconda e terza generazione (mediante inibizione di COX-2 e quindi della sintesi di prostaglandine coinvolte nei processi di flogosi con effetto pro-mielomatoso) [81].

Per quanto riguarda il profilo di tossicità degli IMiDs, questo è costituito in generale da astenia, rash cutanei, bradicardia ed eventi trombo-embolici (TEV), soprattutto nei primi 6-12 mesi di trattamento e per la quale è richiesta un'adeguata profilassi con acido acetil-salicilico, eparina o, in alcuni casi selezionati, con anticoagulanti orali. Inoltre, considerando i noti effetti teratogeni, è fondamentale, laddove indicato, il ricorso a metodi contraccettivi.

Nello specifico, Talidomide, inoltre, presenta come reazioni avverse comuni sonnolenza, disturbi gastrointestinali (specialmente costipazione) e, di rilievo in quanto presente fino al 30% dei pazienti e perché è quella che più inficia la qualità di vita, neuropatia periferica (PN) prevalentemente sensitivo-motoria con estensione disto-prossimale (intorpidimento, crampi muscolari, formicolii, alterata coordinazione, tremori e debolezza motoria) [82].

Lenalidomide e Pomalidomide, invece, sono caratterizzate da una minore tossicità rispetto a Talidomide, in particolare non presentano come effetto collaterale la PN. Oltre agli effetti collaterali comuni agli IMiDs già descritti, altre reazioni avverse legate a queste due molecole sono la mielotossicità (anemia, trombocitopenia e soprattutto neutropenia) ed eventi infettivi (infezioni di grado 3 o 4 in circa il 20% dei pazienti, specialmente se neutropenici o in terapia cronica con glucocorticoidi). Lenalidomide, inoltre, a differenza della Pomalidomide, presenta una tossicità gastrointestinale (soprattutto diarrea correlata a malassorbimento degli acidi biliari ed è infatti generalmente responsiva alla somministrazione di colestiramina) e il suo dosaggio, essendo principalmente escreta in forma immodificata per via urinaria, va aggiustato sulla base della funzionalità renale al fine di non incrementarne la concentrazione plasmatica e quindi la tossicità [83].

### 3.1.2 INIBITORI DEL PROTEASOMA

Gli inibitori del proteasoma sono la seconda categoria di nuovi farmaci che ha rivoluzionato il trattamento del MM.

Il proteasoma è un complesso citoplasmatico multi-enzimatico, responsabile della degradazione della maggior parte delle proteine intracellulari danneggiate o non funzionanti. Pertanto, in virtù dei suoi diversi target di degradazione (tra cui cicline, chinasi ciclino-dipendenti, fattori di trascrizione, oncogeni ed oncosoppressori), è un elemento chiave nella regolazione di vari processi cellulari quali proliferazione, apoptosi, angiogenesi ed

invecchiamento cellulare. Nel MM è presente un'elevata sintesi proteica da parte delle PC neoplastiche, relata all'iperproduzione di Ig monoclonali, e questo fa sì che il proteasoma sia un ottimo target terapeutico [84-85].

Bortezomib (Velcade®) rappresenta il PI di prima generazione ed è stato approvato, prima, per il trattamento del RRMM (2003) e, successivamente, nel contesto di regimi di prima linea (sia per pazienti candidabili che non candidabili a ASCT). La somministrazione di questo farmaco inizialmente era per via endovenosa, ma, previa dimostrazione di non inferiorità in termini di efficacia e di minor tossicità, si è poi passati all'uso della somministrazione sottocutanea nella pratica clinica [86].

Successivamente a Bortezomib, sono stati sviluppati PIs di seconda generazione rappresentati da Carfilzomib (Kyprolis®, la cui unica modalità di somministrazione è endovenosa) ed Ixazomib (Ninlaro®, disponibile invece per via orale), entrambi approvati da FDA e poi da EMA per il trattamento del RRMM.

Il principale meccanismo d'azione di questa categoria di farmaci è appunto legato all'inibizione (reversibile nel caso di Bortezomib e Ixazomib, irreversibile per Carfilzomib) del sito proteolitico 20S del proteasoma, con conseguente accumulo proteico e attivazione dell'apoptosi. Sono stati, inoltre, individuati altri meccanismi d'azione, quali l'inibizione del pathway di NF- $\kappa$ B (tramite la ridotta degradazione del suo inibitore I $\kappa$ B), la stimolazione dell'apoptosi (tramite l'aumento dello stress ossidativo e l'attivazione della caspasi-9 ma anche mediante un'inibizione dei sistemi di riparazione del genoma), inibizione di alcuni meccanismi di farmaco-resistenza (mediati ad esempio dal pathway di NF- $\kappa$ B e dalla glicoproteina P), stimolo del differenziamento osteoblastico ed inibizione di quello osteoclastico, riduzione della sintesi di citochine pro-infiammatorie (quest'ultimo meccanismo d'azione a livello renale è fondamentale per rallentare lo sviluppo della *cast nephropathy*) [87-91].

Le principali tossicità degli PIs sono rappresentate dalla PN (l'incidenza di neuropatia di Carfilzomib è nettamente inferiore rispetto a Bortezomib, pari a circa il 40% per quest'ultimo), mielotossicità (in particolare, trombocitopenia) e riattivazione di un'infezione latente da virus della varicella-zoster VZV (da imputare presumibilmente ad una riduzione della conta linfocitaria T CD4+) [92-93]. Inoltre, sono stati descritti rari casi di microangiopatia trombotica in corso di PIs, soprattutto di Carfilzomib [94]. Per quanto concerne il profilo di tossicità di Carfilzomib, inoltre, un altro frequente effetto collaterale, seppur il meccanismo eziopatogenetico ad oggi non è ancora noto, è quello della tossicità

cardiovascolare, in termini soprattutto di ipertensione arteriosa e, più raramente, di scompenso cardiaco, cardiopatia ischemica e aritmie [95].

Ixazomib, infine, è correlato anche a tossicità gastrointestinale (nausea, vomito, diarrea) ed eruzioni cutanee [96].

### 3.1.3 ANTICORPI MONOCLONALI

La terza categoria di nuovi farmaci, che ha contribuito ad un significativo miglioramento della prognosi dei pazienti con MM, è quella degli anticorpi monoclonali rivolti contro *targets* espressi sulle cellule sia neoplastiche che del microambiente. I principali farmaci appartenenti a questa classe sono rappresentati da:

- ❖ anticorpi anti-CD38: Daratumumab (Darzalex®), il quale verrà descritto separatamente e più dettagliatamente nel paragrafo 3.2, e Isatuximab (Sarclisa®);
- ❖ anticorpi anti-SLAMF7: Elotuzumab (Empliciti®) è un anticorpo umanizzato IgG1 diretto contro SLAMF7, il quale è un recettore transmembrana coinvolto in vari meccanismi cellulari, quali citotossicità, sopravvivenza e adesione cellulare, sviluppo linfocitario, ed è espresso non solo sulle PC neoplastiche, ma anche dalle cellule NK, dai linfociti CD8+ (ed un sottogruppo di T CD4+), dalle cellule dendritiche mature e dai monociti attivati. Elotuzumab è stato approvato FDA ed EMA per il trattamento del RRMM in associazione a lenalidomide e desametasone.

Il meccanismo d'azione di Elotuzumab si basa su: diretta attivazione delle cellule NK (che rilasciano granzima B con funzione apoptotica perforina-dipendente) e citotossicità diretta anticorpo-dipendente (ADCC) (lega SLAMF7, espresso dalle cellule mielomatose, ed il CD16, espresso dalle cellule NK). Inoltre, sono stati ipotizzati altri meccanismi d'azione di Elotuzumab, legati all'attivazione del sistema immunitario tramite le cellule SLAMF7+ [97].

Per quanto riguarda il profilo di tossicità, Elotuzumab è un farmaco ben tollerato, i cui principali effetti avversi sono le reazioni infusionali (IRR) di grado lieve-moderato, che si manifestano solo nel 10% circa dei pazienti alla prima infusione, e la mielotossicità (soprattutto anemia e piastrinopenia) [97].

- ❖ anticorpi anti-BCMA: Belantamab Mafodotin (Blenrep®) è un anticorpo umanizzato IgG1 coniugato con una tossina, la monometilauristatina F (MMAF), diretto contro BCMA (*B-cell Maturation Antigen*), il quale rappresenta oggi un *target* terapeutico di notevole interesse e contro cui sono state sviluppate varie strategie terapeutiche, compresi alcuni anticorpi bispecifici e le cellule CAR-T.

BCMA (anche conosciuto come TNFRSF17) è un recettore della famiglia dei TNF (*tumor necrosis factor*), che lega BAFF (*B-cell activating factor*) e APRIL (*proliferation-inducing ligand*), attivando la via di segnale NF- $\kappa$ B con conseguente ruolo nella maturazione e differenziazione dei linfociti B. BCMA è espresso principalmente sui linfociti B maturi (mentre la sua espressione è minima sulle altre cellule emopoietiche e non emopoietiche) e, quindi, anche sulle cellule mielomatose e la sua espressione aumenta con la progressione di malattia.

Belantamab Mafodotin è stato recentemente approvato da FDA ed EMA per il trattamento di pazienti con RRMM, che abbiano almeno ricevuto 4 linee di terapie precedenti e la cui malattia risulti refrattaria ad almeno un PI, un IMiDs ed un MoAb anti-CD38.

I meccanismi d'azione derivanti dal legame di Belantamb Mafodotin a BCMA includono: il rilascio della MMAF all'interno del citoplasma delle cellule neoplastiche, con conseguente inibizione della polimerizzazione dei microtubuli e apoptosi, la ADCC, e la fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (ADCP) [98].

I principali eventi avversi, emersi dallo studio registrativo, sono la tossicità oculare (cheratopatia legata all'accumulo di MMAF a livello corneale) e la tossicità ematologica (soprattutto trombocitemia) [98].

## 3.2 DARATUMUMAB

Daratumumab è un anticorpo monoclonale IgG1 $\kappa$  umanizzato anti-CD38. Il CD38 è una glicoproteina transmembrana altamente espressa sulle cellule mielomatose, ma non solo; infatti, è espressa anche su altre linee linfoidi e mieloidi (soprattutto cellule NK e sottopopolazioni di linfociti B e T), così come su tessuti non emopoietici, quali l'epitelio prostatico, le isole pancreatiche, alcuni neuroni, la muscolatura striata delle vie respiratorie, le cellule tubulari renali ed il tessuto corneale [99-100]. Tale molecola è coinvolta nell'indurre l'attivazione del segnale, l'*homing* e l'adesione cellulare, la regolazione del calcio citoplasmatico e la sopravvivenza cellulare [101]. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato come CD38 sia coinvolto anche nella produzione di adenosina, la quale ha un ruolo nell'immunosoppressione [102].

### 3.2.1 MECCANISMO D'AZIONE

Daratumumab induce la morte delle PC neoplastiche attraverso vari meccanismi diversi. Innanzitutto, uno dei meccanismi d'azione consiste in una potente ADCC, ma

Daratumumab agisce anche tramite la ADCP ed una marcata azione citotossica complemento mediata (CDC) [103]. In aggiunta, un ulteriore meccanismo d'azione di Daratumumab si basa sulla modulazione del sistema immunitario, a favore di una sua attivazione, riducendo i meccanismi immunosoppressivi tramite la deplezione dei linfociti B, di cellule mieloidi ad azione immunosoppressiva e dei linfociti T regolatori (T-reg CD38+); tale meccanismo è stato supportato dall'evidenza sia di un incremento nel sangue periferico di cellule CD4+ e CD8+ che di una maggior espansione di cellule T attivanti il sistema immunitario nei pazienti responsivi al farmaco rispetto ai *non-responder* [99].

In studi preclinici condotti su cellule tumorali CD38+, l'aggiunta di Daratumumab sembra avere azione sinergica con altri farmaci usati nel trattamento per il MM, in particolare con lenalidomide [104]. La citotossicità dell'anticorpo appare significativamente aumentata in presenza di cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico di soggetti trattati con lenalidomide (la quale stimola le cellule NK) e l'azione CDC si mostra più spiccata nelle cellule dei pazienti esposti al lenalidomide [104]. Il ruolo delle cellule NK è di fondamentale importanza nell'azione del farmaco e questo è stato confermato dal fatto che l'anticorpo monoclonale umanizzato anti-KIR IPH2102, che blocca l'inibizione dei recettori sulle cellule NK, è in grado di aumentare in maniera significativa l'azione litica di Daratumumab sulle cellule mielomatose [104].

### 3.2.2 MECCANISMI DI RESISTENZA

Nonostante i promettenti risultati ottenuti da Daratumumab, i pazienti con MM presentano prima o poi inevitabilmente una recidiva di malattia.

Diversi meccanismi sono stati individuati come i responsabili della comparsa di resistenza farmacologica:

- ❖ riduzione dell'espressione di CD38: i meccanismi d'azione di Daratumumab dipendono dal suo legame con il CD38, e, quindi, l'efficacia è direttamente correlata all'espressione dell'antigene sulle cellule tumorali. Vari studi di citofluorimetria a flusso hanno dimostrato un significativo decremento dei valori di CD38 sia in corso di terapia rispetto al basale che dopo progressione di malattia e la riduzione del bersaglio molecolare si osserva sia nei pazienti responsivi (tanto nei pazienti con buona risposta laboratoristica quanto in quelli con risposte meno profonde) sia nei pazienti *non-responder* [105]. La riduzione dell'espressione di CD38 è correlata principalmente a due fattori: selezione clonale, a favore delle popolazioni che meno esprimono la molecola, e modifica del citoscheletro

cellulare a seguito del legame farmaco-antigene, che determina una redistribuzione del CD38 con rilascio nel microambiente midollare di microvescicole contenenti l'antigene, le quali, a loro volta, inibiscono la risposta immunitaria grazie a meccanismi ATP e NAD<sup>+</sup> dipendenti. Inoltre, questi aggregati circolanti inoltre possono essere fagocitati dalle cellule del sistema immunitario (monociti, granulociti, NK, linfociti B e T) in un processo chiamato trogocitosi, il quale determina il passaggio del complesso daratumumab-CD38 dalle cellule mielomatose alla superficie delle cellule immunitarie, riducendo ulteriormente la presenza di CD38 sulle cellule bersaglio [106-108].

- ❖ perdita di efficacia dei meccanismi ADCC, ADPC, CDC ed immunomediati: l'attivazione delle cellule NK e, quindi, dell'ADCC può essere ridotta dall'esistenza di varianti degli FcγRs espressi sulle cellule bersaglio, che si legano al farmaco con minor affinità [106]. Inoltre, un altro meccanismo coinvolto nella resistenza a Daratumumab sembra essere relato al CD47, la cui sovra-espressione porta all'attivazione di una cascata di segnale inibente i macrofagi e, quindi, la fagocitosi con conseguente riduzione della risposta ADCP [109]. Infine, due ulteriori meccanismi di *escape* a Daratumumab sembrano essere correlati ad un aumento dell'espressione di CD55 e CD59 (implicate nella modulazione della cascata del complemento) sulle cellule mielomatose resistenti e ad una riduzione delle cellule T e del loro antigene di costimolazione CD28 [110-111].

### 3.2.3 TOSSICITA'

Daratumumab è un farmaco promettente anche per il profilo di sicurezza e la buona tollerabilità.

L'evento avverso più frequente sono le IRR (40-50% dei pazienti), che si manifestano nel 90% dei casi alla prima somministrazione e sono per lo più (71%) di grado lieve-moderato (1-2): i sintomi più frequenti sono di tipo respiratorio (bronscospasmo, dispnea e tosse), in quanto il CD38 è espresso a livello delle vie aeree superiori, e, meno frequentemente, febbre, brividi, nausea, cefalea, rash cutaneo ed ipertensione. Non sono state riportate interruzioni del trattamento del farmaco relate a tale evento avverso [112-113]. Poiché le IRR sono un evento avverso frequente e ben noto, esistono misure preventive, quali la valutazione del paziente con prove spirometriche e la premedicazione con antistaminico, steroide, paracetamolo ed eventualmente anti-leucotrienico [114]. Inoltre, sempre a scopo preventivo, la prima infusione endovenosa viene eseguita più lentamente rispetto le successive, con incremento graduale

della velocità d'infusione. Come vedremo nel paragrafo successivo, l'incidenza di IRR è stata significativamente ridotta dalla formulazione sottocutanea di Daratumumab [115].

Altri effetti collaterali riportati sono la tossicità ematologica (principalmente neutropenia e piastrinopenia) ed episodi infettivi [112-113].

Una problematica emersa con l'utilizzo degli MoAbs anti-CD38 nella pratica clinica è la difficoltà a valutare correttamente la risposta alla terapia in pazienti con MM IgGκ per la possibile interferenza da parte del farmaco con le tecniche utilizzate per ricercare la componente monoclonale, in quanto rappresenta anch'esso, infatti, una immunoglobulina monoclonale IgGκ. A tal proposito, sono state studiate varie metodiche per poter distinguere la CM IgGκ patologica da quella farmacologica: primo fra tutti l'immuno-*assay* specifico DIRA, che utilizza un reagente che si lega al farmaco e migra elettroforeticamente in zona diversa rispetto a quella della CM patologica ed il cui impiego sta sempre più aumentando in pratica clinica; altre metodiche ancora in sperimentazione sono la spettrometria di massa e l'uso di anticorpi contro l'epitopo idiotipico di Daratumumab (da infondere prima rispetto al farmaco) che lo renderebbero instabile e non visibile all'elettroforesi [116].

Infine, un ulteriore problema emerso è quello dell'interferenza con i test di compatibilità ematica, in quanto CD38 è espresso in maniera ubiquitaria anche sui globuli rossi; in particolare, è pressoché sempre presente una positività del test di Coombs indiretto (in assenza, tuttavia, di reale emolisi) fino a 5 mesi dopo l'ultima dose di farmaco, motivo per il quale è opportuno eseguire una tipizzazione eritrocitaria estesa prima dell'inizio della terapia con Daratumumab e segnalare la terapia in corso al centro trasfusionale, che potrà così provvedere alla opportuna gestione del paziente (test al ditiotreitolo, trasfusione con completa compatibilità ABO/RH) [114].

#### 3.2.4 SOMMINISTRAZIONE

La prima modalità di somministrazione di Daratumumab è stata quella endovenosa: 16 mg/kg una volta a settimana per le prime 8 settimane, per poi passare ad un'infusione quindicinale per le successive 16 settimane e proseguire, infine, con un'infusione a cadenza mensile.

Successivamente, per migliorare la fattibilità e la qualità di vita dei pazienti è stata studiata la formulazione sottocutanea. Lo studio pilota PAVO ha dimostrato sia l'efficacia che la sicurezza della modalità di somministrazione sottocutanea di Daratumumab in pazienti con RRMM; in particolare, è emerso come la dose fissa di 1800 mg di farmaco somministrato per via sottocutanea (in associazione a 30.000 U di ialuronidasi umana ricombinante,

rHuPH20) abbia portato ad una concentrazione maggiore del farmaco stesso al giorno 1 e 3 del ciclo rispetto ai pazienti trattati con la formulazione endovenosa. Inoltre, come precedentemente accennato, le IRR sono risultate inferiori sia come incidenza sia come gravità (sono state osservate solo nel 12% dei pazienti entro le 6 ore dalla prima somministrazione, tutte di grado  $\leq 3$ ) [114, 117].

Grazie a questi risultati, oggi la formulazione sottocutanea di Daratumumab è diventata lo *standard of care*.

### 3.2.5 STUDI REGISTRATIVI

#### IN MONOTERAPIA

Basandosi sui promettenti risultati ottenuti negli studi preclinici, è iniziato lo studio Daratumumab all'interno di *trials* clinici in pazienti con RRMM.

Il primo studio clinico volto a valutare l'efficacia ed il profilo di sicurezza di Daratumumab in monoterapia è stato il *trial* di fase I GEN501, il quale, mostrando dei validi risultati di efficacia (in termini di risposte e PFS) e di *safety*, ha “dato il via” ad una serie di successivi studi clinici, che hanno poi portato all'approvazione del farmaco in pratica clinica, sia in monoterapia che in combinazione con nuovi farmaci, in varie fasi di malattia [112]. Infatti, lo studio di fase II SIRIUS, nel quale l'ORR, la PFS e la durata di risposta (DOR) sono risultate pari al 29%, a 3.7 mesi ed a 7.4 mesi, rispettivamente (ottimi risultati considerando un *setting* di pazienti R/R pluri-trattati con un numero mediano di linee precedenti pari a 5), ha portato all'approvazione da parte di FDA (2015) ed EMA (2016) di Daratumumab in monoterapia per pazienti dopo almeno 3 linee precedenti, comprensive di almeno un PI e un IMiD [113].

#### IN ASSOCIAZIONE AI NUOVI FARMACI PER IL PAZIENTE RICADUTO-REFRATTARIO:

A seguito dell'efficacia dimostrata di Daratumumab in monoterapia, esso è stato poi studiato in associazione ai nuovi farmaci.

Nello specifico, il primo studio che ha valutato Daratumumab in combinazione con Lenalidomide-desametasone (DRd) per pazienti con RRMM è stato il *trial* di fase I-II GEN503, il quale ha mostrato dati ancor più incoraggianti rispetto la monoterapia (ORR: 81%, PFS e OS a 18 mesi: 72% e 90%, rispettivamente) [118]. Questi risultati di efficacia, senza tossicità aggiuntive, sono stati confermati successivamente dallo studio registrativo di fase III POLLUX, nel quale è stata messa a confronto la combinazione DRd con la sola associazione

Lenalidomide-desametasone (Rd) (con un *follow up* di 44 mesi, ORR: 93% *versus* (vs) 76%, PFS: 45 mesi vs 18 mesi) [119-120].

Analogamente, Daratumumab è stato valutato in associazione a Bortezomib-desametasone (DVd) rispetto alla doppietta Bortezomib-desametasone (Vd) nello studio di fase III CASTOR ed anch'esso ha mostrato ottimi risultati (ORR: 85% vs 63%, PFS a 3 anni: 17 mesi vs 7 mesi) [121-122]. Grazie ai consistenti dati provenienti dagli studi CASTOR e POLLUX, Le combinazioni DRd e DVd sono state approvate in pratica clinica per il paziente R/R sottoposto ad almeno una linea di terapia precedente nel 2016 da FDA e nel 2017 da EMA.

Oltre a Lenalidomide e Bortezomib, Daratumumab è stato poi studiato in associazione anche a nuovi farmaci di più nuova generazione, come Pomalidomide e Carfilzomib.

Il primo studio a valutare la combinazione Daratumumab-Pomalidomide-desametasone (DPd) è stato lo studio EQUULEUS, in cui l'Ab anti-CD38 è stato impiegato in associazione a vari *backbone* per il MM. Grazie ai risultati emersi da questo studio di fase Ib (PFS e OS a 13 mesi: 99 mesi e 18 mesi, rispettivamente) [123], è stato disegnato il *trial* di fase III randomizzato APOLLO, con l'obiettivo di confrontare direttamente DPd rispetto alla sola Pomalidomide-desametasone (Pd): anche in questo studio è stato confermato il vantaggio della tripletta DPd rispetto alla doppietta (PFS: 12 vs 7 mesi), in assenza di nuovi *warnings* sulla sicurezza [124].

Infine, la combinazione di Daratumumab con Carfilzomib e desametasone (DKd) è stata studiata nell'ambito dei protocolli clinici EQUULEUS, prima, e, poi, CANDOR (fase III); in quest'ultimo studio la tripletta DKd è stata confrontata rispetto a solo carfilzomib-desametasone (Kd): ad un *follow-up* mediano di 17 mesi, è stato dimostrato un vantaggio dall'aggiunta dell'anticorpo monoclonale anti-CD38 in termini di PFS (non raggiunta vs 16 mesi), con una riduzione del 37% del rischio di progressione di malattia o di morte [125].

Grazie a questi risultati le combinazioni DPd e DKd sono state approvate sia da FDA in giugno 2017 ed in agosto 2020, rispettivamente, sia recentemente da EMA; l'approvazione da parte di AIFA è tutt'ora in fase di valutazione.

**IN ASSOCIAZIONE AI NUOVI FARMACI PER IL PAZIENTE DI NUOVA DIAGNOSI:**

Considerando gli ottimi risultati mostrati nel *setting* del paziente R/R, ci si è interrogati sulla sua potenziale efficacia in una fase più precoce di malattia, quella della nuova diagnosi; a tal proposito, vari *trials* clinici hanno iniziato a valutare l'efficacia e la sicurezza di

Daratumumab per il paziente con NDMM, sia candidabile che non candidabile alla chemioterapia ad alte dosi.

Partendo dalla categoria di pazienti *unfit* per il trapianto autologo, gli studi registrativi, che hanno poi portato all'approvazione nella pratica clinica, sono stati i *trials* di fase III ALCYONE e MAIA, nei quali è stata valutata l'aggiunta di Daratumumab agli *standard of care* bortezomib-melphalan-prednisone (VMP) e Rd, rispettivamente, in confronto a tali regimi utilizzati da soli [126-129]. Entrambi gli studi hanno mostrato un vantaggio statisticamente significativo in termini di ORR, PFS e anche di OS rispetto a quello che era definito lo *standard of care* fino a quel momento, senza tossicità di rilievo; in particolare, nello studio ALCYONE con un *follow-up* mediano pari a 40 mesi la PFS è risultata “*not reached*” per i pazienti che avevano ricevuto in aggiunta Daratumumab (vs 42 mesi nel braccio standard), con una riduzione del rischio di morte pari al 40% [126-127]. Analogamente, nello studio MAIA la PFS e l'OS a 60 mesi sono risultate pari al 53% e 66%, rispettivamente (vs 29% e 53%, rispettivamente) [128-129]. Come già accennato, grazie ai sorprendenti dati di sopravvivenza, a fronte di una tossicità limitata, le combinazioni Daratumumab-VMP e DRd hanno ricevuto l'approvazione da FDA ed EMA e, attualmente, sono diventate il nuovo *standard of care* in Italia per il paziente di nuova diagnosi non candidabile alle alte dosi di chemioterapia.

Per quanto riguarda, invece, il paziente giovane e *fit*, il cardine del trattamento rimane ancora oggi, come vedremo più estensivamente nei prossimi paragrafi, il trapianto autologo. Quello che, però, negli ultimi anni ha portato ad un cambiamento è l'aggiunta di Daratumumab alla terapia d'induzione pre- e di consolidamento post-ASCT, approvata in pratica clinica da EMA nel 2020. Lo studio pilota è stato lo studio di fase III CASSIOPEIA, nel quale lo *standard of care* decennale europeo bortezomib-talidomide-desametasone (VTD) è stato messo a confronto con la combinazione Daratumumab-VTD. Quest'ultima ha mostrato un significativo vantaggio in termini di risposte profonde (negatività di malattia minima residua – MRD: 64 vs 44%) e di PFS (a 18 mesi: 93% vs 85%), in assenza di eventi avversi di rilievo e modificazioni significative della raccolta delle cellule staminali [130-131].

Inoltre, oggi sono in corso/in fase di analisi vari studi, che indagano Daratumumab in questo *setting* di pazienti; tra questi:

- lo studio di fase II GRIFFIN, in cui è stata valutata lenalidomide al posto di talidomide (Daratumumab-Bortezomib-Lenalidomide-desametasone – DaraVRD vs VRD);
- lo studio di fase III PERSEUS, analogo allo studio GRIFFIN;

- lo studio di fase III CEPHEUS, anch'esso analogo come farmaci allo studio PERSEUS e GRIFFIN ma esteso anche ai pazienti per i quali l'ASCT non è previsto come prima opzione terapeutica (con lo scopo di verificare il ruolo del trapianto anche nell'era di questi nuovi farmaci);
- lo studio di fase 1b NCT01998971, con l'obiettivo di valutare Daratumumab in aggiunta alla tripletta carfilzomib-lenalidomide-desametasone (KRd);
- lo studio di fase II MASTER, volto a indagare il ruolo del consolidamento nell'epoca dei nuovi farmaci (fase d'induzione pre-ASCT con Daratumumab-KRd e, poi, 0, 4 o 8 cicli di consolidamento a seconda del dato di MRD);
- lo studio di fase II con daratumumab, ixazomib, lenalidomide e desametasone;
- lo studio di fase II EMN18, in cui daratumumab in aggiunta a bortezomib-ciclofosfamide-desametasone viene confrontato rispetto a VTD.

### 3.3 IMMUNOTERAPIA

Negli ultimi anni è emerso un interesse sempre più crescente, anche per il MM, circa l'immunoterapia attiva, ovvero approcci terapeutici che "sfruttano" il sistema immunitario del paziente, attivandolo mediante i linfociti T CD3+. Qui di seguito, verrà fatta una breve sintesi (in quanto non oggetto di tesi) delle due principali strategie terapeutiche che si basano su tale principio:

- ❖ Anticorpi bispecifici (BiTE), composti da frammenti di due diversi anticorpi monoclonali e, quindi, in grado di legarsi contemporaneamente a due diversi tipi di antigene: il CD3 sui linfociti T, attivandoli, ed un target sulle cellule mielomatose, che vengono quindi colpite in modo selettivo dai linfociti attivati. Sono stati creati vari BiTE, che "targettano" diversi antigeni espressi dalle cellule di MM: BCMA, quali AMG420, Elranatanab e Teclistamab, GPRC5D, quali Talquetamab, e FcRH5 [132-134].
- ❖ Terapia cellulare con cellule CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapies*), che utilizza l'ingegnerizzazione genetica dei linfociti T al fine di potenziarli e riprogrammarli contro un unico antigene espresso dalle cellule tumorali. Il progressivo sviluppo di questa terapia innovativa e gli ottimi risultati dei *trials* clinici hanno portato progressivamente alla loro approvazione in pratica clinica (nel 2018 da parte di EMA) per alcune patologie ematologiche, quali la leucemia acuta linfoblastica, il linfoma a grandi cellule B diffuso ed il linfoma primitivo del mediastino. Per quanto riguarda il MM, idecabtagene vicleucel (ide-cel) e ciltacabtagene autoleucel (cilta-

cell) hanno mostrato dati promettenti di efficacia nell'ambito degli studi di fase II KarMMA e di fase I/b CARTITUDE-1: in un *setting* di pazienti R/R dopo le terapie convenzionali con i nuovi farmaci, l'ORR è risultata pari all'81% ed al 98%, rispettivamente, e la PFS è risultata variabile da 9 a 23 mesi a seconda dello studio clinico [135-136].

Grazie a questi dati, l'interesse delle cellule CAR-T nel MM è progressivamente aumentato e, attualmente, sono in corso *trials* clinici, volti a valutare tale trattamento anche in fasi più precoci di malattia (ad esempio all'esordio) e con lo scopo di portare ad una loro approvazione in pratica clinica.

### 3.4 TERAPIA DEL PAZIENTE CON NUOVA DIAGNOSI

Quando si decide di iniziare un trattamento per il MM, la scelta del tipo di terapia si basa sulle caratteristiche del paziente (età, performance status e comorbilità). In genere:

- pazienti giovani ( $\leq 65$  anni) e senza rilevanti comorbilità sono candidati al trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche, preceduto da un breve regime di induzione (4-6 cicli) comprensivo di nuovi farmaci e seguito da una eventuale terapia di consolidamento/mantenimento;
- pazienti di età compresa fra i 66 ed i 70 anni considerati ancora *fit* (età biologica inferiore all'età anagrafica, buona funzionalità d'organo e soprattutto assenza di problematiche cardio-respiratorie) sono candidabili al trapianto, eventualmente con chemioterapia a dosaggio ridotto;
- pazienti di età superiore ai 70 anni o per altri motivi (numerose comorbilità) non candidabili al trapianto autologo lo *standard of care* è rappresentato da una combinazione di nuovi farmaci tra loro o con chemioterapia convenzionale.

#### 3.4.1 TERAPIA DI PRIMA LINEA DEL PAZIENTE CANDIDATO AL TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI

Il cardine del trattamento del paziente giovane e *fit* è ancora oggi rappresentato dal trapianto autologo, che consiste nell'infusione di melphalan 200 mg/mq seguito da supporto di cellule staminali emopoietiche periferiche (PBSC), preceduto da una terapia d'induzione e seguito da una terapia di consolidamento/mantenimento. Nonostante l'ASCT sia stato introdotto nella pratica clinica negli anni '80, vari studi, come vedremo qui di seguito, hanno dimostrato come rimanga nel corso degli anni una strategia terapeutica di fondamentale importanza.

Sulla base della dimostrata correlazione dose-risposta per il melphalan, nell'intento di aumentare la sopravvivenza dei pazienti, agli inizi degli anni '90 è stata introdotta anche la somministrazione di due linee sequenziali di chemioterapia ad alte dosi con supporto di PBSC (doppio trapianto autologo). I dati emersi da vari studi clinici, volti a valutare il vantaggio del doppio ASCT, sono discordanti tra loro. Per esempio, lo studio francese IFM94 ha dimostrato un beneficio dal doppio ASCT autologo in termini di significativo prolungamento della OS (OS a 7 anni: 42% vs 21%) e della sopravvivenza libera da eventi (EFS) (20% vs 10%); d'altro canto, lo studio multicentrico randomizzato italiano di fase III "Bologna 96" ha evidenziato un prolungamento significativo dell'EFS per i pazienti sottoposti a tandem ASCT, senza tuttavia rilevare una differenza significativa in termini di OS [137-138]. Una revisione sistematica di cinque *trials* randomizzati per stabilire il vantaggio del doppio ASCT rispetto a quello singolo ha concluso che non vi sono tuttora dati sufficienti, considerando da una parte che sono stati riscontrati dei bias negli studi ad oggi pubblicati, dall'altra che non erano contemplati i più recenti farmaci attualmente a disposizione [139].

Inoltre, l'introduzione nella pratica clinica dei nuovi farmaci e la loro efficacia hanno portato ad interrogarsi nel tempo circa il ruolo del trapianto autologo in generale. Anche in questo caso sono emersi dati discordanti: nello studio di Palumbo et al (randomizzazione tra ASCT o prosecuzione di un trattamento con nuovi farmaci nel contesto di un regime farmacologico lenalidomide-*based*) il trapianto autologo ha mostrato una superiorità sia in termini di PFS che OS, mentre lo studio condotto dall'*Intergroupe Francophone du Myelome* (IFM 2009), che ha comparato Bortezomib-Lenalidomide-Desametasone (VRD) per 8 cicli vs VRD + ASCT (seguiti in entrambi i bracci da un anno di mantenimento con Lenalidomide), ha dimostrato un vantaggio in PFS ma non di OS [140-141].

In considerazione dei risultati discordanti circa la sopravvivenza globale ed al fine di confrontare il ruolo del doppio rispetto al singolo ASCT, è stata eseguita una analisi a lungo termine con un *follow-up* mediano di 10 anni di tre *trials* randomizzati europei basati su regimi d'induzione con tripletta Bortezomib-*based* (VTD o PAD) seguiti da ASCT singolo o doppio (a seconda della randomizzazione) e da consolidamento e/o mantenimento: i risultati emersi hanno mostrato come il doppio ASCT correlasse ad un vantaggio di PFS e OS, maggiormente evidente nei pazienti ad alto rischio (definiti tali sulla base sia dello stadio ISS II/III che della presenza di anomalie citogenetiche quali t(4;14) e/o del(17p)) e nei pazienti che non avevano raggiunto una CR dopo il primo ASCT [142]. Al contrario, lo studio "StaMINA" non ha mostrato vantaggi di sopravvivenza sia libera da malattia che globale dal trapianto autologo,

però occorre tuttavia considerare che la notevole eterogeneità nei regimi di induzione utilizzati rende i risultati di questo *trial* di difficile valutazione e confronto con altri studi [143].

Infine, l'esigenza di investigare prospetticamente il ruolo del trapianto autologo e del tandem ASCT per il paziente giovane nell'epoca dei nuovi farmaci ha portato al disegno del *trial* clinico europeo EMN02/HOVON65, che ha confermato come l'ASCT rimanga lo *standard of care*, in quanto è in grado di garantire una prolungata PFS e OS (anche in sottogruppi di pazienti considerati ad alto rischio), e ha messo in evidenza come il doppio ASCT garantisca un miglioramento prognostico in termini di PFS ed OS, con beneficio particolarmente evidente nei pazienti portatori di del(17p) [144].

#### 3.4.1.1 REGIMI DI INDUZIONE

Attualmente, la terapia d'induzione raccomandata in Europa è una tripletta/quadrupletta Bortezomib-*based* per 4-6 cicli. Tale raccomandazione è supportata da dati provenienti da numerosi *trials* clinici, che si sono evoluti negli anni di pari passo con l'introduzione di un numero sempre più crescente di farmaci disponibili.

Negli anni numerosi *trials* clinici di fase II e III hanno esplorato l'efficacia di un regime di induzione pre-trapianto autologo comprensivo di Bortezomib. Tra questi, lo studio francese IFM2005-01 ha dimostrato la superiorità della combinazione Bortezomib-Desametasone (VD) rispetto la chemioterapia convenzionale (VAD) in termini di *rate* di risposte e di prolungata PFS [145].

L'aggiunta alla combinazione VD di un terzo farmaco chemioterapico, quale la doxorubicina (schema PAD) o la ciclofosfamide (VCD), o immunomodulante ha ulteriormente incrementato la probabilità di risposta e di remissione completa [146-148]. Di particolare interesse è risultata la combinazione di Bortezomib con Talidomide: nel protocollo italiano GIMEMA MMY-3006 la tripletta Bortezomib-Talidomide-Desametasone (VTD) ha dimostrato la superiorità rispetto alla sola combinazione Talidomide-Desametasone (TD) in termini PFS e anche di OS [149-150]; nello studio spagnolo Pethema/GEM 2005 VTD ha portato ad un miglioramento prognostico significativo in termini di PFS, senza, però, un aumento significativo di OS rispetto agli altri regimi terapeutici [151]; anche il *trial* "Total therapy 3" (VTD vs polichemioterapia con cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamide ed etoposide) ha contribuito a validare l'utilizzo della tripletta VTD in pratica clinica [152]. Due studi successivi, uno retrospettivo e l'altro prospettico, hanno invece confrontato le terapie di induzione con VTD e VCD tra loro, evidenziando come la tripletta comprendente l'IMiD si associ ad un maggiore tasso di VGPR e ad una maggiore ORR, a fronte anche di una minore

tossicità ematologica [153-154]. Infine, una metanalisi ha raccolto i risultati di diversi *trials* di confronto tra regimi di induzione Bortezomib-based e non, sancendo definitivamente la superiorità dei primi in termini di qualità della risposta, PFS ed OS [155].

I risultati particolarmente incoraggianti ottenuti dall'associazione di un PI ed un IMiD hanno dunque incentivato a sperimentare la tripla comprendente Bortezomib, Lenalidomide e Desametasone (VRD), con ottimi risultati di efficacia [156-159]. Il regime complessivo dell'IMiD di seconda generazione Lenalidomide (VRD) ha il vantaggio rispetto a quello complessivo dell'IMiD di prima generazione Talidomide (VTD) di essere gravato da minore tossicità neurologica (4% versus 13% di neuropatia G3-G4) [159] e sembra consentire il raggiungimento di un maggior tasso di risposte profonde e di negatività di MRD [160].

Nell'ambito dei nuovi farmaci di ultima generazione, è stato inoltre valutato il PI di seconda generazione Carfilzomib (K). Uno studio di fondamentale rilievo è lo studio FORTE, in cui K è stato valutato in associazione a Lenalidomide o Ciclofosfamide sia nell'ambito di un programma trapiantologico che non comprensivo di ASCT. Analisi eseguite con un follow-up mediano di circa 2 anni hanno evidenziato una superiorità degli approcci KRd-based in termini di qualità delle risposte ottenute (fino a sCR nel 44% dei pazienti e almeno CR nel 60%) e di MRD-negatività (58%) con risultati sovrapponibili tra i due bracci (senza e con ASCT), ad eccezione che nei pazienti ad alto rischio, nei quali la terapia inclusiva di ASCT ha ridotto il rischio di *early relapse* [161].

Infine, come già descritto nel paragrafo 3.2.5, nel 2021 è stata approvata in Europa anche l'aggiunta di un quarto farmaco, l'anticorpo monoclonale anti-CD38 Daratumumab, alle triplette Bortezomib-based. Vari *trials* clinici sono tutt'ora in corso per confermarne i dati di efficacia e *safety*, come gli studi PERSEUS e EMN18, oggetto della presente tesi.

#### 3.4.1.2 MOBILIZZAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

La mobilitazione delle cellule staminali emopoietiche (CSE) CD34+ dal midollo osseo al sangue periferico è un prerequisito indispensabile per la raccolta di un numero adeguato di CSE e per procedere al ASCT con successo. Il numero di CSE CD34+ da raccogliere per consentire una sufficiente ripopolazione midollare è compreso tra 2 e 5 x 10<sup>6</sup> cellule CD34+ /kg, mentre per i pazienti in cui è previsto un possibile tandem ASCT è meglio prefissare un target maggiore (almeno 6 x 10<sup>6</sup> cellule CD34+ /kg). Il regime più ampiamente utilizzato per la mobilitazione è rappresentato da Ciclofosfamide (alla dose di 2-4 g/m<sup>2</sup>) seguito da una stimolazione con il fattore di crescita granulocitario (G-CSF) alla dose di 10 mg/kg [162].

Nel caso di inadeguata mobilizzazione, che si verifica nel 10% circa dei pazienti, l'aggiunta di Plerixafor è particolarmente efficace nel ridurre il *rate* di fallimento della procedura. Tale farmaco è una forbice enzimatica, antagonista di CXCR-4, che agisce impedendone il legame a SDF-1 e dunque l'adesione delle CSE alla matrice midollare, aumentando così il loro rilascio in circolo. Plerixafor è oggi approvato da EMA ed AIFA in associazione al G-CSF nei pazienti *poor mobilizers*, cioè che abbiano fallito almeno un precedente tentativo di mobilizzazione con G-CSF [163].

#### 3.4.1.3 TERAPIA DI CONSOLIDAMENTO

Nonostante il suo ruolo sia ancora globalmente dibattuto e non vi siano evidenze sufficienti a favore di un suo impiego sistematico, la terapia di consolidamento è frequentemente eseguita per incrementare profondità e durata della risposta ottenuta e ricalca generalmente gli schemi di trattamento utilizzati nei regimi di induzione [164].

Dati contrastanti sono emersi da alcuni *trials* clinici di fase III: nello studio clinico EMN02 è emerso un vantaggio in PFS dal consolidamento con VRD rispetto ai pazienti che non hanno ricevuto alcuna terapia di consolidamento [165], mentre nello studio “StaMINA” non sono state evidenziate differenze prognostiche significative di PFS ed OS [166].

Risultati preliminari, ma molto promettenti, sono stati ottenuti dallo studio FORTE con Carfilzomib in associazione a Lenalidomide, che ha mostrato un incremento della qualità di risposta e di negatività della MRD [161].

Gli studi CASSIOPEIA e GRIFFIN hanno mostrato come il *rate* di risposte profonde e di MRD-negatività incrementi dopo la fase di consolidamento con Daratumumab in aggiunta alla tripletta Bortezomib-based [130, 167].

Infine, lo studio MASTER è il primo studio MRD-driven, cioè nel quale viene stabilito se eseguire il consolidamento o meno e quanti cicli di consolidamento (0, 4 o 8 cicli) secondo schema Daratumumab-KRd in base al valore della MRD post ASCT; un'analisi preliminare di questo studio ha mostrato dati molto promettenti [168].

#### 3.4.1.4 TERAPIA DI MANTENIMENTO

La terapia di mantenimento rappresenta invece un trattamento a basse dosi e di lungo termine, che ha l'obiettivo di conservare la risposta ottenuta con le terapie precedentemente utilizzate prolungando PFS ed OS. Proprio perché il trattamento è di lunga durata, particolare enfasi viene posta, in questo contesto, alla tollerabilità ed alla tossicità delle terapie somministrate.

In Italia, oggi, l'unico farmaco approvato in fase di mantenimento è Lenalidomide.

Il primo dei nuovi farmaci ad essere studiato con finalità di mantenimento fu la Talidomide, ma poi il suo impiego a lungo termine è stato abbandonato sia per i risultati discordanti in termini di efficacia [169-170] sia per le importanti tossicità (in particolare polineuropatia ed eventi tromboembolici) tali da determinare frequentemente la discontinuazione e l'interruzione del trattamento [171-172].

Per quanto riguarda invece Lenalidomide, la sua approvazione deriva dai dati di comprovata efficacia e di tollerabilità di una metanalisi di diversi *trials* di fase III, che ha dimostrato come il mantenimento con R (con dose di 5-15 mg/die) fino a progressione determini un incremento significativo di PFS, EFS e anche di OS rispetto al placebo [173]. Da sottolineare, però, come il vantaggio di sopravvivenza sia stato meno significativo nei pazienti ad alto rischio citogenetico, con elevata concentrazione sierica di LDH oppure con alterata clearance della creatinina (< 50 ml/min) [173].

Per quanto riguarda invece i PIs, due *trials* hanno valutato l'impiego di Bortezomib: nel già citato HOVON-65/GMMG-HD4 sono stati messi a confronto regimi di mantenimento con Bortezomib vs Talidomide, dimostrando una superiorità del primo in termini di PFS ed OS, anche nei pazienti ad alto rischio citogenetico e con alterata funzione renale [146, 174]; lo studio Pethema/GEM ha evidenziato, tramite una randomizzazione a mantenimento con IFN, T o TV (tutti della durata di tre anni), un incremento significativo di risposte profonde e di PFS (ma non di OS) nei pazienti trattati con il PI [175]. Nonostante i buoni risultati ottenuti, la terapia di mantenimento con V ha presentato due principali limiti: l'insorgenza di polineuropatia e la somministrazione necessariamente ospedaliera con peggioramento della qualità di vita. In virtù della sua somministrazione orale, che lo renderebbe meglio tollerabile in un regime di mantenimento, è stato oggetto di studio l'impiego di Ixazomib nel *trial* randomizzato di fase III TOURMALINE-MM3, il quale ha evidenziato, rispetto al placebo, un aumento significativo della PFS con buona tollerabilità [176]. Altri farmaci attualmente in corso di valutazione nella fase di mantenimento sono rappresentati da Carfilzomib e Daratumumab, in varie associazioni con Lenalidomide o Ixazomib.

Infine, un altro quesito ancora oggi senza risposta riguarda la durata della terapia di mantenimento: durata fissa (e per quanto?) oppure terapia continuativa fino a progressione? A tal proposito, sono in corso alcuni studi clinici volti ad indagare proprio questo obiettivo, come, per esempio, il trial ENDURANCE (lenalidomide per 2 anni vs lenalidomide fino a progressione) e gli studi GEM12MENOS65 e PERSEUS, nei quali la durata della terapia di mantenimento viene decisa in base alla positività o negatività della MRD.

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

Anche per i pazienti che (in virtù di aspetti quali età, comorbidità e *performance status*) non siano candidabili a ricevere esistono oggi numerose alternative terapeutiche. Per stabilire quale sia la migliore da adottare, è necessaria una stratificazione dei pazienti che ne prenda in considerazione, in modo integrato, le diverse caratteristiche. A tale scopo, è stata proposta il “frailty score”, basato sull’integrazione della scala ADL (*activities of daily living*) di Katz, della scala IADL (*instrumental activities of daily living*) di Lawton e del CCI (*Charlson comorbidity index*) e che analizza il numero e la severità della comorbidità, con particolare attenzione alla funzione cardiocircolatoria, respiratoria, epatica e renale [177]. Tramite queste valutazioni integrate, i pazienti geriatrici possono essere suddivisi in:

- *fit* per i quali sono da preferire regimi terapeutici comprensivi di IMiDs o PIs, associati tra loro e/o a corticosteroidi o chemioterapici convenzionali o anticorpi monoclonali oppure, quando possibile, l’uso di molecole innovative e protocolli sperimentali;
- *intermediate-fit* e *unfit-frail*, per questi pazienti è previsto l’impiego di combinazioni terapeutiche a base di farmaci a dosaggio ridotto, fino all’eventuale impiego di sole terapie palliative e di supporto.

#### INIBITORI DEL PROTEASOMA

Oggi in pratica clinica Bortezomib è approvato in questo *setting* di pazienti in combinazione a desametasone (Vd), a melphalan e prednisone (VMP) e, grazie ai risultati molto recenti del trial ALCYONE, a melphalan-prednisone e Daratumumab (D-VMP) [126-127].

Relativamente al regime MPV, pionieristico è stato lo studio di fase III VISTA, nel quale l’aggiunta del PI ha comportato un incremento significativo in termini risposte e di OS pari al 23% (con beneficio osservato anche nei pazienti di età superiore ai 75 anni, ISS III e ridotta clearance della creatinina) [178]. In virtù delle caratteristiche, lo schema MPV si è affermato tra gli *standard of care* nelle terapie di prima linea del paziente non candidabile a ASCT [164]. Altri studi che hanno valutato Bortezomib nel setting del paziente anziano sono stati il *trial* SWOG S0777, nel quale è stata valutata l’aggiunta di Bortezomib a Rd (VRD) [179], lo studio MARBLE (con l’obiettivo di valutare l’impiego di uno schema terapeutico dato dall’alternanza di VD e RD)[180], alcuni studi di fase II che hanno confermato la validità di un regime modificato di VRD con riduzione dei dosaggi (“VRD lite”) [181] e altri studi ancora che hanno indagato un trattamento sequenziale dato da 4 cicli di MPV e quindi Rd fino a progressione [182]. Sulla base di questi incoraggianti risultati, la tripletta VRD potrebbe, in

un futuro prossimo, divenire la terapia di prima linea nei pazienti non eleggibili a trapianto. Questa la tripletta, inoltre, stata valutata anche in associazione all'anticorpo monoclonale anti-CD38 Isatumximab (studio IMROZ), i cui dati sono tutt'ora in corso di analisi [183].

Sulla scia degli ottimi risultati ottenuti con Bortezomib, sono stati sperimentati anche regimi comprensivi dei PIs di seconda generazione: Carfilzomib è stato valutato nell'ambito delle triplette KCD [184] e KRD [185]; relativamente ad Ixazomib, uno studio importante è quello che ha valutato l'efficacia e la buona tollerabilità della terapia con la tripletta IRD seguita da mantenimento con I [186].

#### IMMUNOMODULANTI

Il primo regime IMiD-*based* è stata l'associazione di MP con Talidomide (MPT), che per anni è rimasta il *gold standard* della terapia di prima linea del paziente anziano. Tale terapia è stata poi sostituita, grazie a dati di spiccata superiorità, da regimi comprensivi dell'IMiD di seconda generazione Lenalidomide (Rd). Lo studio FIRST è stato uno dei primi a dimostrarne il netto vantaggio in termini di sopravvivenza [187]; oggi, grazie ai dati incoraggianti dello studio MAIA, già descritti nel capitolo precedente, la terapia continuativa con Rd in associazione a Daratumumab è divenuta uno degli *standard of care* nel paziente non candidabile ASCT [128-129]. Per quanto riguarda sempre regimi R-*based*, uno studio giapponese di fase II ha messo a confronto Elotuzumab-RD e RD evidenziando un miglioramento significativo dell'ORR nel braccio comprendente l'anti-SLAMF7 (220); tuttavia, sono stati recentemente presentati i risultati preliminari dello studio di fase III "ELOQUENT-1" (finalizzato al medesimo confronto) nei quali l'*endpoint* primario, rappresentato dall'aumento della PFS, non è stato raggiunto [189].

Per quanto riguarda la scelta tra terapia PI-*based* o IMiD-*based* ad oggi non esistono dati a supporto di un regime piuttosto che un altro; Rd ha mostrato nello studio registrativo una sopravvivenza libera da malattia maggiore rispetto lo schema VMP, però i due regimi non sono stati confrontati l'un con l'altro in un *trial* randomizzato. Proprio con questo obiettivo, è stato disegnato il *trial* REAL, unico studio in cui sono state messe a confronto diretto VMP vs Rd, tutt'ora in corso. Ciò che può aiutare, inoltre, a scegliere l'opzione terapeutica migliore è la valutazione completa del paziente, tenendo conto anche delle comorbidità e degli aspetti logistici: in un paziente con pregressi episodi trombotici e/o insufficienza renale si tende a preferire un regime Bortezomib-*based* (assenza di rischio trombotico, non aggiustamenti di dose a seconda della funzione renale, effetto anti-infiammatorio a livello del tubulo renale con rapido debulking di malattia); viceversa, grazie ai risultati eccezionali dello studio MAIA, in

un paziente senza comorbidità di rilievo e *fit* o in un paziente che preferisce una somministrazione orale si tende a prediligere un regime Lenalidomide-*based*.

### 3.4.3 TERAPIA DEL PAZIENTE RICADUTO/REFRATTARIO

Nonostante l'introduzione dei nuovi farmaci, la loro approvazione nelle terapie di prima linea e dunque la loro diffusione abbiano incrementato in modo importante la qualità della risposta ottenuta e la durata della remissione, la storia naturale del MM continua ad essere caratterizzata in modo inevitabile dalla ripresa di attività della malattia, con progressiva resistenza ai trattamenti farmacologici impiegati.

Al momento della ripresa di malattia, la decisione circa la migliore strategia da impiegare nel RRMM deve essere presa sulla base di diversi aspetti: le caratteristiche generali del paziente (età, *performance status*, riserva midollare, esposizione precedente a chemioterapici e altri farmaci antineoplastici con le relative tossicità residue, altre comorbidità), le terapie precedentemente utilizzate (classe di farmaci, durata del trattamento, profondità e durata della risposta ottenuta, tossicità sviluppate) e la malattia al momento della ricaduta (malattia indolente o aggressiva, presenza di anomalie citogenetiche ad alto rischio, aumento dell'LDH, sviluppo di malattia extra-midollare ed eventuale evoluzione a leucemia plasmacellulare).

Considerando il numero sempre maggiore di nuovi farmaci e di loro possibili combinazioni, la scelta del miglior approccio terapeutico ed il corretto *sequencing* stanno diventando sempre più complessi. In linea generale, nella scelta terapeutica ci si basa su alcune raccomandazioni/evidenze, riportate qui di seguito [190]:

- utilizzare una classe di farmaci che non sia stata precedentemente somministrata in prima linea; è anche possibile, tuttavia, re-impiegare il farmaco precedentemente utilizzato (*re-treatment*) oppure una molecola appartenente alla medesima classe (ma di generazione successiva) qualora il paziente sia stato responsivo;
- è stato dimostrato che l'utilizzo di triplette è superiore in termini di efficacia rispetto la combinazione di soli due farmaci;
- nei pazienti *frail* l'utilizzo di regimi terapeutici meno intensivi porta ad *outcomes* di sopravvivenza migliori;
- in pazienti *fit* di età inferiore a 65-70 anni può essere preso in considerazione l'ASCT di salvataggio, qualora la durata di risposta al precedente trapianto sia stata di almeno 2-3 anni (meglio considerare 3 se il paziente ha ricevuto una terapia di mantenimento post ASCT).

Ora andiamo a vedere nel dettaglio quello che attualmente è raccomandato dalle ultime linee guida a seconda della fase di malattia/recidiva.

#### PRIMA RICADUTA

Considerando l'uso sempre più estensivo di Lenalidomide in prima linea, la prima raccomandazione secondo le linee guida dell'IMWG del 2021 è quella di scegliere un approccio terapeutico in prima ricaduta a seconda della refrattarietà o meno a Lenalidomide [191]. Da sottolineare, però, che ad oggi la definizione di refrattarietà a Lenalidomide non è univoca e ci sono vari interrogativi da chiarire: infatti, secondo l'IMWG un paziente viene definito refrattario se ha una recidiva di malattia durante il trattamento con Lenalidomide o entro i 2 mesi dalla sua interruzione, ma quello che rimane ancora da stabilire è se la dose di farmaco (10 mg vs 25 mg), se una sua combinazione con altri farmaci (vs trattamento con Lenalidomide *single agent*) e se il *treatment free interval* (< 2 mesi vs 6-12 mesi) abbiano un impatto sulla definizione di refrattarietà.

Relativamente ai pazienti non refrattari a Lenalidomide, alla prima ricaduta l'approccio terapeutico migliore è un regime Lenalidomide-*based* e le opzioni da preferire sono l'associazione con Daratumumab o Carfilzomib [191]. Infatti, i regimi DRd e KRd sono le combinazioni che hanno mostrato nei pazienti con RRMM una maggior sopravvivenza libera da malattia (44.5 e 26.3 mesi, rispettivamente) ed un più alto *rate* di CR (56% e 32%, rispettivamente) [119-120, 192-193].

Altre opzioni Lenalidomide-*based* consigliate al primo *relapse* sono l'associazione con Elotuzumab (Elo-Rd) (PFS pari a 19.4 mesi nello studio ELOQUENT-2) e con Ixazomib (PFS pari a 20.6 mesi); quest'ultima combinazione (IRd) viene raccomandata in particolare nei pazienti ad alto rischio citogenetico [194-195].

La scelta tra le varie triplete sopra menzionate deve essere guidata anche sulla base, come già detto precedentemente, delle caratteristiche del paziente e della malattia: IRd, essendo una formulazione completamente orale, è fortemente consigliata in quei pazienti con difficoltà motorie o che rifiutino somministrazioni parenterali; in pazienti con comorbidità cardiovascolari, in virtù della nota tossicità, sarebbe da evitare l'uso di Carfilzomib; DRd e KRd, grazie alla loro rapidità di azione, sono da prediligere in quei pazienti con recidiva di malattia aggressiva, mentre nei casi di malattia più indolente Elo-Rd può essere una buona scelta terapeutica. Infine, nei pazienti *frail* possono essere utilizzati regimi meno intensivi e doppiette di farmaci, quali Rd o Vd (se la risposta alla precedente linea con PI è stata sufficientemente adeguata).

Nel paziente, invece, *Lenalidomide-refractory* alla prima ricaduta è da prediligere un regime *PI-based*: le principali opzioni raccomandate sono la combinazione di Bortezomib con Pomalidomide (PVd) e la combinazione di Carfilzomib con gli anticorpi monoclonali anti-CD38, quali Daratumumab (DKd) e Isatuximab (Isa-Kd); altre buone strategie in alternativa da considerare sono l'associazione di Daratumumab con Bortezomib (DVd) o con Pomalidomide (DPd) e la doppietta Kd. Nei pazienti *frail*, anche in questo caso, è sempre meglio prediligere l'uso di Vd in associazione o meno a chemioterapici, come ciclofosfamide o melphalan [191].

Queste raccomandazioni derivano dai dati di efficacia di vari studi clinici. Primo fra tutti lo studio OPTIMISMM, che ha mostrato come l'aggiunta di Pomalidomide a Vd dia un vantaggio in termini di PFS (11.2 vs 7.2 mesi) e riduca il rischio di progressione e morte del 39%; in particolare, è emerso un vantaggio molto significativo in termini di sopravvivenza se utilizzato come regime in prima ricaduta, anche nei pazienti lenalidomide-refractory (22.0 e 17.8 mesi al primo *relapse* nei pazienti non refrattari e refrattari a Lenalidomide, rispettivamente) [196]. L'associazione di Carfilzomib con gli anticorpi monoclonali anti-CD38 ha dato ottimi risultati con PFS nettamente superiori al braccio di controllo, pari a 28.5 mesi nello studio CANDOR (DKd vs Kd) e *not reached* nello studio IKEMA (Isa-Kd vs Kd), grazie ai quali DKd sarà approvato a breve anche in Italia in pratica clinica [125, 197]. Nello studio ENDEAVOR la doppietta Kd ha mostrato una superiorità rispetto al PI di prima generazione Vd [198-199]; l'aggiunta di Daratumumab, inoltre, a Vd e Pd ha mostrato una prolungata PFS: nello studio CASTOR la PFS per il braccio DVd è risultata pari a 16.7 mesi (vs 7.1 mesi per i pazienti trattati con Vd), con un incremento a 27 mesi (vs 7.9 mesi) se tale regime era utilizzato in seconda linea [121, 122], mentre nel *trial* APOLLO l'aggiunta di Daratumumab ha portato ad una riduzione del rischio di progressione o morte del 37% con una PFS pari a 12.4 mesi (vs 6.9 mesi del braccio Pd) [124]. Per quanto riguarda quest'ultima associazione, DPd è approvata sia FDA che EMA, mentre l'approvazione AIFA è tutt'ora in *pending*. Il vantaggio in termini di sopravvivenza si è mantenuto in tutti gli studi sopracitati anche nel sottogruppo di pazienti refrattari a Lenalidomide.

#### RICADUTE SUCCESSIVE

In queste fasi di malattia i pazienti sono già stati esposti o refrattari a Bortezomib e Lenalidomide (*double-refractory*), per cui quello che viene raccomandato dalle linee guida ESMO e IMWG sono le combinazioni con Pomalidomide o Carfilzomib [191].

Per quanto riguarda Pomalidomide, ottimi risultati nei pazienti *double-refractory* sono emersi dalle associazioni con Elotuzumab (Elo-Pd) e con Isatuximab (Isa-Pd), entrambe

attualmente approvate in Italia grazie ai risultati dei *trials* ELOQUENT-3 e ICARIA, rispettivamente [200-201].

Altre due combinazioni efficaci Pomalidomide-*based* sono DPd, già descritta prima, e Carfilzomib-Pd (KPd), entrambe, però non disponibili in pratica clinica in Italia al momento (non ancora approvate da AIFA).

Per quanto riguarda le triplette con K, queste sono già state descritte sopra e trovano spazio nel *setting* del paziente R/R a seconda dei trattamenti eseguiti in precedenza.

Anche la doppietta Pd rappresenta un trattamento con provata efficacia e, grazie alla sua formulazione orale, può essere utilizzata anche nei pazienti *unfit/frail*; inoltre, è stato dimostrato come l'aggiunta di Ciclofosfamide al regime Pd sia in grado di potenziarne l'efficacia anche in pazienti inizialmente non responsivi alla doppietta [202]. Un'altra opzione terapeutica per pazienti *unfit* e *frail* è l'utilizzo, grazie alla sua tollerabilità e maneggevolezza, di Daratumumab *single agent* [112-113].

Con il susseguirsi delle ricadute è stata dimostrata una progressiva resistenza ai regimi farmacologici disponibili. I pazienti refrattari ad uno o più molecole appartenenti alle classi di PIs, IMiDs e MoAbs anti-CD38 (*triple-* o *penta-refractory*) hanno una prognosi infausta, con una OS inferiore a 12 mesi. La raccomandazione per questa categoria di pazienti è quella di arruolarli, laddove possibile, in *clinical trials* oppure utilizzare nuove molecole con meccanismi d'azione differenti e di recentissima approvazione da FDA ed EMA. Tra queste spiccano Belantamab Mafodotin e Selinexor [191].

Belantamab Mafodotin, MoAb coniugato anti-BCMA, è approvato come agente singolo per i pazienti che hanno ricevuto almeno 4 linee precedenti, comprensive almeno di un PI, un IMiD e un MoAb anti-CD38. La sua approvazione, come accennato in precedenza, deriva dai risultati dello studio DREAMM-2 e, attualmente, sono in corso vari *trials* in cui viene valutato in associazione a Pomalidomide e Bortezomib [98].

Selinexor, un inibitore dell'esportina nucleare, è attualmente approvato in combinazione a desametasone per pazienti *penta-refractory*, che abbiano ricevuto almeno 4 linee precedenti, comprensive almeno di due PIs, due IMiDs e un MoAb anti-CD38, grazie ai risultati dello studio STORM [203]. Selinexor, inoltre, è stato valutato anche in combinazione a vari *back-bone* nello studio di fase Ib/II STOMP; tra le varie associazioni la più promettente è risultata essere quella con Bortezomib (SVd), successivamente indagata nello studio di fase III BOSTON, in cui SVd è risultato superiore alla sola associazione Vd e grazie al quale è stato approvato da parte di FDA [204].

## 4. RAZIONALE DELLO STUDIO

Come già descritto nel capitolo 3, lo scenario terapeutico del MM nel corso degli ultimi anni si è ampiamente evoluto, con l'introduzione nella pratica clinica di un numero sempre maggiore di molecole farmacologiche altamente efficaci, che hanno portato ad un significativo miglioramento della prognosi a lungo termine dei pazienti. Inoltre, considerando la stretta correlazione tra profondità di risposta alla terapia e gli *outcomes* di sopravvivenza, l'obiettivo del clinico è quello di utilizzare la combinazione di farmaci migliore per eradicare la malattia residua ed ottenere risposte il più possibile profonde. Nella ricerca clinica si valuta l'efficacia e la sicurezza di nuove molecole dapprima in un *setting* di pazienti pluri-recidivati e pluri-trattati, per poi proporle in fasi più precoci di malattia. Ciò è quanto è avvenuto per Daratumumab: grazie ai dati di efficacia sorprendenti sia in monoterapia sia in combinazione ai nuovi farmaci nei pazienti con RRMM [113, 120, 122], si è voluta esplorare la sua efficacia nei pazienti di nuova diagnosi, proprio con l'obiettivo di incrementare il *rate* di risposte profonde e, quindi, la sopravvivenza a lungo termine, con ottimi risultati nel *setting* dei pazienti sia non candidabili a ASCT [126-129] sia giovani candidabili alla chemioterapia ad alte dosi [130]. In particolare, il *trial* CASSIOPEIA è stato lo studio pilota, che per primo ha confermato l'efficacia e la sicurezza dell'aggiunta di Daratumumab ad una tripletta Bortezomib-based nell'ambito di un programma trapiantologico, modificando, così, lo *standard of care*. In Italia Daratumumab è stato studiato nel paziente con NDMM candidabile a ASCT nell'ambito di due *trials* clinici, uno di fase II (EMN18) ed uno di fase III (EMN17), la cui analisi è in corso, ed è stato approvato in pratica clinica da AIFA in gennaio 2022.

Lo scopo del presente studio è proprio quello di confermare l'efficacia e la sicurezza di Daratumumab aggiunto allo *standard of care*, tramite un'analisi locale dei pazienti del nostro Istituto di Ematologia "L. A. Seràgnoli" arruolati nei due studi appena citati, con un particolare focus sulla raccolta delle PBSC. Infatti, considerando che tale farmaco è stato recentemente introdotto nell'ambito di un programma terapeutico comprensivo di ASCT, i dati riguardanti il suo impatto sulla raccolta delle PBSC sono scarsi e prematuri. Attualmente, dai dati a disposizione in letteratura [131] Daratumumab non impatta negativamente sulla raccolta delle PBSC e, quindi, sulla possibilità di eseguire l'ASCT con successo, che rimane oggi il cardine della terapia del paziente giovane.

In conclusione, il razionale del presente studio è quello di aggiungere dati, oltre a quelli già presenti in letteratura, riguardanti un trattamento introdotto molto di recente nella pratica clinica al fine di aiutare il clinico nella gestione dei pazienti con NDMM.

## 5. OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'endpoint primario del presente studio è quello di comparare l'efficacia, in termini di ottenimento di risposte sia globali (ORR) che profonde (VGPR/CR), dell'aggiunta di Daratumumab a triplette Bortezomib-based come terapia di induzione nell'ambito di un programma trapiantologico in pazienti con NDMM rispetto allo *standard of care*.

Secondariamente, lo studio si propone di:

- ❖ comparare la sopravvivenza libera da malattia (PFS) nei due gruppi di pazienti;
- ❖ valutare il tipo, frequenza e severità della tossicità correlata alla terapia, sia ematologica che extra-ematologica, nei 2 gruppi di pazienti;
- ❖ comparare la procedura di raccolta di cellule staminali periferiche (PBSC) nei due gruppi di pazienti.

## 6. MATERIALI E METODI

### 6.1 DISEGNO DELLO STUDIO E CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE

#### 6.1.1 EMN17 (PERSEUS)

Lo studio PERSEUS è un protocollo di fase III multicentrico randomizzato, volto a verificare la superiorità di Daratumumab in combinazione con Bortezomib-Lenalidomide-desametasone (Dara-VRD) rispetto a VRD in pazienti con NDMM candidabili a ASCT, il cui arruolamento presso il nostro Centro è stato attivo da Luglio 2019 a Dicembre 2019.

Lo studio prevede una randomizzazione che suddivide i pazienti in due gruppi:

- ❖ gruppo Dara-VRD: ricevono 4 cicli di induzione della durata di 28 giorni ciascuno con Daratumumab (1800 mg in somministrazione s.c.) nei giorni 1-8-15-22/28 per i primi 2 cicli e poi solo nei giorni 1-15/28 per i successivi 2 cicli, Bortezomib (1.3 mg/mq somministrazione s.c.) nei giorni 1-4-8-11/28, Lenalidomide (25 mg p.o.) dal giorno 1 a 21/28, desametasone (40 mg p.o.) nei giorni 1-2-3-4-9-10-11-12;
- ❖ gruppo VRD: ricevono 4 cicli di induzione della durata di 28 giorni ciascuno con Bortezomib (1.3 mg/mq somministrazione s.c.) nei giorni 1-4-8-11/28, Lenalidomide (25 mg p.o.) dal giorno 1 a 21/28, desametasone (40 mg p.o.) nei giorni 1-2-3-4-9-10-11-12.

A seguire la terapia d'induzione, i pazienti vengono sottoposti a chemioterapia mobilizzante le cellule staminali con Ciclofosfamide 2 g/mq e stimolazione con G-CSF. Una

volta raccolte le PBSC, lo studio prevede l'esecuzione di un singolo ASCT condizionato con melphalan 200 mg/mq, dopo il quale i pazienti ricevono:

- terapia di consolidamento con 2 cicli della durata di 28 giorni ciascuno con Daratumumab (1800 mg in somministrazione s.c.) nei giorni 1-15/28, Bortezomib (1.3 mg/mq somministrazione s.c.) nei giorni 1-4-8-11/28, Lenalidomide (25 mg p.o.) dal giorno 1 a 21/28, desametasone (40 mg p.o.) nei giorni 1-2-3-4-9-10-11-12 oppure con 2 cicli della durata di 28 giorni ciascuno con Bortezomib (1.3 mg/mq somministrazione s.c.) nei giorni 1-4-8-11/28, Lenalidomide (25 mg p.o.) dal giorno 1 a 21/28, desametasone (40 mg p.o.) nei giorni 1-2-3-4-9-10-11-12 a seconda della randomizzazione e quindi del gruppo di appartenenza;
- terapia di mantenimento con Daratumumab (1800 mg s.c.) ogni 28 giorni associato a Lenalidomide (10 mg p.o.) dal giorno 1 al giorno 28/28 per 2 anni poi, in caso di MRD negatività, solo con Lenalidomide (10 mg p.o.) dal giorno 1 al giorno 28/28 fino a progressione di malattia (in caso di MRD positività prosegue con Daratumumab e Lenalidomide con le stesse modalità dei primi 2 anni fino a progressione di malattia) oppure Lenalidomide (10 mg p.o.) dal giorno 1 al giorno 28/28 fino a progressione di malattia) a seconda della randomizzazione e quindi del gruppo di appartenenza.

Il protocollo prevede i seguenti criteri di inclusione:

- età compresa tra i 18 e i 70 anni;
- mieloma di nuova diagnosi in paziente candidabile a ASCT;
- Presenza di malattia misurabile (intesa come componente monoclonale sierica >1g/dl, urinaria >200 mg/24h, ratio k/l>10);
- Presenza di almeno un criterio CRAB o MDE;
- ECOG 0,1 o 2, Karnovsky>60%;
- Piastrine > 75000/mmc (50000/mmc se infiltrato midollare > 50%), neutrofili > 1000/mmc, calcio sierico < 13,5 mg/dl, AST e ALT < 2,5 volte il limite superiore, bilirubina < 1,5 volte il limite superiore, VFG > 30 ml/min.

Invece, i criteri di esclusione sono i seguenti:

- Pazienti sottoposti in precedenza a terapia per il MM (fatta eccezione per l'utilizzo di terapia steroidea);
- Pazienti con diagnosi di MGUS, amiloidosi AL, mieloma smouldering, morbo di Waldenstrom o leucemia plasmacellulare;
- Presenza di malattia neoplastica maligna nei 5 anni precedenti la randomizzazione;
- Neuropatia di grado  $\geq 2$ ;

- Interessamento SNC da parte di plasmacellule;
- Infezione da epatite A, B o C, o HIV;
- FEV1  $\leq$  50% o asma attiva negli ultimi 2 anni;
- Presenza di patologia cardiovascolare non controllata o infarto nei 6 mesi precedenti;
- Concomitante infezione acuta;
- Grave malattia psichiatrica;
- Nota allergia ad eccipienti utilizzati nei farmaci all'interno del protocollo o incompatibilità con terapie in atto del paziente;
- Utilizzo di forti inibitori di CYP3A4;
- Gravidanza o allattamento;
- Impossibilità di assumere profilassi con antiaggreganti o anticoagulanti;
- Presenza di patologia gastrointestinale che determina malassorbimento.

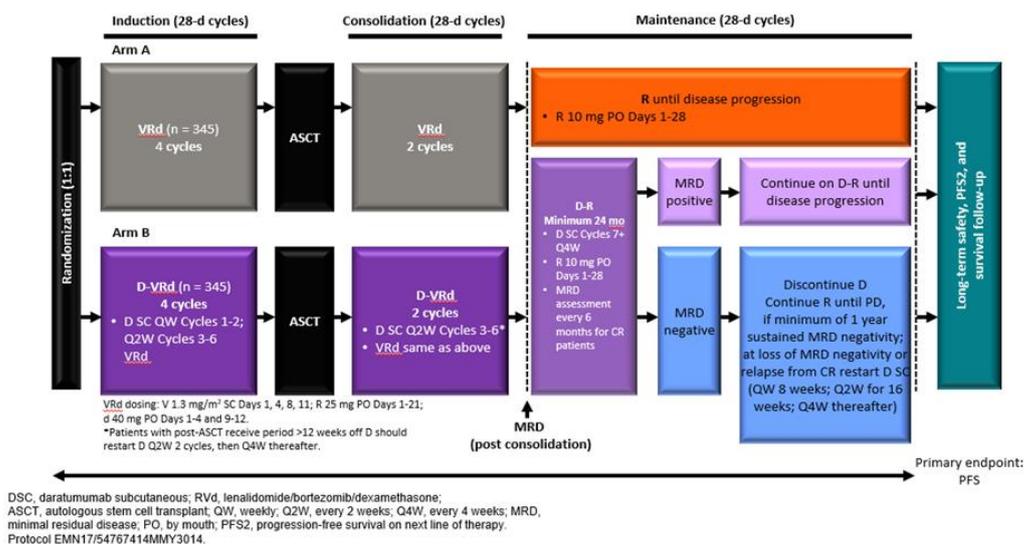


Figura 1: disegno dello studio EMN17

### 6.1.2 EMN 18

L'EMN18 è uno studio di fase II multicentrico randomizzato, con l'obiettivo di verificare l'efficacia e la sicurezza di Daratumumab in combinazione con Bortezomib, Ciclofosfamida, desametasone (Dara-VCD) mettendolo a confronto con lo *standard of care* Bortezomib-Talidomide-desametasone (VTD) in pazienti con NDMM candidabili a trapianto.

Lo studio EMN18 è aperto all'arruolamento presso il nostro Centro a partire da Settembre 2019 (tutt'ora attivo) e tale *trial* prevede due randomizzazioni:

- 1) una prima randomizzazione suddivide i pazienti in due gruppi che ricevono due differenti regimi d'induzione:

- ❖ gruppo Dara-VCD: ricevono 4 cicli della durata di 28 giorni ciascuno di Daratumumab (16 mg/kg e.v.) nei giorni 1-8-15-22/28 per i primi 2 cicli e poi solo nei giorni 1-15/28 per i successivi 2 cicli, Bortezomib (1.3 mg/mq somministrazione s.c.) nei giorni 1-8-15-22/28, Ciclofosfamide (300 mg/mq p.o.) nei giorni 1-8-15-22/28, Desametasone (40 mg p.o.) nei giorni 1-8-15-22/28;
- ❖ gruppo VTD: ricevono 4 cicli della durata di 28 giorni ciascuno di Bortezomib (1.3 mg/mq somministrazione s.c.) nei giorni 1-4-8-11, Talidomide (100 mg p.o.) dal giorno 1 al giorno 28/28, Desametasone (20 mg p.o.) nei giorni 1-2-3-4-8-9-10-11/28.

A seguire tutti i pazienti ricevono chemioterapia a scopo mobilizzante con Ciclofosfamide 3 g/mq seguita da stimolazione con G-CSF per raccogliere le PBSC e, successivamente, a ASCT condizionato con melphalan 200 mg/mq. I pazienti con alto rischio citogenetico (definito come presenza di t(4;14), t(14;16), dell7p) sono candidati ad eseguire secondo ASCT di consolidamento. Dopo la fase di chemioterapia ad alte dosi tutti i pazienti ricevono 2 cicli di consolidamento della durata di 28 giorni ciascuno con lo stesso regime farmacologico utilizzato in induzione.

2) tutti i pazienti con una risposta  $\geq$  PR vengono nuovamente randomizzati a ricevere terapia di mantenimento con:

gruppo Dara: ixazomib 3 mg nei giorni 1-8-15/28 per i primi 4 cicli, quindi ixazomib 4 mg nei giorni 1-8-15/28 dal 5° ciclo in poi in associazione a Daratumumab (16 mg/kg e.v.) una volta ogni 28 giorni, fino a tolleranza o progressione;

gruppo senza Dara: ixazomib 3 mg nei giorni 1-8-15/28 per i primi 4 cicli, quindi ixazomib 4 mg nei giorni 1-8-15/28 dal 5° ciclo in poi, fino a tolleranza o progressione.

In data 23/10/2020 il nostro comitato etico locale ha approvato un emendamento al protocollo (emendamento 2 del 10/02/2020), con il quale è stata sostituita la modalità di somministrazione di Daratumumab; pertanto, dopo tale data i pazienti hanno proseguito la terapia con le modalità sopra descritte, fatta eccezione del dosaggio di Daratumumab: 1800 mg s.c. anziché 16 mg/kg e.v., mantenendo la stessa cadenza di somministrazione.

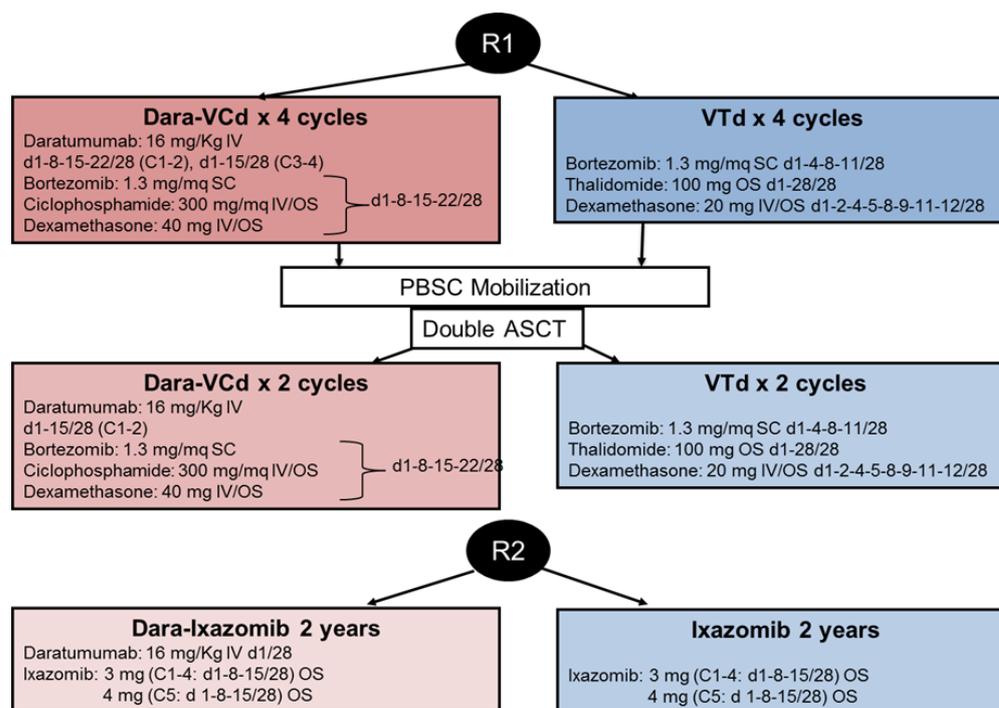
Il protocollo prevede i seguenti criteri di inclusione:

- età compresa tra i 18 e i 65 anni;
- mieloma di nuova diagnosi in paziente candidabile a ASCT;
- Presenza di malattia misurabile (intesa come componente monoclonale sierica  $>1$ g/dl, urinaria  $>200$  mg/24h, ratio k/l  $>10$ );
- Presenza di almeno un criterio CRAB o MDE;

- ECOG 0,1 o 2, Karnovsky > 60%;
- Piastrine > 75000/mmc (50000/mmc se infiltrato midollare > 50%), neutrofilici > 1000/mmc, calcio sierico < 13,5 mg/dl, AST e ALT < 2,5 volte il limite superiore, bilirubina < 1,5 volte il limite superiore, VFG > 30 ml/min;
- frazione d'eliezione > 40%.

Invece, i criteri di esclusione sono i seguenti:

- Pazienti sottoposti in precedenza a terapia per il MM (fatta eccezione per l'utilizzo di terapia steroidea);
- Pazienti con diagnosi di MGUS, amiloidosi AL, mieloma smouldering, morbo di Waldenstrom o leucemia plasmacellulare;
- Presenza di malattia neoplastica maligna nei 5 anni precedenti la randomizzazione;
- Neuropatia di grado  $\geq 2$ ;
- Interessamento SNC da parte di plasmacellule;
- Infezione da epatite A, B o C, o HIV;
- FEV1  $\leq 60\%$ ;
- Presenza di patologia cardiovascolare non controllata o infarto nei 6 mesi precedenti;
- Concomitante infezione acuta;
- Grave malattia psichiatrica;
- Nota allergia ad eccipienti utilizzati nei farmaci all'interno del protocollo o incompatibilit  con terapie in atto del paziente;
- Utilizzo di forti inibitori di CYP3A4;
- Gravidanza o allattamento;
- Impossibilit  di assumere profilassi con antiaggreganti o anticoagulanti;
- Presenza di patologia gastrointestinale che determina malassorbimento.



Double ASCT only for cytogenetic high-risk patients

Figura 2: disegno dello studio EMN18

## 6.2 CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA

Attualmente la risposta al trattamento viene valutata mediante i criteri dell'IMWG aggiornati da Kumar e Colleghi [205].

Remissione completa stringente (sCR):

- remissione completa (definita come di seguito) associata a:
- normale rapporto delle catene leggere libere sieriche e assenza di plasmacellule monoclonali midollari all'analisi immunoistochimica.

Remissione completa (CR):

- negatività di immunofissazione sierica ed urinaria (confermata in almeno due determinazioni successive);
- scomparsa di qualsiasi plasmocitoma;
- presenza di un infiltrato plasmacellulare alla biopsia midollare inferiore al 5% della della cellularità totale;

Risposta Parziale di ottima qualità (VGPR):

- positività di immunofissazione sierica e/o urinaria ma assenza di componente monoclonale all'elettroforesi, oppure
- riduzione della componente monoclonale sierica  $\geq 90\%$  rispetto al *baseline* e componente monoclonale urinaria 100 mg/die;

- in caso di MM micromolecolare: riduzione  $\geq 90\%$  del differenziale tra catena leggera coinvolta e non coinvolta.

Risposta parziale (PR):

- riduzione della componente monoclonale sierica  $\geq 50\%$  rispetto al valore iniziale e riduzione  $\geq 90\%$  della componente monoclonale urinaria o  $< 200$  mg/die;
- in caso di MM non secernente: riduzione  $\geq 50\%$  delle plasmacellule midollari (se al *baseline* queste erano  $\geq 30\%$ ) e, se presenti all'esordio, riduzione  $\geq 50\%$  dei plasmocitomi;
- in caso di MM micromolecolare: riduzione  $\geq 50\%$  del differenziale tra catena leggera coinvolta e non coinvolta.

Risposta minima (MR):

- riduzione della componente monoclonale sierica tra il 25% ed il 49% rispetto al valore iniziale e riduzione tra il 50% ed 89% della componente monoclonale urinaria; se presenti all'esordio, riduzione  $\geq 50\%$  dei plasmocitomi.

Malattia stabile (SD) (da utilizzare solo quando si utilizza l'*endpoint time-to-progression*):

- quando non vengono soddisfatti i criteri di CR, VGPR, PR, MR e progressione.

Progressione (PD):

- aumento della componente monoclonale sierica  $\geq 25\%$  rispetto al *nadir* (incremento almeno di 500 mg/dl in valore assoluto o di 1 g/dl se *nadir*  $\geq 500$  mg/dl) confermato in due determinazioni consecutive o della componente monoclonale urinaria (almeno di 200 mg/die in valore assoluto) confermato in due determinazioni consecutive; oppure
- comparsa di nuove lesioni ossee o aumento  $\geq 50\%$  delle lesioni pre-esistenti, indipendentemente dal valore della componente monoclonale;
- in caso di MM non secernente: aumento  $\geq 25\%$  delle plasmacellule midollari indipendentemente dal valore all'esordio (la quota assoluta deve essere  $\geq 10\%$ );
- in caso di MM micromolecolare: aumento  $\geq 25\%$  del differenziale tra catena leggera coinvolta e non coinvolta (incremento almeno di 10 mg/dl in valore assoluto).

### 6.3 ANALISI CITOGENETICO-MOLECOLARE

L'analisi citogenetico-molecolare è stata eseguita su sangue midollare prelevato dai pazienti al momento dell'arruolamento.

I pazienti sono stati valutati per la presenza/assenza delle seguenti alterazioni cromosomiche: t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p13), del(1p), ampl(1q21), le quali sono state ricercate con

metodica FISH. Le sonde a DNA utilizzate sono marcate direttamente con fluorocromo rosso, verde o blu e sono specifiche per regioni cromosomiche per le quali si vuole valutare l'alterazione.

#### 6.4 ANALISI DELLA TOSSICITA'

La tossicità ematologica ed extra-ematologica durante le varie fasi terapeutiche è stata accuratamente valutata attraverso l'esecuzione seriata di esame obiettivo ed esami laboratoristici e strumentali, quali emocromo completo con formula leucocitaria e piastrine, funzionalità epatica e renale, indici di flogosi (PCR e VES), procalcitonina, esami microbiologici (in caso di sospetta infezione), ecocardiografia, eco-color doppler venoso e arterioso, elettrocardiogramma, radiografia o TC del torace.

La tossicità è stata codificata facendo riferimento ai criteri del *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria* (NCI-CTC version 4.0).

#### 6.5 DEFINIZIONE DEGLI ENDPOINTS "TIME-TO-EVENT"

Come variabili *time-to-event* sono state valutate [206]:

- 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;

Per tutti gli endpoints sopra riportati, i pazienti che terminavano il periodo di osservazione senza aver registrato l'evento atteso sono stati censorizzati a destra alla data dell'ultimo contatto.

#### 6.6 ANALISI STATISTICA

In primis, è stata eseguita un'analisi descrittiva, per la quale le variabili distribuite in modo continuo sono state riportate come mediana più relativo range interquartile (IQR) e le variabili discrete sono state espresse con la loro frequenza assoluta e percentuale.

Le curve di sopravvivenza sono state stimate secondo il metodo di Kaplan-Meier e confrontate in univariata con il Log Rank test. L'indicatore di misura del rischio Hazard Ratio (HR) è stato ottenuto avvalendosi di un modello di regressione semiparametrica di Cox e la relativa statistica di Wald ha permesso di definirne la significatività.

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

## 7. RISULTATI

### 7.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Tutti i dati analizzati nel presente studio provengono da *trials* sponsorizzati dall'*European Myeloma Network* (EMN). Pertanto, è stata richiesta una specifica autorizzazione al Promotore degli studi EMN, ai fini di procedere con l'analisi e la stesura dei risultati ottenuti localmente presso il nostro Centro.

Al momento della data di *cut-off* dell'analisi (1° dicembre 2021), i pazienti arruolati presso il nostro Centro sono risultati 50: 14 nel protocollo clinico EMN17 e 36 nello studio EMN18.

Di questi, 9 sono stati esclusi, in quanto non rispettavano ad una revisione i principali criteri di inclusione ed esclusione dei *trials*, mentre i restanti 41 hanno ricevuto un trattamento nell'ambito dei due protocolli sperimentali e sono stati inclusi nell'analisi: 13 pazienti sono stati trattati secondo lo schema del protocollo EMN17 e 28 pazienti hanno ricevuto un trattamento all'interno del *trial* EMN18.

I pazienti presi in valutazione sono stati suddivisi, in base alla randomizzazione prevista nel protocollo, in due gruppi in base all'utilizzo o meno di Daratumumab nel programma terapeutico. Dei 41 pazienti analizzati, 21 (51%) sono stati randomizzati a ricevere terapia d'induzione sperimentale con Daratumumab (gruppo Daratumumab) e 20 (49%) hanno ricevuto terapia standard (gruppo standard). Nello specifico, nel gruppo Daratumumab 6 pazienti (29%) sono stati trattati con Dara-VRD e 15 (71%) secondo schema Dara-VCD, mentre nel gruppo standard 7 (35%) e 13 (65%) pazienti sono stati trattati con VRD e VTD, rispettivamente.

Le principali caratteristiche dei pazienti all'esordio di malattia sono elencate nella Tabella 4. In particolare, l'età mediana dei pazienti arruolati è risultata pari a 59 anni (IC 95%: 54-61), con un rapporto maschi:femmine pari a 21:20.

Complessivamente, l'analisi FISH è risultata valutabile per 35 soggetti (85%). Di questi, circa un terzo (37%) presentava un profilo citogenetico ad alto rischio, definito dalla presenza di delezione del cromosoma 17p, traslocazione (4;14) e/o traslocazione (14;16).

Lo stadio ISS è stato valutato nel 100% dei casi: 23 pazienti appartenevano alla categoria ISS1 (56%), 12 pazienti allo stadio ISS2 (29%) e 6 (15%) pazienti a quello ISS3. Unendo questo dato all'analisi citogenetica, è emerso come 15 pazienti (43%) appartenevano allo stadio R-ISS1 e 20 (57%) a quello R-ISS2, mentre nessuno è esordito con MM in stadio R-ISS3. Le caratteristiche dei pazienti al *baseline* sono risultate ben bilanciate tra i due gruppi di confronto (gruppo Daratumumab e gruppo standard).

Tabella 4. Principali caratteristiche dei pazienti al *baseline*

| Caratteristiche al <i>baseline</i>        | Totale (n°)     | Daratumumab (n°) | Gruppo Standard (n°) |
|---|-----------------|------------------|----------------------|
| <b>Pazienti</b>                           | 41              | 21               | 20                   |
| <b>Età (IQR)</b>                          | 59 (54-62)      | 62 (56-63)       | 57 (55-61)           |
| <b>Sesso (M:F)</b>                        | 21:20           | 12:9             | 9:11                 |
| <b>Emoglobina, g/dL (IQR)</b>             | 11.8 (9.8-12.6) | 12.2 (10.7-12.5) | 11.3 (10.0-12.0)     |
| <b>Clearance creatinina, ml/min (IQR)</b> | 86 (76-98)      | 88 (71-91)       | 87 (80-95)           |
| < 50 ml/min (%)                           | 3 (8%)          | 3 (100%)         |                      |
| <b>Stadio ISS</b>                         |                 |                  |                      |
| 1   | 23 (56%)        | 11 (52%)         | 12 (60%)             |
| 2   | 12 (29%)        | 5 (24%)          | 7 (35%)              |
| 3   | 6 (15%)         | 5 (24%)          | 1 (5%)               |
| <b>FISH (%)*</b>                          | 35 (85%)        | 18 (51%)         | 17 (49%)             |
| Rischio standard (%)                      | 22 (63%)        | 14 (78%)         | 8 (47%)              |
| Rischio alto (%)                          | 13 (37%)        | 4 (22%)          | 9 (53%)              |
| <b>Stadio R-ISS (%)*</b>                  | 35 (85%)        | 18 (51%)         | 17 (49%)             |
| 1   | 15 (43%)        | 8 (44%)          | 7 (41%)              |
| 2   | 20 (57%)        | 10 (56%)         | 10 (59%)             |
| 3   | 0 (0%)          | 0 (0%)           | 0 (0%)               |

\*FISH valutabile in 35 pazienti su 41 (85%)

Al momento dell'analisi, 35 pazienti su 41 (85%) hanno completato la fase d'induzione con 4 cicli di trattamento, mentre i restanti 6 erano ancora in corso d'induzione; da segnalare che 7 di questi 35 pazienti (20%) hanno prolungato la fase d'induzione con ulteriori 2 cicli, che, inizialmente, erano previsti come consolidamento; infatti, a causa della pandemia da COVID-19, la lista di attesa per la procedura di mobilizzazione delle PBSC ha subito dei ritardi e l'anticipo del consolidamento alla fase pre-ASCT ha evitato che i pazienti rimanessero fuori trattamento per un lungo periodo e mantenessero l'intensità di dose. Dei 35 pazienti che hanno terminato l'induzione, 20 (57%) appartenevano al gruppo Daratumumab (14 pazienti sono stati trattati con Dara-VCD e 6 pazienti secondo schema Dara-VRD) ed i restanti 15 (43%) al gruppo standard (di essi, 8 e 7 hanno ricevuto rispettivamente VTD e VRD).

Trentatré pazienti (80%) hanno eseguito mobilizzazione e raccolta delle PBSC: a seconda dello studio clinico in cui i pazienti erano arruolati, 13 (39%) hanno ricevuto un dosaggio di Ciclofosfamide a scopo mobilizzante pari a 2 g/mq (6 pazienti nel braccio Daratumumab e 7 pazienti nel braccio standard), mentre per 20 pazienti (61%) il dosaggio di Ciclofosfamide è stato pari a 3 g/mq (14 pazienti nel braccio Daratumumab e 6 pazienti nel

braccio standard); successivamente, tutti hanno ricevuto fattore di crescita granulocitario a dosaggio standard pari a 10 mcg/kg; in aggiunta, 10 pazienti (30%) hanno necessitato dell'uso di Plerixafor per incrementare il *rate* di mobilizzazione delle PBSC.

Inoltre, 30 pazienti su 41 (73%) sono stati sottoposti a ASCT condizionato con melphalan 200 mg/mq e, di questi, solo un paziente è stato sottoposto a doppio ASCT.

Infine, 27 (66%) dei pazienti analizzati (compresi i 7 pazienti che hanno eseguito i due cicli subito dopo la fase di induzione per motivi logistici) hanno eseguito la fase di consolidamento e 22 pazienti (54%) erano in corso di mantenimento al momento dell'analisi. Dei pazienti in mantenimento, 11 facevano parte del gruppo Daratumumab (di essi, 6 e 5 erano in trattamento con Daratumumab associato a Lenalidomide e Ixazomib, rispettivamente) e 11 appartenevano al gruppo standard (7 e 4 in monoterapia con Lenalidomide e Ixazomib, rispettivamente).

Per quanto riguarda il braccio sperimentale con Daratumumab, nella fase di induzione (considerando i 35 pazienti che l'hanno terminata) il farmaco è stato somministrato per via endovenosa in 9 pazienti (45%), per via sottocutanea in 6 pazienti (30%) e per via endovenosa, prima, e, poi, sottocutanea (a seguito dell'emendamento del protocollo) nei restanti 5 pazienti (25%); nelle fasi di consolidamento e mantenimento, invece, tutti i pazienti hanno ricevuto il farmaco per via sottocutanea.

## 7.2 TOSSICITA'

L'analisi riguardante il profilo di sicurezza della terapia è stata effettuata sia in fase d'induzione che in fase di mantenimento. Gli eventi avversi sono stati suddivisi in ematologici ed extra-ematologici, con un particolare focus su tossicità gastrointestinale (GI), tossicità cardiovascolare, infezioni, polineuropatia, rash cutanei e reazioni infusionali secondarie a Daratumumab.

Le principali tossicità emerse nella fase d'induzione sono evidenziate nella Tabella 5. In generale, le tossicità più frequenti sono risultate essere la tossicità ematologica (32%), la stipsi (41%) e la neuropatia (32%), tutte prevalentemente di grado 1-2 (grado  $\geq 3$  nel 15%, 0% e 2% dei casi, rispettivamente). Nello specifico, per quanto riguarda la tossicità ematologica, questa è stata prevalentemente caratterizzata da neutropenia (29%, tutti i gradi), seguita da piastrinopenia (17%, tutti i gradi) e anemia (7%, tutti i gradi); inoltre, mettendo a confronto i due gruppi di pazienti, nonostante non sia emersa una differenza statisticamente significativa, essa sembra essere stata più frequente nel gruppo Daratumumab (43% vs 22%). Questo dato, comunque, non ha avuto un impatto significativo dal punto di vista clinico, in

quanto nessun paziente ha necessitato di una riduzione di dose dei farmaci o ha discontinuato il trattamento.

Per quanto riguarda la tossicità extra-ematologica, l'evento avverso più frequente è stato la tossicità GI, per lo più stipsi (41%) di grado 1-2 in tutti i pazienti, con maggior incidenza nel gruppo standard (56% vs 29% nel gruppo Daratumumab) in quanto relata alla Talidomide. La polineuropatia (32%), relata sia Bortezomib che Talidomide, di grado lieve-moderato nella maggior parte dei casi (grado  $\geq 3$  nel 3% dei casi), è stata la complicanza che ha portato più frequentemente ad una riduzione di dosaggi e si è manifestata, anche in questo caso, con un'incidenza maggiore nel gruppo standard (44% vs 24% nel gruppo Daratumumab). Le infezioni, che sono un evento avverso di rilievo, si sono manifestate nel 27% dei pazienti (11 su 41), di cui di grado  $\geq 3$  nel 15% di essi, con una frequenza simile nei due gruppi di confronto.

Infine, per quanto riguarda le IRR relate a Daratumumab, queste sono occorse solo nel 19% dei pazienti (4 su 21), sono risultate tutte di grado 1-2 e si sono manifestate solo alla prima infusione del farmaco per via endovenosa; da sottolineare come nessuna reazione sia emersa con la somministrazione sottocutanea.

Tabella 5. Principali eventi avversi sia ematologici che extra-ematologici in corso d'induzione

| Evento avverso, n° pz (%)           | Totali (41pz) | Gruppo Daratumumab (21 pz) | Gruppo Standard: (20 pz) |
|-------------------------------------|---------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>Tossicità ematologica</b>        | 13 (32%)      | 9 (43%)                    | 4 (22%)                  |
| - Grado $\geq 3$                    | 6 (15%)       | 5 (24%)                    | 1 (6%)                   |
| <b>Infezioni</b>                    | 11 (27%)      | 7 (33%)                    | 4 (22%)                  |
| - Grado $\geq 3$                    | 6 (15%)       | 4 (19%)                    | 2 (11%)                  |
| <b>Neuropatia</b>                   | 13 (32%)      | 5 (24%)                    | 8 (44%)                  |
| - Grado $\geq 3$                    | 1 (3%)        | /                          | 1 (6%)                   |
| <b>Tossicità gastro-intestinale</b> | 16 (41%)      | 6 (29%)                    | 10 (56%)                 |
| - Grado $\geq 3$                    | /             | /                          | /                        |
| <b>Tossicità cardiovascolare</b>    | 2 (5%)        | 1 (5%)                     | 1 (6%)                   |
| - Grado $\geq 3$                    | /             | /                          | /                        |
| <b>Altro*</b>                       | 14 (36%)      | 3 (14%)                    | 11 (61%)                 |
| - Grado $\geq 3$                    | 4 (10%)       | 1 (5%)                     | 3 (17%)                  |
| <b>Reazioni infusionali</b>         | 4 (19%)       | 4 (19%)                    | /                        |
| - Grado $\geq 3$                    | /             | /                          | /                        |

\*Altro comprende: astenia, iperglicemia, rash cutaneo, tossicità epatica; pz: pazienti.

Passando ora alla fase di mantenimento, il profilo di tossicità è analogo alla fase d'induzione.

Le più frequenti rimangono: la tossicità ematologica (50% di tutti i gradi, 32% di grado  $\geq 3$ ), caratterizzata nella quasi totalità dei casi (91%) da neutropenia e con una incidenza simile tra i due gruppi (4 vs 7 pazienti su 11 totali), e la tossicità GI (54%), caratterizzata, però, nella

fase di mantenimento da diarrea relata alla terapia con Lenalidomide (58%) e da nausea/vomito (42%) relata a terapia con Ixazomib, di grado 1-2 in tutti i casi.

L'incidenza delle infezioni è risultata superiore rispetto alla fase d'induzione (41% di tutti i gradi, 18% di grado  $\geq 3$ ); tuttavia, bisogna considerare che, mentre i pazienti iniziavano la terapia di mantenimento, aumentavano i contagi e le infezioni da COVID-19 (seconda ondata) e ciò potrebbe giustificare tale dato (nel gruppo infezioni sono state considerate anche quelle relate al COVID-19).

In generale, anche se il campione di pazienti in esame è piccolo, l'analisi comparativa tra i due gruppi non ha mostrato differenze statisticamente significative in termini di *safety* derivanti dall'aggiunta di Daratumumab sia in fase di induzione che di mantenimento.

## 7.3 OUTCOMES

### 7.3.1 RISPOSTA EMATOLOGICA

Per quanto riguarda la valutazione della risposta, l'ORR è risultato elevato; infatti, tutti i pazienti del gruppo Daratumumab ed il 90% dei pazienti del gruppo standard hanno ottenuto una risposta ematologica in un tempo mediano dall'inizio della terapia pari a 28 e 44 giorni, rispettivamente. Nonostante non ci sia una differenza statisticamente significativa, sembra esserci un *trend* di ottenimento di risposte più veloci, e quindi di rapido *debulking* di malattia, nel gruppo Daratumumab.

Nel gruppo Daratumumab 18 pazienti (86%) hanno ottenuto una risposta profonda  $\geq$ VGPR (CR nel 67% e dei casi) come *best response*; nel gruppo standard una *best response*  $\geq$ VGPR è stata evidenziata in 11 pazienti (55%) (CR nel 40% e dei casi).

Dall'analisi della risposta ematologica, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due gruppi di confronto, probabilmente per l'esiguità del campione in esame; tuttavia, questi risultati mostrano come l'aggiunta Daratumumab porti ad un ottimo *rate* di risposte rapide e profonde.

### 7.3.2 SOPRAVVIVENZA

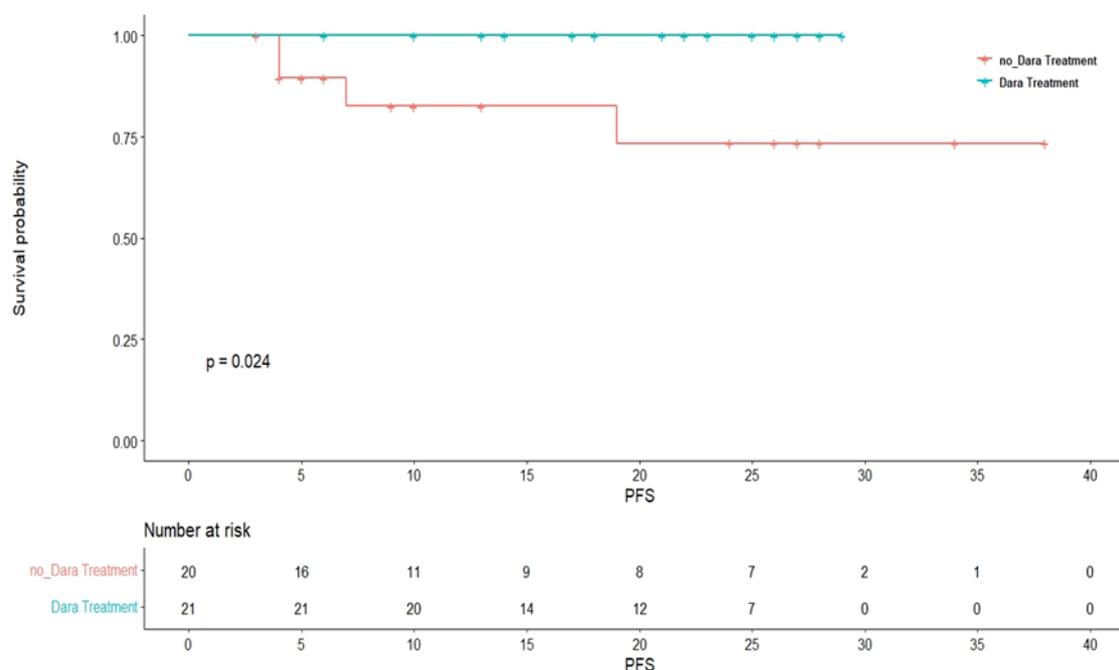
Al momento dell'analisi, con un *follow-up* mediano pari a 19 mesi, tutti i pazienti erano vivi, 5 pazienti (12%) avevano iniziato una nuova linea terapeutica (per progressione o non risposta) e i restanti 36 pazienti (88%) risultavano in corso di trattamento all'interno dei *trials* clinici.

La PFS stimata ad un anno è risultata pari al 100% nel gruppo Daratumumab ed al 73% nel gruppo standard, con una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, a favore del braccio sperimentale ( $p=0.024$ ) (Figura 3).

Per quanto riguarda, invece, l'OS, è necessario un periodo di osservazione più lungo, ai fini di poter trarre delle evidenze valide.

Infine, in considerazione dello scarso numero dei pazienti in esame, non è stato possibile eseguire analisi di sopravvivenza con un'adeguata potenza statistica in specifici sottogruppi di pazienti, sulla base delle diverse caratteristiche basali sia del paziente (quali età, *clearance* della creatinina) che della malattia (stadio ISS, rischio citogenetico, LDH).

Figura 3. Curva di sopravvivenza libera da malattia (PFS) nei due gruppi di pazienti



### 7.3.3 RACCOLTA DELLE CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE

Da un'analisi volta a valutare la raccolta delle PBSC, è emerso come tutti i pazienti tranne 1 abbiano portato a termine tale procedura.

Il numero mediano di PBSC raccolte è risultato pari a  $8.19 \times 10^6/\text{kg}$  (IQR 3.07-15.00), senza differenze statisticamente significative tra i due gruppi di confronto. Da notare, però, che 8 pazienti su 33 (24%) hanno raccolto un numero di PBSC inferiore al target standard di  $6.0 \times 10^6/\text{kg}$  (target necessario per eseguire il doppio trapianto autologo) e tutti questi 8 pazienti avevano ricevuto Daratumumab nella fase d'induzione.

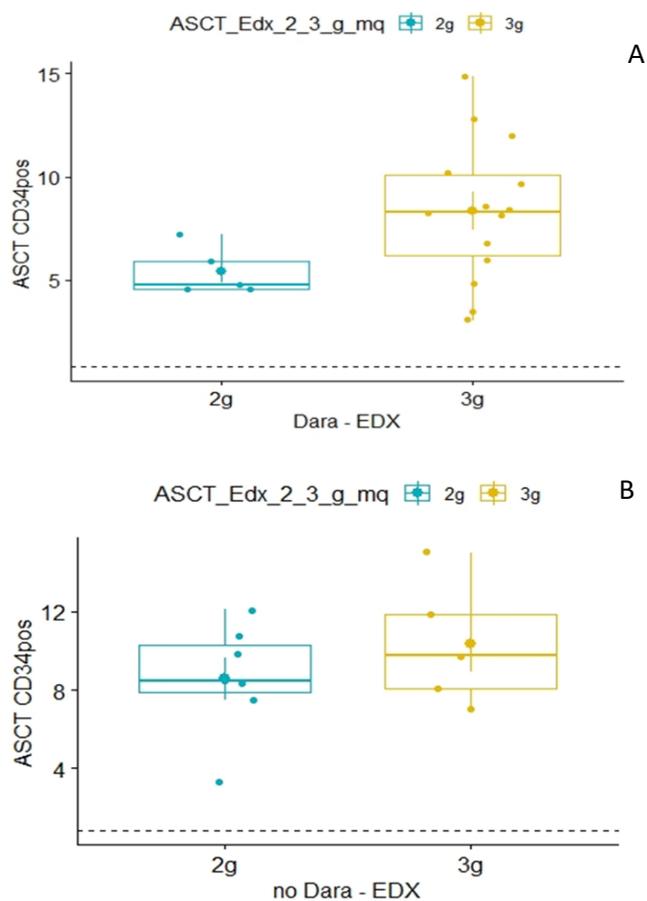
Inoltre, 10 pazienti su 33 (30%) hanno necessitato dell'uso aggiuntivo di plerixafor per incrementare il *rate* di mobilizzazione e quasi la totalità di essi (9 pazienti su 10) aveva ricevuto Daratumumab nella fase d'induzione pre-raccolta.

Tabella 6. Procedura di raccolta delle PBSC, in generale e nei due gruppi di confronto

|   | Tutti i pazienti<br>(33 pts) | Gruppo<br>Daratumumab<br>(20 pz) | Gruppo<br>Standard<br>(13 pz) |
|---|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <b>PBSC raccolte, n° x 10<sup>6</sup>/Kg (IQR)</b>          | 8.16<br>(3.15 – 13.03)       | 7.22<br>(3.07 - 14.83)           | 8.37<br>(3.28 - 12.09)        |
| <b>Fallimento procedura, n° pz (%)</b>                      | 1 (3%)                       | 1 (5%)                           | 0                             |
| <b>Uso di plerixafor, n° pz (%)</b>                         | 10 (31%)                     | <b>9 (45%)</b>                   | 1 (8%)                        |
| <b>Raccolta &lt; 6 x 10<sup>6</sup> CD34+/kg, n° pz (%)</b> | 8 (25%)                      | <b>8 (40%)</b>                   | 0                             |

Altro dato di rilievo è quanto emerso da un'analisi volta a valutare un'eventuale correlazione tra il numero di PBSC raccolte e la dose di chemioterapia mobilizzante, che era differente a seconda del *trial* clinico. Infatti, nei pazienti trattati con Ciclofosfamide alla dose di 2 g/mq il numero mediano di PBSC raccolte è risultato significativamente minore nel gruppo Daratumumab rispetto al gruppo standard (4.68 vs 8.43 x 10<sup>6</sup>/kg, rispettivamente; p=0.022), mentre questa differenza non è emersa nei pazienti del gruppo Daratumumab e gruppo standard sottoposti a dose superiore di Ciclofosfamide (3 g/mq). Inoltre, a conferma di questo dato, analizzando solo i pazienti del gruppo Daratumumab, è emersa una differenza statisticamente significativa in termini di PBSC raccolte tra i pazienti che hanno ricevuto Ciclofosfamide 2 g/mq e quelli che hanno ricevuto 3 g/mq (4.79 vs 8.16 x 10<sup>6</sup>/kg, rispettivamente; p=0.05), con un vantaggio a favore delle alte dosi di chemioterapia (Figura 4A). Questo vantaggio non si è mantenuto nei pazienti nel gruppo standard sottoposti a Ciclofosfamide 2 g/mq e 3 g/mq, rispettivamente (Figura 4B).

Figura 4. Numero mediano PBSC raccolte a seconda del dosaggio di chemioterapia mobilizzante nel gruppo Daratumumab (A) e nel gruppo standard (B).



## 8. DISCUSSIONE

Lo scenario terapeutico del MM si è ampiamente evoluto nelle ultime decadi con l'introduzione di un numero sempre maggiore di nuovi farmaci, non chemioterapici, e di loro combinazioni molto efficaci. In particolare, l'immunoterapia ha assunto un ruolo fondamentale nel trattamento dei pazienti con MM. In tal contesto, Daratumumab è il farmaco che, più di tutti, ha mostrato dati straordinari di efficacia e sicurezza ed il suo utilizzo è sempre più estensivo e sempre più precoce.

Daratumumab ha mostrato un'ottima efficacia ed una buona tollerabilità nel *setting* del RRMM, prima, e, poi, anche nei pazienti di NDMM [113, 120, 122, 126-130]. Grazie ai *trials* MAIA e CASSIOPEIA, che hanno studiato Daratumumab in combinazione ai nuovi farmaci nei pazienti all'esordio di malattia, questo farmaco è stato approvato molto recentemente in pratica clinica in Europa e poi in Italia, sia per pazienti eleggibili che non eleggibili alla chemioterapia ad alte dosi [129-130]. Infatti, nei vari studi clinici Daratumumab in aggiunta allo *standard of care* ha mostrato un aumento del *rate* di risposte profonde e,

quindi, della sopravvivenza a lungo termine, modificando, così, ancora una volta le prospettive terapeutiche del MM.

Considerando la recente approvazione di Daratumumab nel *setting* dei pazienti di nuova diagnosi, lo scopo del presente studio è stato quello di confermarne l'efficacia e la sicurezza, al fine di aggiungere dati ed aiutare i clinici, tramite un'analisi locale di pazienti del nostro Istituto di Ematologia "L. A. Seràgnoli" arruolati in due studi clinici (EMN17 e EMN18).

La presente analisi, con un *follow-up* mediano pari a 19 mesi, ha confermato quanto presente in letteratura riguardo l'efficacia e la sicurezza dell'aggiunta di Daratumumab allo *standard of care* per i pazienti con NDMM candidabili a ASCT [130, 167]. Infatti, l'utilizzo di Daratumumab è stato associato ad un elevato *rate* di risposte rapide e profonde ( $\geq$ VGPR), che, come abbiamo visto nei capitoli precedenti, sono correlate a migliori *outcomes* a lungo termine [207]. Oltre l'efficacia in termini di risposte, l'aggiunta di Daratumumab ha portato ad un vantaggio significativo in termini di PFS rispetto al braccio standard, risultata pari al 100% a 12 mesi senza alcuna progressione documentata di malattia.

Come già accennato, Daratumumab è risultato un farmaco sicuro: dalla nostra analisi non sono emerse tossicità aggiuntive o inaspettate e gli eventi avversi sono risultati in linea con quanto descritto in letteratura, simili al braccio di confronto. L'evento avverso relato esclusivamente all'anticorpo monoclonale è stata la reazione infusioneale: questa, come ci si aspettava, è avvenuta durante la prima infusione della formulazione endovenosa, nella totalità dei casi è stata di grado lieve-moderato e non ha implicato delle discontinuazioni di trattamento; pertanto, Daratumumab rimane un farmaco sicuro e maneggevole, le cui reazioni infusioneali possono essere gestite e prevenute con adeguata premedicazione [114]. Di rilievo è che non si è osservata nella nostra analisi alcuna reazione infusioneale con la formulazione sottocutanea. Analogamente, lo studio PAVO ha dimostrato come la somministrazione per via sottocutanea fosse associata ad un numero inferiore di reazioni infusioneali (12%), anche in questo caso alla prima infusione, rendendo tale formulazione la prima scelta, sia in termini di maneggevolezza (minor tempo infusioneale) sia in termini di *safety*, a parità di efficacia. In gennaio 2022 la formulazione endovenosa è stata sostituita con quella sottocutanea anche in Italia.

Considerando che tale farmaco è stato recentemente introdotto nell'ambito di un programma terapeutico comprensivo di ASCT, i dati riguardanti il suo impatto sulla raccolta delle PBSC sono scarsi e prematuri. Attualmente, dai dati a disposizione in letteratura Daratumumab non impatta negativamente sulla raccolta delle PBSC e, quindi, sulla possibilità

di eseguire l'ASCT con successo, che rimane oggi il cardine della terapia del paziente giovane [131]. Con il fine di aggiungere informazioni a questo riguardo, abbiamo eseguito un'analisi valutando prima la raccolta delle PBSC in ciascun gruppo di pazienti e, poi, anche in base alla dose di chemioterapia mobilizzante utilizzata. Dalla nostra analisi Daratumumab non impatta negativamente sulla raccolta delle PBSC, nonostante un maggior numero di pazienti che ricevono questo farmaco necessiti dell'uso di Plerixafor, analogamente a quanto emerso dal trial CASSIOPEIA [130-131]. Nel *trial* registrativo il numero medio di PBSC raccolte è risultato inferiore per i pazienti sottoposti a Daratumumab rispetto al gruppo di confronto ( $6.7 \times 10^6/\text{kg}$  vs  $10.0 \times 10^6/\text{kg}$ ,  $p < 0.0001$ ), con una percentuale di pazienti pari al 22% ed all'8% che hanno necessitato di Plerixafor, rispettivamente, nei due gruppi. Tuttavia, questo dato non ha avuto un impatto sull'esecuzione del trapianto, in quanto una percentuale di pazienti analoga nei due gruppi è stata sottoposta alla chemioterapia ad alte dosi (97.0% vs 98.8%, rispettivamente,  $p = 0.0758$ ). Nella nostra analisi locale le PBSC raccolte dai pazienti nel gruppo Daratumumab sono risultate pari a  $7.22 \times 10^6/\text{kg}$  (rispetto a  $8.37 \times 10^6/\text{kg}$  del gruppo standard) in assenza di una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, ma, anche qui, è stata confermata la necessità di un utilizzo più frequente di Plerixafor per i pazienti nel gruppo Daratumumab (45% vs 8% del gruppo standard).

Un altro dato ulteriore, di rilievo, è che i pazienti sottoposti a Daratumumab nella fase d'induzione possano beneficiare da un dosaggio maggiore di Ciclofosfamide mobilizzante, pari a 3 g/mq, che, peraltro, è lo stesso dosaggio utilizzato nel *trial* CASSIOPEIA e da cui derivano i dati disponibili attualmente in letteratura riguardo l'impatto di Daratumumab sulla raccolta delle PBSC [130-131]. Infatti, se si analizzano i pazienti in base alla dose di chemioterapia mobilizzante emergono delle differenze. In primis, i pazienti trattati con Ciclofosfamide pari a 2 g/mq raccolgono un numero di cellule inferiore se sottoposti a Daratumumab nella fase d'induzione rispetto ai pazienti sottoposti a terapia standard ( $4.68 \times 10^6/\text{kg}$  vs  $8.43 \times 10^6/\text{kg}$ , rispettivamente;  $p = 0.022$ ); tale dato non viene confermato utilizzando una dose maggiore di chemioterapia (3 g/mq). Inoltre, considerando solo i pazienti nel gruppo Daratumumab si osserva una differenza statisticamente significativa nel numero di PBSC raccolte nei pazienti sottoposti a Ciclofosfamide 2 g/mq e 3 g/mq, a favore di quest'ultimo. Nonostante queste differenze nel numero di PBSC raccolte, anche la nostra analisi ha mostrato come Daratumumab non abbia alterato il programma trapiantologico: tutti i pazienti che hanno portato a termine la procedura di raccolta delle PBSC sono stati poi sottoposti a ASCT con successo come pianificato.

In conclusione, la nostra analisi conferma che Daratumumab rappresenta un nuovo *standard of care* per i pazienti NDMM candidabili a ASCT, integrando in questo modo gli anticorpi monoclonali ad un programma trapiantologico. Se si pensa che fino a poco tempo fa l'immunoterapia era possibile solamente all'interno di *trials* clinici per pazienti con una malattia molto avanzata, si possono immaginare a breve termine strategie terapeutiche con meccanismi d'azione sempre più innovativi e mirati, quali per esempio la terapia cellulare, anche per le fasi precoci di malattia, che possano non solo prolungare in modo ancor più significativo l'aspettativa di vita dei pazienti, ma portare anche ad una speranza di possibile guarigione nel contesto di una patologia, che, ad oggi, risulta ancora incurabile.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Tura S. Corso di malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici. Società Editrice Esculapio. 2020.
2. Linee guida Mieloma AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica), 2017.
3. Siegel RL, et al. Cancer Statistics. Cancer Journal for Clinicians. 2019.
4. Sergentanis TN, et al. Risk Factors for Multiple Myeloma: A Systematic Review of Meta-Analyses. Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia. 2015;15(10):563-77.
5. Jameson JL, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine 20th edition. McGraw-Hill Education. 2018.
6. Landgren O, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood. 2009;113(22):5412-17.
7. Dispenzieri A, et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. Lancet. 2010;375(9727):1721-8.
8. Kyle RA, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. New Engl J Med. 2002; 346(8):564-9.
9. Kyle RA et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. N Engl J Med. 2018; 378(3): 241–9.
10. Kyle RA, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. N Engl J Med. 2007; 356(25): 2582-90.
11. Lakshman A, et al. Risk stratification of smoldering multiple myeloma incorporating revised IMWG diagnostic criteria. Blood Cancer Journal. 2018; 6(59).
12. Rajkumar SV, et al. Smoldering Multiple Myeloma. Blood. 2015; 125(20): 3069-75.
13. Rajkumar SV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol. 2014; 15(12): 538-48.
14. Hallek M, et al. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. Blood. 1998;91(1):3-21.
15. Abbas AK, et al. Cellular and Molecular Immunology 9th edition. Elsevier. 2017.
16. Podar K, et al. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. Leukemia. 2009; 23(1):10-24.
17. Mitsiades CS, et al. The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: Interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. European Journal of Cancer. 2006; 42: 1564-73.

18. Roy P, et al. The NF- $\kappa$ B Activating Pathways in Multiple Myeloma. *Biomedicines*. 2018.
19. Chaidos A, et al. Clinical drug resistance linked to interconvertible phenotypic and functional states of tumor-propagating cells in multiple myeloma. *Blood*. 2013; 121(2): 318-28.
20. Paiva B, et al. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia*. 2017; 31: 382–92.
21. Hanahan D, et al. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74.
22. Makrilia N, et al. The role of angiogenesis in solid tumors: An overview. *European Journal of Internal Medicine*. 2009; 20: 663-71.
23. Kumar V, et al. *Robbins & Cotran: Pathologic Basis of Disease* 9th edition. Elsevier. 2014.
24. Kranenburg O, et al. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1654(1): 23-37.
25. Kumar R, et al. The role of HER2 in angiogenesis. *Seminars in Oncology*. 2001; 28(5): 27-32.
26. Pfaff MJ, et al. Tumor suppressor protein p53 negatively regulates ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Journal of Vascular Surgery*. 2018; 68(6): 222S-33S.
27. Maxwell PH, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399(6733): 271-75.
28. Bingle L, et al. The role of tumor-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *Journal of Pathology*. 2002; 196: 254-65.
29. Giuliani N, et al. Angiogenesis and Multiple Myeloma. *Cancer Microenvironment*. 2011; 4: 325-37.
30. Kumar S, et al. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia*. 2005; 19(8): 1466–70.
31. Kimlinger T, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factors and their receptors in multiple myeloma. *Haematologica*. 2006; 91(8): 1033-40.
32. Ria R, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *American Journal of Blood Research*. 2011; 1(1): 76-89.
33. Ribatti D, et al. A Role of Endothelial Cells and Fibroblasts in Multiple Myeloma Angiogenic Switch. *Cancer treatment and research*. 2016; 169: 51-61.

34. Ferrarini M, et al. Proteasome inhibitors and modulators of angiogenesis in multiple myeloma. *Current Medical Chemistry*. 2011; 18(34): 5185-95.
35. Roodman GD. Pathogenesis of Myeloma Bone Disease. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010; 109(2): 283-91.
36. Sezer O, et al. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood*. 2003; 101(6): 2094-98.
37. Standal T, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002; 100(8): 3002-07.
38. Parrondo RD, et al. Prevention Of Skeletal Related Events In Multiple Myeloma: Focus On The RANK-L Pathway In The Treatment Of Multiple Myeloma. *OncoTargets and Therapy*. 2019; 12: 8467-78.
39. Terpos E, et al. Serum levels of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) correlate with the extent of bone disease and survival in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2003; 123(1): 106-9.
40. Terpos E, et al. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer Journal*. 2018; 8(1): 7.
41. Vallet S, et al. Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(11): 5124-29.
42. Kyle RA, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1): 21-33.
43. Dimopoulos MA, et al. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(8): 1485-93.
44. Heher EC, et al. Kidney disease associated with plasma cell dyscrasias. *Blood*. 2010; 116(9): 1397-1404.
45. Gonsalves WI, et al. Improvement in renal function and its impact on survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2015; 5(3): e296.
46. Dimopoulos MA, et al. Significant improvement in the survival of patients with multiple myeloma presenting with severe renal impairment after the introduction of novel agents. *Ann Oncol*. 2014; 25(1): 195-200.
47. Dimopoulos MA, et al. International Myeloma Working Group Recommendations for the Diagnosis and Management of Myeloma-Related Renal Impairment. *J Clin Oncol*. 2016; 34(13): 1544-57.

48. Blimark C, et al. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2015; 100(1): 107-13.
49. Zamagni E, et al. Imaging in multiple myeloma: How? When? *Blood*. 2019; 133(7): 644-51.
50. Zamagni E, et al. The role of imaging techniques in the management of multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2012; 159(5): 499-513.
51. Hillengass J, et al. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. *The Lancet Oncology*. 2019; 20(6): 302-12.
52. Cavo M, et al. Role of (18)F-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. *Lancet Oncol*. 2017; 18(4): e206-e217.
53. Durie BG, et al. 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): 842-54.
54. Greipp PR, et al. International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005; 23(15): 3412-20.
55. Palumbo A, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2015; 33(26): 2863-69.
56. Jung SH, et al. A prognostic scoring system for patients with multiple myeloma classified as stage II with the Revised International Staging System. *British Journal of Haematology*. 2018; 181(5): 707-10.
57. González-Calle V, et al. Evaluation of Revised International Staging System (R-ISS) for transplant-eligible multiple myeloma patients. *Annals of Hematology*. 2018; 97(8): 1453-62.
58. Ozaki S, et al. Evaluation of the Revised International Staging System (R-ISS) in Japanese patients with multiple myeloma. *Annals of Hematology*. 2019; 98(7): 1703-11.
59. D'Agostino M. et al. A New Risk Stratification Model (R2-ISS) in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Analysis of Mature Data from 7077 Patients Collected By European Myeloma Network within Harmony Big Data Platform. *Blood* (2020) 136 (Supplement 1): 34-37.

60. Tabernero D, et al. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *The American Journal of Pathology*. 1996; 149(1): 153-61.
61. Rajan AM, et al. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood cancer journal*. 2015; 5(10): e365.
62. Fonseca R, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009; 23(12): 2210-21.
63. Barilà G, et al. Identification of the true hyperdiploid multiple myeloma subset by combining conventional karyotyping and FISH analysis. *Blood cancer journal*. 2020; 10(2): 18.
64. Chng WJ, et al. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best practice & research. Clinical hematology*. 2007; 20(4): 571-96.
65. Perrot A, et al. Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2019; 37(19): 1657-65.
66. Sonneveld P, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016; 127(24): 2955-62.
67. Baysal M, et al. Concepts of Double Hit and Triple Hit Disease in Multiple Myeloma, Entity and Prognostic Significance. 2020; 10(1): 5991.
68. Chng WJ, et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008; 22(12): 2280-84.
69. Keats JJ, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer cell*. 2007; 12(2): 131-44.
70. Shaughnessy JD Jr, 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): 2276-84.
71. Egan JB, 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): 1060-66.
72. Laubach JP, et al. The evolution and impact of therapy in multiple myeloma. *Medical Oncology*. 2010; 27: 1-6.
73. Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 3832-42.

74. Attal M, et al. Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 1997; 11(1): 133-47.
75. Child JA, et al. Medical Research Council Adult Leukemia Working. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348(19): 1875-83.
76. Palumbo A, et al. Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2011; 364: 1046-60.
77. D'Amato RJ, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994; 91(9): 4082-85.
78. Moreira AL, et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *The journal of experimental medicine*. 1993; 177(6): 1675-80.
79. Haslett PA, et al. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *The journal of experimental medicine*. 1998; 187(11): 1885-92.
80. Mercurio A, et al. A Mini-Review on Thalidomide: Chemistry, Mechanisms of Action, Therapeutic Potential and Anti-Angiogenic Properties in Multiple Myeloma. *Current Medicinal Chemistry*. 2017; 24(25): 2736-44.
81. Quach H, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010; 24(1): 22-32.
82. Plasmati R, et al. Neuropathy in multiple myeloma treated with thalidomide: a prospective study. *Neurology*. 2007; 69(6): 573-81.
83. Chen N, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lenalidomide. *Clinical pharmacokinetics*. 2017; 56(2): 139-52.
84. Moreau P, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*. 2012; 120(5): 947-59.
85. Meister S, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer research*. 2007; 67(4): 1783-92.
86. Moreau P, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *The Lancet Oncology*. 2011; 12(5): 431-40.
87. Hideshima T, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The journal of biological chemistry*. 2002; 277(19): 16639-47.

88. Breitschopf K, et al. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(28): 21648-52.
89. Mitsiades N, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*. 2003; 101(6): 2377-80.
90. Mohty M, et al. The effects of bortezomib on bone disease in patients with multiple myeloma. *Cancer*. 2014; 120(5): 618-23.
91. Zhu W, et al. Bortezomib-based treatment for multiple myeloma patients with renal impairment: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Medicine*. 2016; 95(46): e5202.
92. Field-Smith A, et al. Bortezomib (Velcade™) in the Treatment of Multiple Myeloma. *Therapeutics and clinical risk management*. 2006; 2(3): 271-79.
93. Muchtar E, et al. A practical review on carfilzomib in multiple myeloma. *European Journal of Haematology*. 2016; 96(6): 564-77.
94. Haddadin M, et al. Late Presentation of Carfilzomib Associated Thrombotic Microangiopathy. *Am J Med Case Reports*. 2019; 7(10): 240-43.
95. Bringhen S, et al. Prevention, monitoring and treatment of cardiovascular adverse events in myeloma patients receiving carfilzomib A consensus paper by the European Myeloma Network and the Italian Society of Arterial Hypertension. *Journal of internal medicine*. 2019; 286(1): 63-74.
96. Kumar S, et al. Management of adverse events associated with ixazomib plus lenalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2017; 178(4): 571-82.
97. Ritchie D, et al. Mechanisms of Action and Clinical Development of Elotuzumab. *Clinical and Translational Science*. 2018; 11(3): 261-66.
98. Richardson PG, et al. Single-agent belantamab mafodotin for relapsed/refractory multiple myeloma: analysis of the lyophilised presentation cohort from the pivotal DREAMM-2 study. *Blood Cancer J*. 2020; 10(10): 106.
99. Krejcik J, et al. Daratumumab depletes CD381 immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016; 128(3): 384-94.
100. Horenstein AL, et al. CD38 and CD157 ectoenzymes mark cell subsets in the human corneal limbus. *Mol Med*. 2009; 15(3-4): 76-84.

101. Malavasi F, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev.* 2008; 88(3): 841-86.
102. Chillemi A, et al. Roles and modalities of ectonucleotidases in remodeling the multiple myeloma niche. *Front Immunol.* 2017; 8: 305.
103. de Weers M, et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol.* 2011; 186(3): 1840-48.
104. Nijhof IS, et al. Daratumumab-mediated lysis of primary multiple myeloma cells is enhanced in combination with the human anti-KIR antibody IPH2102 and lenalidomide. *Haematologica.* 2015; 100(2): 263–8.
105. Nijhof IS, et al. CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood* 2016; 128: 959–70.
106. Van de Donk NWCJ, et al. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front Immunol.* 2018; 9: 2134.
107. Horenstein AL, et al. NAD<sup>+</sup>-Metabolizing Ectoenzymes in Remodeling Tumor-Host Interactions: The Human Myeloma Model Cells. 2015; 4: 520–37.
108. Krejcik J, et al. Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab. *Clin Cancer Res.* 2017; 23: 7498–511.
109. Casneuf T, et al. Effects of daratumumab on natural killer cells and impact on clinical outcomes in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Adv.* 2017; 1: 2105–14.
110. Matozaki T, et al. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol.* 2009; 19: 72–80.
111. Neri P, et al. Single Cell Resolution Profiling Defines the Innate and Adaptive Immune Repertoires Modulated By Daratumumab and IMiDs Treatment in Multiple Myeloma (MM). *Blood.* 2017; 130: 123.
112. Lokhorst HM, et al. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2015; 373(13): 1207-19.
113. Lonial S, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open label, randomised, phase 2 trial. *Lancet.* 2016; 387(10027): 1551-60.
114. Moreau P, et al. Practical considerations for the use of daratumumab, a novel CD38 monoclonal antibody, in myeloma. *Drugs.* 2016; 76: 853-67.

115. Usmani SZ, et al. Open-Label, Multicenter, Dose Escalation Phase 1b Study to Assess the Subcutaneous Delivery of Daratumumab in Patients (pts) with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (PAVO). *Blood*. 2016; 128: 1149.
116. Murata K, et al. Treatment of multiple myeloma with monoclonal antibodies and the dilemma of false positive M-spikes in peripheral blood. *Clinical biochemistry*. 2018; 51: 66-71.
117. San-Miguel J, et al. Subcutaneous daratumumab in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: Part 2 of the open-label, multicenter, dose-escalation phase 1b study (PAVO). *Haematologica*. 2021; 106(6): 1725-32.
118. Plesner T, et al. Phase 1/2 study of daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *Blood*. 2016; 128: 1821-28.
119. Dimopoulos MA, et al. Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2016; 375: 1319-31.
120. Bahlis NJ, 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): 1875-84.
121. Palumbo A, et al. Daratumumab, bortezomib, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2016; 375: 754-66.
122. Mateos MV, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone Versus Bortezomib and Dexamethasone in Patients With Previously Treated Multiple Myeloma: Three-year Follow-up of CASTOR. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2020; 20(8): 509-18.
123. Chari A, et al. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017; 130: 974-81.
124. Dimopoulos MA, 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. *Lancet*. 2021; 22(6): 801-12.
125. Dimopoulos MA, 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. *Lancet*. 2020; 396(10245):186-97.
126. Mateos MV, et al. Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2018; 378(6): 518-28.

127. Mateos MV, et al. Overall survival with daratumumab, bortezomib, melphalan, and prednisone in newly diagnosed multiple myeloma (ALCYONE): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2020; 395(10218): 132-41.
128. Facon T, et al. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2019; 380(22): 2104-15.
129. Facon 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. *Lancet Oncol*. 2021; 22(11): 1582-96.
130. Moreau P, et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019; 394: 29-38.
131. Hulin C, et al. Stem cell yield and transplantation in transplant-eligible newly diagnosed multiple myeloma patients receiving daratumumab + bortezomib/thalidomide/dexamethasone in the phase 3 CASSIOPEIA study. *Haematologica*. 2021; 106(8): 2257-60.
132. Bahlis NJ, et al. Efficacy and safety of elranatamab (PF-06863135), a B-cell maturation antigen (BCMA)-CD3 bispecific antibody, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (MM). 2021 ASCO Annual Meeting *Journal of Clinical Oncology* 39(15): 8006.
133. Pillarisetti K, et al. A T-cell–redirecting bispecific G-protein–coupled receptor class 5 member D x CD3 anti-body to treat multiple myeloma. *Blood*. 2020; 135(15): 1232–43.
134. Verkleij CPM, et al. Preclinical activity and determinants of response of the GPRC5DxCD3 bispecific antibody talquetamab in multiple myeloma. *Blood Adv*. 2021; 5(8): 2196–15.
135. Munshi NC, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2021; 384(8): 705-16.
136. Berdeja JC, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen re-ceptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTI-TUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet*. 2021; 398(10297): 314-24.
137. Attal M, et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003; 349(26): 2495-502.

138. Cavo M, et al. Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *J Clin Oncol*. 2007; 25(17): 2434-41.
139. Naumann-Winter F, et al. First-line tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation versus single high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in multiple myeloma, a systematic review of controlled studies. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012; 10:CD004626.
140. Palumbo A, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2014; 371(10): 895-905.
141. Attal M, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med*. 2017; 376(14): 1311-20.
142. Cavo M, et al. Double Vs Single Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Long-Term Follow-up (10-Years) Analysis of Randomized Phase 3 Studies. *Blood*. 2018; 132(1): 124.
143. Sonneveld P, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON65/GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*. 2012; 30(24): 2946-55.
144. Cavo 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. *Lancet Haematol*. 2020; 7(6): e458-e468.
145. Harousseau JL, et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 4621-29.
146. Sonneveld P, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON65/GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*. 2012; 30(24): 2946-55.
147. Popat R, et al. Bortezomib, Doxorubicin and Dexamethasone (PAD) front-line treatment of multiple myeloma: updated results after long term follow-up. *Br J Haematol*. 2008; 141(4): 512-16.

148. Reeder CB, et al. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia*. 2009; (23): 1337-41.
149. Cavo M, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3. *Lancet*. 2010; 376(9758): 2075-85.
150. Tacchetti P, et al. Bortezomib-Thalidomide-Dexamethasone Versus Thalidomide-Dexamethasone before and after Double Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed MM: Final Analysis of Phase 3 Gimema-MMY-3006 Study and Prognostic Score for Survival Outcomes. *Blood*. 2018; 132: S1.
151. Rosiñol L, et al. VTD (Bortezomib/Thalidomide/Dexamethasone) As Pretransplant Induction Therapy for Multiple Myeloma: Definitive Results of a Randomized Phase 3 Pethema/GEM Study. *Blood*. 2018; 132(1): 126.
152. Pineda-Roman M, et al. Sustained complete remissions in multiple myeloma linked to bortezomib in total therapy 3: comparison with total therapy 2. *British Journal of Haematology*. 2008; 140(6): 625-34.
153. Cavo M, et al. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD) is superior to bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone (VCD) as induction therapy prior to autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015; 29(12): 2429-31.
154. Moreau P, 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): 2569-74.
155. Sonneveld P, 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): 3279-87.
156. Richardson PG, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2010; 116(5): 679-86.
157. Roussel M, et al. Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the IFM). *JCO*. 2014; 32(25): 2712-17.
158. Attal M, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Eng J Med*. 2017; 376(14): 1311-20.

159. Rosiñol L, et al. Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone as induction therapy prior to autologous transplant in multiple myeloma. *Blood*. 2019; 134(16): 1337-45.
160. Rosiñol L, 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(1): 3245.
161. Gay F, et al. Efficacy of carfilzomib lenalidomide dexamethasone (KRd) with or without transplantation in newly diagnosed myeloma according to risk status: Results from the FORTE trial. *JCO*. 2019; 37(15): 8002.
162. Giralt S, et al. International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100). *Leukemia*. 2009; 23(10): 1904-12.
163. Di Persio JF, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2009; 113: 5720–6.
164. Moreau P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*. 2017; 28.
165. Sonneveld P, et al. Consolidation followed by maintenance vs maintenance alone in newly diagnosed, transplant eligible multiple myeloma: a randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM trial). Oral presentation. EHA. 2018; S108.
166. Stadtmauer EA, et al. Autologous Transplantation, Consolidation, and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma: Results of the BMT CTN 0702 Trial. *JCO*. 2019; 37(7): 589-97.
167. Voorhees PM, et al. Daratumumab, lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone for transplant-eligible newly diagnosed multiple myeloma: the GRIFFIN trial. *Blood*. 2020; 136(8): 936–45.
168. Costa L, et al. Daratumumab, Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone With Minimal Residual Disease Response-Adapted Therapy in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *JCO*. 2021. Online ahead of print.
169. Attal M, et al. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006; 108(10): 3289-94.
170. Lokhorst HM, et al. A randomized phase 3 study on the effect of thalidomide combined with adriamycin, dexamethasone, and high-dose melphalan, followed by thalidomide maintenance in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2010; 115(6): 1113-20.

171. Morgan GJ, et al. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC Myeloma IX results and meta-analysis. *Blood*. 2012; 119(1): 7-15.
172. Kagoya Y, Thalidomide maintenance therapy for patients with multiple myeloma: meta-analysis. *Leukemia research*. 2012; 36(8): 1016-21.
173. McCarthy PL, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *The N Eng J Med*. 2012; 366(19): 1770-81.
174. Goldschmidt H, et al. Bortezomib before and after high-dose therapy in myeloma: long-term results from the phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Leukemia*. 2018; 32(2): 383-90.
175. Rosiñol L, et al. Bortezomib and thalidomide maintenance after stem cell transplantation for multiple myeloma: a PETHEMA/GEM trial. *Leukemia*. 2017; 31(9): 1922-27.
176. Dimopoulos MA, et al. Oral ixazomib maintenance following autologous stem cell transplantation (TOURMALINE-MM3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019; 393: 253-64.
177. Palumbo A, et al. Geriatric assessment predicts survival and toxicities in elderly myeloma patients: an International Myeloma Working Group report. *Blood*. 2015; 125(13): 2068-74.
178. San Miguel JF, et al. Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. *JCO*. 2013; 31(4): 448-55.
179. Durie BMG, et al. Longer Term Follow up of the A Randomized Phase III Trial SWOG S0777: Bortezomib, Lenalidomide and Dexamethasone Vs. Lenalidomide and Dexamethasone in Patients (Pts) with Previously Untreated Multiple Myeloma without an Intent for Immediate ASCT. *Blood*. 2018; 132(1): 1992.
180. Yokoyama A, et al. Phase II Study of Treatment for Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients Over 75 Years Old with Alternating Bortezomib/dexamethasone and Lenalidomide/dexamethasone: the MARBLE Trial. *Acta medica Okayama*. 2019; 73(6): 547-52.
181. O'Donnell EK, et al. A phase 2 study of modified lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in transplant-ineligible multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2018; 182(2): 222-30.

182. Isa R, et al. Sequential therapy of four cycles of bortezomib, melphalan, and prednisolone followed by continuous lenalidomide and dexamethasone for transplant-ineligible newly diagnosed multiple myeloma. *Annals of hematology*. 2020; 99(1): 137-45.
183. Orłowski RZ, et al. Phase III (IMROZ) study design: Isatuximab plus bortezomib (V), lenalidomide (R), and dexamethasone (d) vs VRd in transplant-ineligible patients (pts) with newly diagnosed multiple myeloma (NDMM). *JCO*. 2018; 36(15).
184. Bringhen S, et al. Carfilzomib, cyclophosphamide, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a multicenter, phase 2 study. *Blood*. 2014; 124(1): 63-9.
185. Jakubowiak AJ, 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): 1801-09.
186. Kumar SK, et al. Safety and tolerability of ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with previously untreated multiple myeloma: an open-label phase 1/2 study. *The Lancet Oncology*. 2014; 15(3): 1503-12.
187. Facon T, et al. Final analysis of survival outcomes in the phase 3 FIRST trial of up-front treatment for multiple myeloma. *Blood*; 2018; 131(3): 301-10.
188. Kubo K, et al. Elotuzumab plus lenalidomide and dexamethasone for newly diagnosed multiple myeloma: a randomized, open-label, phase 2 study in Japan. *International Journal of Hematology*. 2020; 111(1): 65-74.
189. Bristol Myers Squibb Company. Bristol Myers Squibb Reports Primary Results of ELOQUENT-1 Study Evaluating Empliciti (elotuzumab) Plus Revlimid (lenalidomide) and Dexamethasone in Patients with Newly Diagnosed, Untreated Multiple Myeloma. Phase 3 trial did not meet primary endpoint of progression-free survival in patients not eligible for transplant. [Online] 2020. <https://news.bms.com/press-release/corporatefinancial-news/bristol-myers-squibb-reports-primary-results-eloquent-1-study>.
190. Van de Donk NWCJ, et al. Sequencing multiple myeloma therapies with and after antibody therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2020; 2020(1): 248-58.
191. Moreau P, et al. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: recommendations from the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol*. 2021; 22(3): e105-e108.
192. Stewart AK, et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2015; 372(2): 142-52.

193. Siegel DS, et al. Improvement in Overall Survival With Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *JCO*. 2018; 36(8): 728-34.
194. Lonial S, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*. 2015; 373(7): 621-31.
195. Moreau P, et al. Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016; 374(17): 1621-34.
196. Richardson PG, 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): 781-94.
197. Moreau P, et al. Isatuximab plus carfilzomib/dexamethasone versus carfilzomib/dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: IKEMA Phase III study design. *Future Oncology*. 2020; 16(2): 4347-58.
198. Dimopoulos MA, 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.
199. Dimopoulos MA, et al. Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2017; 18(10): 1327-37.
200. Dimopoulos MA, et al. Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2018; 379(19): 1811-22.
201. Richardson PG, et al. Isatuximab plus pomalidomide/dexamethasone versus pomalidomide/dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: ICARIA Phase III study design. *Future Oncology*. 2018; 14(11): 1035-47.
202. Weisel KC, et al. Addition of cyclophosphamide on insufficient response to pomalidomide and dexamethasone: results of the phase II PERSPECTIVE Multiple Myeloma trial. *Blood Cancer Journal*. 2019; 9(4): 45.
203. Chari A, et al. Oral Selinexor-Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2019; 381: 727-38.
204. Grosicki S, et al. Once-per-week Selinexor, bortezomib, and dexamethasone versus twice-per-week bortezomib and dexamethasone in patients with multiple myeloma (BOSTON): a randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2020; 396(10262): 1563-73.

205. Kumar S, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016; 17(8): e328-e346.

206. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2013/01/WC500137126.pdf](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

207. Munshi NC, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2017; 3(1): 28-35.

## ABSTRACT TESI DI DOTTORATO

Lo scenario terapeutico del MM si è ampiamente evoluto nelle ultime decadi con l'introduzione di un numero sempre maggiore di nuovi farmaci, non chemioterapici, e di loro combinazioni molto efficaci. In particolare, l'immunoterapia ha assunto un ruolo fondamentale nel trattamento dei pazienti con MM. In tal contesto, spicca Daratumumab, grazie ai suoi dati di efficacia e di sicurezza dimostrati sia nel *setting* del RRMM che dei pazienti di NDMM candidabili e non candidabili alla chemioterapia ad alte dosi.

Lo scopo del presente studio è quello di aggiungere dati circa la combinazione di Daratumumab con la terapia standard nel contesto di un programma trapiantologico per pazienti di nuova diagnosi candidabili alla chemioterapia ad alte dosi, analizzando localmente pazienti del nostro Istituto di Ematologia "L. A. Seràgnoli" arruolati in due studi clinici (EMN17 e EMN18).

Nel presente elaborato sono riportati i dati relativi all'efficacia e alla sicurezza di Daratumumab in combinazione a triplette Bortezomib-based, con un particolare focus sull'impatto dell'anticorpo monoclonale sulla raccolta delle PBSC.

La nostra analisi locale, con un *follow-up* mediano pari a 19 mesi, ha confermato un'ottima efficacia di Daratumumab aggiunto alla terapia standard, in quanto è stato associato ad un elevato *rate* di risposte rapide e profonde ( $\geq$ VGPR) e ad un vantaggio in termini di PFS, rispetto al braccio standard.

Per quanto riguarda la *safety*, Daratumumab è risultato un farmaco sicuro, senza tossicità aggiuntive o inaspettate e gli eventi avversi sono risultati in linea con quanto descritto in letteratura, simili al braccio di confronto. In particolare, le reazioni infusionali (IRR) relate a Daratumumab, come aspettato, sono risultate tutte di grado lieve-moderato durante la prima infusione della formulazione endovenosa; nei pazienti, invece, trattati con la formulazione sottocutanea non è stata dimostrata alcuna IRR, confermando la sua maggior maneggevolezza. Grazie ai dati dello studio PAVO, oggi la somministrazione sottocutanea è la prima scelta anche in pratica clinica.

Attualmente, dai dati a disposizione in letteratura Daratumumab non impatta negativamente sulla raccolta delle PBSC e, quindi, sulla possibilità di eseguire l'ASCT con successo, che rimane oggi il cardine della terapia del paziente giovane. Nel *trial* registrativo CASSIOPEIA il numero mediano di PBSC raccolte è risultato inferiore per i pazienti sottoposti a Daratumumab rispetto al gruppo di confronto, con una percentuale maggiore di pazienti che hanno necessitato di Plerixafor, senza, tuttavia, modifiche nell'iter trapiantologico. Analogamente, nella nostra analisi locale, seppur non sia emersa una

differenza statisticamente significativa nel numero di PBSC raccolte tra i due gruppi, è emerso come i pazienti del gruppo Daratumumab abbiano necessitato più frequentemente dell'utilizzo di Plerixafor. Inoltre, nel presente studio abbiamo analizzato il numero di PBSC raccolte a seconda del dosaggio di chemioterapia mobilizzante (Ciclofosfamide) utilizzata (2 g/mq o 3 g/mq a seconda di quanto previsto dagli studi clinici): è emerso come i pazienti sottoposti a Daratumumab nella fase d'induzione possano beneficiare da un dosaggio maggiore di Ciclofosfamide mobilizzante, pari a 3 g/mq, che, peraltro, è lo stesso dosaggio utilizzato nel trial CASSIOPEIA e da cui derivano i dati disponibili attualmente in letteratura riguardo l'impatto di Daratumumab sulla raccolta delle PBSC.

Durante lo svolgimento del presente progetto di ricerca Daratumumab è stato approvato in pratica clinica prima in Europa (2020) e poi in Italia (2021), grazie agli ottimi risultati emergenti in letteratura. Il presente studio ha confermato come Daratumumab aggiunto ad un regime Bortezomib-*based* rappresenti un nuovo *standard of care* per i pazienti con NDMM candidabili a ASCT.