

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

Ciclo XXX

Settore concorsuale: 06/D3 – Malattie del sangue, Oncologia e Reumatologia
Settore scientifico-disciplinare: MED/15 – Malattie del sangue

**IDENTIFICAZIONE DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE
NEL MIELOMA MULTIPLO E DI FATTORI PROGNOSTICI
PREDITTIVI DI OUTCOME**

Presentata dalla Dott.ssa Lucia Pantani

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Pier-Luigi Lollini

Supervisore
Chiar.mo Prof. Michele Cavo

Esame finale anno 2018

INDICE

1. ABSTRACT DEL PROGETTO DI RICERCA	3
2. IL MIELOMA MULTIPLO.....	4
2.1 INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO E STORIA NATURALE.....	5
2.2 PRESENTAZIONE CLINICA.....	7
3. MIELOMAGENESI.....	8
3.1 MICROAMBIENTE MIDOLLARE E CITOCHINE.....	9
3.2 ANGIOGENESI.....	11
3.3 DANNO OSSEO	13
3.4 CITOGENETICA E CARATTERISTICHE MOLECOLARI.....	16
4. STADIAZIONE E FATTORI PROGNOSTICI.....	21
5. TERAPIA	24
5.1 PRINCIPALI FARMACI: MECCANISMI D’AZIONE E TOSSICITÀ	25
5.1.1 TALIDOMIDE	25
5.1.2 IMiDs o ANALOGHI DELLA TALIDOMIDE	28
5.1.3 INIBITORI DEL PROTEASOMA	32
5.1.4 INIBITORI DELL’ISTONE DE-ACETILASI.....	39
5.1.5 ANTICORPI MONOCLONALI	41
5.2 TERAPIA DEL PAZIENTE CON MM DI NUOVA DIAGNOSI.....	43
5.2.1 PAZIENTE CANDIDATO A TRAPIANTO AUTOLOGO	43
5.2.2 PAZIENTE NON CANDIDABILE A TRAPIANTO AUTOLOGO	50
5.3 TERAPIA DEL PAZIENTE CON MIELOMA MULTIPLO RICADUTO/REFRATTARIO.....	53
6. RAZIONALE DELLO STUDIO.....	59
8. OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	60
9. MATERIALI E METODI	61
9.1 ELEGGIBILITA’ ALLO STUDIO	61
9.2 DISEGNO DELLO STUDIO.....	62
9.3 CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA	65
9.4 ANALISI CITOGENETICO-MOLECOLARE	66
9.5 ANALISI STATISTICA	66
10. RISULTATI.....	68
10.1 ANALISI SULLA POPOLAZIONE GLOBALE	68
10.2 INTENSIFICAZIONE CON VMP versus ASCT (R1).....	72
10.3 SINGOLO versus DOPPIO ASCT.....	78
10.3.1 ANALISI PER PROTOCOL.....	84
10.4 CONSOLIDAMENTO (R2)	86
11. DISCUSSIONE	87
12. BIBLIOGRAFIA	93

1. ABSTRACT DEL PROGETTO DI RICERCA

A partire dagli anni '90 l'introduzione nella pratica clinica e l'applicazione sistematica della chemioterapia ad alte dosi con supporto di cellule staminali emopoietiche autologhe (ASCT) ha radicalmente modificato l'outcome clinico dei pazienti con mieloma multiplo.

La successiva disponibilità di nuovi farmaci, come inibitori del proteasoma (Bortezomib) ed agenti immunomodulatori (Talidomide e Lenalidomide), e la loro integrazione nel percorso trapiantologico ha permesso di migliorare ulteriormente il rate di risposte e prolungare la sopravvivenza, eleggendo questa combinazione a gold standard terapeutico per pazienti giovani con mieloma all'esordio¹.

Allo stesso modo, nel paziente anziano non candidabile alla terapia ad alte dosi, l'associazione di chemioterapia convenzionale (Melphalan-Prednisone, MP) con nuovi farmaci, ed in particolare con Bortezomib (schema VMP), ha portato ad un significativo prolungamento della sopravvivenza libera da malattia e globale, con raggiungimento di un rate di risposte complete paragonabile a quello ottenuto dopo ASCT in era pre-nuovi farmaci².

Proprio i sorprendenti risultati ottenuti in prima linea nel paziente anziano pongono il razionale per l'ideazione di studi volti a ridefinire, nell'era dei nuovi farmaci, il ruolo ed il corretto timing del trapianto autologo e la strategia terapeutica ottimale per il paziente giovane.

L'obiettivo del progetto di ricerca è quello di identificare le migliori strategie terapeutiche e i possibili fattori prognostici predittivi di outcome nel contesto di trials clinici sperimentali spontanei ideati, condotti e coordinati dall'Istituto di Ematologia "Seragnoli" allo scopo di implementare e ottimizzare il trattamento dei pazienti con mieloma multiplo alla diagnosi o con malattia ricaduta/refrattaria.

Il più recente studio condotto dal nostro Istituto, nel contesto dell'European Myeloma Network (EMN) è rappresentato dal protocollo EMN02/HO95MM (EudraCT number: 2009-017903-28), un trial internazionale multicentrico randomizzato di fase III, da poco chiuso all'arruolamento, che ha visto la partecipazione di 15 paesi europei (circa 60 centri italiani) per un totale di più di 1500 pazienti arruolati. L'endpoint primario dello studio era analizzare se la strategia terapeutica basata sull'utilizzo di chemioterapia ad alte dosi e trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche rimanga lo standard per i pazienti con mieloma multiplo all'esordio ed età inferiore a 65 anni, o se l'impiego combinato di chemioterapia convenzionale con farmaci di nuova generazione possa risultare egualmente o più efficace. Al contempo, lo studio si proponeva di analizzare e validare, su tale popolazione di pazienti, l'impatto prognostico di alcune caratteristiche cliniche e genetico-molecolari presenti al baseline.

2. IL MIELOMA MULTIPLO

Il Mieloma Multiplo (MM) è una patologia neoplastica dell'adulto anziano caratterizzata dalla proliferazione e dall'accumulo di linfociti B e plasmacellule nel midollo osseo o, più raramente (in una percentuale variabile tra il 7-15% dei casi in diverse fasi di malattia), nei tessuti extramidollari (*extramedullary disease*). Il clone neoplastico tipicamente sintetizza immunoglobuline monoclonali, ovvero identiche in composizione isotipica (stessa classe di catena pesante e stesso tipo di catena leggera) e idiotipica (stessa sequenza aminoacidica della regione variabile), in forma completa o incompleta (la sola catena leggera). Da un punto di vista laboratoristico, tali immunoglobuline anomale, definite complessivamente componente monoclonale (CM), sono rilevabili nel siero e/o nelle urine, e tipicamente conferiscono una grossolana alterazione al profilo elettroforetico, che assume un aspetto patognomonico "bicerne" per comparsa di un picco monoclonale in zona β o γ del tracciato accanto al picco fisiologico determinato dall'albumina. La classe di immunoglobuline più frequentemente prodotta dalle plasmacellule neoplastiche è quella delle IgG, seguita da IgA, IgD ed infine IgM (rarissimo il MM IgE)³. Nell'1-2% dei casi tuttavia i pazienti presentano le caratteristiche cliniche del mieloma in assenza di una CM rilevabile nel siero o nelle urine: in questi casi si parla di MM non secernente. Utile per il monitoraggio della taglia neoplastica e delle sue variazioni in corso di terapia nel caso di MM non secernente è il dosaggio delle catene leggere libere kappa e lambda circolanti nel siero (*serum free light chain assay, sFLC*). Tale esame valuta quantitativamente le catene kappa e lambda circolanti non legate alle catene pesanti ed il loro rapporto che, quando alterato, è indicativo di uno sbilanciamento nella normale produzione delle immunoglobuline⁴.

Da un punto di vista epidemiologico, il mieloma rappresenta l'1% di tutte le neoplasie ed il 10% di quelle ematologiche. L'incidenza stimata in Europa è pari a circa 4 nuovi casi su 100.000 individui per anno. Il sesso maschile è interessato con frequenza lievemente superiore rispetto al sesso femminile (1.3:1) ed i soggetti di etnia afroamericana presentano una probabilità di sviluppare la malattia doppia rispetto ai soggetti di razza caucasica. Alla diagnosi l'età media è di circa 70 anni e soltanto il 3% dei pazienti arruolati nei protocolli terapeutici ha meno di 40 anni^{3,5}.

L'eziologia del MM non è tuttora nota. Da numerose osservazioni epidemiologiche emergono come probabili fattori di rischio l'esposizione a tossici ambientali e/o professionali (es. radiazioni ionizzanti, pesticidi, solventi, derivati del petrolio). Sono stati infine descritti rari clusters familiari di malattia, ed il potenziale ruolo del background genetico è stato confermato da studi di *genome-wide association* che hanno identificato polimorfismi a singolo nucleotide localizzati su differenti regioni geniche

fortemente correlati con il rischio di sviluppare MM. Non esiste tuttavia una vera e propria ereditarietà della patologia⁶.

2.1 INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO E STORIA NATURALE

La storia naturale del MM prevede il passaggio progressivo da una fase di bassa taglia neoplastica senza danno d'organo (gammopatia monoclonale di incerto significato, MGUS) ad una fase di malattia attiva con danno d'organo, e quindi necessità di terapia⁷. In circa un terzo dei pazienti il MM è preceduto dal riscontro occasionale di una **MGUS**, clinicamente silente e laboratoristicamente caratterizzata dalla presenza di una modesta componente monoclonale, per lo più sierica. La MGUS è presente in circa il 3% delle persone sopra i 50 anni e raggiunge il 5% sopra i 70 anni, con un rischio di progressione a MM dell'1% all'anno⁸. Tale gruppo si rivela però fortemente eterogeneo al suo interno: vi sono infatti delle condizioni di MGUS a maggiore probabilità di evoluzione maligna, nelle quali il rischio di progredire a mieloma attivo sfiora il 60% a 20 anni di follow-up. Tali caratteristiche di malignità comprendono: la concentrazione della CM sierica (>1.5 g/dl), l'isotipo della CM (non IgG), una *ratio* delle sFLC al di fuori del range di normalità e la percentuale ed il fenotipo clonale delle plasmacellule midollari⁸.

In alcuni pazienti possiamo identificare una fase intermedia di **MM asintomatico (o smouldering)**, caratterizzato da una più elevata quota di plasmacellule neoplastiche e quantità di componente monoclonale, in assenza tuttavia di danno d'organo; il rischio di evoluzione a mieloma sintomatico è pari, in questo caso, al 10% all'anno nei primi 5 anni successivi alla diagnosi⁹. Configurano un rischio aumentato di progressione l'elevato rapporto delle catene leggere, la presenza di una CM > 3g/dL, la presenza di un MM IgA, un pattern evolutivo (aumento $\geq 25\%$ della CM sierica o delle catene leggere libere a 6 mesi dal precedente controllo o ancora aumento $\geq 25\%$ della creatinina sierica), l'immunoparesi e le alterazioni citogenetiche ad alto rischio, pattern "diffuso" o presenza di 1 lesione focale alla RMN, captazione alla PET-TC senza lesioni osteolitiche sottostanti.

La diagnosi di **MM ATTIVO o SINTOMATICO** si basa infine sulla contemporanea presenza di un infiltrato plasmacellulare superiore al 10% a livello midollare e/o presenza di plasmocitoma confermato istologicamente, proteine monoclonali nel siero o nelle urine (ad eccezione dei pazienti con MM non secernente) ed evidenza di danno d'organo attribuibile al disordine proliferativo linfoplasmacellulare sottostante¹⁰.

Il danno d'organo è stato definito per numerosi anni secondo la presenza dei segni CRAB, ovvero anemia, insufficienza renale, ipercalcemia o lesioni osteolitiche (vedi Tabella 1).

Più recentemente, il miglioramento delle metodiche di indagine, la disponibilità di sempre maggiori opzioni terapeutiche, e la dimostrazione che un intervento precoce in

pazienti ad alto rischio ancora clinicamente asintomatici possa effettivamente ritardare la progressione a MM attivo ed estendere la sopravvivenza globale¹¹, ha portato l'*International Myeloma Working Group* (IMWG) a rivedere i criteri diagnostici del MM.

Secondo i nuovi criteri classificativi IMWG, in aggiunta ai classici criteri CRAB di danno d'organo, sono stati introdotti come **biomarcatori di malignità** - indicativi di imminente rischio di sviluppo di sintomaticità e quindi di "*MM defining events*" - anche un infiltrato plasmacellulare midollare $\geq 60\%$, un sFLC *ratio* (catena coinvolta/catena non coinvolta) ≥ 100 e la presenza di 2 o più lesioni focali alla RMN. Tali criteri risultano predittivi della possibilità di sviluppare un danno d'organo CRAB maggiore dell'80% a 2 anni, e concorrono pertanto a definire la diagnosi di MM attivo meritevole di terapia¹².

Il mieloma rimane ad oggi una neoplasia incurabile, la cui storia naturale, durante la fase attiva, si caratterizza per l'alternanza di periodi di remissione seguiti inevitabilmente da fasi di ripresa di malattia. Nel tempo le risposte ai trattamenti si fanno sempre più insoddisfacenti e le ricadute più frequenti, finché la malattia non entra nella fase terminale, definita come ricaduta-refrattaria, caratterizzata da una pressoché totale farmaco resistenza.

Tabella 1: Criteri IMWG per la diagnosi delle discrasie plasmacellulari

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

2.2 PRESENTAZIONE CLINICA

L'espansione della massa neoplastica, l'aumentata produzione di immunoglobuline monoclonali e le loro peculiari caratteristiche chimico-fisiche, e la produzione autocrina e paracrina di citochine sono tutti fattori che concorrono alla presentazione clinica del mieloma in cui si distinguono, per incidenza e severità, l'interessamento scheletrico e renale⁴.

- ❖ La **patologia scheletrica** costituisce la più frequente e severa manifestazione clinica del MM. Essa è presente alla diagnosi nel 70-80% dei pazienti affetti da mieloma, ed è spesso responsabile della loro cattiva qualità di vita, oltre a rappresentare una importante concausa della morbilità e mortalità correlate alla malattia. Le manifestazioni più tipiche sono osteoporosi di grado variabile, lesioni osteolitiche, fratture patologiche, dolore osseo severo, possibili quadri di compressione midollare, alterazioni del metabolismo del calcio e conseguente insufficienza renale. Le sedi più comunemente interessate sono quelle ricche di midollo emopoietico: il rachide (49%), le coste (33%), il bacino (34%) e le ossa lunghe, ma anche il cranio. La patogenesi del danno scheletrico (alla quale è dedicato un apposito capitolo) è secondaria ad un'esaltata attività osteoclastica ed all'inibizione dell'azione osteoblastica, con conseguente perdita di massa ossea (rimodellamento *osseo uncoupled*)¹³.
- ❖ L'**insufficienza renale** (IR) è la più grave complicanza del MM. Può essere presente alla diagnosi nel 20-30% dei pazienti (con necessità di un trattamento dialitico sostitutivo upfront in circa il 10% dei casi¹⁴) ed in oltre il 50% nelle fasi di malattia più avanzate. L'IR è considerata un fattore prognostico negativo che solitamente riflette un'alta taglia di malattia ed una maggior aggressività clinica e che espone il paziente ad un alto rischio di mortalità precoce¹⁵⁻¹⁶. La patogenesi del danno renale da mieloma è complessa e multifattoriale. Nella maggior parte dei casi è legata all'effetto tossico delle catene leggere monoclonali in eccesso, che possono danneggiare vari segmenti del nefrone attraverso meccanismi quali precipitazione intratubulare, danno diretto (o mediato da enzimi lisosomiali) sull'epitelio tubulare, deposizione lungo la membrana basale dei tubuli e dei glomeruli, dando origine a quadri clinici ed istopatologici differenti. La forma più frequente (oltre il 90% dei casi) è il rene da mieloma (**cast nephropaty**): il danno in questo caso è prevalentemente tubulare, secondario ad accumulo e precipitazione endoluminale di catene leggere (legate alla glicoproteina di Tamm-Horsfall) con formazione di cilindri ialini ostruenti che determinano un'atrofia del tubulo ed un quadro di fibrosi tubulo-interstiziale¹⁷⁻¹⁹. Il danno renale può essere aggravato o precipitato da ipercalcemia, disidratazione, utilizzo di farmaci nefrotossici (in primis gli antinfiammatori non steroidei, spesso assunti dai pazienti per alleviare la sintomatologia dolorosa ossea), infezioni, iperuricemia.

Altri quadri tipici, seppur più rari, includono: malattia da deposito di catene leggere, amiloidosi AL, sindrome di Fanconi, malattia da deposito di catene pesanti.

- ❖ L'**insufficienza midollare** si manifesta più comunemente con un quadro di anemia normocromica normocitica, dovuta alla sostituzione della normale emopoiesi da parte dell'infiltrato plasmacellulare patologico. Il grado di anemia correla direttamente con il grado di infiltrazione midollare, e se questo si riduce (ad un valore $\leq 30\%$) in seguito a terapia anche l'anemia risulta effettivamente reversibile. L'anemia può essere aggravata laddove ci sia un importante coinvolgimento renale per riduzione dell'EPO, la cui produzione è inibita anche dalla cascata citochinica dell'IL-6.
- ❖ L'aumentata **morbilità infettiva** - che rappresenta la principale causa di morte di questi pazienti - è legata alla ridotta efficacia della risposta immunitaria sia umorale, per soppressione della normale produzione immunoglobulinica e risposta anticorpale, che cellulo-mediata, per riduzione del numero e dell'attività dei linfociti T CD4+ Th1, ridotta capacità citotossica dei linfociti T CD8+, disfunzione delle cellule *natural killer* (NK) e delle cellule dendritiche. Il risultato è un quadro di immunoparesi, la cui origine è principalmente da ricercarsi nella ricca produzione citochinica (tra cui TGF β , IL10, IL6, VEGF) ad opera sia delle plasmacellule neoplastiche che delle cellule stromali del midollo osseo (BMSC), ed al quale contribuisce l'immunodepressione secondaria alle terapie anti-mielomatose messe in atto²⁰.
- ❖ Molto rara è la sindrome da **iperviscosità**, più tipicamente legata a CM di tipo IgA e IgM di elevata entità, che si associa ad un aumentato rischio di eventi trombotici e che si può manifestare con cefalea, astenia, dispnea, peggioramento di scompenso cardiaco cronico, disturbi visivi, retinopatia, vertigini, atassia.

3. MIELOMAGENESI

Il MM è una neoplasia clonale della B linfocitopoiesi che può procedere attraverso differenti fasi: una fase inattiva, in cui le cellule tumorali sono plasmacellule mature non proliferanti; una fase attiva, con una percentuale $\leq 1\%$ di plasmablasti proliferanti, ed una fase fulminante che si caratterizza per un incremento dei plasmablasti e per la frequente disseminazione extramidollare della malattia con comparsa di plasmacellule circolanti nel sangue periferico (leucemia plasmacellulare)²¹.

Le plasmacellule costituiscono la principale popolazione neoplastica nel MM e sono localizzate prevalentemente nel midollo osseo; raramente possono essere riscontrate in altre sedi. La loro bassa attività proliferativa ($\leq 1\%$) ha portato ad ipotizzare l'esistenza

di un pool cellulare proliferante che rifornisca il compartimento plasmacellulare, costituito da B linfociti neoplastici²²; questa ipotesi, inizialmente supportata da studi relativi alla caratterizzazione isotipica e idiotipica delle immunoglobuline di superficie dei linfociti B del sangue periferico²³, è stata dimostrata inequivocabilmente in tempi più recenti grazie all'impiego di metodiche di studio del riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline (*polymerase chain reaction*, PCR). Nei pazienti con MM esiste infatti una popolazione di cellule B circolanti aventi le stesse caratteristiche delle plasmacellule mielomatose²⁴.

L'evidenza, nel sangue periferico di questi pazienti, di B linfociti neoplastici caratterizzati da ipermutazioni somatiche a carico dei geni delle immunoglobuline, e la dimostrazione della stabilità delle medesime ipermutazioni durante la storia naturale della malattia, hanno portato a concludere che l'evento trasformante si realizzasse a livello di un progenitore linfoide che ha già superato la fase maturativa antigene dipendente; tale fase fisiologicamente ha luogo all'interno del centro germinativo degli organi linfoidei secondari (primariamente i linfonodi)²⁵. Per accordare l'origine periferica dei precursori delle plasmacellule mielomatose con la localizzazione elettivamente midollare del MM è stato ipotizzato, e successivamente dimostrato, che le cellule B circolanti nel sangue periferico migrino specificatamente al midollo osseo, dove stabiliscono strette interazioni (grazie al loro ampio corredo di molecole di adesione) con le cellule stromali del microambiente midollare. L'interazione stroma-plasmacellula, grazie al ruolo cruciale svolto da numerose citochine prodotte sia dalle cellule mielomatose che dalle cellule stromali, fa sì che le cellule di mieloma ricevano i segnali appropriati per proliferare e differenziare in plasmacellule mature²⁶.

3.1 MICROAMBIENTE MIDOLLARE E CITOCHINE

Il microambiente midollare può essere definito un variegato ecosistema composto da:

- un compartimento cellulare: che comprende sia elementi emopoietici (cellule staminali, progenitori/precursori, cellule NK, macrofagi, megacariociti, piastrine, eritrociti, linfociti, cellule dendritiche), che elementi stromali (*fibroblast-like cells* o BMSC, condrociti, osteoblasti ed osteoclasti, cellule endoteliali)
- un compartimento non cellulare: costituito dalle proteine della matrice extracellulare (ECM), quali collagene, fibronectina, laminina, proteoglicani, glicosamminoglicani, e innumerevoli fattori solubili (citochine, chemochine, fattori di crescita)

Le cellule mielomatose ed i vari componenti del microambiente dialogano tra loro sotto l'influsso di numerosi segnali e messaggeri intercellulari, attraverso loops citochinici, autocrini e paracrini, e mediante l'adesione cellula-cellula. Grazie a queste reciproche interazioni (sia fisiche che citochimiche) le cellule mielomatose vengono attivamente spinte verso una maggiore proliferazione, sopravvivenza cellulare e instabilità genomica, contribuendo inoltre alla distruzione ossea²⁷⁻²⁸.

I principali meccanismi di interazione presenti nel microambiente midollare sono riportati nella Figura 1.

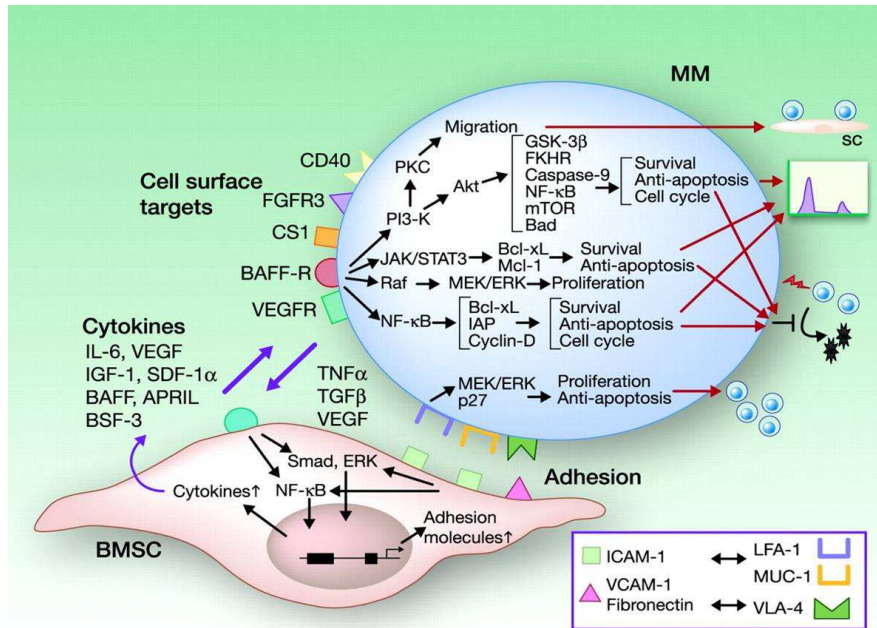


Figura 1. Interazioni tra cellule e cross-talk citochinico nel microambiente midollare²⁹.

Le principali molecole d'adesione coinvolte appartengono alle famiglie delle integrine, caderine, selectine, sindecani e alla superfamiglia delle immunoglobuline: sindecano-1 o CD138, ICAM1 (CD54), N-CAM (CD56), LFA3 (CD58), H-CAM (CD44), CD74, VLA4, VLA5, CS-1, β 2-microglobulina; mentre il cosiddetto *liquid milieu* comprende numerosissimi fattori solubili tra cui IL6, VEGF, IGF-1, TNF α , CD40, TGF β , bFGF, MIP1 α , SCF, HGF, IL3, IL1 β , metalloproteasi.

Tutti questi fattori, interagendo tra loro, portano all'attivazione nella plasmacellula di molteplici pathway intracellulari di trasduzione del segnale, mediante attivazione di differenti proteine-chinasi, con conseguente aumentata trascrizione di numerosi geni²⁷⁻³⁴.

- ❖ Ras/Raf/MEK/MAPK *pathway*, attivato da IL6, IGF1, VEGF e integrine: determina proliferazione cellulare e può indurre farmaco resistenza alla chemioterapia
- ❖ PI3K/Akt *pathway*, attivato da IL6, IGF1, VEGF, integrine: determina inibizione dell'apoptosi e quindi sopravvivenza delle plasmacellule.
- ❖ JAK/STAT3 *pathway*, attivato da IL6: determina proliferazione cellulare.
- ❖ NF κ B *pathway*, attivato costitutivamente nel MM, sia per alterazioni genetiche che epigenetiche; su questa via agisce in modo selettivo il farmaco *Bortezomib*, inibitore del proteasoma.
- ❖ Wnt/APC/ β catenina via canonica e Wnt/RhoA via alternativa, implicate nella proliferazione, nella farmaco-resistenza ed anche nella patogenesi del danno osseo.

Tra i vari elementi cellulari che popolano il microambiente midollare di fondamentale importanza sono le cellule stromali (BMSCs). L'adesione delle cellule neoplastiche alle BMSCs determina sulle prime un effetto anti-apoptotico e pro-proliferativo, mentre nelle seconde induce l'iperproduzione di IL6, tramite l'attivazione della via NF-kB. L'IL-6 è una delle principali citochine che supportano la crescita, la sopravvivenza e l'acquisizione di farmaco-resistenza nelle cellule mielomatose. Si crea in questo modo un circolo vizioso²⁸.

Dati recenti suggeriscono l'esistenza di cellule staminali di MM (MMSC), con capacità di differenziazione e di auto-rinnovamento: un piccolissimo comparto cellulare nel contesto della più ampia popolazione neoplastica, insinuato probabilmente nelle nicchie osteoblastiche o nelle nicchie vascolari midollari.

Alcuni studi *in vitro* dimostrano che, rispetto alle plasmacellule CD138+, la sensibilità ai più comuni agenti terapeutici anti-mieloma è significativamente inferiore nei progenitori mielomatosi CD138 negativi; queste cellule dal potenziale clonogenico sembrano infatti possedere un'alta capacità di wash-out e di detossificazione intracellulare, che potrebbe contribuire a spiegare l'alta frequenza di relapse nei pazienti trattati per MM³⁵.

Come già accennato in precedenza, nel microambiente midollare troviamo anche linfociti B e T, cellule *natural killer* e cellule dendritiche, la cui attività è marcatamente depressa: si crea un'immunosoppressione nei confronti delle cellule tumorali, che possono quindi crescere e proliferare indisturbate.

L'efficacia ed il successo dei "nuovi farmaci" (IMiDs e inibitori del proteasoma quali bortezomib e i suoi derivati di seconda generazione) sono legati alla loro capacità di agire, appunto, sul microambiente midollare, interferendo con i sistemi di *cross-talk* su cui si fonda la proliferazione, la resistenza e la progressione della cellula mielomatosa²⁸.

3.2 ANGIOGENESI

Numerose evidenze sperimentali indicano che l'angiogenesi, come fonte di ossigeno e nutrimento, riveste un ruolo cruciale nel processo neoplastico. Studi effettuati sia su modelli animali sia nell'uomo hanno dimostrato la formazione di nuovi vasi sanguigni negli stadi precoci dello sviluppo tumorale, così come nella fase avanzata di disseminazione neoplastica³⁶.

E' un dato assodato che sia i tumori solidi che le neoplasie ematologiche siano dotate di capacità angiogenica e che da essa dipendano largamente la loro crescita e capacità invasiva. L'osservazione che le neoplasie possono originare tanto in tessuti riccamente vascolarizzati quanto in altri più poveri di vasi - nel cui contesto inducono lo sviluppo di nuovi capillari - suggerisce che le cellule tumorali stesse o le cellule del microambiente rilascino fattori che stimolano la proliferazione di cellule endoteliali quiescenti³⁷.

Attualmente sono stati identificati alcuni di questi fattori proangiogenetici tra cui TGF- β (*transforming growth factor- β*), PDGF (*platelets derived growth factor*), a-FGF (FGF-1, fattore di crescita fibroblastico acido), b-FGF (FGF-2, fattore di crescita fibroblastico basico) ed infine VEGF e i suoi fattori correlati, VEGF-B, C, D. Queste sostanze si legano a recettori transmembrana con attività tirosino-chinasica localizzati sulle cellule endoteliali, determinando una cascata di trasduzione del segnale che porta alla attivazione della angiogenesi.

Sono stati identificati anche fattori antiangiogenetici, alcuni dei quali sono rappresentati da frammenti di proteine ampiamente presenti nell'organismo come la fibronectina, la prolattina, il collagene di tipo 1 e 8, il plasminogeno e il fattore di crescita epidermico (EGF), la cui esistenza è stata ipotizzata osservando la capacità di fattori quali IFN- α (interferone- α), fattore piastrinico 4 e trombospondina 1 (TSP-1) di inibire la chemiotassi e la proliferazione endoteliale. Il rilascio di questi frammenti polipeptidici con attività antiangiogenetica è legato all'attività di alcune proteasi e all'espressione di geni oncosoppressori, quali p53, che in forma *wild type* regolano l'espressione di TSP-1 e di altri inibitori dell'angiogenesi³⁸. Questo complesso sistema di regolazione ha contribuito a fare ipotizzare l'esistenza di un meccanismo di bilanciamento nel controllo dell'angiogenesi. La prevalenza dell'attività degli inibitori contribuisce a mantenere quiescenti la cellule endoteliali, mentre la riduzione della loro concentrazione o l'induzione degli attivatori innescano il processo dell'angiogenesi conducendo alla proliferazione di nuovi vasi (*angiogenic switch*)³⁶. Tale fenomeno si verifica in diverse situazioni come ad esempio l'ipossia delle cellule tumorali (dovuta all'aumento della massa neoplastica non parallelo all'aumento dei vasi), l'attivazione di alcuni oncogeni (come H-RAS o V-SRC) e l'inattivazione di geni oncosoppressori³⁹.

L'angiogenesi riveste un ruolo di primaria importanza nella patogenesi del MM.

Sono state ipotizzate due fasi di angiogenesi, legate a due fasi distinte della malattia: una prima fase, detta prevascolare, più lunga e corrispondente clinicamente alla MGUS o al MM *smouldering*, in cui la malattia è quiescente o in lenta crescita; ed una seconda fase, più breve (fase vascolare), in cui la crescita tumorale è rapida e la malattia più attiva. Questa transizione è guidata da fattori di crescita quali HGF, b-FGF e VEGF, liberati sia dalle cellule tumorali che dalle cellule del microambiente midollare, e da alcune citochine quali IL-6 e IL-8. Tali fattori sono presenti in maggiore quantità a livello del midollo osseo, evidenza che sottolinea l'importanza del microambiente midollare nella loro produzione. Sembra inoltre esistere una correlazione diretta tra i livelli sierici di tali fattori e lo stadio clinico della malattia⁴⁰⁻⁴².

A seguito dell'attivazione dell'angiogenesi, si forma un'intricata rete di vasi sanguigni patologici, con anomala struttura e disposizione a mosaico, che contribuiscono alle modificazioni indotte dal mieloma sul midollo osseo e sullo scheletro: i nuovi capillari proliferano a partire da vasi pre-esistenti in seguito alla degradazione della membrana

basale delle cellule endoteliali e della matrice extra-cellulare, ed alla migrazione nello stroma, con ampia alterazione dei tessuti circostanti. I vasi neoformati nutrono le cellule tumorali e ne supportano la crescita; allo stesso tempo il cross-talk tra plasmacellule e microambiente promuove ulteriormente l'angiogenesi, in un circolo vizioso che sostiene la sopravvivenza del clone neoplastico.

Diversi studi hanno dimostrato come l'angiogenesi nel midollo osseo di pazienti affetti da MM, misurata come numero di nuovi vasi (*microvessel density*, MVD), sia legata ad un più alto indice di proliferazione plasmacellulare (*labelling index*, LI) e a fasi di malattia più attiva^{41,43}. A conferma dell'importanza prognostica della MVD è stata evidenziata la persistenza di angiogenesi a livello midollare anche in pazienti che raggiungono la remissione completa dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche: ciò è probabilmente legato al persistere di uno stimolo angiogenetico da parte della minima malattia residua non rilevabile con i metodi convenzionali, il quale a sua volta stimola la secrezione di fattori che agiscono sulle plasmacellule maligne residue, contribuendo quasi inevitabilmente alla ricaduta⁴⁴. Inoltre, l'anomala rete vascolare ostacola l'adeguata diffusione dei farmaci nella sede di malattia.

3.3 DANNO OSSEO

In condizioni fisiologiche il tessuto osseo è sottoposto a continuo rimodellamento strutturale: il riassorbimento è innescato sia dalle sollecitazioni meccaniche che dall'azione ormonale mobilitante il calcio (PTH, calcitonina, vitamina D), ma ci sono altrettanti stimoli che possono controbilanciarlo e portare alla neoformazione, processo che viene a mancare in caso di MM. Più precisamente, la perdita di massa ossea è dovuta ad una esaltata attività degli osteoclasti (con aumento del loro reclutamento e della loro sopravvivenza), non controbilanciata da una maggiore deposizione di matrice ossea da parte degli osteoblasti, la cui attività risulta inibita (rimodellamento osseo uncoupled). L'inibizione dell'attività osteoblastica è un evento tardivo nella patogenesi della patologia scheletrica, a differenza dell'aumentata attivazione osteoclastica che si manifesta più precocemente^{13,45}.

Se da un lato le cellule mielomatose hanno un'azione nel favorire la distruzione ossea, dall'altra il riassorbimento osseo induce il rilascio di fattori di crescita per le cellule di MM, con conseguente aumento della taglia neoplastica, che a sua volta potenzia ancor più la distruzione ossea: si viene a creare quindi un circolo vizioso⁴⁶.

IPERATTIVAZIONE OSTEOCLASTICA

Fin dagli anni '70, l'osservazione di un aumentato numero di osteoclasti nelle biopsie osteomidollari di pazienti affetti da MM in fase attiva, e del loro stretto rapporto con le cellule stromali, ha portato ad ipotizzare che l'esaltata attività osteoclastica fosse mediata da fattori locali (una volta definiti OAF, *osteoclast stimulating factors*), prodotti

direttamente dalle cellule mielomatose o in seguito all'interazione tra queste e lo stroma midollare. Numerose sono le citochine ed i fattori di crescita a cui negli anni è stato attribuito un ruolo nell'attività di stimolazione degli osteoclasti. Tra questi ricordiamo IL-6, IL-3, PTHrP (*parathormon related protein*), IL-1 β , TNF- α , MIP1 α .

Recentemente è stato identificato un complesso sistema di fattori (RANKL, RANK, OPG) che fisiologicamente riveste un ruolo fondamentale nel controllo della osteoclastogenesi e la cui deregolazione in corso di MM costituisce la base patogenetica della esaltata perdita di massa ossea.

- **RANK/RANK-L pathway:** RANK (*receptor activator of NF κ B*) è un recettore transmembrana appartenente alla superfamiglia dei recettori per il TNF, prevalentemente espresso sui precursori degli osteoclasti e sugli osteoclasti maturi⁴⁷. Il suo ligando (RANK-L) è prodotto dalle cellule del microambiente midollare e da cellule linfoidi. Il legame RANK-RANK-L promuove il differenziamento degli osteoclasti, la loro maturazione, proliferazione e attivazione; è stata inoltre descritta l'inibizione dell'apoptosi di osteoclasti maturi⁴⁸. L'OPG (osteoprotegerina), prodotta da osteoblasti, BMSC e altri tipi cellulari, è invece un inibitore dell'attività di RANK, in quanto lo lega impedendone l'attivazione da parte di RANK-L e inibendo in tal modo la proliferazione, la maturazione e l'attività degli osteoclasti⁴⁹. L'equilibrio RANK-OPG è regolato da molti fattori fisiologici come citochine, ormoni (gli estrogeni aumentano i livelli di OPG, il PTH favorisce l'attività di RANK), fattori di crescita. Diversamente da quanto si osserva in condizioni fisiologiche, nei pazienti con MM l'equilibrio fra la produzione di RANKL e OPG è alterato: benché le cellule mielomatose non producano direttamente RANKL né esprimano RANK sulla propria superficie, esse sono in grado di interagire con le BMSC e con i pre-osteoblasti, in cui stimolano la produzione di RANKL e inibiscono la secrezione di OPG, esaltando così l'attività osteoclastica e spostando quindi la bilancia a favore del riassorbimento osseo⁵⁰. Le plasmacellule neoplastiche, inoltre, tramite il legame con syndecan-1 (CD-138), internalizzano OPG avviandola alla distruzione nell'apparato lisosomiale⁵¹.
- **MIP1 α** (*Macrophage inflammatory protein-1 α*) è una chemochina prodotta dalle cellule neoplastiche nel 70% dei pazienti (il gene risulta overespresso negli studi di *gene expression profiling*) che gioca un ruolo importante sia dal punto di vista osteoclastogenico che nel processo di *homing* delle plasmacellule richiamate a popolare il midollo osseo dal sangue periferico e dagli organi linfoidi secondari. MIP1 α favorisce l'adesione tra PC e BMSC e conseguentemente aumenta la produzione di IL-6, RANK-L, VEGF e TNF α , incrementando quindi la crescita delle cellule di MM, l'angiogenesi e la distruzione scheletrica. E' stata descritta una correlazione tra livelli sierici di MIP1 α , estensione della perdita ossea e sopravvivenza del paziente⁵². Secondo alcuni studi vi è correlazione anche tra

l'iperespressione di MIP1 α e l'attivazione costitutiva del gene di fusione FGFR3, risultante dalla t(4;14), la quale si associa a sua volta ad una severa patologia scheletrica e ad una cattiva prognosi⁵³⁻⁵⁴.

- I livelli di **IL-3** (così come quelli di RANK-L e MIP1 α) sono più elevati nelle biopsie osteomidollari dei pazienti affetti da MM che in quelle dei soggetti sani. In vitro questa citochina potenzia l'azione di RANK-L e MIP1 α , promuove l'osteoclastogenesi, supporta la proliferazione delle cellule mielomatose ed inibisce inoltre indirettamente la formazione di nuovi osteoblasti a partire dai loro precursori⁵⁵.
- **IL-6** è fondamentale per la crescita del clone neoplastico, ma agisce anche favorendo la differenziazione degli osteoclasti: i livelli di IL-6 sono, infatti, più alti nei pazienti con lesioni litiche rispetto a coloro che non presentano interessamento scheletrico. Numerosi studi suggeriscono che questa citochina sia prodotta tanto dalle plasmacellule neoplastiche quanto da BMSC, osteoclasti, osteoblasti, che con esse contraggono strette interazioni cellula-cellula⁵⁶.

INIBIZIONE OSTEOBLASTICA

Oltre all'aumentata attività degli osteoclasti, concorre al danno osseo (soprattutto in fase tardiva) una riduzione dell'attività degli osteoblasti, risultato dell'inibizione della maturazione delle cellule funzionanti. Numerose citochine (IL-3, IL-7, IL-6) e fattori solubili (*Dickkopf-1* e *secreted frizzled related proteins*), prodotti dall'interazione delle plasmacellule neoplastiche con il microambiente midollare, sono responsabili dell'inibizione delle vie di differenziazione e maturazione osteoblastica⁵⁷:

- La formazione degli osteoblasti a partire dalle cellule mesenchimali pluripotenti necessita dell'attivazione di **Runx2/Cbfa1** e **Osterix** (fattore di trascrizione *zinc-finger* a valle di Runx2). Quando le cellule di mieloma sono poste in coltura assieme ai progenitori osteoblastici l'adesione cellula-cellula (integrina-VLA4) e gli elevati livelli citochinici inibiscono Runx2/Cbfa1, conducendo ad una marcata diminuzione del numero di osteoblasti maturi⁵⁸.
- Il **Wnt signaling pathway** svolge un ruolo importante per la differenziazione e la maturazione degli osteoblasti. La glicoproteina Wnt si lega al co-recettore LRP5 o LRP6 formando con questo un complesso che attiva il recettore *frizzled*; la trasduzione del segnale mediata dal recettore conduce alla defosforilazione e alla stabilizzazione della β -catenina, che migra nel nucleo e up-regola l'espressione di geni target, tra i quali quelli necessari alla differenziazione degli osteoblasti. Nel MM questa via di trasduzione del segnale viene bloccata da inibitori solubili come Dickkopf-1 (**DKK1**), che lega LRP e ne previene il legame a Wnt, e le *Secreted frizzled related proteins* (**sFRP**), che agiscono come recettori solubili di Wnt⁵⁹. Esiste una correlazione diretta tra elevati livelli sierici di DKK1 ed estensione delle

lesioni litiche, che sono più consistenti nelle fasi precoci della malattia, mentre i valori si riducono nella malattia terminale perché la plasmacellula acquista aggiuntive anomalie genetiche che la rendono autonoma rispetto al microambiente midollare⁶⁰.

- Altri fattori con un possibile ruolo nella riduzione dell'attività osteoblastica sono **IL-3** (il quale sopprime la differenziazione osteoblastica ed incrementa il riassorbimento osseo) e **IL-7** (potente inibitore della maturazione osteoblastica).

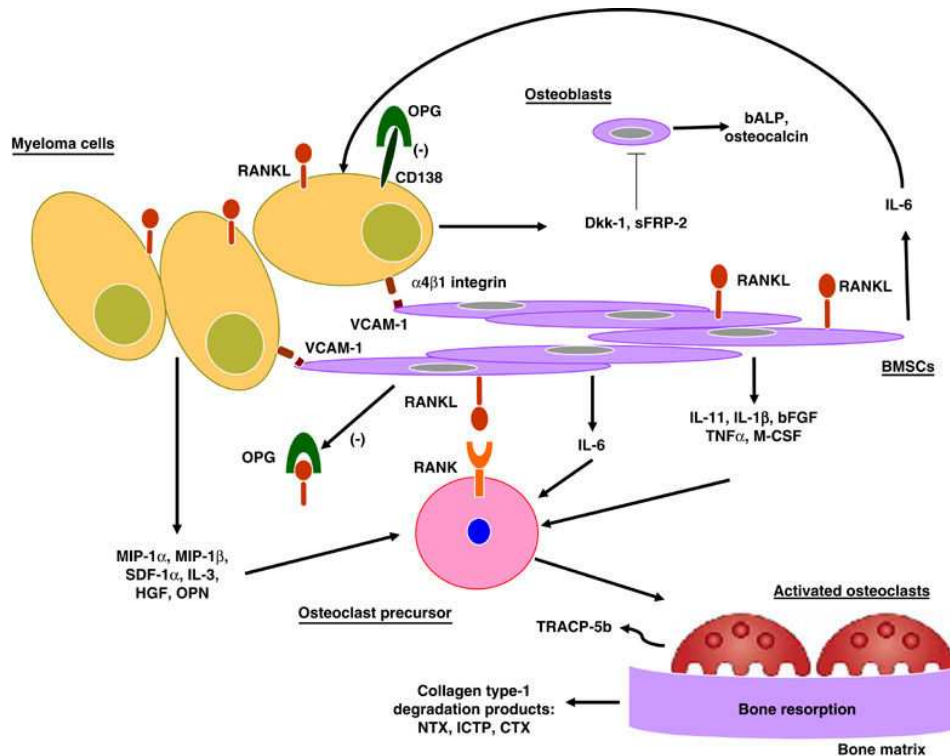


Figura 2: Patogenesi della malattia ossea

3.4 CITOGENETICA E CARATTERISTICHE MOLECOLARI

A causa del basso indice proliferativo (PCLI 1-2%) delle cellule mielomatose, il cariotipo convenzionale sottostima la reale incidenza delle alterazioni genetiche, mostrando un cariotipo anomalo soltanto nel 30-50% dei casi di nuova diagnosi, in relazione alla difficoltà di ottenere un adeguato numero di metafasi analizzabili. Con l'utilizzo della *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), che permette di rilevare alterazioni cromosomiche sia nelle cellule in metafase sia nei nuclei in interfase, è invece possibile riscontrare anomalie citogenetiche approssimativamente nell'80-90% dei pazienti, indipendentemente dallo stadio e stato della malattia⁶¹.

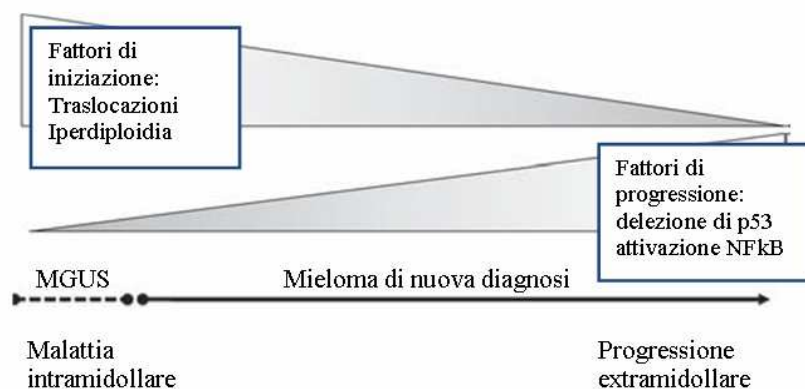
Nei pazienti affetti da MM si riscontrano sia alterazioni numeriche che anomalie cromosomiche strutturali, e sulla base del tipo di alterazioni identificate è stata proposta la suddivisione del MM in due categorie⁶²⁻⁶³:

- **a cariotipo iperdiploide:** conta in genere 48-75 cromosomi, con trisomie a carico di 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21; raramente presenta traslocazioni (probabilmente secondarie e legate ad instabilità genomica), e si associa ad una prognosi più favorevole e ad una malattia più BMSC dipendente. E' riscontrabile nel 40-60% dei pazienti con MM;
- **a cariotipo non iperdiploide:** frequentemente si associa a traslocazioni che coinvolgono il cromosoma 14q32, e a monosomie o delezioni (soprattutto a carico del cromosoma 13q14 o del 17p13); corrisponde ad una malattia più aggressiva e meno localizzata⁶⁴.

La citogenetica rappresenta un aspetto fondamentale della patogenesi del MM, che si configura come un processo multistep con accumulo di alterazioni genetiche sequenziali⁶⁵⁻⁶⁷, in cui si riconoscono:

- **eventi genetici primari:** responsabili dell'immortalizzazione del clone neoplastico, presenti ad ogni stadio della malattia (sin dalla fase di MGUS), e rappresentati da iperdiploidia e traslocazioni coinvolgenti il dominio IgH sul cromosoma 14;
- **eventi genetici secondari:** progressivi, segnano il passaggio da MGUS a mieloma sino a leucemia plasmacellulare, costituiti prevalentemente da alterazioni numeriche (delezione 17, anomalie del cromosoma 1), traslocazioni coinvolgenti c-myc, mutazioni attivanti NF-kB.

E' stato inoltre documentato come le alterazioni citogenetiche tendano a co-segregare, e come la compresenza di più alterazioni a cattiva prognosi determini un'ulteriore riduzione della sopravvivenza. In particolare la presenza di 3 o più alterazioni citogenetiche ad alto rischio identifica un sottogruppo di pazienti ad *ultra-high risk*, con aspettativa di vita inferiore ai 2 anni⁶⁸.



Traslocazioni

Le traslocazioni presenti nel MM comunemente coinvolgono il locus IgH sul cromosoma 14 o i loci IgL kappa e lambda sui cromosomi 2 e 22. Tali anomalie citogenetiche sono dovute ad errori nelle modificazioni del DNA che avvengono durante il passaggio attraverso il centro germinativo del follicolo linfoide secondario;

dal momento che questi meccanismi sono spenti nella plasmacellula normale e neoplastica rappresentano probabilmente l'evento iniziante il MM⁶⁵.

Le traslocazioni coinvolgenti il cromosoma 14q23, e quindi il gene per le IgH, ricorrono nel 40% dei pazienti. Tipicamente non producono un gene di fusione, ma hanno come risultato quello di portare un oncogene (localizzato sul cromosoma partner) sotto il controllo del potente *enhancer* delle immunoglobuline, causandone la de-regolazione trascrizionale. Frequentemente interessati sono i geni delle Cicline D1 D2 D3 su 11q13, 12p13, 6p21, c-MAF su 16q23, MAF-B su 20q12, MAF-A su 8q24, MMSET (Multiple Myeloma Set domain) e FGFR3 su 4p16. I riarrangiamenti a carico del 14q32 sono riscontrabili nella MGUS con una frequenza simile a quella rilevabile nel MM; tale osservazione suggerisce che esse rappresentino un evento precoce nella storia naturale della malattia^{63,69}.

Analizziamo le principali traslocazioni più nel dettaglio.

La **t(11;14)(q13;q32)**, presente nel 15% dei pazienti, porta alla up-regolazione della Ciclina D1; è comune nel MM a IgM, nelle forme iposecnerenti e nella Amiloidosi AL; immunofenotipicamente i cloni possono essere CD20positivi. E' stata associata a buona prognosi dopo chemioterapia ad alte dosi ma a scarsa sopravvivenza alla ricaduta⁷⁰⁻⁷¹.

La **t(4;14)(p16;q32)**, presente in un 15% dei pazienti, conduce ad un'aumentata espressione di MMSET (con formazione del gene di fusione IgH-MMSET sul cromosoma 4) e di FGFR3 (recettore del fattore di crescita fibroblastico, sul 14), anche se nel 25% dei casi la perdita del derivativo 14 comporta la perdita stessa del recettore⁷². Tale anomalia, caratterizzata da precoce *relapse*, si associa a cattiva prognosi dopo chemioterapia tradizionale e/o trapianto autologo⁷³⁻⁷⁴. Tuttavia, a conferma della notevole eterogeneità del MM, uno studio francese riporta una prognosi relativamente favorevole per i pazienti t(4;14) positivi con alta concentrazione di emoglobina e bassa β2microglobulina⁷⁵. In generale, la cascata che viene attivata da MMSET è quella di IRF-4, uno dei mediatori a valle di NF-kB; per tale motivo gli attuali regimi terapeutici con bortezomib (che agisce su questa via), sembrano in grado di migliorare (ma non superare) il rischio avverso associato a questa traslocazione⁷⁶.

La **t(14;16)(q32;q23)** è poco frequente (2-5% nei pazienti con MM, 11% nei pazienti con leucemia plasmacellulare) e porta all'iperespressione del gene MAF. Tende ad associarsi a delezione del 13, isotipo IgA, alti livelli di catene leggere libere sieriche, e ad una presentazione clinica aggressiva, con presenza di insufficienza renale acuta all'esordio in un 25% dei casi. Rappresenta un fattore prognostico negativo^{66,69}.

La **t(14;20)(q32;q12)** è molto rara (1-2% dei casi), comporta una iperespressione del gene MAF-B sul cromosoma 20, il quale codifica per una proteina zinc-finger implicata nella normale differenziazione della linea monocitaria delle cellule staminali emopoietiche, ma che se iperespresso favorisce la cancerogenesi. Si associa a prognosi sfavorevole.

Alterazioni citogenetiche secondarie

La **delezione del cromosoma 13** (monosomia completa o perdita di 13q14⁷⁷) si osserva nel 50% dei pazienti e coinvolge il gene RB1 per sua perdita omozigote o perdita di una copia funzionale (aploinsufficienza). Tale anomalia si associa frequentemente (80-90% dei casi) alla t(4;14), e sembra ormai associato che la cattiva prognosi dei pazienti del(13q) positivi riportata in numerosi studi⁷⁸⁻⁸¹ sia probabilmente dovuta alla concomitante presenza di altre alterazioni. Altri possibili meccanismi molecolari implicati nella del(13) sono la *down*-regolazione di geni coinvolti nella riparazione del DNA, quali ERCC5 e ERCC1 (*excision repair cross-complementing deficiency-5* e 1), e la *up*-regolazione di IGF1R⁸².

La **delezione di 17p13** è un'alterazione citogenetica di grande valore prognostico, meno frequente nel MM di nuova diagnosi (10% dei casi) e più tipica della malattia in fase avanzata. Comporta la perdita di funzione del *tumor suppressor* gene p53, regolatore fondamentale dei processi di *DNA repair* e apoptosi cellulare, e si associa ad una malattia biologicamente più aggressiva: la perdita dell'attività pro-apoptotica di p53 svincola infatti la sopravvivenza del clone neoplastico dal microambiente midollare, favorendo lo sviluppo di leucemia plasmacellulare e di malattia extramidollare, con frequente interessamento del sistema nervoso centrale. La perdita di p53 rappresenta un fattore di rischio indipendente, predittivo di una ridotta sopravvivenza e di una minor durata della risposta ai trattamenti⁸³⁻⁸⁵.

Le anomalie a carico del **cromosoma 1**, *gain* (guadagno) di 1q o *loss* (perdita) di 1p, hanno un'alta prevalenza nel MM. Il *gain* a livello di 1q21 comporta un aumento dell'espressione di CKS1B con un conseguente aumento dell'indice proliferativo⁸⁶⁻⁸⁷. Un recente studio americano condotto su 131 pazienti con MM di nuova diagnosi sottoposti a trapianto autologo ha identificato nella perdita di 1p31-32 un fattore prognostico indipendente associato ad una significativa riduzione della OS⁸⁸.

Alterata espressione di singoli geni

Anche l'alterata espressione di singoli geni può avere un impatto prognostico. Solitamente non viene indagata nella normale pratica clinica, ma può essere oggetto di studi sperimentali.

L'oncogene **c-MYC**, iperespresso nella malattia in fase avanzata, conferisce minor dipendenza dal microambiente midollare e maggior capacità proliferativa, associandosi pertanto a cattiva prognosi⁶⁵.

L'attivazione costitutiva del *pathway* **NFkB**, che può risultare da alterazioni epigenetiche o da mutazioni che silenziano le sue molecole inibitrici (TRAF3, TRAF2, CYLD) o amplificano le proteine attivatrici (NIK, CD40, TACI, LTBR), sta rivestendo sempre maggiore importanza per le sue implicazioni prognostico-terapeutiche, in considerazione del sempre più frequente impiego nella pratica clinica degli inibitori del

proteasoma che bloccano il pathway. Ad esempio, è stato messo in evidenza come pazienti con una maggiore espressione di TRAF3 abbiano una probabilità di risposta a tali farmaci molto più elevata rispetto ai pazienti con livelli normali di questo inibitore (90% vs 30%)⁸⁹⁻⁹⁰.

Infine, mutazioni attivanti **N-RAS** o **K-RAS**, associate spesso ad un aumento della Ciclina D1 ed alla t(11;14), sembrano essere eventi precoci nel passaggio da MGUS a MM. Alcuni studi tuttavia dimostrano che il peso prognostico è maggiore per le alterazioni di K-RAS rispetto ad N-RAS⁹¹.

Tabella 2. Classificazione citogenetico-molecolare proposta da IMWG⁹²

Valore Prognostico	High-Risk	Standard-Risk
Alterazione Citogenetica	FISH: t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p), gain(1q), cariotipo non iperdiploide Cariotipo: del(13) GEP: profilo ad alto rischio	Tutte le restanti, incluse: FISH: t(11;14), t(6;14)

Direzioni future

Nella comune pratica clinica, le alterazioni genetico-molecolari precedentemente descritte vengono individuate con la tecnica FISH (*fluorescent in situ hybridization*); tuttavia in ambito sperimentale sono di largo impiego anche GEP (*gene expression profiling*) ed aCGH (*array comparative genomic hybridization*) con l'obiettivo di identificare profili di espressione genica associati a malattia a basso ed alto rischio.

Altre promettenti nuove metodiche sono l'analisi dei polimorfismi genici o SNPs (*Small Nuclear Polymorphisms*) e il sequenziamento del DNA di nuova generazione o NGS (*Next Generation Sequencing*).

Lo studio dei polimorfismi genici nel MM ha recentemente portato all'identificazione di alcune varianti alleliche significativamente correlate all'insorgenza della malattia e al suo decorso clinico. Inoltre lo studio degli SNPs può avvalersi attualmente di una tecnologia molecolare molto avanzata, rappresentata dai cosiddetti *SNPs-array*, ovvero da chip di dimensioni molto ridotte su cui sono ibridizzati diversi *set* di oligonucleotidi specifici per i principali polimorfismi presenti nel genoma umano.

La tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*, NGS) consente di sequenziare un numero molto elevato di basi in un unico esperimento e può essere applicata al sequenziamento dell'intero genoma (*Whole Genome Sequencing*, WGS), oppure di segmenti del genoma (*Deep Amplicon Sequencing*). I risultati dei primi esperimenti di WGS nel MM hanno dimostrato che tutti i pazienti con MM sono portatori di mutazioni puntiformi in moltissimi geni (NRAS, KRAS, FAM46C, TP53 e CCND1)⁹³. Altri lavori hanno utilizzato la tecnologia di NGS per studiare campioni seriali di uno stesso paziente, dimostrando così la presenza

contemporanea di diversi cloni all'esordio di malattia, che fluttuano durante il decorso della malattia probabilmente sotto la pressione selettiva della terapia eseguita sul paziente⁹⁴⁻⁹⁵.

4. STADIAZIONE E FATTORI PROGNOSTICI

I pazienti con MM possono presentare un decorso clinico estremamente eterogeneo, e proprio tale variabilità ha reso necessario individuare specifici parametri che permettano di distinguere una malattia aggressiva ad alto rischio da una relativamente indolente e definire modelli prognostici in grado di predire la sopravvivenza e stimare la risposta alle terapie. Tale esigenza è divenuta particolarmente rilevante negli ultimi anni in relazione alla disponibilità di differenti opzioni farmacologiche ed alla possibilità, quindi, di modulare la strategia terapeutica sulle caratteristiche di rischio di ogni paziente. Ad oggi siamo in grado di riconoscere il contributo di numerosi fattori in grado di influenzare la prognosi del MM, sia legati a specifiche caratteristiche dei pazienti (come età, comorbidità, performance status, funzionalità renale), che a parametri indicativi della taglia tumorale o espressione della variabilità biologica della malattia, che relati alla responsività ai trattamenti⁹⁶.

Uno dei primi tentativi di stadiare/stratificare i pazienti con MM risale al 1975 ed è rappresentato dalla **classificazione di Durie & Salmon**. Tale sistema consentiva di definire tre stadi clinici di malattia (I, II, III) corrispondenti ad una massa tumorale progressivamente più espansa, ed identificabili sulla base del livello di emoglobina, calcemia, estensione delle lesioni scheletriche e concentrazione della componente M sierica e/o urinaria al basale. Venivano inoltre distinte due varietà, definite A e B, a seconda che la funzionalità renale fosse, rispettivamente, normale (creatinina <2mg/dl) o alterata (creatinina >2mg/dl)⁹⁷. Quindi una mera quantificazione della taglia di malattia che non prendeva in considerazione aspetti più prettamente biologici, e gravata dal fatto che uno dei parametri classificativi, la valutazione strumentale del danno osseo, è altamente osservatore-dipendente.

Alle informazioni prognostiche derivate da questa classificazione vengono attualmente preferiti altri parametri di maggiore affidabilità, quali la β 2microglobulina (β 2M)⁹⁸⁻⁹⁹, la proteina C reattiva (PCR)¹⁰⁰, le latticodeidrogenasi (LDH)¹⁰¹⁻¹⁰² e l'albumina¹⁰³. In tal senso, a partire dagli anni 2000, è stato introdotto il sistema classificativo **ISS (*International Staging System*)** che definisce tre stadi di malattia a seconda dei livelli di β 2M (come indice di massa tumorale, funzionalità renale e stato immunitario), e dei livelli di albumina (espressione indiretta dalla secrezione paracrina ed autocrina di IL-6 e dello stato generale del paziente). Ogni stadio correla con una diversa sopravvivenza

mediana, progressivamente ridotta all'aumentare del rischio: 62 mesi per lo stadio I, 44 per lo stadio II e 29 per lo stadio III¹⁰⁴.

Negli ultimi anni, inoltre, è venuta affermandosi con sempre maggiore rilevanza l'importanza che le alterazioni citogenetiche e molecolari svolgono nel condizionare la prognosi dei pazienti con MM, in particolare la del17p13, la t(4;14), la t(14;16) e le alterazioni del cromosoma 1 (delezione 1p, amplificazione 1q); tali anomalie sono già state illustrate nel capitolo dedicato alle alterazioni citogenetiche.

Al fine di avere una ancor più incisiva stratificazione del rischio, sono stati proposti negli ultimi anni alcuni nuovi score prognostici in grado di coniugare fattori relati al burden tumorale e variabilità biologica della malattia¹⁰⁵⁻¹⁰⁶. Il più recente è rappresentato dal **Revised International Staging System (R-ISS)**, basato sulla combinazione di stadio ISS, presenza di anomalie citogenetiche - con t(4-14), t(14-16) e del(17p) come marcatori di rischio - e livelli di LDH compresi nel range di normalità o superiori. Il nuovo algoritmo è in grado di identificare 3 distinte popolazioni di pazienti a diverso outcome, sia in termini di incidenza di relapse che di sopravvivenza a lungo termine. La netta separazione tra i 3 gruppi di rischio si mantiene anche diversificando l'analisi per tipo di terapia ricevuta dai pazienti¹⁰⁷.

Tabella 3: Stadiazione Revised-ISS

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

Altre caratteristiche che identificano un MM ad alto rischio sono la presenza di plasmacellule circolanti nel sangue periferico (leucemia plasmacellulare¹⁰⁸⁻¹¹⁰), e la localizzazione extramidollare¹¹¹⁻¹¹⁴ di malattia, entrambe accomunate dalla capacità di diffondersi al di fuori del midollo. La disseminazione di cellule tumorali dal midollo è legata ad alterata espressione di molecole di adesione e recettori chemochinici, ed alla presenza di diverse aberrazioni molecolari che contribuiscono a determinare una crescita neoplastica svincolata dal controllo del microambiente midollare, l'inibizione dell'apoptosi ed un escape dai meccanismi di immunosorveglianza. L'aggressività della

presentazione clinica, la frequente associazione con altri noti fattori di rischio, le scarse profondità e durata di risposta ai trattamenti, e la forte instabilità genomica che caratterizzano queste forme di MM, conferiscono una prognosi particolarmente sfavorevole ai pazienti, soprattutto se in recidiva di malattia.

Un ultimo aspetto importante nel predire la sopravvivenza è rappresentato dalla risposta alla terapia.

Da tempo è nota la correlazione tra risposta completa (CR) e outcome per alcune neoplasie ematologiche, quali la leucemia acuta o i linfomi ad alto grado. Nel MM è stato possibile indagare il rapporto tra la qualità delle risposte e gli outcomes a lungo termine solo da quando i progressi in ambito terapeutico hanno consentito di aumentare le percentuali di pazienti che raggiungono la CR¹¹⁵.

Nel setting del trapianto autologo un'ampia metanalisi, condotta integrando i dati di 21 diversi studi su una popolazione di quasi 5000 pazienti, ha evidenziato l'esistenza di una correlazione tra il raggiungimento di una remissione completa e la sopravvivenza globale e libera da progressione¹¹⁶.

La correlazione tra risposta, outcome e qualità di vita, riscontrata anche in settings differenti (pazienti non eleggibili al trapianto¹¹⁷, malattia ricaduta/refrattaria¹¹⁸) e con differenti strategie terapeutiche, è la prova che il raggiungimento della CR debba collocarsi tra gli obiettivi primari della terapia del MM. In tale contesto appare tuttavia rilevante ottenere una CR duratura, in quanto solo una risposta mantenuta nel tempo risulta effettivamente un marker surrogato di buona prognosi¹¹⁹⁻¹²⁰.

Sebbene l'attuale definizione di CR sia basata prevalentemente su risultati sierologici e di citologia, l'applicazione di metodiche sempre più sensibili di tipo immunofenotipico, molecolare e di imaging ha contribuito ulteriormente a definire il livello di profondità di questa risposta ed il suo impatto sull'outcome. In questo contesto, la scomparsa della malattia minima residua, valutata a livello midollare mediante la citometria a flusso multiparametrica (MFC), ha un significativo valore prognostico, superiore a quello della semplice morfologia convenzionale¹²¹. La disponibilità di markers molecolari, come il riarrangiamento dei geni della catena pesante delle immunoglobuline (IgH), consente di effettuare una valutazione della malattia minima residua da un punto di vista molecolare¹²².

Le tecniche di imaging, come la RM o la PET, rappresentano un ulteriore valido strumento per la valutazione della malattia minima residua (e quindi per una più precisa definizione dello status di CR), grazie alla loro capacità di identificare la persistenza di lesioni focali scheletriche (potenziali sedi di cellule mielomatose non secernenti) o di siti di malattia attiva al di fuori del midollo¹²³. La negativizzazione alla RM e/o alla PET delle lesioni presenti all'esordio di malattia dopo terapia mirata rappresenta un fattore prognostico indipendente, favorevole, per un controllo più duraturo della malattia e per un prolungamento della OS¹²⁴⁻¹²⁵.

5. TERAPIA

La terapia del MM ha una storia lunga ed inizialmente poco fruttuosa¹²⁶. L'introduzione in oncologia, a partire dagli anni '50-'60, degli agenti alchilanti, quali melphalan e ciclofosfamide, delle nitrosouree, degli alcaloidi della vinca (vincristina) e delle antracicline (doxorubicina), e le prime dimostrazioni della loro attività contro le cellule mielomatose, segnano formalmente l'inizio della terapia del MM¹²⁷.

Nello stesso periodo emergono le prime evidenze di efficacia per i corticosteroidi, prednisone e desametasone a dosi pulsate in particolare¹²⁸⁻¹²⁹.

L'utilizzo di cicli intermittenti di melphalan-prednisone (MP) ha rappresentato per molti decenni il "gold standard" nel trattamento dei pazienti con MM. Con questa strategia terapeutica si ottiene una risposta in circa il 50-60% dei pazienti, ma solo nel 5-10% di questi è documentata una remissione completa (CR). La durata media della risposta è di 1-2 anni e solo il 5-10% dei pazienti diventa un sopravvissuto a lungo termine¹³⁰⁻¹³¹.

Nel tentativo di migliorare i risultati terapeutici vengono proposte differenti associazioni di farmaci chemioterapici, come VBMCP (vincristina, carmustina, melphalan, ciclofosfamide e prednisone) e BMCP (carmustina, melphalan, ciclofosfamide e prednisone) che determinano un più alto *rate* di risposta, senza tuttavia influenzare la sopravvivenza globale, che si attesta intorno ai 3 anni¹³⁰.

Uno dei regimi polichemioterapici più utilizzati è stato il VAD (vincristina, adriamicina, desametasone), che presenta i vantaggi, rispetto alle altre combinazioni, di una rapida induzione di risposta, del possibile impiego in pazienti con insufficienza renale, e dell'assenza di tossicità nei confronti delle cellule staminali emopoietiche sane¹³².

L'incapacità di altri agenti chemioterapici, da soli o in combinazione, di influire positivamente sul prolungamento della sopravvivenza ha portato ad un periodo di sostanziale stagnazione terapeutica durato oltre 20 anni.

Agli inizi degli anni '80, le prime evidenze di una correlazione dose-risposta per il melphalan e la successiva introduzione della chemioterapia con alchilanti ad alte dosi seguita dal trapianto di cellule staminali emopoietiche, autologo e allogenico, ha aperto una nuova era terapeutica¹³³.

Tuttavia è a partire dagli anni 2000 che avviene la vera "rivoluzione" nella terapia del MM, grazie all'introduzione nella pratica clinica dei "nuovi farmaci", ovvero agenti non antiblastici in grado di esercitare la propria attività, oltre che sul clone neoplastico, anche a livello del microambiente midollare, il cui ruolo, come già ricordato, è cruciale nella crescita, sopravvivenza e resistenza alle chemioterapie convenzionali delle cellule mielomatose¹³⁴.

Tra i nuovi farmaci entrati a far parte stabilmente della pratica clinica, gli agenti immunomodulatori talidomide e lenalidomide e l'inibitore del proteasoma bortezomib

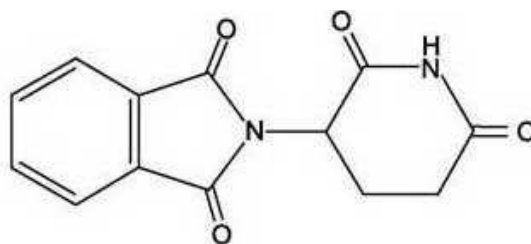
variabilmente associati tra loro o in combinazione con chemioterapici convenzionali, hanno drasticamente migliorato l'outcome clinico dei pazienti con mieloma, sia all'esordio di malattia che nelle fasi più avanzate, ed indipendentemente dall'età.

Ulteriori nuovi farmaci appartenenti a diverse classi e con differenti meccanismi d'azione sono in fase di studio pre-clinico e clinico, con la prospettiva futura di un panorama terapeutico ancora più ampio¹³⁵.

Nei prossimi paragrafi saranno analizzati i meccanismi d'azione ed il profilo di tossicità dei principali nuovi farmaci e, successivamente, sarà illustrato il ruolo fondamentale che rivestono nella terapia del MM di nuova diagnosi e nel contesto della malattia ricaduta/refrattaria.

5.1 PRINCIPALI FARMACI: MECCANISMI D'AZIONE E TOSSICITÀ

5.1.1 TALIDOMIDE



2-(2,6-dioxopiperidin-3yl)-1H-isoindole-1,3(2H)-dione

Talidomide è un derivato dell'acido glutammico, introdotto nella pratica clinica alla fine degli anni '50 come sedativo. Il suo utilizzo per la terapia dell'insonnia e delle nausee mattutine nelle donne in gravidanza è stato responsabile di più di 10.000 casi accertati di gravi malformazioni neonatali, in particolare di focomelia¹³⁶. In conseguenza di questa grave teratogenicità il farmaco fu ritirato dal mercato all'inizio degli anni '60 e da allora è stato utilizzato sporadicamente in svariate patologie, come l'eritema nodoso lepromatoso, le lesioni cutanee da LES, la stomatite aftosa AIDS-relata e la malattia da trapianto contro l'ospite (GVHD). L'efficacia del farmaco in queste diverse condizioni cliniche ha indotto i ricercatori ad indagare ulteriormente la molecola, con conseguente dimostrazione delle sue significative proprietà antiangiogenetiche¹³⁷⁻¹³⁸.

Proprio queste proprietà del farmaco, correlate all'evidenza sperimentale che l'angiogenesi midollare riveste un ruolo di primaria importanza nello sviluppo, progressione e prognosi della malattia, costituiscono il razionale per l'utilizzo della talidomide nel mieloma multiplo.

Meccanismi d'azione

I meccanismi tramite cui talidomide esplica la sua azione antitumorale sono molteplici.

- Inibizione dell'angiogenesi: trials preclinici e studi in vitro hanno dimostrato che talidomide sembra inibire l'angiogenesi indotta dal bFGF (*basic fibroblast growth factor*) e dal VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Tuttavia, l'osservazione che la densità microvascolare del midollo osseo e la concentrazione plasmatica di VEGF e bFGF non differiscono in modo significativo tra i pazienti responsivi o refrattari alla terapia con talidomide suggerisce l'esistenza di ulteriori potenziali meccanismi d'azione¹³⁸⁻¹³⁹.
- Inibizione della produzione di citochine e fattori di crescita: talidomide determina una diminuita attività del fattore trascrizionale NF- κ B, per inibizione diretta del suo legame con il DNA, o per inattivazione della chinasi responsabile della degradazione del suo inibitore (I- κ B), con conseguente ridotta produzione di IL-6¹⁴⁰. Inoltre è in grado di inibire la sintesi del TNF- α (facilitando la degradazione del suo mRNA) e di conseguenza ridurre la produzione di alcune molecole d'adesione (VLA-4, ICAM-1, VCAM-1) normalmente trascritte in presenza di alte concentrazioni di tale fattore¹⁴¹⁻¹⁴².
- Modulazione di molecole di adesione cellulare: regolando l'espressione di tali molecole, talidomide riduce le interazioni tra cellule mielomatose ed il microambiente midollare¹⁴³⁻¹⁴⁴.
- Azione pro-apoptotica: talidomide sembra indurre un arresto di crescita durante la fase G1 del ciclo cellulare, con conseguente apoptosi mediante attivazione della caspasi 8¹⁴⁵.
- Azione immunomodulante: talidomide è in grado di promuovere una risposta immunitaria nei confronti del clone neoplastico stimolando la proliferazione di linfociti T citotossici, la secrezione di IFN γ e IL-2, l'espansione numerica e l'incremento di capacità funzionale citotossica dei linfociti NK¹⁴⁶⁻¹⁴⁷.

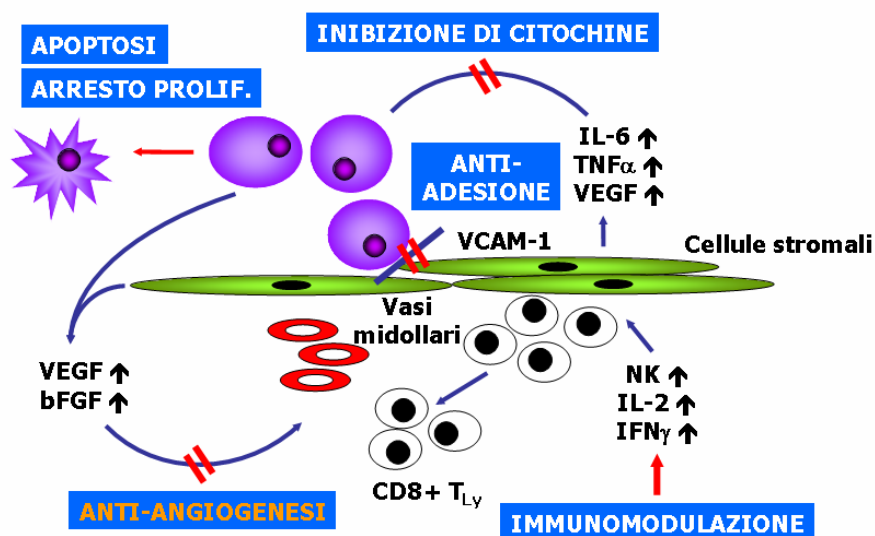


Figura 3. Meccanismi d'azione di talidomide

Profilo di tossicità

L'impiego di Talidomide è gravato da una non trascurabile tossicità, soprattutto extramidollare, dipendente dal dosaggio e dalla durata di somministrazione, che comporta elevate percentuali di diminuzione di dose e discontinuazione della terapia.

Le reazioni avverse di più comune riscontro (almeno un terzo dei pazienti), come sonnolenza, rash cutaneo, stipsi, astenia, sono solitamente di modesta entità e reversibili, e possono andare incontro a tolleranza, o alleviarsi alla diminuzione del dosaggio di talidomide¹⁴⁸. I problemi clinici più rilevanti emersi dall'utilizzo della talidomide sono invece la neuropatia periferica sensitiva, (associata principalmente a terapia di lunga durata), e l'aumentata incidenza di tromboembolismo venoso.

Ovviamente, in considerazione dei noti effetti teratogeni, è mandatoria una adeguata copertura anticoncezionale per i pazienti in età fertile.

- Neuropatia periferica (PN): rappresenta la complicanza che maggiormente influenza la qualità di vita dei pazienti. Il danno nervoso, come si evince da studi su conduzione nervosa e potenziali evocati somatosensoriali, può svilupparsi come neuropatia assonale lunghezza-dipendente (*axonal dying-back degeneration*) o, meno frequentemente, come una gangliopatia sensitiva. Si tratta di una neuropatia prevalentemente sensoriale, bilaterale e simmetrica, talora altamente invalidante, che coinvolge principalmente le estremità distali (mani e piedi) con andamento ascendente, e che si manifesta con parestesie, disestesie, tremori ed alterazioni della marcia. La sintomatologia insorge generalmente dopo un'esposizione prolungata nel tempo alla talidomide; la sua potenziale irreversibilità, anche dopo adeguata riduzione di dose del farmaco, richiede uno stretto monitoraggio clinico. L'incidenza di PN di grado 3-4 riportata in letteratura è variabile dal 3% al 18% dei casi¹⁴⁹⁻¹⁵².

- Tromboembolismo venoso (TEV). La patogenesi dell'aumentato rischio trombotico appare multifattoriale e non del tutto nota¹⁵³. L'incidenza complessiva di TEV varia dall'8 al 23% a seconda delle casistiche, e risulta massima quando talidomide è somministrata (in assenza di un'idonea profilassi antirombotica) in associazione ad antracline o altri farmaci chemioterapici (range 3-34%). Il rischio di TEV sembra correlare inoltre con la taglia neoplastica (giustificando l'incidenza notevolmente superiore nei pazienti all'esordio rispetto ai pazienti in ricaduta). Viene segnalata inoltre un'incidenza nettamente superiore nei primi 2-3 mesi dall'inizio della terapia¹⁵⁴.

Non c'è al momento in letteratura un consenso unanime circa il farmaco da utilizzare per la profilassi del TEV; sono state proposte dosi terapeutiche di anticoagulanti orali (INR=2-3) o dosi fisse sub-terapeutiche, eparine a basso peso molecolare, oppure dosaggi variabili di acido acetil-salicilico (ASA)¹⁵⁴.

Un recente studio randomizzato volto a valutare la migliore terapia profilattica per la TVP non ha evidenziato la superiorità di un trattamento rispetto ad un altro nei pazienti privi di fattori di rischio aggiuntivi, mentre per i pazienti anziani con fattori di rischio

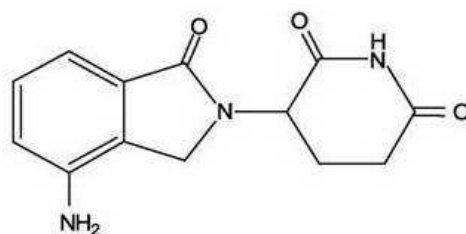
trombo embolici è consigliata una terapia profilattica con eparina a basso peso molecolare¹⁵⁵.

5.1.2 IMiDs o ANALOGHI DELLA TALIDOMIDE

I farmaci immunomodulatori (IMiDs), tra i quali lenalidomide (Revlimid®) e pomalidomide (Imnovid®) sono ormai di uso consolidato nella pratica clinica quotidiana, sono molecole di derivazione dalla talidomide, sviluppate allo scopo di potenziarne gli effetti e migliorarne il profilo di tossicità.

L'azione antitumorale degli IMiDs deriva principalmente dall'attività che esercitano sui processi di sorveglianza e regolazione immunologica, sulla proliferazione-differenziazione-apoptosi cellulare e sul microambiente midollare.

LENALIDOMIDE



3-(4-amino-1-oxo1,3-dihydro-2H-isondol-2-yl) piperidine-2,6-dione

Lenalidomide (CC-5013), IMiD di seconda generazione, è stata ufficialmente approvata (in associazione a desametasone) per il trattamento del MM ricaduto/refrattario (nel 2006 dalla FDA e nel 2008 da EMA), e più recentemente (2017) come terapia di prima linea nei pazienti non candidabili a chemioterapia ad alte dosi. Il suo ampio profilo d'azione ne consente l'impiego anche in altre emopatie, quali leucemia linfatica cronica, sindrome mielodisplastica con delezione 5q, linfoma mantellare e macroglobulinemia di Waldenstrom¹⁵⁶.

Rispetto a talidomide, lenalidomide è caratterizzata da maggior efficacia e miglior profilo di sicurezza, in particolare per la drastica riduzione della neurotossicità.

L'escrezione del farmaco è prevalentemente renale, perciò il dosaggio deve essere adeguato alla clearance della creatinina¹⁵⁷.

Meccanismi d'azione¹⁵⁸

1) Azione immunomodulatrice:

- Co-stimolazione dei linfociti T: l'attivazione delle T-cells richiede un duplice segnale, quello inviato dal *T cell receptor* (TCR), che lega il suo specifico antigene, e la co-stimolazione (legame B7-CD28) ad opera di una *antigen presenting cell* (APC). In presenza di lenalidomide il secondo segnale non è necessario. Essa incrementa la produzione di IL-2 (tramite *enhancement* del

fattore di trascrizione AP-1) e favorisce la fosforilazione di CD28, con conseguente trasduzione del segnale via PI3K nelle cellule T attivate.

- Attivazione delle cellule NK: oltre a favorire la proliferazione delle cellule NK tramite IL-2 e IFN γ , lenalidomide promuove anche la ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*), ovvero l'induzione della morte cellulare tramite il legame del complesso antigene tumorale+Ig al recettore Fc γ della NK, la quale attiva il rilascio di perforina e granzime (molecole citotossiche).
- Inibizione dei T-reg: è stato notato come, nonostante l'aumento di IL-2 indotto dagli IMiDs, vi sia una riduzione dell'attivazione dei T-reg mediata da questa citochina, con conseguente riduzione della tolleranza immunitaria; essa è probabilmente dovuta a riduzione dei livelli del fattore di trascrizione FOXP3 (*Forkhead box P3*) implicato nel loro sviluppo.

2) Azione sul microambiente midollare:

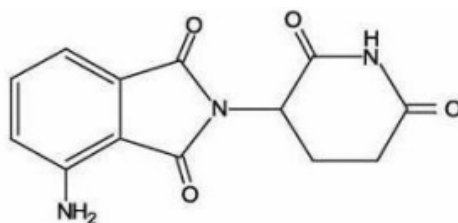
- Proprietà anti-angiogenetiche: lenalidomide esplica la sua azione anti-angiogenetica (inferiore a quella di talidomide) attraverso una riduzione dei livelli di VEGF e bFGF. Inibisce inoltre la fosforilazione (e quindi l'attivazione) della proteina Akt, elemento cardine del *pathway* PI3K, implicato nella proliferazione cellulare e nell'induzione dell'angiogenesi.
- Proprietà anti-infiammatorie: numerose citochine hanno una duplice azione, pro-infiammatoria e pro-mielomatosa. Ad esempio l'enzima ciclossigenasi-2 (COX2) converte l'acido arachidonico in prostaglandina E2, che a sua volta promuove l'angiogenesi e la produzione di IL6. Lenalidomide inibisce l'espressione della COX2 ed il rilascio di citochine quali TNF α , MIP1 α , GM-CSF.
- *Downregulation* delle molecole di adesione: lenalidomide riduce la produzione di TNF α , responsabile, se in alte concentrazioni, dell'iperespressione di molecole d'adesione come LFA1, ICAM1, VCAM1, VLA4, le quali consentono il legame PC-BMSC e conseguentemente la crescita e la sopravvivenza delle cellule neoplastiche.
- Azione sugli osteoclasti: studi in vitro dimostrano che gli IMiDs riducono la differenziazione osteoclastica, probabilmente bloccando il fattore di trascrizione PU.1 e la MAP chinasi pERK.

3) Azione antiproliferativa: lenalidomide aumenta l'espressione di p21, p27 e p15 (inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti) che porta a una ridotta fosforilazione delle proteine RBs, con arresto del ciclo cellulare in G0/G1. E' stato inoltre dimostrato che, dopo un trattamento di lunga durata, gli IMiDs down-regolano l'attività di NF- κ B nelle cellule mielomatose: a ciò consegue una riduzione di proteine anti-apoptotiche come cIAP2 e FLIP, inibitori della caspasi-8, che risulta dunque iperattiva.

Profilo di tossicità

A differenza di talidomide, lenalidomide non induce sedazione, stipsi o neurotossicità. La sua tossicità è prevalentemente ematologica e consiste in una mielosoppressione di grado variabile, con neutropenia e piastrinopenia gestibili con opportune riduzioni di dose e supporto con fattore di crescita granulocitario. Il rischio di TEV appare sostanzialmente sovrapponibile a quello riscontrato con talidomide e rende pertanto necessaria una profilassi antitrombotica. Altri effetti avversi segnalati sono ipokaliemia, crampi muscolari e diarrea, specialmente in seguito a somministrazioni prolungate nel tempo: quest'ultima appare secondaria ad un malassorbimento degli acidi biliari e trova beneficio dall'assunzione di colestiramina¹⁵⁹.

POMALIDOMIDE



4-amino-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl) isoindole-1,3-dione

Pomalidomide (CC-4047), è un immunomodulatore di terza generazione recentemente testato in numerosi studi clinici che ne hanno permesso l'approvazione nel 2013, prima da parte della FDA (*Food and Drug Administration*) e poco dopo dall'EMA (*European Medicine Agency*), per trattamento di pazienti con MM ricaduto/refrattario a più di due linee di terapia, comprensive di lenalidomide e bortezomib¹⁶⁰⁻¹⁶¹.

Pomalidomide viene somministrata per via orale e metabolizzata tramite la via del citocromo P450 (CYP1A2 e CYP3A2), per poi essere eliminata per via renale sotto forma di metaboliti (che non sembrano contribuire all'azione farmacologica), a differenza di lenalidomide che è escreta per la maggior parte invariata. Non sono pertanto necessarie modificazioni di dose in pazienti con insufficienza renale¹⁶².

L'azione antitumorale viene esercitata prevalentemente mediante effetti antiproliferativi e pro-apoptotici sulle plasmacellule, immunomodulazione (aumento dell'attività dei linfociti T e delle NK, soppressione dei linfociti T regolatori) ed interazione con il microambiente midollare (effetti antiangiogenetici ed anti-infiammatori). Sono stati osservati anche effetti citotossici da parte degli IMiDs, prevalentemente attraverso l'inibizione del nuclear factor k-B (NFkB) e l'induzione dell'apoptosi tramite le caspasi-8. L'azione di pomalidomide si è dimostrata essere ancora più potente di quella esercitata dagli altri IMiDs¹⁶³.

La principale tossicità di pomalidomide è di tipo ematologico, con in particolare una neutropenia di grado 3-4, riportata a seconda delle casistiche come variabile dal 26 al

66%, che si presenta più frequentemente nei primi cicli di terapia e che appare dipendente dal dosaggio utilizzato (2-4 mg) e dal numero di precedenti linee terapeutiche. Effetti collaterali non ematologici sono poco comuni e raramente determinano discontinuazione dalla terapia o morte. Il più frequentemente riportato è l'astenia, rilevata nel 62% dei pazienti (8% di grado 3-4). L'incidenza di eventi tromboembolici è simile a quella riportata per gli altri IMiDs e rende pertanto necessaria una profilassi antitrombotica¹⁶⁴.

Meccanismo di resistenza agli IMiDs

È stato ampiamente dimostrato come la proteina **cereblon (CRBN)** sia un importante mediatore dell'attività antiproliferativa ed immunomodulatrice degli IMiDs¹⁶⁵⁻¹⁶⁶. Questa proteina forma, insieme alle proteine leganti il DNA danneggiato DDB1, Cullin-4A (CUL4A) e al regolatore delle culline ROC1, il complesso E3 ubiquitina-ligasi, responsabile dell'ubiquitinazione e quindi dell'eliminazione di molte proteine. I farmaci della classe degli IMiDs legano direttamente CRBN e ne cambiano la specificità per il substrato, portando ad un minor tasso di degradazione per alcune proteine (come la *homeobox* MEIS2) ed incrementando invece il tasso di degradazione di altre, quali quelle derivate dagli oncogeni MYC e IRF4 ed i substrati Ikaros (IKZF1) e Aiolos (IKZF3). Questi ultimi due sono dei fattori di repressione trascrizionale dell'interleuchina-2: la loro degradazione da parte di CRBN, su stimolo degli IMiDs, porta a una maggiore quota di trascrizione di IL-2 e quindi a migliore capacità di attivazione dei linfociti T e di controllo immunitario della neoplasia¹⁶⁷.

Alcuni studi hanno dimostrato come l'espressione di CRBN possa risultare predittiva di *progression free survival* e risposta agli IMiDs: nei pazienti con espressione di CRBN molto bassa la risposta è praticamente nulla, mentre alti livelli di CRBN correlano con una prognosi migliore¹⁶⁸. Di conseguenza, una ridotta espressione di CRBN potrebbe essere responsabile di fenomeni di resistenza a questi farmaci.

Tuttavia, studi più recenti hanno dimostrato come le sole mutazioni di CRBN non

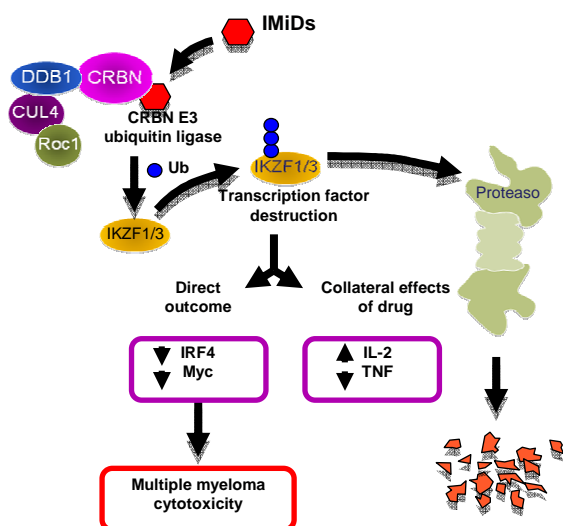


Figura 4: Meccanismo d'azione degli IMiDs. Ruolo di Cereblon

Siano in grado di spiegare appieno i meccanismi di resistenza; in particolare pomalidomide può rimanere attiva anche su cellule resistenti a lenalidomide¹⁶⁶. Da qui, il tentativo di scoprire altri mediatori a valle di CRBN che possano spiegare la variabilità di risposta in pazienti con medesimi valori di CRBN. Questi sono stati identificati nei livelli di espressione delle *CRBN-binding proteins* ed in particolare di Ikaros e Aiolos. Una ridotta espressione di queste proteine correla con una mancata risposta al trattamento e ad una ridotta OS¹⁶⁹⁻¹⁷⁰.

5.1.3 INIBITORI DEL PROTEASOMA

Il proteasoma è un complesso multienzimatico presente nel citoplasma di tutte le cellule eucariote, la cui funzione fisiologica è di catabolizzare e scindere in piccoli frammenti polipeptidici la maggior parte delle proteine intracellulari destinate all'eliminazione. Le proteine mal ripiegate o non più funzionanti presenti nella cellula vengono, infatti, marcate attraverso il legame (in successive tappe enzimatiche) con l'ubiquitina, che viene riconosciuta a sua volta e legata dal proteasoma. Una volta nel proteasoma, la proteina bersaglio si libera dal legame con l'ubiquitina e viene degradata.

Il proteasoma 26S si compone di un core 20S proteolitico, formato da due anelli alfa esterni e due anelli beta interni in cui risiedono i domini catalitici, e da due subunità regolatorie 19S che hanno la funzione di riconoscere e indirizzare alla degradazione le proteine precedentemente sottoposte ad ubiquitinazione¹⁷¹⁻¹⁷². L'attività catalitica dei domini centrali β può essere di tre tipi: *chymotrypsin-like* (CT-L) mediata dalla catena $\beta 5$, *trypsin-like* (T-L) dalla $\beta 2$ e *caspase-like* (C-L) dalla $\beta 1$. (vedi figura 5)

La lista delle proteine target che vengono controllate dal sistema ubiquitina-proteasoma comprende cicline, chinasi ciclino-dipendenti, oncogeni, *tumor suppressor genes*, attivatori e inibitori di fattori di trascrizione.

Nelle cellule neoplastiche il proteasoma è implicato nei meccanismi che sottendono la crescita tumorale, l'apoptosi, l'angiogenesi e la diffusione metastatica, rappresentando quindi un potenziale bersaglio terapeutico.

La sua continua attività catabolizzante è necessaria per il corretto funzionamento cellulare. Tuttavia, anche una sua eccessiva attività può risultare dannosa per la cellula. Quando le proteine mal funzionanti o danneggiate sono troppe, normalmente l'attività del proteasoma diventa insufficiente ed esse si accumulano nel citoplasma, attivando i meccanismi apoptotici della cellula attraverso la cosiddetta UPR (*unfolded protein response*¹⁷³⁻¹⁷⁴). È quanto avviene tipicamente nelle cellule tumorali. Se però il proteasoma incrementa la propria attività, la cellula tumorale non va più in apoptosi e, anzi, può acquisire resistenza alle terapie. Nel caso del MM, è stata appunto riscontrata un'eccessiva attività del proteasoma, che riesce così a degradare una quantità di proteine anomale molto superiore alla norma, facendo mancare alle cellule neoplastiche la spinta

apoptotica mediata da UPR e favorendone, quindi, indirettamente la crescita e la proliferazione. L'azione degli inibitori del proteasoma (PI) è quindi quella di ridurre questa eccessiva attività e di ristabilire i normali meccanismi di controllo tumorale. Tali farmaci sono particolarmente efficaci nel caso del MM poiché le PC neoplastiche, sintetizzando le immunoglobuline monoclonali, hanno un altissimo tasso di sintesi proteica non funzionale e di conseguenza un altissimo stimolo intrinseco dell'UPR, che viene bloccato soltanto dall'aumentata attività del proteasoma¹⁷⁵.

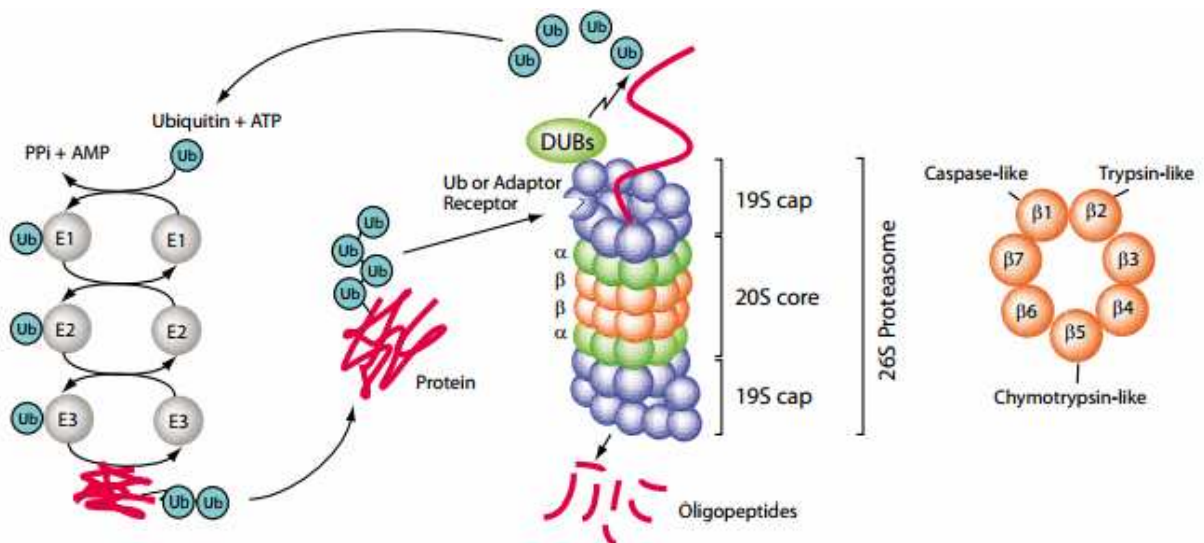


Figura 5: Sistema ubiquitina-proteasoma e struttura del proteasoma

BORTEZOMIB

Bortezomib (acido boronico N- (2,3-pirazin)carbonil-L-fenilalanina-L-leucina o PS-341, Velcade®) è il capostipite degli inibitori del proteasoma.

Bortezomib è ufficialmente approvato da FDA ed EMA, in differenti regimi di combinazione, nel trattamento di prima linea dei pazienti candidabili e non candidabili a ASCT, e nel trattamento del MM ricaduto/refrattario

Bortezomib ha la capacità di legarsi reversibilmente a tutte e 3 le subunità catalitiche del core 20S, con particolare affinità per la subunità β5 CT-L, inibendo l'attività del proteasoma e causando un accumulo delle proteine destinate alla degradazione proteolitica. Le cellule di mieloma hanno un'elevata sensibilità all'azione di bortezomib, 20-40 volte maggiore rispetto all'effetto inibitorio che questo farmaco svolge nei confronti delle cellule mononucleate circolanti del sangue e 170 volte maggiore rispetto a quella esercitata sulle BMSC: questa maggiore sensibilità delle cellule mielomatose comporta come risultato biologico una spinta apoptotica specifica e mirata nei confronti delle cellule neoplastiche¹⁷⁵.

Meccanismi d'azione

L'effetto antitumorale complessiva di bortezomib nel MM è il risultato di molteplici e fini meccanismi d'azione¹⁷⁵⁻¹⁷⁶.

1) Azione sulle cellule neoplastiche:

- Inibizione di NF- κ B: è un fattore trascrizionale che svolge una importante azione fisiologica in corso di processi flogistici e immunitari. Nel processo di tumorigenesi NF- κ B è responsabile di un incremento della proliferazione cellulare, dell'inibizione dell'apoptosi, del processo invasivo localizzato e metastatico, dell'induzione dell'angiogenesi^{175,177}.

Fisiologicamente l'eterodimero NF- κ B si trova nel citoplasma legato al suo inibitore I- κ B. La stimolazione cellulare da parte di citochine, o anche da fattori di stress come i farmaci chemioterapici, induce la degradazione di I- κ B attraverso il proteasoma, con la conseguente attivazione di NF- κ B e la sua traslocazione nel nucleo, dove stimola la trascrizione di geni implicati nella sopravvivenza ed adesione cellulare e nella produzione di citochine (specialmente IL-6). Bortezomib inibisce l'attività di NF- κ B bloccando la degradazione di I- κ B. Ciò induce anche una riduzione dei livelli di Bcl-2, una ridotta sintesi di inibitori dell'apoptosi (IAPs), l'attivazione della Caspasi-9 e la ridotta produzione di fattori pro-angiogenetici¹⁷⁸ (vedi figura 6).

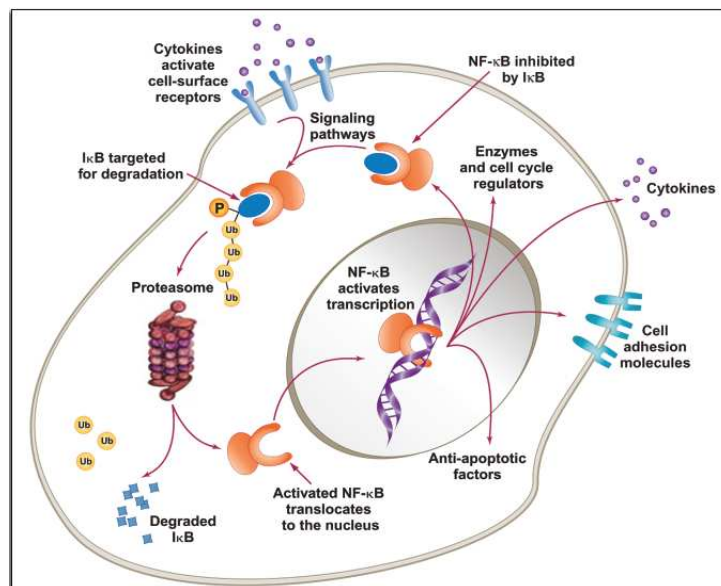


Figura 6. Meccanismo di degradazione proteasoma-mediato della via di traduzione del segnale NF- κ B

- Induzione dell'apoptosi: il meccanismo che porta all'apoptosi segue due possibili vie. La prima viene definita estrinseca, perché inizia con l'attivazione dei cosiddetti recettori di morte (FAS e TRAIL), presenti sulla superficie cellulare, i quali innescano una cascata di eventi intracellulari che conducono

all' attivazione delle caspasi, in particolare la caspasi-8. La seconda via, detta intrinseca, coinvolge prevalentemente i mitocondri ed è basata sull'equilibrio fra proteine antiapoptotiche (Bcl2, Mcl1) e due gruppi di proteine proapoptotiche, il gruppo Bax e le proteine BH3-*only*. Bortezomib è in grado inoltre di innescare la via estrinseca dell'apoptosi (Caspasi-8) mediante l'attivazione di JNK, con conseguente aumento di FAS. Inoltre, attiva la via intrinseca attraverso un accumulo di ioni calcio nei mitocondri e conseguente alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale, con liberazione del citocromo-c e attivazione della caspasi-9¹⁷⁹⁻¹⁸⁰. Un altro stimolo pro-apoptotico è rappresentato dalla capacità del farmaco di inibire il sistema di riparazione del genoma attraverso l'inattivazione della proteina chinasi DNA-dipendente e attraverso la salvaguardia della via p53. Infatti, un importante substrato del proteasoma è il sistema p53/MDM2. Diversi stress cellulari favoriscono l'accumulo della proteina p53, il cui ruolo è l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare o l'induzione di meccanismi di riparazione o apoptosi, in presenza di danni sul DNA. Tuttavia l'accumulo di p53 aumenta l'espressione di MDM2, che a sua volta ubiquitina p53 e la rende suscettibile alla degradazione proteasomica. Quindi, attraverso l'impiego di un inibitore del proteasoma, potrebbe essere possibile preservare la via di p53 e favorire i meccanismi riparativi o l'apoptosi delle cellule che hanno subito un danno al proprio patrimonio genetico. Questo effetto permette di abbassare la soglia terapeutica di alcuni chemioterapici e pone le basi per un'azione sinergica con questi¹⁸¹. Infine, anche il meccanismo della UPR contribuisce allo stimolo apoptotico, attivando direttamente la Caspasi-2, a valle di entrambe le vie¹⁸²⁻¹⁸³.

2) Azione sulla farmacoresistenza: la resistenza farmacologica delle cellule mielomatose, mediata dalle complesse alterazioni genetico-molecolari da esse acquisite e dalle interazioni che stabiliscono con il microambiente midollare, rappresenta il maggior ostacolo all'eradicazione della malattia minima residua. Purtroppo le vie attraverso le quali la farmacoresistenza viene indotta sono molteplici e molto complesse; tra queste spicca per importanza l'attivazione costitutiva di NF-kB. Studi in vitro dimostrano che bortezomib, inibendo questo *pathway*, sensibilizza le cellule neoplastiche all'azione di doxorubicina e melphalan; l'aggiunta del desametasone potenzia l'effetto. Studi preclinici hanno dimostrato che il ripristino della sensibilità ai chemioterapici nelle cellule trattate con bortezomib è dovuto a: inibizione di NF-kB, *down regulation* della via p44/42 MAPK, aumento di p53, interferenza con i meccanismi di *cross talk* PC-BMSC¹⁸⁴. L'aumento della chemiosensibilità dipende anche dalla capacità di bortezomib di inibire la maturazione (e di conseguenza l'attività) della glicoproteina-P (in grado di indurre *multi drug resistance*)¹⁸⁵.

3) Azione sull'osso: il legame di RANKL al suo recettore RANK sulla superficie dei precursori osteoclastici induce l'attivazione del sistema NF- κ B che permette la differenziazione e l'attivazione degli osteoclasti (OC). Tale effetto è abolito in presenza dell'inibitore del proteasoma. Il sistema ubiquitina-proteasoma è coinvolto anche nella differenziazione osteoblastica, esso modula l'espressione di *bone morphogenic protein 2* (BMP2) via Wnt e di Runx2/Cbfa1/Osterix. Bortezomib quindi non solo contrasta l'esaltato riassorbimento osteoclastico (riduzione dei *markers* NTX, RANKL, TRACP5b, CTX) ma favorisce anche l'apposizione di osso neoformato (aumento di ALP e OC e calo di DKK1)¹⁸⁶.

4) Azione sul rene: la forma più comune di coinvolgimento renale nel MM è una nefropatia tubulo-interstiziale nota come *cast nephropathy*, che si associa ad atrofia del tubulo renale e presenza di cilindri composti da catene leggere aggregate dalla proteina di Tamm-Horsfall. La patogenesi di queste lesioni va ricercata nell'azione citotossica e pro-infiammatoria delle catene leggere endocitate dalle cellule epiteliali tubulari: assistiamo all'abnorme produzione di citochine quali IL1, IL6, TNF α , TGF α e β , che attivano le vie di trasduzione del segnale NF- κ B e MAPK¹⁷⁷. Bortezomib è altamente efficace nel paziente con insufficienza renale non solo per la rapida diminuzione della taglia neoplastica e per la farmacocinetica non nefrolesiva, ma anche per la sua capacità di agire al cuore della patogenesi del danno tubulare¹⁸⁷.

Tossicità

Gli eventi avversi più frequentemente associati al trattamento con bortezomib sono disturbi gastrointestinali (nausea, diarrea, stipsi, vomito, anoressia), costituzionali (astenia e febbre), ematologici (piastrinopenia, anemia, neutropenia), infezioni da Herpes Zoster, ipotensione e neuropatia periferica. In generale questi effetti collaterali sono prevedibili, gestibili con appropriate terapie di supporto e solo raramente comportano la sospensione del trattamento¹⁸⁸⁻¹⁸⁹.

La neuropatia periferica (PN) è l'effetto collaterale che più condiziona la qualità di vita e la *compliance* del paziente e che può portare a riduzioni di dose o a sospensioni definitive del farmaco. La PN indotta da bortezomib è prevalentemente di tipo sensitivo (polineuropatia sensoriale assonale interessante le piccole fibre) ed è reversibile nella maggior parte dei pazienti, con un tempo mediano per la remissione dei sintomi pari a circa 3.5 mesi¹⁹⁰⁻¹⁹¹. Il quadro clinico è caratterizzato da parestesie, formicolio, bruciore, intorpidimento e dolore, che interessano più frequentemente gli arti inferiori rispetto a quelli superiori. La sintomatologia ha una distribuzione caratteristica a guanto e calza, con iperestesia ed aumentata sensibilità dolorosa al caldo e al freddo. La PN è riportata in letteratura con un'incidenza variabile a seconda dei diversi studi e dell'età dei pazienti trattati, con percentuali di neuropatia di grado 3-4 dal 12 al 25%^{2,192}. Il meccanismo patogenetico attraverso il quale bortezomib danneggia le

fibre nervose non è ancora chiaro. Recentemente è stata ipotizzata la presenza di una predisposizione genetica all'insorgenza della neuropatia; tale ipotesi scaturisce dai risultati di alcuni studi in cui si è rilevata un'associazione tra l'insorgenza di neuropatia da bortezomib, differenti *patterns* di espressione genica (GEP) e polimorfismi di singoli nucleotidi¹⁹²⁻¹⁹⁵. Comunque, a causa delle limitazioni metodologiche degli studi, occorre cautela nell'interpretazione di questi dati. La comparsa di neuropatia può essere ridotta dalla recente introduzione della somministrazione sottocutanea di bortezomib: uno studio francese ha dimostrato infatti come la somministrazione sottocute, a parità di efficacia, riduca l'incidenza di neuropatia dal 16% al 6%¹⁹⁶.

La piastrinopenia indotta da bortezomib è tipicamente transitoria e con un pattern ciclico e prevedibile di riduzione e recupero della conta piastrinica che fa supporre una azione citostatica più che citolitica nei confronti del megacariocita. La produzione di piastrine da parte dei megacariociti è infatti un processo in parte dipendente da NF-kB, principale fattore inibito da bortezomib, mentre la secrezione di trombopoietina (TPO) non viene influenzata da questo processo. L'incidenza di piastrinopenia di grado 3-4 varia in letteratura dal 13 al 38%^{2,197}.

Un altro evento avverso dovuto a bortezomib è la riattivazione dell'infezione da virus dell'Herpes Zoster. Il meccanismo preciso alla base di questa morbidità infettiva è sconosciuto, anche se alcuni studi chiamano in causa la diminuzione dei linfociti T CD4+ osservata nei pazienti trattati con bortezomib, a cui consegue l'indebolimento dei sistemi di sorveglianza e di lotta alle infezioni virali¹⁹⁸. L'adozione di una terapia profilattica con Aciclovir consente di annullare o comunque ridurre significativamente il rischio di riattivazione di HVZ, soprattutto nei pazienti trattati con la combinazione bortezomib/desametasone¹⁹⁹.

CARFILZOMIB

Carfilzomib (PR-171, Kyprolis®), PI di seconda generazione, appartiene alla classe degli epossichetoni. E' ufficialmente approvato da FDA e EMA in combinazione con desametasone o con lenalidomide-desametasone per il trattamento di pazienti con MM ricaduto/refrattario che abbiano ricevuto almeno una precedente linea di terapia.

Carfilzomib blocca irreversibilmente la subunità β5 del proteasoma con la stessa affinità di bortezomib, ma in maniera ancora più specifica e potente: infatti la funzione della subunità può essere ripristinata solo in seguito ad una sua nuova sintesi proteica. Ciò determina, al contrario dei PI boronati, un'azione più selettività sul proteasoma ed una minore attività *off target*²⁰⁰⁻²⁰¹.

Lo spettro d'azione ricalca in gran parte quello di bortezomib, essendo stata dimostrata in studi preclinici anche per gli epossichetoni un'attività sul riassorbimento osseo e un'azione pro-apoptotica su cellule tumorali a livello di diversi organi e apparati²⁰¹⁻²⁰².

Carfilzomib sembrerebbe garantire risposte anche nei pazienti resistenti a bortezomib; inoltre, presenta un profilo di tossicità più favorevole, essendo gravato da una minore neurotossicità²⁰³⁻²⁰⁶.

La sua **tossicità** è, invece, prevalentemente cardiovascolare: i primi studi condotti nel setting del MM ricaduto/refrattario hanno evidenziato in un 4% dei casi comparsa o aggravamento di scompenso cardiaco, edema polmonare, ipertensione o cardiopatia ischemica²⁰⁷. Il meccanismo patogenetico è poco noto: secondo alcune ipotesi carfilzomib danneggia le cellule endoteliali vascolari attraverso l'azione sui mitocondri, secondo altre sono coinvolti direttamente i cardiomiociti²⁰⁸. Sono raccomandate pertanto prima di iniziare un trattamento con carfilzomib l'esecuzione di un'ecocardiografia, di solito integrata ai valori di BNP/NT-BNP per valutare la presenza di un eventuale pregresso scompenso non noto, ed un corretto monitoraggio della pressione arteriosa in corso di trattamento²⁰⁹. Altri eventi avversi frequentemente riportati sono di ordine ematologico (trombocitopenia, anemia, linfopenia).

IXAZOMIB

Ixazomib (MLN9708, Ninlaro®) è il primo PI di seconda generazione a formulazione orale ad essere stato valutato per il trattamento del MM.

Chimicamente è un estere citrato dell'acido borbonico che a contatto con soluzione acquosa o plasma viene immediatamente idrolizzato nella sua forma biologicamente attiva (MLN2238), la quale si lega in maniera selettiva e reversibile alla subunità $\beta 5$ del complesso 20S del proteasoma, determinandone l'inibizione. Ad alte concentrazioni l'inibizione è estesa anche ai siti proteolitici caspasi-like ($\beta 1$) e tripsina-like ($\beta 2$). Gli studi preclinici hanno dimostrato come, a fronte della stessa potenza e selettività nell'inibire il proteasoma, ixazomib presenti un tempo di dissociazione dal proteasoma 6 volte inferiore rispetto al bortezomib, associato ad una maggior distribuzione/penetrazione tissutale e ad una conseguente miglior attività antitumorale²¹⁰⁻²¹².

La **tossicità** si è dimostrata limitata ed è soprattutto gastrointestinale ed ematologica (*in primis* piastrinopenia, seguita da neutropenia), nella maggioranza dei casi di grado lieve. Sono segnalati anche rash cutaneo, particolarmente nei primi tre mesi di terapia e facilmente gestibile con antistaminici o glucocorticoidi topici, ed edemi periferici. Non è emersa finora, invece, un'aumentata incidenza di neuropatia periferica o di eventi cardiovascolari.

Ixazomib ha dimostrato efficacia in associazione a lenalidomide-desametasone in pazienti con MM ricaduto/refrattario ad almeno una precedente linea di terapia²¹³ (condizione per cui ha ricevuto approvazione ufficiale FDA nel 2015), ed anche come trattamento di prima linea²¹⁴.

La bassa incidenza di eventi avversi, l'elevata biodisponibilità e la facile via di somministrazione rendono ixazomib un farmaco ideale per terapie di lunga durata.

5.1.4 INIBITORI DELL'ISTONE DE-ACETILASI

Le istone deacetilasi (HDCA) sono una famiglia di enzimi coinvolti in meccanismi di regolazione epigenetica (con conseguente modulazione della trascrizione genica ed impatto sui processi di crescita e sopravvivenza cellulare) e di degradazione proteica. In particolare, le HDCA, agendo in maniera complementare ed opposta agli enzimi istone acetil-transferasi, modulano il livello di acetilazione delle proteine istoniche: l'acetilazione induce l'apertura della cromatina, permettendo alla macchina trascrizionale di entrare in contatto con i promotori dei geni, mentre al contrario la deacetilazione determina il silenziamento genico. La deacetilazione può avvenire anche a livello di proteine non-istoniche (ad esempio fattori trascrizionali, proteine del citoscheletro, chaperons) portando ad un cambiamento nella loro attività e stabilità.

Esistono 18 diversi tipi di HDAC (tra cui HDAC6 rappresenta un componente fondamentale del pathway dell'aggresoma), divise in 4 classi, ed i vari inibitori impiegati a scopo anti-tumorale possono essere diretti contro ciascuna di queste diverse classi²¹⁵⁻²¹⁶.

La loro azione sul MM non è ancora completamente delucidata, tuttavia ad oggi sono state identificate le seguenti funzioni *in vitro*:

1. **Up-regolazione dei fattori che bloccano la proliferazione cellulare** (p21) con conseguente blocco in fase G1/S del ciclo cellulare.
2. **Regolazione dei segnali pro-apoptotici e tossicità mediata dalle caspasi.** Gli inibitori HDAC impattano sia sulla via intrinseca che su quella estrinseca dell'apoptosi mediata dalle caspasi rispettivamente attraverso:
 - l'aumento della traslocazione e dell'espressione di proteine mitocondriali quali il citocromo c e APAF-1;
 - il clivaggio delle caspasi 3 e 9, normalmente mediato dal *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), il quale si lega ai recettori di morte cellulare DR4 e DR5, inducendo apoptosi. L'inibitore del HDAC incrementa l'espressione di DR4/5, aumentando l'efficacia di questa via.
3. **Inibizione del pathway di degradazione dell'aggresoma.** È stata dimostrata una maggiore efficacia dei PI quando associati all'inibitore HDAC. In effetti, entrambi i farmaci agiscono su dei pathway di degradazione che risultano alterati nelle cellule di MM e che sono fondamentali per la sopravvivenza delle cellule mielomatose: il proteasoma è inibito dai PI, l'aggresoma dagli inibitori di HDAC. Probabilmente, quando le proteine mal ripiegate all'interno della cellula non possono essere degradate dal proteasoma (ad esempio perché inibito dai PI), esse prendono un'altra via (quella dell'aggresoma), impedendo quindi l'accumulo intracellulare di proteine mal ripiegate ed ubiquitinate, che sarebbe di per sé uno stimolo di stress e quindi apoptotico per le cellule (secondo la già precedentemente descritta via della UPR). L'HDAC6 ha in particolare un effetto facilitante il trasporto delle proteine

ubiquitinate all'agresoma: l'aggiunta dell'inibitore delle HDAC blocca questo passaggio rendendo più potente il segnale di stress cellulare. Tra tutte le azioni degli inibitori degli HDACs, questa sembra essere *in vivo* (per quel che è stato rilevato dagli studi condotti finora) la più rilevante.

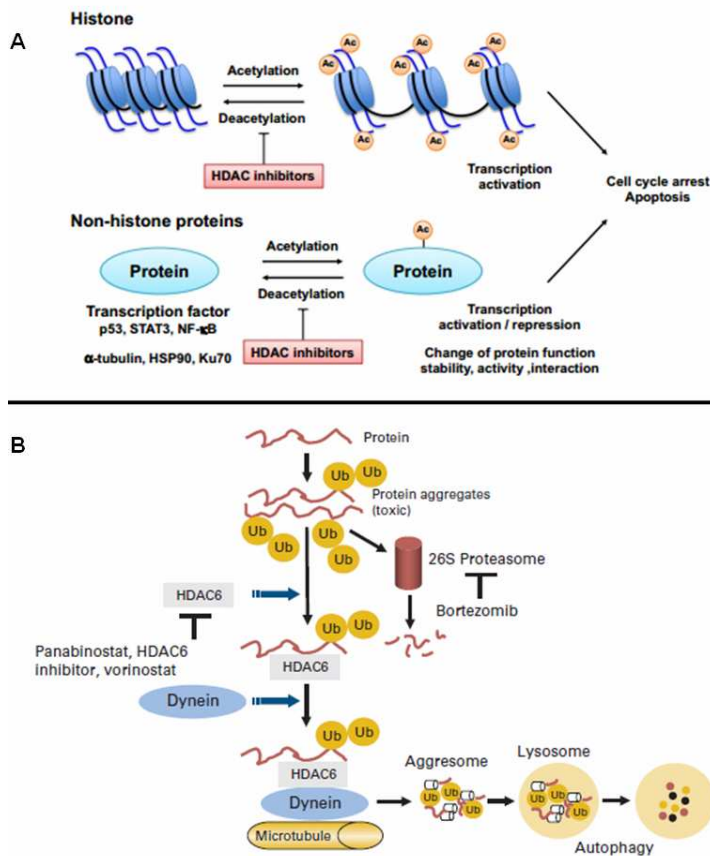


Figura 7. Meccanismo d'azione degli inibitori HDACs

A: deacetilazione di proteine istoniche e non istoniche

B: via di degradazione dell'agresoma

PANOBINOSTAT

Panobinostat (Farydak®) è un potente inibitore orale dell'istone deacetilasi ed ha un'attività ad ampio spettro; i suoi principali bersagli nel MM sono HDACs di classe I (1,2,3,8), classe II (4,5,6,) e classe IV (HDAC 11). È approvato dal 2015 in combinazione a bortezomib e desametasone in pazienti che abbiano ricevuto almeno due precedenti linee di terapia contenenti sia bortezomib che un IMiD²¹⁷.

Gli studi condotti sinora hanno evidenziato una importante tossicità del farmaco, con frequente necessità di riduzioni posologiche. Gli eventi avversi di grado ≥ 3 più comunemente riportati sono di ordine ematologico (la trombocitopenia è il più frequente, sino al 60% dei pazienti, con spesso necessità di supporto trasfusionale; neutropenia ed anemia sono meno comuni), e gastrointestinale (in particolare diarrea, che risulta essere il fattore principalmente limitante la terapia con panobinostat). Altri effetti avversi riportati frequentemente sono ipertensione e affaticamento. Possibili anche ipokaliemia ed ipocalcemia, che possono a loro volta indurre un allungamento dell'intervallo QT all'elettrocardiogramma²¹⁸⁻²¹⁹.

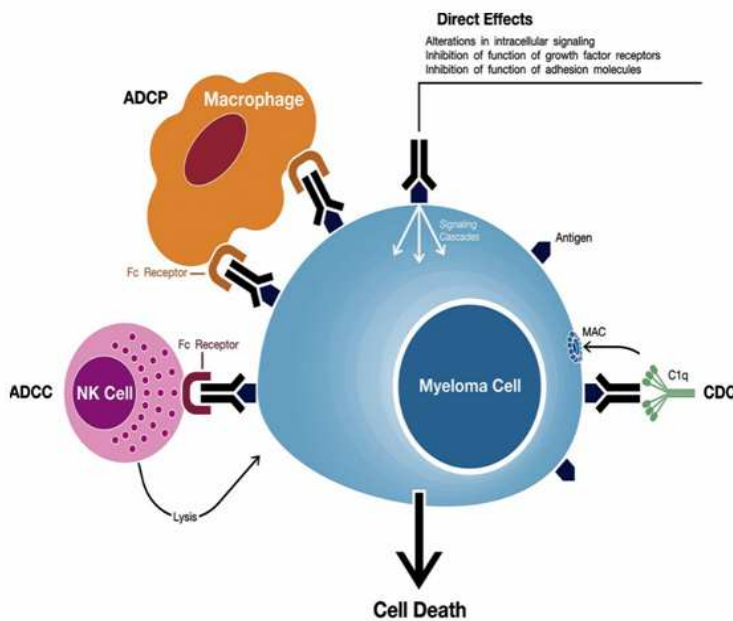
5.1.5 ANTICORPI MONOCLONALI

Nel panorama delle molecole di nuova generazione entrate a far parte dell'armamentario terapeutico del MM, i risultati più promettenti sembrano provenire dagli anticorpi monoclonali (MoAb), che esercitano la loro azione bersagliando selettivamente specifiche molecole presenti sulla superficie delle plasmacellule²²⁰.

Gli anticorpi monoclonali possono agire sul bersaglio attraverso vari meccanismi²²¹:

1. citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC)
2. citotossicità cellulare complemento-dipendente (CDC)
3. citotossicità mediata dalla fagocitosi (ADCP)
4. induzione diretta di apoptosi e arresto di crescita attraverso l'interazione con molecole coinvolte in specifici *pathway* importanti per la sopravvivenza cellulare.

Ad oggi, sono in fase di studio anticorpi diretti contro vari fattori di crescita e molecole di superficie delle cellule mielomatose, mentre due farmaci già sono stati approvati: Daratumumab, contro CD38, ed Elotuzumab, contro SLAMF7²²².



Gli anticorpi monoclonali contro target espressi sulle plasmacellule mielomatose possono indurre la morte cellulare attraverso la via Fc mediata con diversi meccanismi (CDC, ADCC e ADCP):

- la via ADCC è ottenuta tramite l'attivazione di recettori per Fc espressi sulle cellule NK e sulle cellule mieloidi da parte delle immunoglobuline espresse dal tumore. La conseguente citotossicità è indotta da due vie, una mediata dal rilascio di granzima e perforina, l'altra coinvolge l'apoptosi indotta da FasL e dal TNF.
- ADCP prevede la fagocitosi da parte dei macrofagi.
- il meccanismo CDC dipende, invece, dall'interazione tra il dominio Fc degli anticorpi con il frammento attivante la via classica del complemento (C1q), che media l'attivazione di proteine a cascata fino alla formazione del complesso MAC (*membrane attack complex*), responsabile di lisi cellulare. Sempre in seguito all'attivazione di questa via si producono anche chemochine solubili del complemento (C3a e C5a) che richiamano e attivano altre cellule immunitarie.

Sembra, inoltre, che le cellule tumorali opsonizzate dagli anticorpi o da loro frammenti possano essere riconosciute dalle cellule APC (*antigen-presenting cells*) e che questo possa incrementare la risposta T-specifica contro le cellule tumorali.

Figura 8. Meccanismo d'azione dei MoAB

DARATUMUMAB

Daratumumab (Darzalex®) è un Ab monoclonale umano IgGkappa diretto contro l'antigene CD38, una glicoproteina transmembrana tipo II coinvolta in meccanismi di regolazione del signaling, homing ed adesione cellulare, e con un ruolo da cofattore enzimatico nella regolazione del flusso di calcio attraverso la membrana. Il CD38 è espresso ad elevata intensità sulle plasmacellule ed in misura minore su altre cellule del sistema emopoietico (come elementi T e B linfocitari, eritrociti) e cellule muscolari lisce²²³⁻²²⁴.

Daratumumab è in grado di agire attraverso due diversi meccanismi:

- azione diretta sulle plasmacellule: il legame tra Ab e CD38 determina lisi plasmacellulare per induzione diretta di apoptosi e attraverso meccanismi di citotossicità cellulare anticorpo- e complemento-dipendente e fagocitosi anticorpo-dipendente²²⁵⁻²²⁶
- azione immunomodulatoria: mediante deplezione di cellule regolatorie immunosoppressive CD38+ ed espansione/attivazione di cellule T citotossiche²²⁷.

Daratumumab è stato approvato nel 2015 dalla FDA e più recentemente da EMA, dapprima come agente singolo nella terapia del RRMM in fase avanzata (almeno 2 precedenti linee di terapia, comprendenti un PI e un IMiD)²²⁸⁻²²⁹, e successivamente in combinazione con bortezomib-desametasone o lenalidomide-desametasone per il trattamento di pazienti sottoposti ad almeno una precedente linea di terapia²³⁰⁻²³¹.

Per quanto riguarda il profilo di tossicità del farmaco, il principale evento avverso è rappresentato dalle possibili **reazioni infusionali**, perlopiù di grado I-II, documentabili in circa il 40-50% dei casi, principalmente nel corso della prima infusione²²¹: tra le possibili manifestazioni vi sono febbre, vomito, rinite, broncospasmo, tosse e dispnea. La velocità di infusione è il principale fattore favorente lo sviluppo di queste reazioni.

Una delle problematiche emerse dall'utilizzo degli Ab monoclonali nella pratica clinica è la difficoltà nello stimare correttamente la risposta alla terapia per la possibile **interferenza** da parte del farmaco con le tecniche di elettroforesi e immunofissazione utilizzate per ricercare la componente monoclonale. L'anticorpo monoclonale rappresenta anch'esso, infatti, un'immunoglobulina monoclonale²³².

Inoltre gli Ab monoclonali anti CD38 possono interferire con i test di compatibilità ematica (CD38 è espresso sui globuli rossi), determinando una falsa positività del test di Coombs indiretto (in assenza di reale emolisi) sino a 5 mesi dalla sospensione del trattamento²²¹.

ELOTUZUMAB

Elotuzumab (Empliciti®) è un anticorpo umanizzato IgG1 anti-SLAMF7 (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule F7*), proteina espressa dalle cellule neoplastiche (fino al 95% delle plasmacellule midollari, indipendentemente dalla citogenetica) e dalle cellule NK, ma non dalle cellule al di fuori del sistema ematopoietico; ciò consente un'azione "mirata" dell'anticorpo, con minimi effetti collaterali.

Elotuzumab esercita una doppia azione: da un lato, attiva in maniera diretta le cellule NK, effetto correlato all'espressione della proteina di *signaling* EAT-2 sulla NK stessa; dall'altro, in seguito al legame con le plasmacellule tumorali, consente la ADCC via CD16^{221,233}.

Sulla base dei risultati dello studio ELOQUENT-2, questo anticorpo è stato approvato sia da FDA (novembre 2015) che da EMA (maggio 2016) in combinazione con Rd (Elo-Rd) per il trattamento di pazienti con RRMM sottoposti ad almeno una precedente

linea di terapia²³⁴.

Analogamente agli altri Ab monoclonali la sua principale tossicità è rappresentata dalle possibili reazioni infusionali, riscontrabili con Elotuzumab in circa il 10% dei casi, per lo più in corso della prima infusione²²¹.

5.2 TERAPIA DEL PAZIENTE CON MM DI NUOVA DIAGNOSI

Secondo i nuovi criteri classificativi dell'IMWG¹², l'indicazione ad iniziare una terapia specifica per il MM è data dalla presenza di almeno uno dei MDE (*myeloma defining event*), ovvero comparsa di un danno d'organo secondo i criteri CRAB, o presenza di un biomarcatore di aggressività (vedi tabella 1), sebbene alcuni *trials* clinici abbiano recentemente mostrato il ruolo di un trattamento precoce¹¹.

La scelta del trattamento deve essere effettuata sulla base delle evidenze disponibili e delle caratteristiche del paziente (in particolare età, *performance status* e comorbidità). In genere, i pazienti di età ≤65 anni (pazienti giovani) e senza comorbidità rilevanti sono candidati all'assunzione di un breve (3-4 cicli) regime di induzione comprensivo di “nuovi farmaci” seguito da chemioterapia ad alte dosi con supporto di cellule staminali autologhe (trapianto autologo), ed eventualmente da una terapia di consolidamento/mantenimento. I pazienti di età compresa fra i 65 ed i 70 anni considerati ancora *fit* (età biologica inferiore all'età anagrafica, assenza di problematiche cardio-respiratorie, buona funzionalità d'organo) sono comunque candidabili al trapianto, se necessario utilizzando un regime di condizionamento a dosi ridotte. Lo *standard* per i pazienti di età superiore ai 70 anni, o per vari motivi non candidabili al trapianto, è la chemioterapia convenzionale in associazione ai nuovi farmaci, o combinazioni di farmaci non chemioterapici.

5.2.1 PAZIENTE CANDIDATO A TRAPIANTO AUTOLOGO

Impiegato inizialmente nei primi anni '80 in pazienti con MM refrattario, il melphalan ad alte dosi seguito da trapianto di progenitori emopoietici autologhi (ASCT), rappresenta attualmente la principale terapia di prima linea per pazienti con MM di età inferiore ai 65 anni^{1,235}.

Questa acquisizione è basata sui risultati di due studi prospettici randomizzati, condotti dall'*Intergruppo Francophone du Myélome (IFM-90)*²³⁶ e dal *Medical Research Council (MRC)*²³⁷, che hanno fornito evidenza della superiorità del singolo trapianto autologo nei confronti della chemioterapia convenzionale (CCT), sia in termini di raggiungimento della risposta completa (CR) che in termini di prolungamento di 12-15 mesi della sopravvivenza globale (OS).

Tabella 4. Principali studi su ASCT prima dell'introduzione dei "nuovi farmaci"

Autore	Random terapia	N° pz	ORR%	CR%	PFS	OS
Trapianto vs Chemioterapia						
Attal IFM90 ²³⁶	ASCT CCT	100 100	81 vs 57 P <0.001	22* vs 5 p 0.001	28 vs 18m p 0.01	57 vs 44m p 0.03
Child MRCVII ²³⁷	ASCT CCT	200 201	86 vs 48 p NR	44 vs 8 p < 0.001	32 vs 20m p < 0.001	54 vs 42m p 0.04
Ferland MAG90 ²³⁸	ASCT CCT	91 94	78 vs 58	57 vs 20	39 vs 13m	65 vs 64m
Barlogie S9321 ²³⁹	ASCT CCT	261 255	93 vs 90	17 vs 15	17 vs 14% at 7y	38 vs 38% at 7y
Barlogie TT1 vs SWOG ²⁴⁰	Tandem CCT	152 152	NR	41 vs NR	37 vs 16m p <0.001	79 vs 43m p <0.001
Bladé PETHEMA ²⁴¹	ASCT CCT	81 83	82 vs 83	30 vs 11 p 0.002	42 vs 33m (ns)	66 vs 61m (ns)
Palumbo MMSG ²⁴²	ASCT (mel 100x2) CCT	95 99	72 vs 66	25 vs 6 p 0.002	28 vs 16m p <0.001	58 vs 42m p <0.001
Singolo vs doppio ASCT						
Attal IFM94 ²⁴³	Singolo tandem	199 200	84 vs 88	*42 vs 50	25 vs 30m p 0.03	48 vs 58m p 0.01
Cavo BO96 ²⁴⁴	Singolo tandem	163 158	NR	*33 vs 47	23 vs 35m p 0.002	65 vs 71m (ns)
Ferland MAG95 ²⁴⁵	Singolo tandem	94 99	NR	*37 vs 39	31 vs 33m	49 vs 73 m
Goldschmidt ²⁴⁶	Singolo tandem	Tot 358	NR	NR	23 vs 29	NR
Sonneveld ²⁴⁷	Singolo tandem	148 155	86 vs 90	13 vs 32 p 0.002	20 vs 22m p 0.01	50 vs 55

Note: CCT chemioterapia convenzionale, ASCT autotrapianto, ORR: risposte globali, CR remissione completa, PFS sopravvivenza libera da eventi, OS sopravvivenza globale ,TT1 *total therapy*, IFM *Intergruppe francophone du myèlome*, MRC *medical research council*, PETHEMA *programa para el estudio y tratamiento de las hemopatias malignas*, SWOG *South west oncology group*, HOVON *Hemato-oncologie voor volwassen nederland*, BO Bologna, MAG *Myèlome autogrefe*, , NR non raggiunta, NS non significativo, nCR remissione quasi completa. *: ≥ nCR

Il regime di condizionamento al trapianto autologo più largamente utilizzato è il melphalan alla dose di 200 mg/m², che si è dimostrato essere equivalente e meno tossico rispetto alla dose di 140 mg/m² associata ad irradiazione corporea totale (TBI)²⁴⁸.

Sulla base della dimostrata correlazione dose-risposta per il melphalan, nell'intento di aumentare ulteriormente la probabilità di ottenimento della CR e di prolungare la durata di controllo della malattia e l'OS, agli inizi degli anni '90 è stata introdotta nella pratica clinica la somministrazione di due linee sequenziali di chemioterapia ad alte dosi con supporto di cellule staminali (doppio trapianto autologo)²⁴⁰. Alcuni studi prospettici randomizzati di confronto del singolo vs doppio trapianto autologo condotti successivamente hanno prodotto dati in parte discordanti, probabilmente a causa di una non sufficientemente prolungata durata di osservazione.

Lo studio randomizzato francese IFM-94 ha dimostrato il beneficio clinico derivante da un doppio trapianto autologo in termini di significativo prolungamento della OS (42% a 7 anni per i pazienti che avevano ricevuto il doppio autotrapianto vs 21% per il gruppo di controllo) e della sopravvivenza libera da eventi (EFS) (20% vs 10% a 7 anni)²⁴³; d'altro canto lo studio multicentrico randomizzato italiano di fase III, "Bologna 96", ha evidenziato una maggior percentuale di CR nei pazienti randomizzati a ricevere due trapianti, ed un prolungamento significativo dell'EFS, pari a 12 mesi, per questo gruppo, senza tuttavia rilevare una differenza significativa in termini di OS²⁴⁴. In entrambi gli studi i maggiori benefici clinici del doppio trapianto autologo sono stati conseguiti nei pazienti che avevano fallito l'ottenimento di una risposta di elevata qualità (remissione completa o risposta parziale di buona qualità) dopo il primo trapianto autologo²⁴³⁻²⁴⁴.

REGIMI DI INDUZIONE

Per più di 20 anni per l'induzione al trapianto è stato utilizzato il regime polichemioterapico VAD (vincristina, adriamicina, desametasone)²⁴⁹, oggi soppiantato dall'avvento dei nuovi farmaci, dimostratisi superiori nella fase preparatoria al trapianto²⁵⁰⁻²⁵².

Talidomide è stato il primo dei nuovi farmaci ad essere integrato nel programma trapiantologico.

Esiste un'ampia convergenza di dati circa la superiorità di risposta offerta dalla combinazione talidomide-desametasone (TD) o talidomide-chemioterapia rispetto ai classici regimi VAD o VAD-simili. In tal senso uno studio caso-controllo condotto c/o il nostro Istituto, ha confrontato 135 pazienti arruolati nel protocollo "Bologna 2002"²⁵³, in cui la terapia di induzione prevedeva l'impiego di TD, con 135 pazienti arruolati nel precedente protocollo "Bologna 96", nel quale come terapia di preparazione al trapianto era utilizzato lo schema VAD. Tale studio ha dimostrato come la terapia di prima linea con TD sia superiore rispetto a VAD in termini di percentuale di ottenimento di una risposta \geq VGPR al termine della terapia di induzione (30% vs 15 %, rispettivamente, $p=0.003$), e come tale riduzione della taglia neoplastica correli anche con un significativo beneficio in termini di risposta di alta qualità dopo doppio trapianto autologo (risposta \geq VGPR rispettivamente 68% vs 49%, $p 0.001$) e di durata della

risposta (PFS a 4 anni: 51% vs 31%, p 0.001)²⁵¹.

In linea con questi risultati sono anche le conclusioni di altri studi randomizzati di fase III dimostranti la superiorità terapeutica di talidomide, associata a desametasone o a chemioterapia, applicata come terapia di induzione pre-trapianto per pazienti con MM di nuova diagnosi nei confronti dei regimi convenzionali²⁵⁴⁻²⁵⁵.

Inoltre, l'inserimento di talidomide in un programma di chemioterapia intensificata di induzione seguita da doppio trapianto autologo e chemioterapia di consolidamento (*Total Therapy 2: TT2*) ha prodotto un *rate* di CR del 62%²⁵⁶ ed un significativo prolungamento della OS (anche nei pazienti a prognosi sfavorevole per la presenza di anomalie citogenetiche)²⁵⁷; l'ultimo *update* prevedeva complessivamente una OS stimata a 10 anni del 50%²⁵⁸.

Negli ultimi anni numerosi trials clinici di fase II e III hanno esplorato l'efficacia di un regime di induzione pre-trapianto autologo comprensivo di **bortezomib**.

Tra questi, lo studio francese IFM2005-01 ha dimostrato la superiorità della combinazione bortezomib-desametasone (VD) nei confronti del regime VAD in termini di rate di risposte post induzione e post trapianto e di prolungata PFS (36 vs 29 mesi)²⁵².

L'aggiunta alla combinazione VD di un terzo farmaco chemioterapico quale doxorubicina (schema PAD) o ciclofosfamida (VCD), ha ulteriormente incrementato la probabilità di risposta e di remissione completa²⁵⁹⁻²⁶².

Di particolare interesse risulta la combinazione di bortezomib con un farmaco attivo sul microambiente midollare come talidomide. Il protocollo italiano di fase III GIMEMA MMY-3006 ha dimostrato la superiorità della tripletta bortezomib-talidomide-desametasone (VTD) vs TD, somministrata come terapia di induzione pre e consolidamento post doppio trapianto, in termini sia di rate di risposta (CR/nCR post induzione: 31% vs 11%, p = 0.0001; CR/nCR post consolidamento: 73.1% vs 60.9%, p=0.02)²⁶³ che di prolungata PFS (57 vs 42 mesi all'ultimo aggiornamento, con follow up mediano di 65 mesi)²⁶⁴. In linea coi risultati italiani è uno studio spagnolo a 3 bracci volto a comparare l'associazione VTD con regimi polichemioterapici²⁶⁵. Tali dati hanno portato all'approvazione ufficiale EMA dello schema VTD come terapia di induzione in pazienti all'esordio eleggibili alle alte dosi.

Con l'obiettivo di ridurre la tossicità, un recente studio francese ha sperimentato la stessa combinazione con dosaggi ridotti di bortezomib e talidomide (vtD), confermando l'ottenimento di ottime percentuali di risposta anche con una minor intensità di dose, con il vantaggio di un miglior profilo di tollerabilità²⁶⁶.

Tali osservazioni sono confermate da una recente metanalisi che raccoglie i dati dei 4 principali trials europei di fase 3 che hanno indagato e confrontato in maniera randomizzata l'efficacia di un regime di induzione comprensivo o meno di bortezomib nei pazienti con MM di nuova diagnosi candidati al trapianto autologo (singolo o doppio a seconda del disegno dei singoli studi). L'analisi integrata di più di 1500

pazienti ha dimostrato l'impatto positivo di una terapia bortezomib-based sul rate di risposte post induzione e post trapianto e sulla sopravvivenza libera da malattia, con un beneficio che si mantiene in sottogruppi di pazienti con caratteristiche correlate a cattiva prognosi. Nessun trial, considerato singolarmente, ha mostrato un vantaggio significativo di OS tra i vari regimi in studio, mentre l'analisi integrata, pur con i limiti di un breve follow up mediano, ha evidenziato un forte *trend* verso una prolungata sopravvivenza per i pazienti trattati con bortezomib, con una riduzione del 19% del rischio di morte²⁶⁷.

Ulteriori conferme sull'efficacia di regimi bortezomib-based derivano dal protocollo *Total Therapy 3* (TT3) del gruppo dell'Arkansas University. Lo studio consisteva in 2 cicli VTD associati a polichemioterapia secondo schema PACE (cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamide ed etoposide) somministrati sia pre- che post doppio ASCT, con successiva terapia di mantenimento della durata di tre anni (cicli mensili di VTD nel primo anno e due ulteriori anni con solo TD). Analisi a 24 mesi hanno evidenziato una nCR nell'83% dei pazienti, mantenuta nell'88% dei casi anche nei due anni successivi. La PFS, a due anni, è stata pari a 84% e OS a 86%, con prognosi peggiore nei pazienti con alti livelli di β 2-microglobulina, aumento della creatinina, LDH elevato e citogenetica con alterazioni ad alto rischio²⁶⁸. Un'analisi comparativa con TT2, protocollo impiegato in precedenza dagli stessi autori (DT-PACE), ha dimostrato - a parità di fattori prognostici al *baseline* - un prolungamento della durata della CR (mantenuta a 2 anni dal 92% dei pazienti nel TT3 vs 81% nel TT2) ed un trend verso una prolungata OS²⁶⁹.

Differenti studi hanno inoltre messo a confronto diversi regimi bortezomib-based: da una recente analisi è emerso come il regime VCD sia efficace quanto PAD in termini di risposte di elevata qualità, comportando, tuttavia, un'inferiore tossicità²⁷⁰. Lo schema VTD a sua volta si è dimostrato superiore a VCD sulla base di due studi - uno retrospettivo caso-controllo ed uno prospettico - nell'aumentare la probabilità di ottenimento di una risposta di elevata qualità, associandosi inoltre a ridotta tossicità ematologica, seppure a fronte di una aumentata incidenza di neuropatia periferica²⁷¹⁻²⁷².

Infine, è stato pubblicato anche uno studio in cui è stata valutata l'efficacia del regime VTD vs VTDC: i risultati hanno mostrato come, a fronte di una sostanziale pari efficacia nel garantire risposte di alta qualità, l'aggiunta di ciclofosfamide al regime VTD sia associata ad una maggiore tossicità e ad una diminuzione del *Global Health*²⁷³.

Gli incoraggianti risultati ottenuti con l'associazione di un inibitore del proteasoma e di un agente immunomodulante hanno portato a sperimentare la combinazione bortezomib, lenalidomide e desametasone (VRD). In un primo studio multicentrico di fase I/II tale combinazione si è dimostrata ben tollerata ed ha consentito di ottenere un rate di risposte pari al 100% nei pazienti di nuova diagnosi, con un 40% di CR/nCR²⁷⁴.

Tali dati sono stati confermati da un ulteriore studio di fase II, in cui VRD somministrato

come induzione e consolidamento post trapianto (seguito da mantenimento con lenalidomide) ha portato il 68% dei pazienti a raggiungere una negativizzazione della malattia minima residua (MRD) alla valutazione con citofluorimetria a flusso, ed a mantenere tale profondità di risposta a lungo termine: ad un follow up mediano di 39 mesi nessun paziente è risultato in progressione di malattia²⁷⁵.

Il più recente studio di fase III (SWOG S0777) ha confrontato lenalidomide e desametasone (RD) rispetto a VRD come prima linea in pazienti con MM candidabili o meno ad ASCT. Il trattamento con VRD rispetto ad RD si è associato ad un significativo prolungamento della PFS mediana (43 mesi vs 31 mesi) e della OS (75 mesi vs 64 mesi), con effetti avversi sovrapponibili (anemia, leucopenia, linfopenia, neutropenia e trombocitopenia), fatta eccezione per la neuropatia (33% in VRD rispetto al 3% in RD)²⁷⁶.

L'associazione di ciclofosfamide allo schema VRD (VDRC) ha mostrato l'efficacia di tale combinazione (risposte globali 96%, \geq nCR 60%) a prezzo tuttavia di un incremento degli eventi avversi segnalati²⁷⁷.

Sulla scia degli ottimi risultati ottenuti nel setting del MM ricaduto/refrattario, recenti studi hanno valutato regimi comprensivi di carfilzomib ed IMiDs/ciclofosfamide in prima linea; in particolare la combinazione carfilzomib-lenalidomide-desametasone (**KRd**) integrata nel contesto di un programma trapiantologico, si associa ad un alto rate di risposte profonde, con percentuali di CR dell'82% (comprensive dell'89% e 71% di MRD negatività, valutata rispettivamente con citofluorimetria e NGS)²⁷⁸.

Sono infine in corso studi randomizzati volti a valutare un eventuale beneficio derivante dall'impiego di regimi a quattro farmaci, aggiungendo un anticorpo monoclonale (daratumumab o elotuzumab) ai regimi standard (VTD/VRD).

CONSOLIDAMENTO/MANTENIMENTO POST TRAPIANTO

Il proseguimento dell'*iter* terapeutico dopo ASCT è tuttora argomento di studio e di dibattito nella comunità scientifica internazionale.

Al fine di migliorare ulteriormente la risposta ottenuta con la terapia di induzione ed il trapianto autologo, il paziente può essere avviato ad una terapia di consolidamento e/o di mantenimento.

Il **consolidamento** in particolare si basa su un regime terapeutico altamente efficace somministrato a breve termine (2-4 cicli), per limitarne la tossicità. In tali termini può essere considerato un secondo trapianto autologo, di particolare beneficio per i pazienti che non abbiano ottenuto una risposta almeno pari a VGPR dopo la prima procedura trapiantologica. Alcuni studi hanno invece testato regimi di consolidamento comprensivi di nuovi farmaci variabilmente associati tra loro.

Il ruolo di un consolidamento post trapianto autologo con bortezomib in monoterapia è stato valutato dal *Nordic Myeloma Group* nell'ambito di un protocollo randomizzato di

fase 3. Lo studio ha dimostrato un vantaggio in termini di response rate e PFS per i pazienti sottoposti a consolidamento rispetto ai pazienti randomizzati a sola osservazione, con un limitato profilo di tossicità, senza tuttavia significative differenze in OS²⁷⁹.

Alcuni studi hanno dimostrato, su piccole casistiche di pazienti, come una terapia di consolidamento con VTD, in pazienti con risposte di alta qualità dopo trapianto autologo, contribuisca a ridurre ulteriormente la taglia residua di malattia ed a determinare una remissione molecolare²⁸⁰⁻²⁸¹.

Un'analisi per-protocol del già citato studio italiano GIMEMA MMY-3006, condotta su pazienti che avessero effettivamente completato tutte le fasi terapeutiche previste, ha dimostrato come un regime di consolidamento con VTD consenta di incrementare la profondità della risposta e prolungare la PFS in grado significativamente superiore rispetto alla combinazione TD²⁸².

Due ulteriori studi francesi hanno dimostrato la probabilità di upgradare la risposta alla terapia e prolungare la sopravvivenza libera da eventi dopo consolidamento secondo schema VTD o VRD^{275,283}.

Risultati ancora migliori, seppur preliminari, emergono da studi di fase II tuttora in corso che propongono combinazioni con carfilzomib, steroidi e talidomide²⁸⁴ (KTD) o lenalidomide²⁸⁵ (KRD): il regime KTD consente di ottenere una CR nel 63% dei casi, mentre il consolidamento con KRD incrementa il rate di sCR sino al 90%, con raggiungimento di una MRD-negatività in un'alta percentuale di pazienti.

In linea generale attualmente il consolidamento viene comunque considerato uno standard per migliorare ulteriormente la qualità della risposta e tendenzialmente ricalca la terapia utilizzata in induzione.

In aggiunta può essere considerata una terapia di **mantenimento**, finalizzata a conservare nel tempo la risposta ottenuta, utilizzando farmaci a bassi dosaggi, per un periodo di tempo prolungato (almeno 1-2 anni). Le principali opzioni attuali per la terapia di mantenimento, dopo il fallimento in quest'ambito dell'*Interferon* (IFN) e dei corticosteroidi, sono ancora una volta IMiDs e PI²⁸⁶⁻²⁸⁷.

Diversi studi hanno dimostrato il beneficio sulla PFS di talidomide come agente singolo o associato al prednisone nella terapia di mantenimento dopo ASCT, ma solo in due di questi è emerso un prolungamento della OS²⁸⁸⁻²⁹². La riduzione nell'incidenza di relapse è stata tuttavia osservata solo per la popolazione a basso rischio citogenetico. In aggiunta, occorre considerare la possibile comparsa di effetti tossici correlati alla prolungata esposizione a talidomide ed in particolare lo sviluppo di polineuropatia, che spesso altera la qualità di vita dei pazienti e porta ad interruzione del trattamento.

Alcuni dati sull'impiego di bortezomib in mantenimento derivano dal protocollo HOVON-65/GMMG-HD4, che metteva a confronto induzione con VAD vs PAD in pazienti eleggibili ad ASCT, seguita da terapia a lungo termine con talidomide vs

bortezomib. Dall'analisi dello studio è emerso un significativo prolungamento della PFS per pazienti trattati con PAD e poi sottoposti a mantenimento con bortezomib (34 vs 28 mesi, HR 0.77; p= 0.001) rispetto alla combinazione VAD-talidomide, con un vantaggio in termini di OS per pazienti ad alto rischio citogenetico per presenza di del(17p)²⁵⁹.

Similmente, il gruppo spagnolo ha sperimentato 3 diverse opzioni di mantenimento post ASCT: interferon-alfa, talidomide in monoterapia o in associazione a bortezomib, dimostrando il massimo vantaggio in termini di PFS per quest'ultima combinazione²⁶⁵.

I dati più consolidati sul mantenimento derivano dall'impiego di lenalidomide, che appare essere un candidato ideale per terapia di lunga durata in virtù della sua formulazione orale e del profilo di tossicità accettabile.

Tre trial hanno già dimostrato un prolungamento della PFS per i pazienti randomizzati a ricevere lenalidomide (5-15 mg/die) vs placebo, dopo singolo o doppio ASCT²⁹³⁻²⁹⁴ o a seguito della randomizzazione tra ASCT e sola terapia di prima linea con melphalan-prednisone-lenalidomide²⁹⁵. La recentissima analisi combinata dei 3 studi sopracitati, ha dimostrato un significativo prolungamento della OS in pazienti sottoposti a mantenimento con lenalidomide, seppur meno pronunciato in pazienti con alto rischio citogenetico basale, senza evidenza di una significativa aumentata incidenza di sviluppare seconde neoplasie associate ad una prolungata somministrazione (dopo i primi, non univoci, report a questo riguardo). Questi risultati hanno determinato l'approvazione ufficiale da parte di FDA ed EMA per un mantenimento con lenalidomide in pazienti sottoposti a trapianto autologo in prima linea²⁹⁶.

Risultati promettenti, ancora preliminari, sembrano provenire da un mantenimento con ixazomib²⁹⁷ o anticorpi monoclonali.

5.2.2 PAZIENTE NON CANDIDABILE A TRAPIANTO AUTOLOGO

Per il paziente con MM di nuova diagnosi che per età, comorbidità o altri fattori, non risulti candidabile al trapianto di cellule staminali, vi sono numerose soluzioni terapeutiche. Occorre tuttavia eseguire prima una corretta valutazione del livello di vulnerabilità dei pazienti anziani che possa fornire una stima della fattibilità di un determinato trattamento e che risulti predittiva del rischio di tossicità e di mortalità ad esso collegato²⁹⁸. A tale scopo esistono specifiche scale geriatriche che valutano la concomitante presenza di malattie croniche o altre condizioni patologiche, o che stimano le riserve funzionali/cognitive ed il grado di indipendenza mantenuto dal paziente. L'integrazione di questi dati permette di stratificare il paziente anziano in differenti categorie di "idoneità", alle quali potranno corrispondere trattamenti diversificati al fine di ridurre il rischio di complicanze/disabilità, incrementare la tolleranza e l'efficacia delle terapie, mantenendo in ogni caso una buona qualità di vita. Per i pazienti considerati "fit" l'approccio attuale prevede combinazioni di IMiDs e/o PIs *full dose* in associazione a steroidi/chemioterapici convenzionali o molecole

sperimentali (ove possibile). I pazienti “**unfit**” necessitano di riduzione dei dosaggi farmacologici e di schemi terapeutici semplificati; per i pazienti “**frail**” è indicato l'utilizzo di sole terapie palliative/di supporto²⁹⁹.

Lo schema melphalan-prednisone (MP) ha costituito per anni l'unica opzione terapeutica per il paziente anziano in grado di determinare una risposta in almeno il 50% dei casi, senza tuttavia migliorare la sopravvivenza dei pazienti¹³⁰.

L'introduzione dei nuovi farmaci ha consentito di ottenere invece un significativo incremento di PFS, OS e del rate di risposta³⁰⁰.

Le prime evidenze in letteratura derivano dall'aggiunta di **talidomide** allo schema MP³⁰¹⁻³⁰³. Un'ampia metanalisi di 6 diversi studi randomizzati, pur con i limiti dovuti all'eterogeneità dei differenti trials per caratteristiche dei pazienti arruolati e schemi posologici, ha dimostrato come il regime talidomide-melphalan-prednisone (MPT) correli significativamente con incremento del rate di risposte, un prolungamento della PFS ed un vantaggio in OS pari a circa 6 mesi se comparata al regime MP³⁰⁴.

Secondo dei nuovi farmaci ad essere introdotto nella terapia di prima linea del paziente non candidabile ad ASCT, **bortezomib** è stato valutato inizialmente nel protocollo internazionale prospettico di fase 3 VISTA. Lo studio ha dimostrato che la combinazione bortezomib-melphalan-prednisone (VMP), con somministrazioni bisettimanali di bortezomib, è correlata ad una maggior probabilità di CR e ORR rispetto al regime MP e, di conseguenza, prolungate TTP e OS (24 vs 16.6 mesi, $p < 0.001$ e 56.4 vs 43.1 mesi, $p = 0.0004$, rispettivamente), con un rischio di mortalità ridotto del 31%². In considerazione dei risultati ottenuti, il regime VMP si è affermato come *standard of care* per il paziente con età ≥ 65 anni in molti paesi. Studi successivi hanno poi esplorato una schedula di infusione di bortezomib monosettimanale, riuscendo a dimostrare come una ridotta frequenza di somministrazione si associ ad un migliore profilo di tossicità, in particolare con ridotta incidenza di neuropatia periferica, che si traduce in una maggior “compliance” al trattamento (minor necessità di interruzione o riduzione dei dosaggi per eventi avversi) e che di fatto consente di mantenere una adeguata intensità di dose e non compromettere pertanto l'efficacia terapeutica³⁰⁵⁻³⁰⁶.

Ulteriori studi hanno valutato le associazioni di bortezomib con talidomide-prednisone (VTP), o con melphalan-prednisone-Talidomide (VMPT) confermando nei pazienti anziani l'efficacia delle combinazioni comprensive di bortezomib³⁰⁷⁻³⁰⁸.

Per quanto riguarda l'utilizzo di **lenalidomide** in prima linea, esistono evidenze - derivanti da casistiche miste di pazienti candidabili o meno ad ASCT - della sua efficacia in associazione a steroidi³⁰⁹, in particolare con un vantaggio in OS per chi riceve desametasone a basse dosi (schema Rd)³¹⁰.

Tuttavia, l'approvazione ufficiale dagli enti regolatori della combinazione Rd in prima linea è derivata dal *trial* randomizzato di fase III FIRST (MM020). Lo studio ha

confrontato l'efficacia della combinazione standard MPT vs un trattamento con Rd somministrato per un numero fisso di cicli (Rd-18) o in maniera continuativa sino a progressione di malattia (*continuous treatment*, CT). I dati emersi evidenziano come Rd somministrata in CT si associ ad un miglioramento nella PFS sia rispetto ad Rd-18 che a MPT (questi 2 ultimi regimi hanno infatti un andamento molto simile), ad un vantaggio in termini di OS (59% vs 51% per MPT con un follow up mediano di 37 mesi) e ad una ridotta incidenza di eventi avversi di grado 3-4 (70 vs 78%)³¹¹.

Recentemente è stato pubblicato uno studio volto a valutare l'eventuale beneficio derivante dall'aggiunta di un alchilante nell'ambito di un regime a tre farmaci lenalidomide-*based* vs Rd: le combinazioni melphalan-lenalidomide-prednisone (MPR) o ciclofosfamide-lenalidomide-prednisone (CPR) non hanno mostrato correlare con vantaggio sugli *endpoints* di sopravvivenza rispetto a Rd, a fronte - per gli schemi comprensivi di alchilante - di una maggiore tossicità ematologica³¹².

Nel già citato studio SWOG S0777, la combinazione bortezomib-lenalidomide-desametasone (VRd) si è rivelata superiore in termini di ORR, PFS e OS rispetto a solo Rd anche nel paziente anziano, con una sostanziale sovrapposibilità tra i 2 tipi di trattamento per quanto riguarda la tossicità ematologica riportata, ma con aumentata incidenza di neuropatia periferica per chi ha ricevuto bortezomib²⁷⁶. Tali dati possono far ipotizzare che lo schema VRd potrà diventare nel prossimo futuro un nuovo *standard of care* per i pazienti non eleggibili ad ASCT.

Un'ulteriore proposta terapeutica in questo setting di pazienti è l'associazione di **carfilzomib**-ciclofosfamide-desametasone, somministrata per 9 cicli mensili, seguita poi da mantenimento con carfilzomib, che ha dimostrato (in uno studio multicentrico di fase II) l'ottenimento di un ORR del 96% (comprensivo di un 20% di sCR), PFS e OS stimate a 2 anni del 76% e 87%, rispettivamente, ed un profilo di tossicità accettabile³¹³. Risultati ancora migliori sembrano provenire dalla combinazione carfilzomib-Rd, che in alcuni studi di fase I/II ha fatto registrare altissimi rate di risposte profonde, ed una sopravvivenza a 2 anni superiore al 90%. Tali dati necessitano tuttavia di essere validati da studi di fase III, tuttora in corso²⁷⁸.

Sono in corso infine ulteriori trials clinici volti ad indagare l'efficacia di nuovi PI (ad esempio ixazomib) e l'associazione di anticorpi monoclonali (come elotuzumab e daratumumab) agli schemi terapeutici convenzionalmente impiegati nella pratica clinica quotidiana per i pazienti anziani all'esordio di malattia.

5.3 TERAPIA DEL PAZIENTE CON MIELOMA MULTIPLO RICADUTO/REFRATTARIO

Come già sottolineato nei paragrafi precedenti, l'introduzione dei nuovi farmaci nella terapia del MM ha incrementato notevolmente la qualità e la durata della risposta terapeutica; ciò nonostante la storia naturale continua ad essere caratterizzata dall'alternanza di periodi di remissione seguiti inevitabilmente da fasi di ripresa di malattia. Nel tempo le risposte ai trattamenti si fanno sempre più insoddisfacenti e le ricadute più frequenti, finché la malattia non entra nella fase finale definita come ricaduta-refrattaria, caratterizzata da una pressoché totale farmaco resistenza. Gli IMiDs ed i PI hanno rivoluzionato il trattamento anche in questa categoria di pazienti, aumentando notevolmente l'*overall survival* (OS) rispetto all'utilizzo del solo Desametasone ad alte dosi³¹⁴⁻³¹⁵.

Per scegliere la migliore strategia terapeutica occorre bilanciare adeguatamente efficacia e tossicità, prendendo in considerazione:

- fattori paziente-relati: età, *performance status*, funzionalità renale, riserva midollare, precedenti esposizioni ai farmaci antitumorali, tossicità residue dalle precedenti terapie, neuropatia periferica, rischio tromboembolico;
- caratteristiche del MM alla ricaduta: malattia indolente o aggressiva, presenza di anomalie citogenetiche ad alto rischio come del(17p) o t(4;14) o ampl(1q21), malattia extramidollare, evoluzione a leucemia plasmacellulare;
- precedente storia di terapia: numero di precedenti linee terapeutiche, tipologia di farmaci utilizzati, qualità e durata della risposta ottenuta.

Attualmente, al momento della ricaduta abbiamo la possibilità di scegliere tra numerose differenti strategie terapeutiche: di solito si privilegiano inizialmente terapie comprensive di IMiDs e PI, seguendo il principio generale di somministrare la classe di farmaci che il paziente non ha già sperimentato in prima linea; si può effettuare un *retreatment* o *rechallenge* con la medesima molecola o classe di molecole utilizzate nella terapia precedente in pazienti dimostratisi già responsivi a tali farmaci; per il paziente fit e con età inferiore a 65-70 anni può rappresentare una valida opzione il trapianto autologo di salvataggio (se la durata di risposta con il primo ASCT è stata sufficientemente lunga ed è stata ottenuta una buona qualità di risposta); da ultimo, l'arruolamento in trials clinici dà la possibilità di accedere a molecole di nuova generazione³¹⁵⁻³¹⁷.

La prognosi dei pazienti che sono già stati esposti sia a lenalidomide che a bortezomib e che hanno sviluppato resistenza ad entrambi (*double-refractory* MM) era fino a qualche tempo fa assolutamente infausta, con OS e PFS mediane di 9 e 5 mesi rispettivamente³¹⁸. L'outcome di tali pazienti è migliorato grazie ai recenti e significativi progressi compiuti nella conoscenza della biologia del mieloma, che hanno portato

all'identificazione di nuovi possibili target terapeutici ed al conseguente sviluppo di molecole di nuova generazione con miglior profilo di tollerabilità e diversi meccanismi d'azione. Una pletora di nuovi farmaci, in grado di bersagliare specifici pathways coinvolti nella crescita e sopravvivenza della cellula tumorale, è stata pertanto estensivamente studiata negli ultimi anni sia a livello preclinico che clinico; alcune di queste molecole hanno raggiunto la sperimentazione di fase 3 o hanno già ricevuto l'approvazione ufficiale da parte degli enti regolatori in virtù della loro dimostrata efficacia. Tali molecole offrono la prospettiva di un armamentario terapeutico ancora più ampio dal quale attingere per creare combinazioni di farmaci in grado di migliorare ulteriormente la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti con mieloma ricaduto/refrattario¹³⁵.

Esponiamo brevemente di seguito i principali farmaci attualmente utilizzati in questo sottogruppo di pazienti.

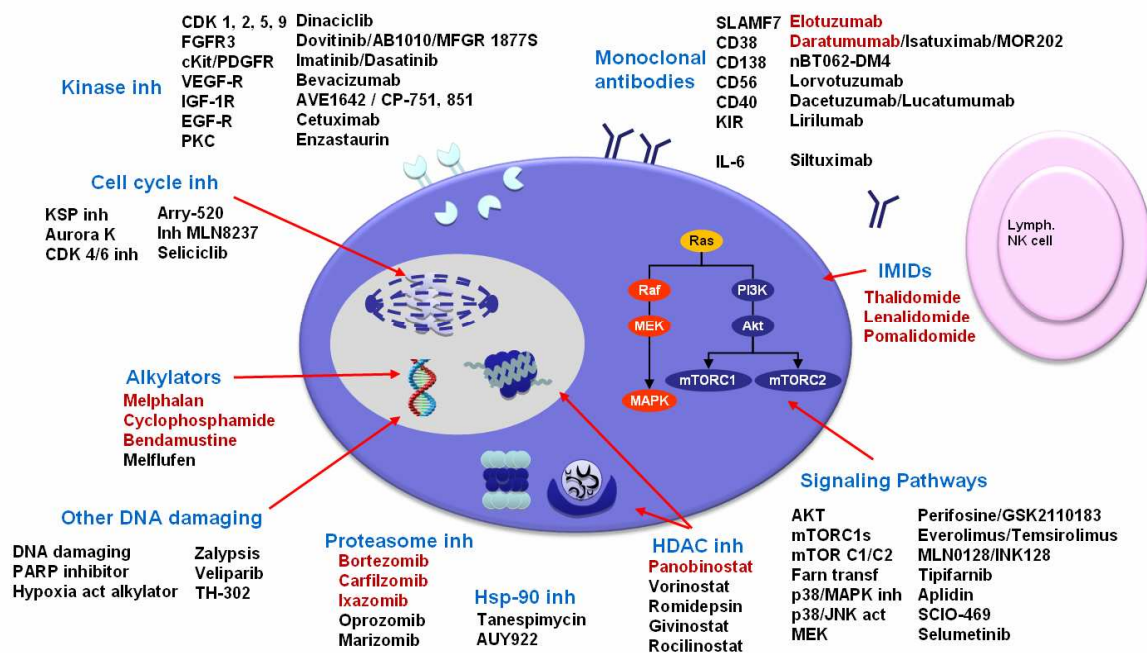


Figura 9: Nuovi farmaci approvati (in rosso) o in sperimentazione clinica per il MM

➤ Lenalidomide

Le prime evidenze dell'efficiacia di lenalidomide in combinazione con desametasone (Rd) nel setting del RRMM derivano da 2 trial di fase III (MM009³¹⁹ e MM010³²⁰) condotti in parallelo (uno negli Usa, l'altro in Europa e Australia), riservati a pazienti sottoposti ad almeno una precedente linea di terapia. Gli studi hanno prodotto risultati del tutto sovrapponibili, con evidenza di una significativa superiorità della combinazione Rd rispetto a desametasone associato a placebo, in termini di response rate, TTP e OS. Sulla base di questi 2 studi, nel 2006 Rd è stato ufficialmente approvato per il trattamento di pazienti con RRMM dopo almeno una linea di terapia. Una

successiva analisi combinata dei 2 protocolli con un follow up aggiornato a 48 mesi ha confermato quanto emerso dalle prime analisi, con ORR del 60% per il braccio Rd vs 22% nel braccio desametasone ($p < 0.001$), TTP 13.4 vs 4.6 mesi ($p < 0.001$) e OS mediana 38 vs 31.6 mesi ($p=0.045$)³²¹. L'ampia casistica di pazienti derivante dall'analisi combinata dei 2 trial ha reso possibili numerose sottoanalisi volte a definire l'ottimale timing e durata della terapia con Rd e a fornire indicazioni su eventuali aggiustamenti posologici³²²⁻³²³.

La combinazione Rd rappresenta uno dei backbone per le innovative combinazioni a 3 farmaci comprensive di PIs di seconda generazione e/o anticorpi monoclonali.

➤ **Bortezomib**

Bortezomib, capostipite della famiglia degli inibitori del proteasoma, è stato il primo dei nuovi farmaci ad essere approvato da FDA e da EMA per il trattamento del mieloma refrattario. L'approvazione è avvenuta a seguito di due trial di fase 2 (SUMMIT³²⁴ e CREST³²⁵) in pazienti refrattari all'ultima linea di terapia ricevuta. Bortezomib veniva somministrato ev in monoterapia a cadenza bisettimanale, con possibilità di aggiungere desametasone in caso di progressione dopo i primi 2 cicli di trattamento oppure in caso di una stabilità di malattia dopo 4 cicli. Entrambi gli studi hanno evidenziato un rate di risposte almeno PR pari al 30% circa ed una TTP di 7-11 mesi. L'aggiunta di desametasone ha determinato un incremento della risposta nel 18% e 33% dei pazienti. Il successivo studio di fase 3, APEX, ha sancito la superiorità di bortezomib in monoterapia rispetto a desametasone ad alte dosi, in termini di ORR, TTP e OS³²⁶. Un'analisi updatata con follow up mediano di 22 mesi ha confermato il vantaggio di bortezomib, con TTP mediana 6.2 vs 3.5 mesi e prolungata sopravvivenza (30 vs 24 m) nonostante più del 60% dei pazienti nel braccio desametasone abbia poi ricevuto bortezomib al momento della progressione³²⁷. Nel 2005 bortezomib è stato approvato single agent per pazienti con almeno una linea precedente di terapia.

Da allora numerosi studi hanno mostrato l'efficacia di bortezomib in combinazione con desametasone³²⁸⁻³²⁹, IMiDs³³⁰, doxorubicina³³¹ e bendamustina³³²⁻³³³.

Bortezomib-desametasone è attualmente considerato uno standard of care per la terapia del MMRR e la base di partenza per la costruzione di combinazioni volte ad esplorare l'efficacia di nuove molecole.

➤ **Pomalidomide**

Studi clinici hanno dimostrato come pomalidomide, associata a desametasone (Pd), sia efficace nei pazienti con RRMM, con un livello di risposta pari al 63% dei pazienti in studio, anche quando refrattari a lenalidomide e bortezomib¹⁶⁰. La schedula di somministrazione di pomalidomide alla dose di 4mg/die per 21 giorni consecutivi in cicli di 28 giorni, è stata definita sulla base di uno studio randomizzato di fase II che ha

dimostrato come tale schema risultasse correlare, rispetto alla somministrazione continuativa, con pari efficacia e minore tossicità (mielosoppressione)³³⁴.

L'approvazione da parte di FDA ed EMA dello schema PD è avvenuta nel 2013 in seguito ai risultati dello studio randomizzato di fase III, MM-003: esso confrontava pomalidomide associato a desametasone a basse dosi rispetto al desametasone ad alte dosi in monoterapia, verificandone efficacia e profilo di tossicità, in pazienti refrattari a bortezomib e lenalidomide. Pd si è dimostrato superiore al desametasone ad alte dosi, in una popolazione di pazienti pesantemente pretrattati, in termini di PFS (4 vs 1.9 mesi) e di OS (13.1 vs 8.1 mesi)¹⁶¹.

L'attuale indicazione EMA e AIFA per Pd è rappresentata da pazienti con RRMM sottoposti ad almeno due precedenti linee di terapia comprensive di bortezomib e lenalidomide e con dimostrata progressione di malattia durante l'ultima linea ricevuta.

➤ **Carfilzomib**

Numerosi *trials* hanno dimostrato la sua capacità di influire positivamente sulla prognosi del paziente con RRMM. Inizialmente somministrato in monoterapia, è stato poi associato a numerose altre molecole, al fine di individuare schemi di maggiore efficacia terapeutica. Due ampi trials randomizzati di fase III hanno recentemente dimostrato, in pazienti sottoposti a 1-3 precedenti linee di terapia, la superiorità del regime a due farmaci **Kd** rispetto alla combinazione comprensiva del PI di prima generazione Vd (studio ENDEAVOR)²⁰⁶ e del regime a tre farmaci **KRd** rispetto al regime a due farmaci Rd (studio ASPIRE)²⁰⁵. In particolare, Kd è risultato superiore a Vd riportando un vantaggio di PFS pari a 18.7 vs 9.4 mesi, ed un incremento del ORR (77% vs 63%) e del CR rate (13% vs 6%). Analogamente la combinazione KRd è risultata correlare rispetto a Rd con significativo aumento della PFS (rispettivamente 26,3 mesi vs 17,6 mesi), aumentato ORR (87% vs 66%) e CR rate (32% vs 9%). Nonostante una maggiore incidenza di effetti avversi di grado ≥ 3 in KRd, la qualità della vita si è dimostrata superiore in questo schema rispetto al semplice Rd. Lo studio ASPIRE ha pertanto rivelato come l'aggiunta di carfilzomib ad Rd nel paziente RRMM porti ad un incremento significativo della PFS, con un favorevole profilo rischio/beneficio²⁰⁵.

Sulla base di tali risultati il Carfilzomib è stato recentemente approvato da FDA e da EMA, in combinazione con Desametasone o con Rd, per il trattamento di pazienti con RRMM che abbiano ricevuto almeno una precedente linea di terapia.

➤ **Ixazomib**

Il regime a tre farmaci derivante dalla combinazione di Ixazomib a Rd si è recentemente dimostrato superiore rispetto al regime a due farmaci Rd, nell'ambito di pazienti con RRMM sottoposti a 1-3 precedenti linee di terapia, sulla base dello studio di fase III

randomizzato in doppio cieco TOURMALINE²¹³. In particolare, IxaRd è risultato correlare rispetto a Rd con significativo vantaggio di PFS (20,6 mesi *versus* 14,7 mesi) e aumentato CR rate (12.7% *vs* 7%). Sulla base dello studio TOURMALINE la combinazione IxaRd è stata approvata dalla FDA e EMA per il trattamento dei pazienti con RRMM sottoposti ad almeno una precedente linea di terapia.

➤ **Daratumumab**

Daratumumab agente singolo ha dimostrato elevata efficacia, nell'ambito di studi di fase II, nel trattamento del RRMM in fase avanzata di malattia, riportando in un gruppo di pazienti con una mediana di 5 precedenti linee di terapia un tasso di risposta complessivo del 31%, con una mediana di PFS pari a 4 mesi e soprattutto una OS pari a 20,1 mesi, significativamente superiore a quella classicamente nota in tale *setting* di malattia avanzata^{224,229}.

Inoltre, due ampi *trials* randomizzati hanno valutato l'aggiunta di Daratumumab a Rd (studio POLLUX) e Vd (studio CASTOR), nell'ambito di pazienti con RRMM sottoposti a 1-3 precedente linea di terapia²³⁰⁻²³¹. Dara-Rd rispetto a Rd è risultato correlare con significativo vantaggio di PFS, 76% *vs* 49% a 18 mesi, e con risposte profonde, riportando rispettivamente un CR *rate* pari al 46% *vs* 20%. Analogamente, Dara-Vd nei confronti di Vd, si è tradotto in una prolungata PFS (60% *vs* 22% a 12 mesi), e aumentato *rate* di risposte globali e complete (CR *rate* 26% *vs* 10% rispettivamente).

Daratumumab è stato pertanto approvato da FDA e EMA come agente singolo nel trattamento di pazienti con RRMM già trattati con PI e IMiDs e con dimostrata progressione all'ultima linea di terapia; e in associazione a Rd o Vd per pazienti con RRMM sottoposti ad almeno una precedente linea di terapia.

➤ **Elotuzumab**

Elotuzumab somministrato come agente singolo si è rivelato inefficace nel migliorare il *rate* di risposte dei pazienti con RRMM o ridurre l'incidenza di relapse³³⁵.

Differenti risultati sono invece emersi quando indagato in combinazione.

A tal proposito, lo studio ELOQUENT-2²³⁴, *trial* randomizzato di fase III, ha confrontato il regime a tre farmaci derivante dalla combinazione di Elotuzumab con Rd *vs* il regime a due farmaci standard Rd, nel trattamento di pazienti con RRMM sottoposti a 1-3 precedenti linee di terapia. Ancora una volta il regime a tre farmaci si è associato ad un vantaggio significativo, riportando per Elo-Rd *vs* Rd un prolungamento della PFS pari a 19,4 mesi *versus* 14,9 mesi.

Elotuzumab è stato pertanto approvato FDA e EMA in combinazione con Rd per il trattamento di pazienti con RRMM sottoposti ad almeno una precedente linea di terapia.

➤ **Panobinostat**

La combinazione Panobinostat con Vd (Pan-Vd) è stata confrontata con Vd nell'ambito di un trial randomizzato di fase III, per pazienti con RRMM sottoposti a 1-3 precedenti linee di terapia (PANORAMA 1)²¹⁸.

Il razionale di questa scelta sta nell'ipotesi di un sinergismo d'azione tra l'inibizione del proteasoma, il conseguente accumulo di proteine da degradare e l'attivazione di una via di degradazione alternativa: quest'ultima coinvolge il trasporto delle suddette proteine alterate e aggregate fra di loro in una struttura cellulare - recentemente identificata - nota come "aggresoma" e distruzione delle stesse tramite autofagia. I risultati dello studio PANORAMA hanno riportato un vantaggio derivante dalla combinazione Pan-Vd rispetto a Vd in termini di percentuale di risposte complete (27.6% vs 15.7%; $p < 0.001$) e di PFS (12 vs 8 mesi, HR 0.63, 95% CI 0.52-0.76; $p < 0.0001$), particolarmente evidente ad una analisi per sottogruppi nei pazienti che avessero già ricevuto almeno due precedenti linee di terapia, comprensive di PI e IMiD, da cui deriva l'attuale approvazione FDA e EMA. Tuttavia, l'aggiunta di Panobinostat si associa anche a un'aumentata incidenza di eventi avversi tra cui trombocitopenia, linfopenia, diarrea, astenia e neuropatia periferica.

6. RAZIONALE DELLO STUDIO

La chemioterapia ad alte dosi con supporto di cellule staminali emopoietiche (ASCT) rappresenta da almeno 20 anni lo standard terapeutico per i pazienti con mieloma multiplo di età inferiore a 65 anni. La più recente disponibilità di farmaci di nuova generazione attivi contro il microambiente midollare (come agenti immunomodulanti e inibitori del proteasoma) e la loro progressiva integrazione nel percorso trapiantologico, sia come terapia di induzione pre- che come consolidamento post-trapianto, ha consentito di migliorare significativamente il rate e la profondità delle risposte ottenute e di prolungare la sopravvivenza dei pazienti.

Parimenti, un miglior outcome è stato osservato in pazienti anziani o non candidabili alla terapia ad alte dosi, per i quali la combinazione di chemioterapia convenzionale e nuovi farmaci (in particolare bortezomib, schema VMP) si è tradotta in un rate di remissioni complete paragonabili a quanto dimostrato post ASCT in era pre-nuovi farmaci, una significativa riduzione dell'incidenza di ricaduta di malattia ed un prolungamento della sopravvivenza globale.

Questi dati brillanti pongono il quesito se il trapianto autologo rimanga lo *standard of care* per il paziente giovane, o se gli stessi risultati in termini di outcome non possano essere raggiunti con la sola applicazione di regimi terapeutici basati su nuovi farmaci.

L'esigenza di investigare prospetticamente il ruolo ed il corretto timing del trapianto autologo nell'era dei nuovi farmaci, e quindi ridefinire la strategia terapeutica ottimale per il paziente giovane, ha portato al trial clinico EMN02/HOVON65 (EudraCT number: 2009-017903-28), uno studio multicentrico, internazionale di fase III, che ha visto la partecipazione di 15 diversi paesi europei, circa 60 centri italiani, e l'arruolamento di oltre 1500 pazienti di età <65 anni con mieloma all'esordio.

Lo studio prevedeva una prima fase terapeutica di induzione con bortezomib-ciclofosfamide-desametasone, seguita da mobilitazione e raccolta di cellule staminali emopoietiche del sangue periferico. I pazienti venivano poi sottoposti ad una prima randomizzazione (R1) tra terapia di intensificazione con bortezomib-melphalan-prednisone (schema VMP) o melphalan ad alte dosi ed ASCT. Per i centri con una *policy* di doppio trapianto la randomizzazione era pianificata in rapporto 1:1:1 tra VMP e singolo trapianto (ASCT-1) o doppia procedura (ASCT-2). Al termine della fase di intensificazione era programmata una seconda randomizzazione a ricevere terapia di consolidamento con bortezomib-lenalidomide-desametasone vs nessun consolidamento, seguita da mantenimento con basse dosi di lenalidomide per tutti i pazienti sino a progressione di malattia o intolleranza.

Nel presente elaborato saranno riportati i dati relativi alla seconda analisi ad interim dello studio, con particolare riferimento alla prima randomizzazione.

8. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo studio si proponeva di:

- comparare l'efficacia in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS) della terapia di intensificazione con VMP *versus* terapia ad alte dosi e trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche
- valutare l'effetto sulla PFS della terapia di consolidamento con VRD seguita da mantenimento con lenalidomide *versus* solo mantenimento
- confrontare l'efficacia di un singolo contro un doppio trapianto autologo
- valutare il rate di risposte globali (ORR) e di alta qualità (CR+VGPR) dopo terapia di induzione, intensificazione con VMP o trapianto autologo, dopo consolidamento ed in corso di mantenimento
- valutare la sopravvivenza globale (OS)
- valutare la frequenza e la severità della tossicità correlata alla terapia, sia di tipo ematologico che extramidollare
- valutare l'impatto sulla PFS di fattori prognostici presenti al baseline (come elevati livelli di β 2-microglobulina sierica, alterazioni citogenetiche ad alto rischio) nella popolazione generale e nei diversi gruppi di trattamento
- valutare la qualità di vita

Studi correlativi:

- confermare l'impatto dell'interessamento scheletrico (documentato al *baseline* con 18-FDG-TC/PET totale corporea) sull'outcome clinico, in termini di durata di remissione, PFS e OS
- valutare la correlazione tra interessamento scheletrico alla TC/PET ed altri fattori prognostici (in particolare presenza di alterazioni citogenetiche e molecolari)
- valutare l'impatto su PFS ed OS di una risposta metabolica completa alla PET dopo terapia di induzione, trapianto autologo e consolidamento
- valutare l'impatto prognostico di profili di espressione genica (GEP) sull'ORR dopo terapia di induzione e nei diversi bracci di randomizzazione.
- validare il ruolo prognostico di una remissione completa stringente e della malattia minima residua (MRD) valutata con citofluorimetria a flusso in pazienti con mieloma di nuova diagnosi trattati con nuovi farmaci

Endpoint primari

- valutare la PFS per tutti i pazienti inclusi nello studio
- confrontare la PFS nei pazienti inclusi nella prima randomizzazione (R1)
- confrontare la PFS nei pazienti inclusi nella seconda randomizzazione (R2)

Endpoint secondari

- confrontare l'efficacia in termini di PFS tra singolo e doppio trapianto autologo
- valutare il rate di risposte e la loro qualità nel corso del trattamento
- valutare l'OS dall'inizio del trattamento, da R1 e da R2

9. MATERIALI E METODI

9.1 ELEGGIBILITA' ALLO STUDIO

I pazienti, al fine di essere arruolabili nel protocollo, dovevano rispettare le caratteristiche sotto elencate.

CRITERI DI INCLUSIONE

- Diagnosi di MM all'esordio, sintomatico per presenza di danno d'organo secondo i criteri CRAB
- Malattia misurabile (definita dalla presenza di CM sierica > 10g/L o CM urinaria >200 mg/24h o rapporto delle sFLC alterato con catena coinvolta in concentrazione > 100mg/L) o documentazione istologica di plasmocitoma
- Età compresa tra i 18 e i 65 anni
- WHO performance status 0-3 (con grado 3 accettabile solo se causato da MM e non secondario ad altre comorbidità presenti)
- Test di gravidanza negativo, se applicabile
- Capacità di firmare il consenso informato alla terapia

CRITERI DI ESCLUSIONE

- Amiloidosi AL sistemica
- Leucemia Plasmacellulare
- MM non-secernente
- Precedente trattamento chemioterapico e/o radioterapico
- Scompenso cardiaco (stadio NYHA II-IV)
- Disfunzione epatica severa (bilirubina sierica \geq 30mmol/L o transaminasi superiori a 2,5 volte il rispettivo valore di riferimento massimo, escluse alterazioni secondarie a localizzazione di MM)
- Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) \leq 15ml/min
- Pazienti HIV positivi
- Pazienti con infezioni attive, non controllate
- Pazienti con neuropatia basale di grado \geq 2 (*Common Toxicity Criteria*)
- Pazienti con neoplasie maligne attive nel corso degli ultimi 5 anni (ad eccezione di

carcinoma cervicale stadio 0 e carcinoma squamoso basocellulare)

- Donne fertili non complianti/impossibilitate ad eseguire terapia contraccettiva o in fase di allattamento

ELEGGIBILITA' ALLA PRIMA RANDOMIZZAZIONE (R1)

- WHO performance status 0-2
- Raccolta di un quantitativo di progenitori staminali ematopoietici superiore a 4×10^6 CD34+/kg
- Bilirubina e transaminasi < 2.5 volte il limite superiore di riferimento
- Assenza di grave patologia polmonare, neurologica o psichiatrica
- Assenza di PNP di grado ≥ 3 , secondaria a bortezomib
- Assenza di progressione di malattia

ELEGGIBILITA' ALLA SECONDA RANDOMIZZAZIONE (R2)

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

9.2 DISEGNO DELLO STUDIO

Il protocollo EMN02/HOVON65 è uno studio prospettico, internazionale multicentrico, randomizzato, di fase 3, riservato a pazienti con MM di nuova diagnosi ed età ≤ 65 anni, articolato su 5 distinte fasi terapeutiche (schematizzate nella figura 10).

Induzione

Tutti pazienti arruolati nel protocollo ricevevano una terapia di induzione con 3-4* cicli, della durata di 21 giorni ciascuno, comprensivi di bortezomib-ciclofosfamide-desametasone (VCD), somministrati secondo la schedula sotto riportata.

Farmaco	Dose (singola)	Somministrazione	Giorno
Bortezomib	1.3 mg/m ²	Intravenosa / Sottocutanea*	1,4,8,11
Ciclofosfamide	500 mg/m ²	Intravenosa	1,8
Desametasone	40 mg	Orale	1,2,4,5,8,9,11,12

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

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

Mobilizzazione raccolta progenitori emopoietici

Al termine della terapia di induzione i pazienti venivano avviati a terapia infusione con ciclofosfamide (4-2 g/m²*) associata a fattore di crescita granulocitario (G-CSF), somministrato a partire dal 5° giorno post ciclofosfamide e proseguito sino ad avvenuta raccolta delle cellule staminali emopoietiche circolanti (PBSC). La soglia minima di raccolta era fissata a 4x10⁶/kg cellule CD34+, quantitativo ritenuto sufficiente a supportare due linee sequenziali di chemioterapia ad alte dosi.

Intensificazione (prima randomizzazione, R1)

In seguito alla raccolta di PBSC, i pazienti venivano sottoposti ad una prima randomizzazione (R1) tra terapia di intensificazione con bortezomib-melphalan-prednisone (schema VMP) o 1-2 linee sequenziali di melphalan ad alte dosi (HDM) con trapianto di cellule staminali emopoietiche (ASCT). La randomizzazione era pianificata in rapporto 1:1 tra VMP e ASCT nei centri ematologici con una politica fissa di un solo trapianto (ovvero la maggior parte dei centri europei) o su base 1:1:1 tra VMP e 1 o 2 trapianti nei centri con una politica di doppio ASCT (prevalente in Italia). In caso di insufficiente raccolta di cellule staminali emopoietiche, i pazienti non erano eleggibili per la R1, ma potevano comunque proseguire il protocollo e ricevere terapia con VMP, mantenendo la possibilità di essere randomizzati per la successiva fase terapeutica.

L'intensificazione iniziava tra la 4° e la 6° settimana dopo la raccolta.

Il braccio di terapia VMP prevedeva la somministrazione di 4 cicli, della durata di 42 giorni ciascuno, secondo il seguente schema:

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

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

Il braccio ASCT prevedeva la somministrazione di melphalan ad alte dosi (200 mg/m²) e successiva re-infusione dei progenitori ematopoietici secondo questo schema:

Farmaco	Dose (singola)	Somministrazione	Giorno
Melphalan	100mg/m ²	Intravenosa	-3,-2**
Reinfusione PBSC	Almeno 2 x 10 ⁶ CD34+/kg		0

** i pazienti con insufficienza renale eseguivano solo 100 mg/m² al giorno -3 oppure un dosaggio modulato in base alla clearance della creatinina.

Il secondo ASCT, se previsto, veniva effettuato a distanza di 2-3 mesi dal primo.

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

Consolidamento (seconda randomizzazione, R2)

A distanza di 8 settimane dal termine della fase di intensificazione, i pazienti venivano randomizzati a ricevere, o meno, terapia di consolidamento con bortezomib-lenalidomide-desametasone (VRD), per 2 cicli della durata di 28 giorni ciascuno, secondo le modalità sotto riportate:

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

Mantenimento

Infine, tutti i pazienti ricevevano lenalidomide in mantenimento alla dose di 10 mg/die per 21 giorni consecutivi ogni 28 giorni. La terapia di mantenimento veniva proseguita fino progressione di malattia o comparsa di intolleranza.

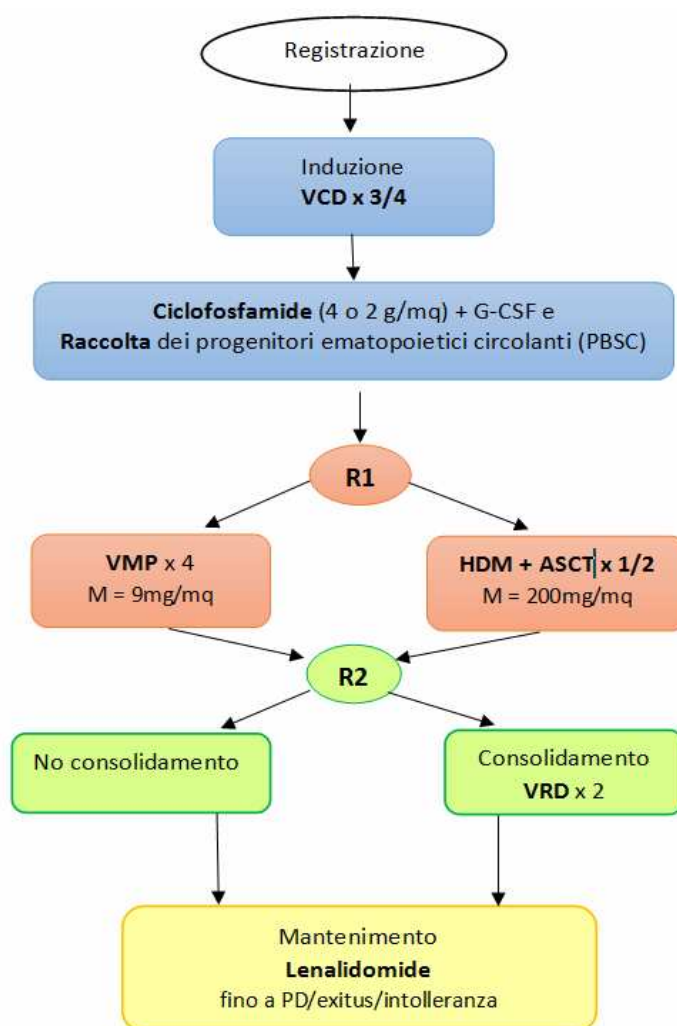


Figura 10 - EMN02 trial: disegno dello studio

9.3 CRITERI DI VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA

La risposta alle varie fasi terapeutiche è stata definita sulla base dei criteri stabiliti dall'*International Myeloma Working Group (IMWG)*³³⁶:

Risposta completa (CR)

- scomparsa della componente monoclonale (CM) originaria dal siero e dalle urine all'elettroforesi ed all'immunofissazione
- presenza di un infiltrato plasmacellulare (PC) alla biopsia midollare inferiore al 5% della cellularità totale.
- scomparsa di eventuali masse extramidollari presenti al basale

Risposta completa stringente (sCR)

- devono essere rispettati i criteri per CR
- normale rapporto κ/λ delle sFLC
- assenza di PC clonali nel midollo osseo documentabili tramite immunofluorescenza o immunohistochimica

Very good partial response (VGPR)

- CM sierica e urinaria rilevabile all'immunofissazione ma non all'elettroforesi, oppure
- riduzione ≥ 90 % della CM sierica e CM urinaria < 100 mg/24h,
- se malattia valutabile al basale solo per sFLC: riduzione ≥ 90 % del differenziale tra catena leggera *involved/uninvolved*

Risposta parziale (PR)

- riduzione della CM sierica ≥ 50 % del valore iniziale e riduzione della CM urinaria ≥ 90 % o inferiore a 200 mg nelle 24 ore
- se malattia valutabile solo per sFCL: riduzione ≥ 50 % della differenza fra i livelli di sFLC coinvolte/non coinvolte
- in caso di dosaggio sFLC non misurabile: riduzione ≥ 50 % delle PC (purché l'infiltrato iniziale fosse > 30 %)
- riduzione ≥ 50 % delle dimensioni del plasmocitoma, se presente alla diagnosi

Malattia stabile (SD)

- non soddisfatti i criteri per sCR, CR, VGPR, PR e progressione

Progressione di malattia (PD)

- incremento ≥ 25 % rispetto al nadir in due determinazioni consecutive della CM sierica (con valore assoluto incrementato di almeno 500 mg/dl) e/o CM urinaria (con valore assoluto incrementato di almeno 200 mg/die) e/o del differenziale tra catena coinvolta e non coinvolta (incremento assoluto > 10 mg/dl)
- se malattia non misurabile: incremento delle PC midollari ≥ 10 %
- comparsa di nuove lesioni ossee o aumento delle lesioni pre-esistenti, indipendentemente dal valore della CM
- comparsa di ipercalcemia (Ca^{2+} sierico corretto $> 11,5$ mg/dL) attribuibile unicamente al disturbo proliferativo delle plasmacellule

9.4 ANALISI CITOGENETICO-MOLECOLARE

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

La separazione della frazione plasmacellulare (cellule CD138⁺) è stata eseguita mediante separatore immunomagnetico (tecnologia MACS, Miltenyi Biotec).

I pazienti sono stati valutati per la presenza o assenza delle seguenti alterazioni cromosomiche: del(13q14), del(17p13), del(1p32), gain(1q21), t(4;14)(p16;q32), t(6;14)(p21;q32), t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23), t(14;20)(q32;q11), ed iperdiploidia. La ricerca delle alterazioni è stata fatta con metodica FISH, attraverso specifiche sonde a DNA *multiprobe* (Cytocell) per quanto riguarda le traslocazioni coinvolgenti il cromosoma 14 e le anomalie a carico dei cromosomi 1, 13 e 17, e con sonde cosmiche (LSI) e centromeriche (CEP) dei cromosomi 5, 9 e 15 per la determinazione dell'iperdiploidia.

9.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita per intenzione di trattamento (*intention to treat*, ITT) ed ha coinvolto tutti i pazienti arruolati nel protocollo che avessero ricevuto almeno una dose della terapia programmata.

Le principali caratteristiche clinico-demografiche raccolte al *baseline* sono state descritte come frequenze relative e percentuali quando le variabili erano di tipo categoriale, oppure attraverso mediana e range interquartile (IQR) se le distribuzioni erano di tipo continuo. Per confrontare le caratteristiche basali è stato utilizzato il test χ^2 o di Fisher come appropriato per le variabili discrete, oppure il test di Mann-Whitney per campioni indipendenti nei confronti di distribuzioni continue.

L'analisi di sopravvivenza è stata eseguita stimando i *time-to-event* mediante metodo Kaplan-Meier e le relative curve di sopravvivenza sono poi state confrontate utilizzando il Log Rank test.

La regressione semi-parametrica di Cox è stata svolta prima con modelli univariati, al fine di individuare le variabili statisticamente significative da includere, poi, nel modello multivariabile, con un approccio step-forward. Soltanto il modello finale è stato riportato nei risultati presenti in questo elaborato.

La significatività statistica è stata fissata per tutti i test per $p < 0.05$.

La sopravvivenza libera da malattia (*progression free survival*, PFS) è stata definita come intervallo tra la data di inizio della terapia e la data di progressione, la data di morte oppure la data dell'ultimo follow up del paziente quando nessun evento fosse

registrato. La sopravvivenza globale (*overall survival*, OS) è stata definita come il tempo tra l'inizio del trattamento e la data di morte del paziente oppure, come per la PFS, la data dell'ultimo follow up qualora l'evento morte non si fosse verificato.

Secondo protocollo, PFS e OS mediane sono state stimate a partire dalla data di induzione o dalla data di randomizzazione a seconda dell'endpoint primario analizzato. Qualora PFS o OS mediane non fossero state raggiunte sono stati riportati i valori di sopravvivenza percentuali registrati al tempo di follow up mediano.

La tossicità è stata analizzata prevalentemente tramite tabulazione ed è stata considerata solo l'incidenza di eventi avversi di grado ≥ 2 , codificati secondo i criteri del National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC version 4.0).

Il protocollo prevedeva 2 analisi ad interim, pianificate al raggiungimento (prima del 33% e poi del 66%) del numero di eventi sufficienti a garantire una potenza del test Log Rank di almeno il 92% per il confronto degli endpoints primari. I dati presentati in questo elaborato sono relativi alla seconda analisi ad interim.

L'analisi statistica è stata svolta mediante il software R, versione 3.4.1 per Windows (*The R foundation for Statistical Computing*).

10. RISULTATI

10.1 ANALISI SULLA POPOLAZIONE GLOBALE

Da febbraio 2011 ad aprile 2014 sono stati arruolati complessivamente 1503 pazienti, provenienti da 15 diversi paesi europei e 57 centri ematologici italiani. Undici pazienti tuttavia non hanno mai iniziato il programma terapeutico, o per ritiro del consenso o per fallimento delle procedure di screening previste dal protocollo, e sono stati di conseguenza esclusi dall'analisi per intenzione di trattamento.

Tabella 5: Caratteristiche dei pazienti al *baseline*

Caratteristiche	Nr. pazienti (%)	Mediana (IQR)
Popolazione in studio	1492	
Età (anni)		58 (52 - 62)
Sesso maschile	862 (57.8)	
Albumina, g/dl		3.8 (3.3 - 4.2)
β_2 -microglobulina, mg/l		3.4 (2.4 - 5.2)
Stadio ISS		
- I	579 (38.8)	
- II	583 (39.1)	
- III	330 (22.1)	
LDH > limite superiore di riferimento	211 (14.1)	
Stadio Revised-ISS		
- I	288 (19.3)	
- II	842 (56.4)	
- III	136 (9.1)	
- non valutabile	226 (15.1)	
Plasmacellule midollari, %		50 (30 - 80)
Emoglobina, g/dl		10.9 (9.5 - 12.4)
Piastrine, ($\times 10^3$ /mmc)		227 (176 - 279)
Creatinina, mg/dl		0.9 (0.76 - 1.16)
Clearance creatinina, ml/min		84 (60 - 103)
Calcio sierico, mmol/l		2.35 (2.2 - 2.5)
Alterazioni citogenetiche in FISH*		
- t(4;14)	139 (12.0)	
- t(11;14)	205 (19.8)	
- t(14;16)	41 (3.7)	
- del(17p)	136 (11.3)	
- amp(1q)	433 (37.8)	
- del(1p)	133 (11.9)	
- iperdiploidia	549 (49.8)	
Profilo di rischio citogenetico a 3 variabili: [t(4;14) e/o t(14;16) e/o del(17p)]		
- pazienti valutabili	1098 (73.6)	
- alto rischio (HR cyto3)	291 (26.5)	
- rischio standard (SR cyto3)	807 (73.5)	
Profilo di rischio citogenetico a 5 variabili: [t(4;14) e/o t(14;16) e/o del(17p) e/o amp(1q) e/o del(1p)]		
- pazienti valutabili	1107 (74.2)	
- alto rischio (HR cyto 5)	625 (56.5)	
- rischio standard (SR cyto 5)	482 (43.5)	

IQR range interquartile; ISS International Staging System; LDH latticodeidrogenasi; FISH fluorescence in-situ hybridization

* percentuali relative ai pazienti valutabili per le singole alterazioni

Le principali caratteristiche anagrafiche e di malattia al *baseline* (illustrate estensivamente nella tabella 5) sono in linea con quanto documentato in letteratura per la stessa tipologia di pazienti. L'età mediana all'arruolamento era 58 anni, e più della metà della popolazione in studio era di sesso maschile.

Il 22% ed il 9% dei pazienti presentava una malattia in stadio III secondo classificazione ISS e revised-ISS, rispettivamente. Nel 14% dei casi erano presenti valori di LDH superiori ai limiti di riferimento, mentre un infiltrato plasmacellulare midollare superiore al 60% della cellularità totale è stato riportato nel 43% dei pazienti.

L'analisi citogenetico-molecolare è stata possibile in oltre il 70% dei casi. Secondo i criteri IMWG⁶³, un profilo citogenetico ad alto rischio (HRcyto3), definito dalla positività in analisi FISH per t(4;14) e/o t(14;16) e/o del(17p), era evidenziabile nel 26.5% dei pazienti. La presenza di alterazioni a carico del cromosoma 1 (amp1q21 e/o del1p), associata o meno alle precedenti anomalie citogenetiche, identificava invece un nuovo profilo di rischio - modulato su 5 variabili (HRcyto5) - che è stato rilevato nel 56.5% dei casi. Il rischio standard (SRcyto3/5) era definito dalla contemporanea assenza di tutte le alterazioni ricercate.

Al momento della presente analisi, con un follow up mediano di 39.9 mesi (IQR 28.9 - 49.7), 648 pazienti (43%) risultavano progrediti e 295 (20%) deceduti.

La PFS mediana è risultata pari a 47.7 mesi, mentre l'OS registrata al follow up mediano (mFU) era dell'80.3% (figura 11)

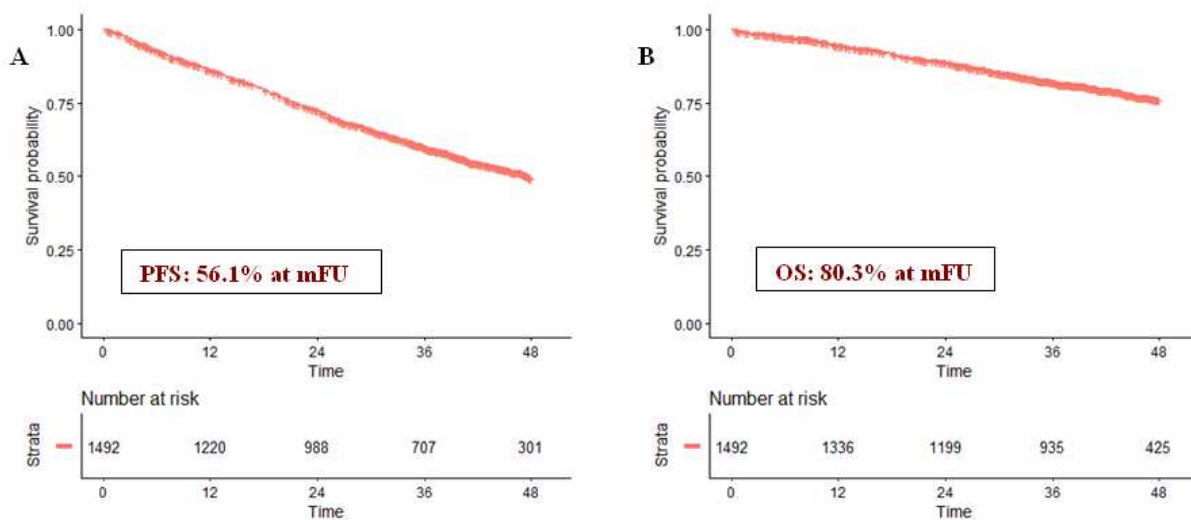


Figura 11: curve di PFS (A) e OS (B) per l'intera popolazione in studio.

E' stato quindi valutato l'impatto prognostico su PFS e OS di alcune caratteristiche cliniche e genetico-molecolari presenti al baseline (riportate in dettaglio nella tabella 6).

Tabella 6: Principali variabili con effetto su PFS e OS

Variabile			PFS al f.up mediano			OS al f.up mediano			
	n pts	%	HR	95% CI	p value	%	HR	95% CI	p value
Hb ≥ 10,5 g/dl	864	62,7	1,72	1,47-2,00	<0,0001	86,0	1,99	1,58-2,50	<0,0001
Hb < 10,5	612	46,5				72,4			
PLTs ≥ 150/mm ³	1264	59,0	1,74	1,43-2,12	<0,0001	82,8	2,18	1,67-2,86	<0,0001
PLTs < 150	208	37,5				66,0			
PC < 60%	772	60,3	1,36	1,16-1,60	0,0001	83,3	1,44	1,14-1,83	0,0025
PC ≥ 60%	629	50,9				77,4			
CiCr ≥ 40 ml/min	1370	56,7	1,70	1,05-1,79	0,0220	81,3	1,96	1,40-2,76	0,0001
CiCr < 40	119	48,8				68,6			
β ₂ M ≤ 3,5 mg/l	782	62,4	1,54	1,32-1,81	<0,0001	86,4	2,17	1,71-2,75	<0,0001
β₂M > 3,5	710	49,2				73,8			
β ₂ M < 5,5 mg/l	1164	59,6	1,74	1,46-2,07	<0,0001	84,8	2,60	2,06-3,29	<0,0001
β₂M ≥ 5,5	328	43,7				64,2			
Albumina > 3,5 g/dl	928	59,5	1,39	1,19-1,63	<0,0001	83,5	1,61	1,29-2,03	<0,0001
Albumina ≤ 3,5	564	50,5				75,1			
LDH < upper limit	1187	58,7	1,73	1,42-2,12	<0,0001	83,0	2,32	1,78-3,04	<0,0001
LDH > upper limit	211	38,8				64,6			
Stadio ISS			II vs I				II vs I		
I	579	64,2	1,37	1,14-1,65	0,0007	87,7	1,61	1,20-2,17	0,0016
II	583	55,2	III vs I			81,9	III vs I		
III	330	43,5	2,06	1,68-2,51	<0,0001	64,3	3,37	2,51-4,54	<0,0001
Revised-ISS			II vs I				II vs I		
R-ISS I	288	70,7	1,85	1,46-2,35	<0,0001	91,7	2,89	1,87-4,46	<0,0001
R-ISS II	842	53,3	III vs I			79,4	III vs I		
R-ISS III	136	31,1	3,57	2,64-4,83	<0,0001	49,9	7,59	4,70-12,26	<0,0001
del17p13: neg	1064	57,6	1,68	1,32-2,14	<0,0001	82,0	2,31	1,69-3,16	<0,0001
del17p13: pos	136	40,2				61,2			
t(4;14): neg	1016	57,1	1,50	1,18-1,91	0,0009	81,2	1,99	1,45-2,73	<0,0001
t(4;14): pos	139	41,5				66,0			
t(14;16): neg	1066	56,7	1,65	1,09-2,49	0,0170	80,4	2,38	1,43-3,96	0,0008
t(14;16): pos	41	37,1				54,5			
del1p36: neg	989	57,4	1,38	1,07-1,78	0,0126	81,1	1,79	1,28-2,49	0,0007
del1p36: pos	133	45,5				67,4			
amp1q21: neg	713	61,2	1,48	1,24-1,76	<0,0001	83,8	1,87	1,45-2,40	<0,0001
amp1q21: pos	433	47,3				72,0			
SR cyto 3	807	61,2	1,82	1,51-2,19	<0,0001	84,7	2,62	2,02-3,39	<0,0001
HR cyto 3	291	40,1				63,3			
SR cyto 5	482	66,2	1,78	1,48-2,15	<0,0001	87,7	2,59	1,94-3,47	<0,0001
HR cyto 5	625	47,1				71,2			
Best response ≥ CR	567	74,7	2,86	2,33-3,56	<0,0001	91,5	3,03	2,16-4,31	<0,0001
Best < CR	858	44,4				76,3			
Best ≥ VGPR	1060	62,3	2,50	2,02-3,08	<0,0001	84,7	1,85	1,37-2,53	0,0001
Best < VGPR	365	34,0				74,0			

Pts: pazienti; HR hazard ratio; CI intervallo di confidenza; Hb emoglobina; PLTs piastrine; PC plasmacellule midollari; CiCr clearance della creatinina; β₂M beta2microglobulina; LDH latticodeidrogenasi; ISS International Staging System; CR remissione completa; VGPR very good partial response; HRcyto alto rischio citogenetico; SR rischio standard

Tabella 7: Regressione multivariata di Cox

ANALISI MULTIVARIATA			
Variabili con effetto su PFS	HR	95% CI	p value
Emoglobina < 10.5 g/dl	1.29	1.02 - 1.63	0.032
Alto rischio citogenetico (HR-cyto3)	1.47	1.14 - 1.90	0.003
Stadio revised-ISS II	1.61	1.18 - 2.19	0.002
Stadio revised-ISS III	2.21	1.41 - 3.48	<0.001
Best response < VGPR	2.78	2.20 - 3.53	<0.001
Variabili con effetto su OS	HR	95% CI	p value
β_2 -microglobulina > 3.5 mg/l	1.67	1.18 - 2.35	0.003
Piastrine < 150.000/mmc	1.84	1.25 - 2.70	0.002
Alto rischio citogenetico (HR-cyto3)	2.37	1.71 - 3.28	<0.001
LDH > limite superiore di normalità	2.41	1.67 - 3.50	<0.001
Best response < VGPR	3.02	2.03 - 4.49	<0.001

L'analisi ha confermato il peso prognostico di alcuni parametri correlati al burden tumorale ed al rate di proliferazione, come alti livelli di β_2 microglobulina sierica (> 3.5 e \geq 5.5 mg/l) e valori di LDH superiori al limite massimo di riferimento. Allo stesso modo, la presenza di un significativo infiltrato plasmacellulare e di una scarsa riserva midollare, espressa da riduzione della concentrazione emoglobinica e della conta piastrinica basali, correla con una ridotta sopravvivenza libera da malattia e globale.

Scarsa prognosi è conferita anche dalla presenza di un'insufficienza renale (definita da una clearance della creatinina inferiore a 40 ml/min) e da bassi livelli di albumina, espressione sia di uno shift nella sintesi proteica (condizionato dall'eccessivo rilascio di IL-6 da parte del clone neoplastico e del microambiente midollare) che dello stato generale del paziente.

Tra i fattori che più fortemente condizionano PFS e OS ci sono le anomalie citogenetiche, sia considerate singolarmente (delezione del cromosoma 17, alterazioni del cromosoma 1, traslocazioni coinvolgenti il gene IgH sul cromosoma 14), che comprese nei profili di rischio HRcyto3 e HRcyto5.

Lo studio conferma inoltre, su un'ampia casistica, la validità degli score prognostici ISS e revised-ISS (che coniugano fattori legati sia alla taglia che alla variabilità biologica del tumore) nell'identificare popolazioni di pazienti a diverso rischio di recidiva e/o morte precoce.

Infine, la qualità della risposta al trattamento è in grado di influenzare fortemente l'outcome dei pazienti, con una significativa riduzione della sopravvivenza per chi non raggiunge almeno una VGPR.

L'analisi multivariata ha evidenziato come una concentrazione di emoglobina <10.5 g/dl, un alto rischio citogenetico secondo profilo a 3 variabili, uno stadio revised-ISS II e III, ed il mancato raggiungimento di una risposta almeno pari a VGPR in corso di trattamento, siano i principali fattori significativamente correlati ad un'aumentata incidenza di recidiva di malattia. Mentre valori di β_2 microglobulina >3.5 mg/l, conta piastrinica <150.000/mmc, un profilo HRcyto3, alti livelli di LDH ed una risposta non di alta qualità sono risultate le variabili significative ed indipendenti predittive di ridotta sopravvivenza globale (vedi tabella 7).

10.2 INTENSIFICAZIONE CON VMP versus ASCT (R1)

I pazienti in possesso dei criteri di eleggibilità alla prima randomizzazione (e pertanto inclusi nell'analisi) erano 1192. Di questi, 497 hanno eseguito intensificazione con VMP, mentre 695 sono stati randomizzati ad ASCT (488 singolo e 207 tandem).

Le principali caratteristiche anagrafiche e di malattia al baseline (riassunte nella tabella 8) sono risultate ben bilanciate tra i 2 gruppi di trattamento.

Tabella 8: Principali caratteristiche basali dei pazienti inclusi in R1

	VMP (n = 497)	ASCT (n = 695)
Età mediana, anni (IQR)	57 (51 - 62)	58 (53 - 62)
Sesso, M/F %	56/44	59/41
β_2 -microglobulina (mg/L), mediana (IQR)	3.3 (2.4 - 5.0)	3.3 (2.3 - 4.8)
Albumina (g/dL), mediana (IQR)	3.8 (3.3 - 4.2)	3.8 (3.3 - 4.2)
Stadio ISS I - II - III, %	42 - 38 - 21	42 - 39 - 20
Emoglobina (g/dL), mediana (IQR)	11.0 (9.6 - 12.6)	11.1 (9.7 - 12.6)
Piastrine ($\times 10^9/L$), mediana (IQR)	232 (181 - 283)	226 (177 - 280)
Creatinina (mg/dL), mediana (IQR)	0.93 (0.76 - 1.18)	0.90 (0.74 - 1.10)
Plasmacellule midollari, % (IQR)	50 (27 - 70)	50 (30 - 80)
LDH > valore massimo di riferimento, %	11.5	14.0
Stadio R-ISS I - II - III - nv, %	19 - 54 - 8 - 19	22 - 56 - 8 - 14
Analisi FISH centralizzata		
- Alto rischio HR-cyto 3	89 (25.1)	134 (25.1)
- Alto rischio HR-cyto 5	184 (52.9)	296 (55.2)

L'età mediana era 57 anni per i pazienti nel gruppo VMP e 58 per i trapiantati. Del tutto identici tra i 2 gruppi sono risultati i valori mediani di β_2 microglobulina (3.3 mg/l), albumina sierica (3.8 g/dl), emoglobina (11g/dl) e la percentuale di infiltrato midollare plasmacellulare (50%). Sostanzialmente sovrapponibili anche i valori di piastrine, creatinina, e percentuale di pazienti con livelli di LDH superiori ai range fisiologici di

normalità. Omogenea è risultata anche la stratificazione del rischio secondo stadiazione ISS (stadio III nel 21% e 20% dei pazienti rispettivamente nel braccio VMP e ASCT) e revised-ISS (stadio III nell'8% dei pazienti valutabili in entrambi i gruppi).

L'analisi FISH è risultata valutabile in oltre il 70% dei pazienti, ed ha permesso di identificare un profilo citogenetico ad alto rischio (stimato su 3 variabili, HRcyto3) nel 25% dei casi, indipendentemente dalla randomizzazione. La percentuale di pazienti ad alto rischio sale al 53% per il braccio VMP e al 55% per il gruppo ASCT se si applica il modello comprensivo di 5 anomalie citogenetiche (HRcyto5).

All'analisi per intenzione di trattamento e con un follow up mediano di 37.8 mesi (IQR 28.9-46.9) dalla randomizzazione, la PFS mediana è risultata di 44.3 mesi per il gruppo VMP e non ancora raggiunta per i trapiantati, con stime a 3 anni del 57% e 64.3% rispettivamente, e con una riduzione del rischio relativo di progressione o morte del 24% (HR=0.76; 95% CI=0.64-0.90; p=0.002). (figura 12)

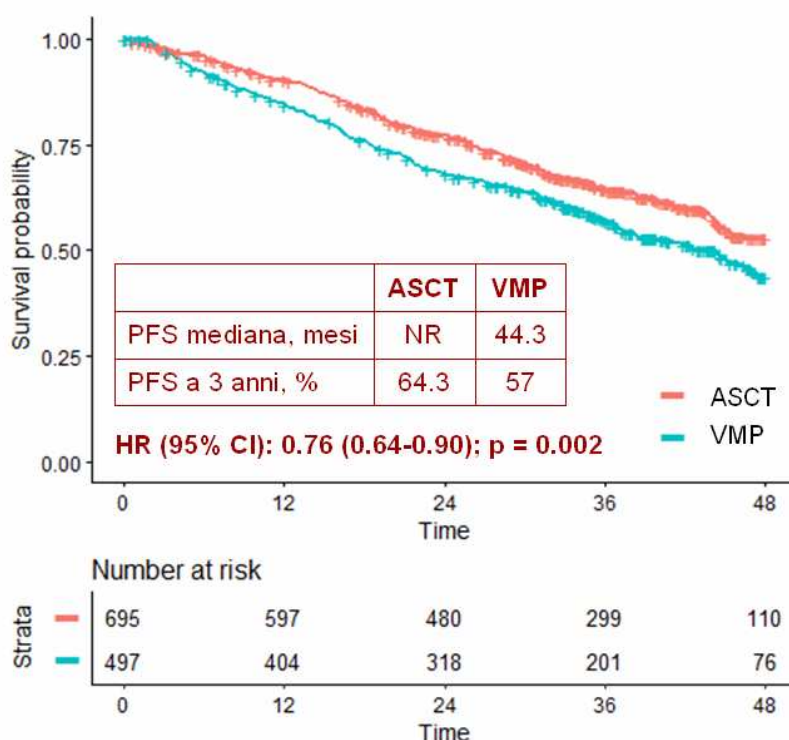


Figura 12: PFS secondo R1 (VMP vs ASCT)

Il significativo prolungamento della PFS correlato ad ASCT è stato osservato indipendentemente dall'età dei pazienti (≤ 55 e > 55 anni: $p=0.038$ e $p=0.027$, rispettivamente), dal sesso (maschi e femmine: $p=0.017$ e $p=0.038$) e dalla presenza di alcuni fattori basali con noto impatto sulla prognosi. (figura 13A)

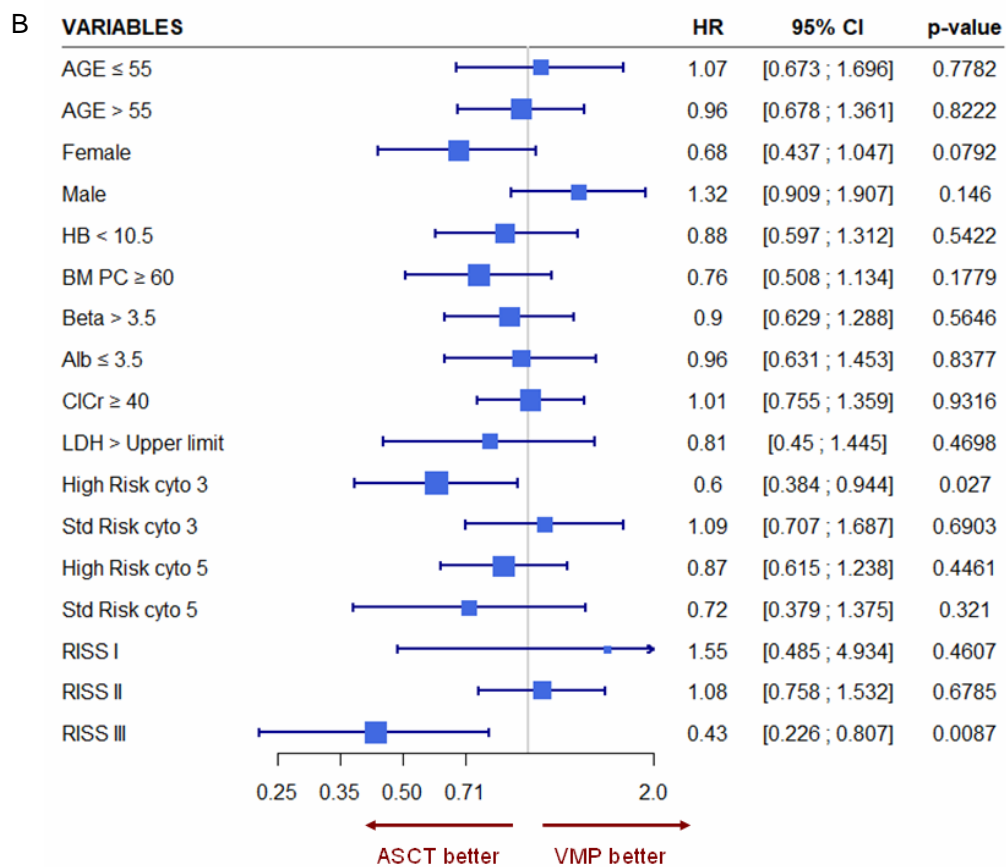
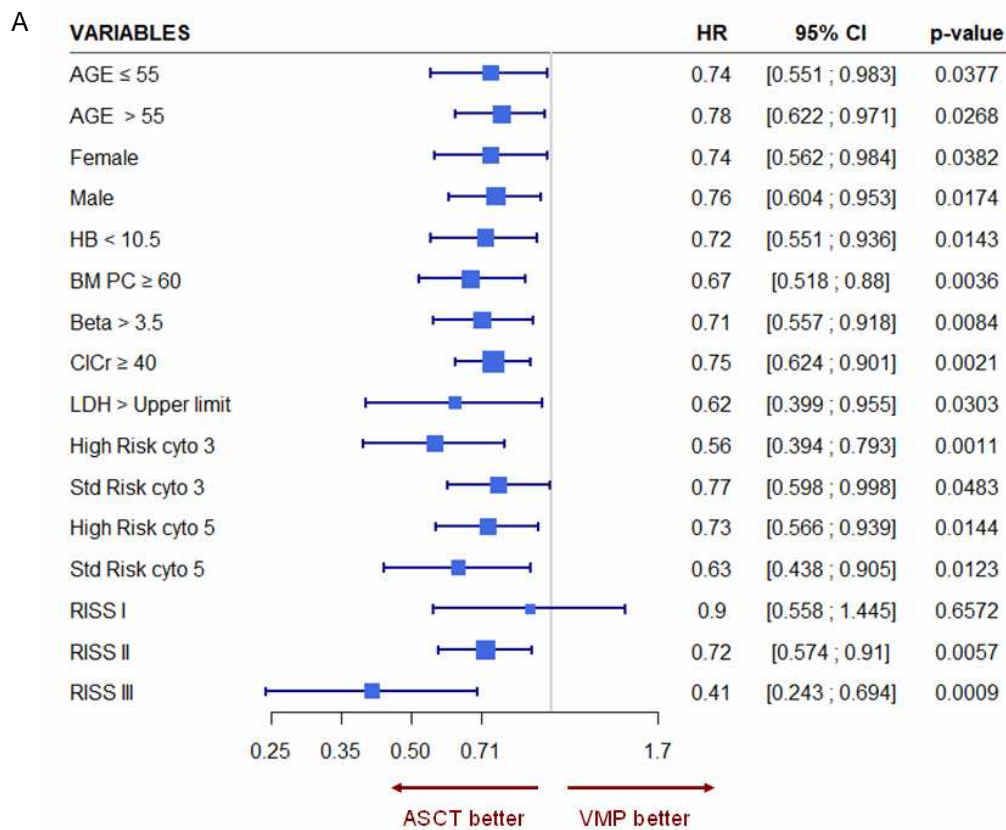


Figura 13: Analisi univariata per sottogruppi. PFS (A); OS (B)

In particolare: emoglobina <10.5 g/dl (HR=0.72, CI=0.55-0.94, p=0.0143), β_2 microglobulina >3.5 mg/l (HR=0.71, CI=0.56-0.92, p=0.0084), LDH superiore al limite massimo di riferimento (HR=0.62, CI=0.40-0.96, p=0.0312), plasmacellule midollari $\geq 60\%$ (HR=0.68, CI=0.52-0.88, p=0.0037), stadio revised-ISS II (HR=0.72; CI=0.57-0.91; p=0.0057), e R-ISS III (HR=0.41; CI=0.24-0.69; P=0.0009).

Per quanto riguarda le caratteristiche citogenetiche basali, la randomizzazione ad ASCT è in grado di conferire un significativo vantaggio in termini di PFS rispetto a VMP sia in pazienti a rischio standard che ad alto rischio, indipendentemente dal profilo indagato: SRcyto3: HR=0.78, p=0.0483; HRcyto3: HR=0.56, p=0.0011; SRcyto5: HR=0.63, p=0.0125; HRcyto5: HR=0.73, p=0.0146, (vedi figura 14).

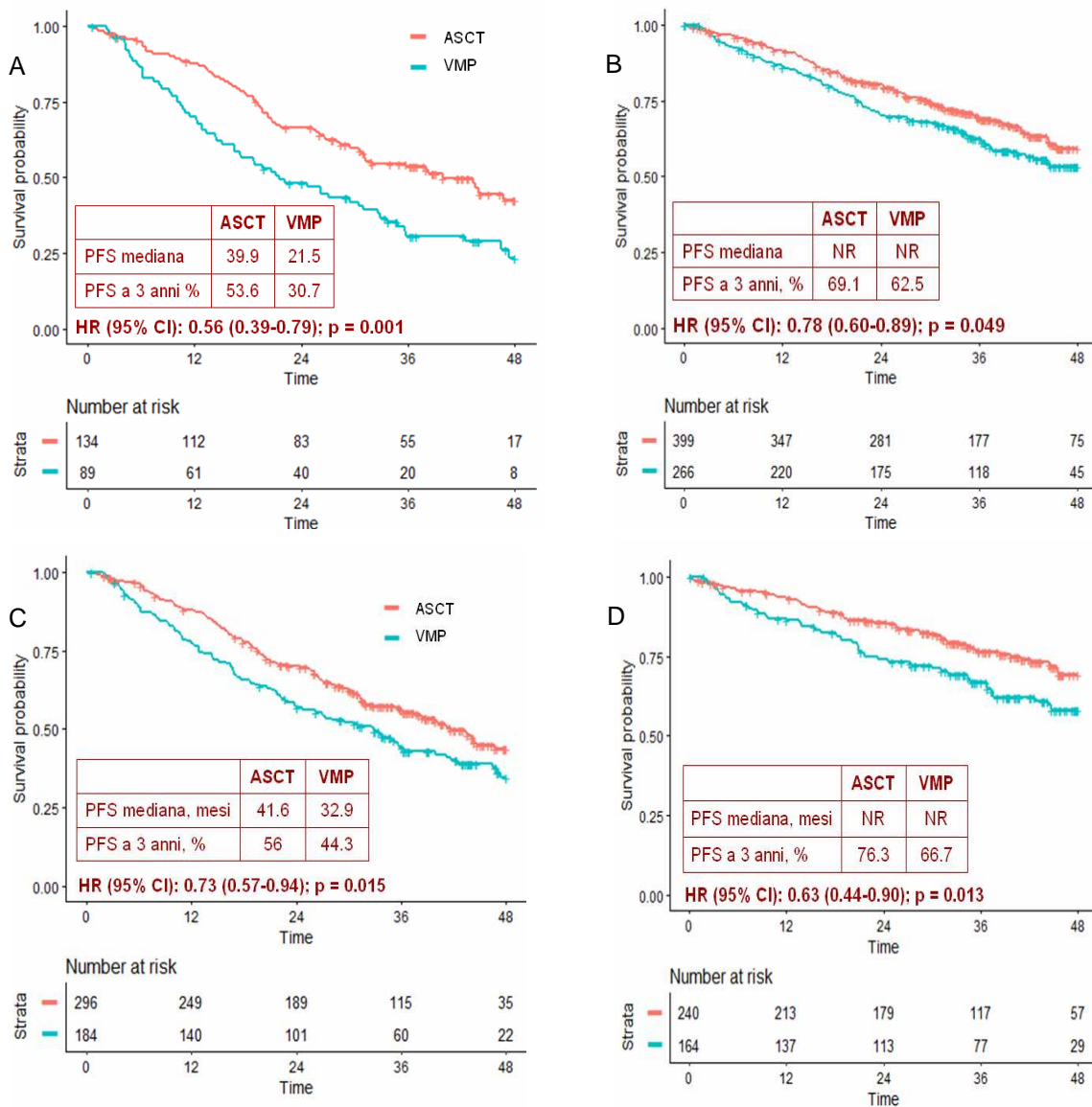


Figura 14: PFS secondo R1 e caratteristiche citogenetiche.
HR-cyto3 (A); SR-cyto3 (B); HR-cyto5 (C); SR-cyto5 (D)

Per quanto riguarda la responsività complessiva al trattamento, il 95% dei pazienti in entrambi i gruppi ha ottenuto almeno una risposta parziale, con percentuali di remissioni completa e stringente (CR+sCR) del 43% e 46% per il braccio VMP e ASCT, rispettivamente ($p=0.317$). La probabilità di ottenere una risposta di alta qualità (\geq VGPR secondo i criteri IMWG) è stata invece significativamente superiore nel gruppo trapianto (84.3% vs 75.4% per i pazienti trattati con VMP, $p<0.001$), (figura 15).

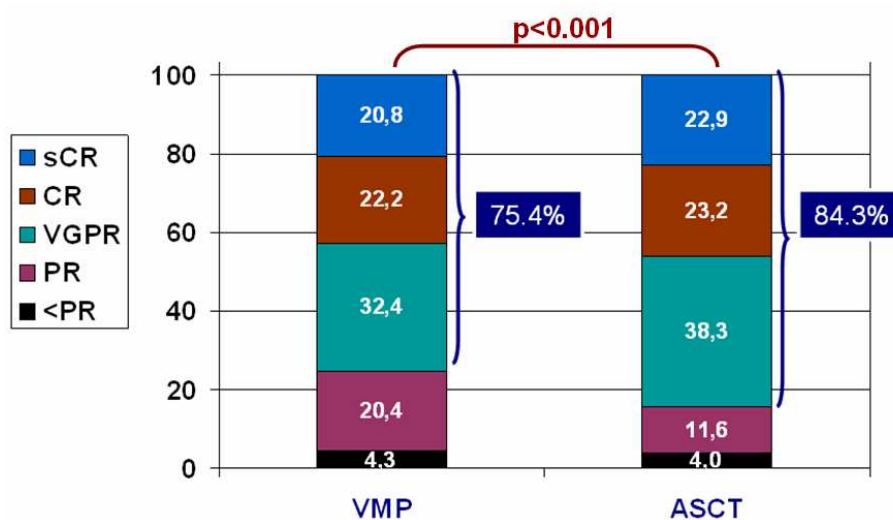


Figura 15: Best response

In analisi multivariata la randomizzazione a trapianto autologo (HR=0.70, $p=0.001$), una concentrazione di emoglobina ≥ 10.5 g/dl (HR=0.74, $p=0.009$), un profilo di rischio SRcyto3 (HR=0.61, $p<0.001$), uno stadio R-ISS (HR=0.69, $p=0.015$) e l'ottenimento di una risposta di alta qualità (HR=0.41, $p<0.001$), sono risultate le principali variabili significative ed indipendenti predittive di un controllo duraturo di malattia, (tabella 9).

Tabella 9: Analisi multivariata di Cox

Variabili con effetto su PFS	HR	95% CI	P value
Randomizzazione ad ASCT	0.70	0.57 - 0.87	0.001
Emoglobina ≥ 10.5 g/dl	0.74	0.60 - 0.93	0.009
Rischio citogenetico standard (3)	0.61	0.48 - 0.78	<0.001
Stadio revised-ISS I (vs II+III)	0.69	0.51 - 0.93	0.015
Best response \geq VGPR	0.41	0.32 - 0.52	<0.001

La sopravvivenza globale stimata a 3 anni è risultata dell'85% in entrambi i gruppi di trattamento. Tuttavia, valutando l'OS in sottogruppi predefiniti di pazienti, è emerso un significativo vantaggio correlato ad ASCT per popolazioni con caratteristiche prognostiche sfavorevoli, come stadio R-ISS III (stime a 3 anni del 69% vs 47% nel

braccio VMP; HR=0.43, CI=0.23-0.81, p=0.0087) e profilo HRcyto3 (74% vs 61%, HR=0.60, CI=0.38-0.94, p=0.027), inclusi pazienti portatori di del(17p) (75% vs 51%, HR=0.47, CI=0.24-0.92, p=0.0285), (figura 13B e figura 16).

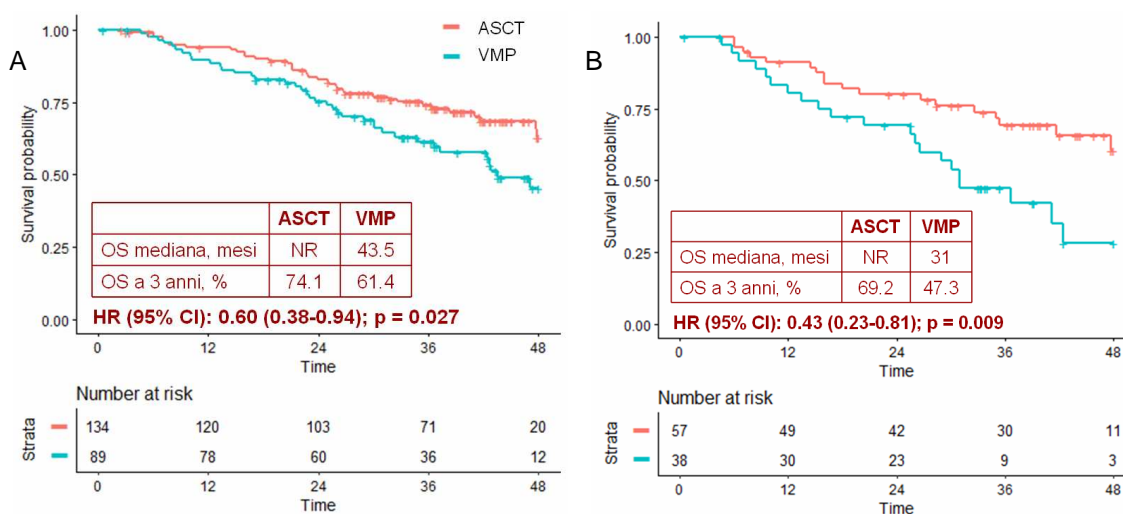


Figura 16: OS in pazienti con profilo HRcyto3 (A) e stadio R-ISS III (B)

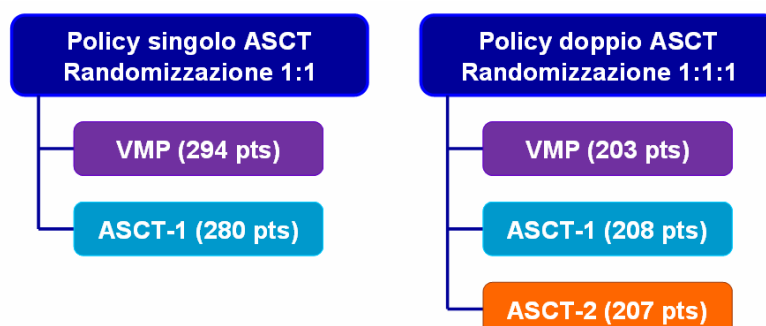
Infine, come atteso, il profilo di tossicità è risultato significativamente diverso tra le 2 popolazioni in studio, con maggior frequenza di pancitopenia, tossicità gastrointestinale/mucosale ed infettiva dovute al regime di condizionamento submieloablativo nel braccio trapianto e più alta incidenza di neuropatia periferica e fatigue (tipicamente correlate all'infusione di bortezomib) per i pazienti trattati con VMP. Nella tabella 10 sono riportati in dettaglio gli eventi avversi di grado 2-4 e ≥ 3 registrati nei 2 gruppi. La mortalità legata al trapianto è stata molto limitata (1%).

Tabella 10: Principali eventi avversi nei 2 gruppi di trattamento

	VMP (n = 472)		ASCT (n = 627)	
	Gr. 2-4	Gr. ≥ 3	Gr. 2-4	Gr. ≥ 3
Anemia	10.0	0.6	55.5	15.8
Neutropenia	41.7	29.0	79.4	78.2
Trombocitopenia	29.7	15.3	84.2	82.1
Gastrointestinali	19.1	5.7	34.0	12.0
Mucosite	0.2	/	33.0	15.6
Neutropenia febbrile	0.2	0.2	23.8	17.5
Sepsi	/	/	4.3	3.2
Infezioni respiratorie	7.6	1.7	4.9	2.6
Neuropatia periferica	36.4	13.8	7.3	1.6
Fatigue	12.1	1.5	7.5	1.3
Cardiaci	5.3	2.0	6.1	1.8

10.3 SINGOLO versus DOPPIO ASCT

Come già ricordato, secondo il disegno dello studio, 618 pazienti arruolati in centri con politica di doppio trapianto sono stati randomizzati a ricevere VMP (n=203), ASCT-1 (n=208) o ASCT-2 (n=207), (vedi grafico sottostante).



La distribuzione delle principali caratteristiche anagrafiche e di malattia basali è risultata omogenea nei 415 pazienti sottoposti a trapianto autologo, (vedi tabella 11).

L'età mediana era 58 anni per i pazienti nel braccio ASCT-1 e 57 nel braccio ASCT-2. Nessuna differenza significativa è emersa per quanto riguarda i principali parametri laboratoristici e la percentuale di infiltrato plasmacellulare midollare.

In entrambi i gruppi, uno stadio ISS III era presente nel 19% dei casi, ed uno stadio R-ISS II+III nel 62%. Una lieve, non significativa, prevalenza di pazienti ad alto rischio citogenetico è stata osservata per i pazienti sottoposti a singolo rispetto a doppio trapianto (HRcyto3 26% vs 22%; HRcyto5 55% vs 50%).

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

	ASCT-1 (n = 208)	ASCT-2 (n = 207)
Età mediana, anni (IQR)	58 (53 - 62)	57 (52 - 61)
Sesso M/F %	55/45	62/38
β_2 -microglobulina (mg/L), mediana (IQR)	3.1 (2.3 - 4.5)	3.3 (2.3 - 4.7)
Albumina (g/dL), mediana (IQR)	3.9 (3.3 - 4.3)	3.8 (3.5 - 4.2)
Stadio ISS I - II - III, %	45 - 36 - 19	43 - 38 - 19
Emoglobina (g/dL), mediana (IQR)	11.1 (9.8 - 12.4)	11.4 (10.1 - 12.9)
Piastrine ($\times 10^9/L$), mediana (IQR)	215 (167 - 272)	234 (178 - 284)
Creatinina (mg/dL), mediana (IQR)	0.87 (0.70 - 1.05)	0.88 (0.72 - 1.10)
Plasmacellule midollari, % (IQR)	50 (30 - 80)	54 (30 - 80)
LDH > valore massimo di riferimento, %	13.5	10.6
Stadio R-ISS I - II - III - nv, %	26 - 54 - 8 - 13	28 - 56 - 6 - 11
Analisi FISH centralizzata		
- Alto rischio HR-cyto 3	43 (25.7)	38 (21.5)
- Alto rischio HR-cyto 5	93 (55.4)	90 (49.7)

All'analisi per intenzione di trattamento, la PFS stimata a 3 anni è risultata del 64% nel gruppo ASCT-1 e del 72.5% nel gruppo ASCT-2 (HR=0.71; CI=0.51-0.98; P=0.040), con una riduzione del rischio relativo di progressione o morte del 30%, (figura 16).

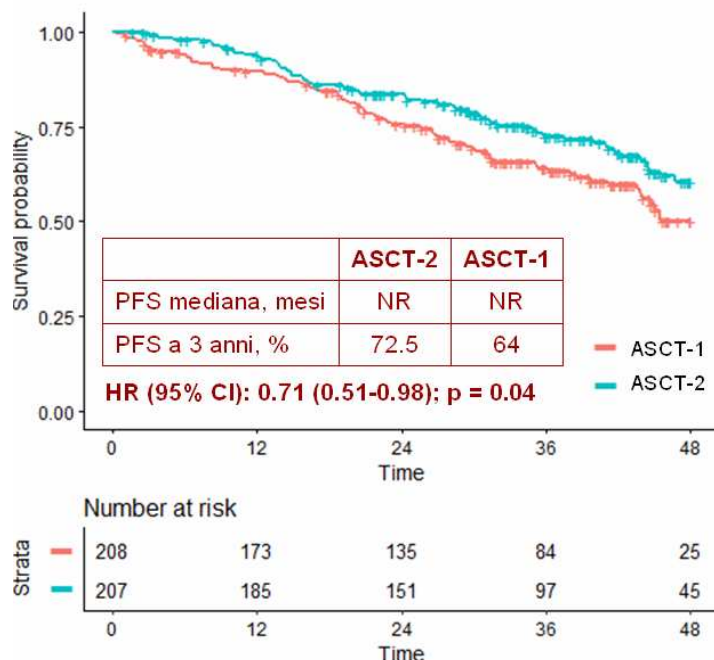


Figura 16: PFS secondo randomizzazione (ASCT-1 vs ASCT-2)

Anche in questo contesto, il prolungamento della PFS correlata al doppio trapianto si conferma in sottopopolazioni predefinite a diverso rischio prognostico; in particolare pazienti in stadio R-ISS II+III (HR=0.64; CI=0.43-0.97; P=0.034), con profilo citogenetico HRcyto3 (HR=0.42; CI=0.21-0.84; p=0.014) e HRcyto5 (HR=0.65; CI=0.42-1.01; p=0.059), di età superiore a 55 anni (HR=0.64; CI=0.43-0.96; p=0.033) e che abbiano ottenuto una risposta \geq VGPR (HR=0.64; CI=0.44-0.94; p=0.023), (vedi figura 17A).

Un'analisi più approfondita dei pazienti portatori di HRcyto3 evidenzia come la randomizzazione ad ASCT-2 sia in grado non solo di esercitare un più duraturo controllo di malattia rispetto ad ASCT-1, ma anche di mitigare in generale l'impatto prognostico negativo associato alle anomalie citogenetiche ad alto rischio. Se confrontiamo infatti l'outcome dei pazienti relativamente al loro profilo citogenetico basale, si osserva come la PFS sia sostanzialmente sovrapponibile per pazienti a rischio standard o alto che ricevono un doppio trapianto (stime a 3 anni del 69% e del 76%, rispettivamente, p=0.482), mentre permane una significativa riduzione della sopravvivenza libera da malattia nei pazienti ad alto rischio trattati con singolo trapianto rispetto ai pazienti a rischio standard (PFS 70% vs 41%, p<0.001), (figura 18).

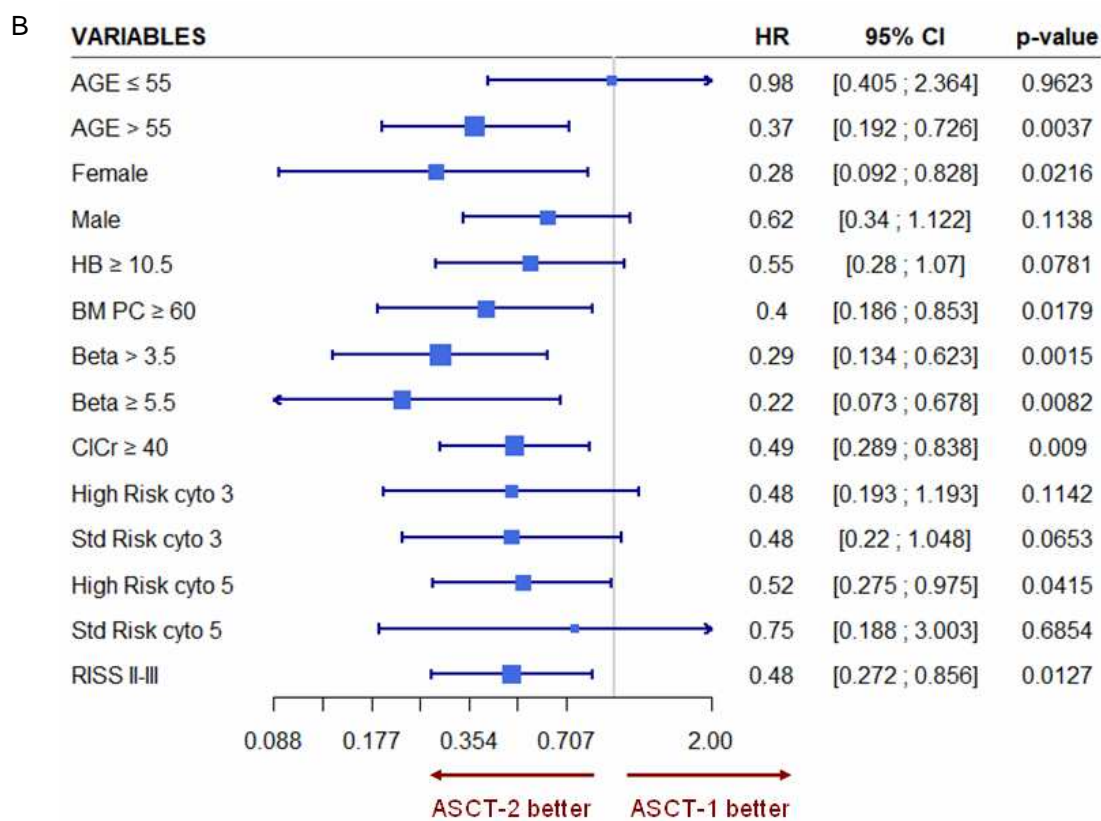
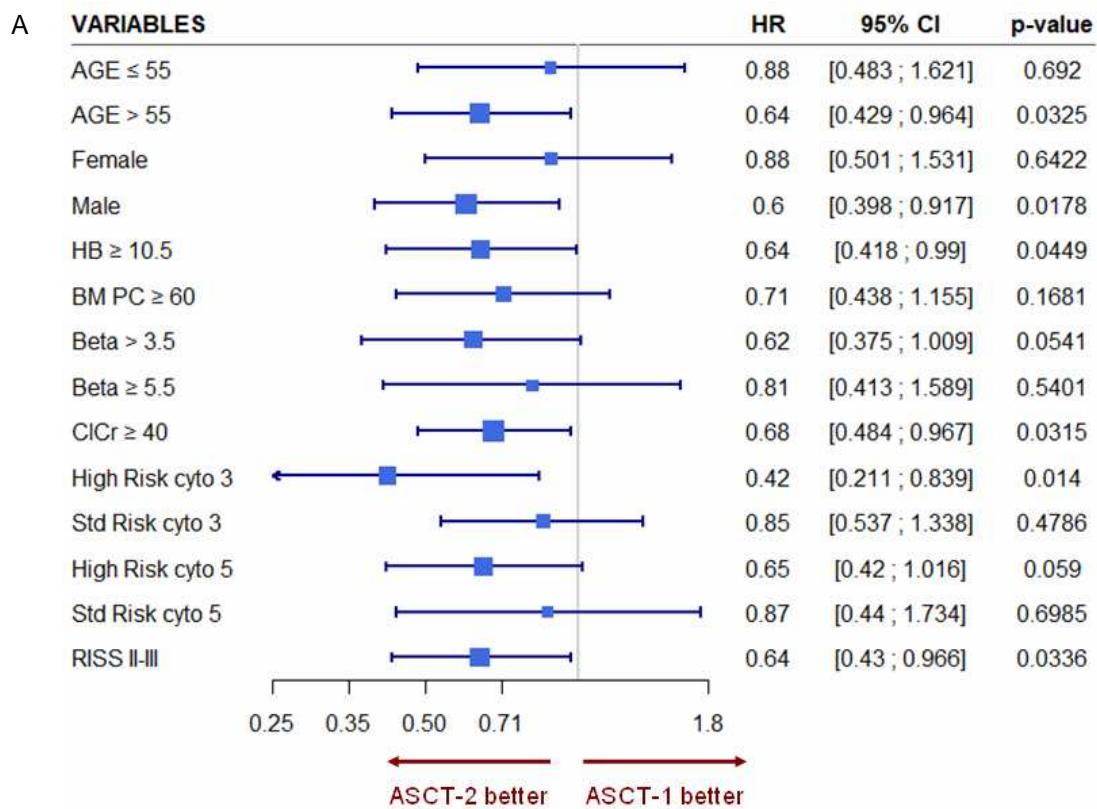


Figura 17: Analisi univariata per sottogruppi: PFS (A), OS (B)

Lo stesso esito si evidenzia per i pazienti con positività per del(17p): sovrapponibile controllo di malattia per pazienti portatori o meno della delezione nel braccio ASCT-2 ($p=0.354$), persistente e significativa riduzione di PFS per i pazienti trattati nel gruppo ASCT-1 (PFS 43% vs 67% in presenza e assenza di delezione, rispettivamente, $p=0.01$).

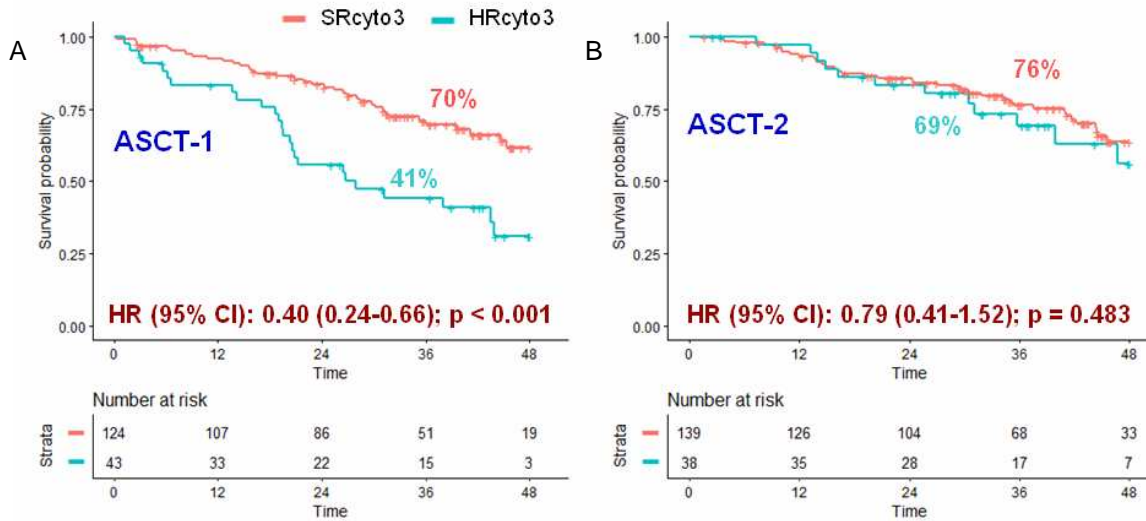


Figura 18: PFS secondo alto o basso rischio citogenetico nei due gruppi. ASCT-1 (A), ASCT-2 (B)

Per quanto riguarda la best response ottenuta in corso di trattamento, non si registrano differenze significative nel rate di risposte di alta qualità, sia \geq VGPR (86% vs 85% per ASCT-1 e ASCT-2, rispettivamente, $p=0.766$) che CR/sCR (46% vs 47%, $p=0.885$), tra i 2 gruppi di trattamento.

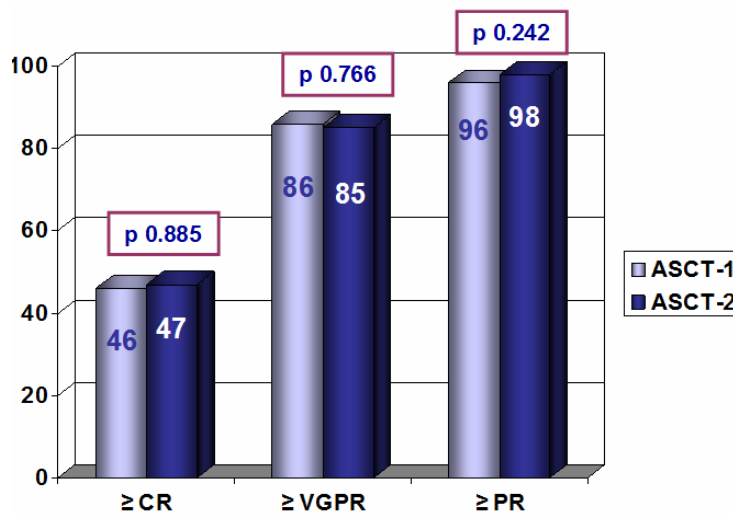


Figura 19: Best response

Secondo il modello multivariabile di Cox, la randomizzazione ad ASCT-2 (HR=0.66, p=0.029), lo stadio R-ISS I vs II+III (HR=0.61, p=0.042), il profilo citogenetico SRcyto3 (HR=0.35, p<0.001) e l'ottenimento di una risposta di alta qualità (HR=0.28, p<0.001), sono risultate le variabili significative ed indipendenti predittive di prolungata sopravvivenza libera da malattia.

Tabella 12: Analisi multivariata di Cox

Variabili con effetto su PFS	HR	95% CI	P value
Stadio revised-ISS I (vs II+III)	0.61	0.37 - 0.98	0.042
Randomizzazione ad ASCT-2	0.66	0.45 - 0.96	0.029
Rischio citogenetico standard (3)	0.35	0.22 - 0.56	<0.001
Best response \geq VGPR	0.28	0.17 - 0.45	<0.001

L'OS, stimata a 3 anni, è risultata significativamente superiore per pazienti randomizzati a doppio rispetto a singolo trapianto (89% vs 82% rispettivamente; HR=0.52; CI=0.31-0.86; p=0.011); un beneficio che appare ancora una volta più evidente in sottogruppi di pazienti con caratteristiche prognosticamente sfavorevoli, come stadio R-ISS II+III (HR=0.48; CI=0.27-0.86; p=0.013), plasmacellule midollari \geq 60% (HR=0.40; CI=0.19-0.85; p=0.018) e HRcyto5 (HR=0.52; CI=0.28-0.98; p=0.042), (vedi figura 17B + 20).

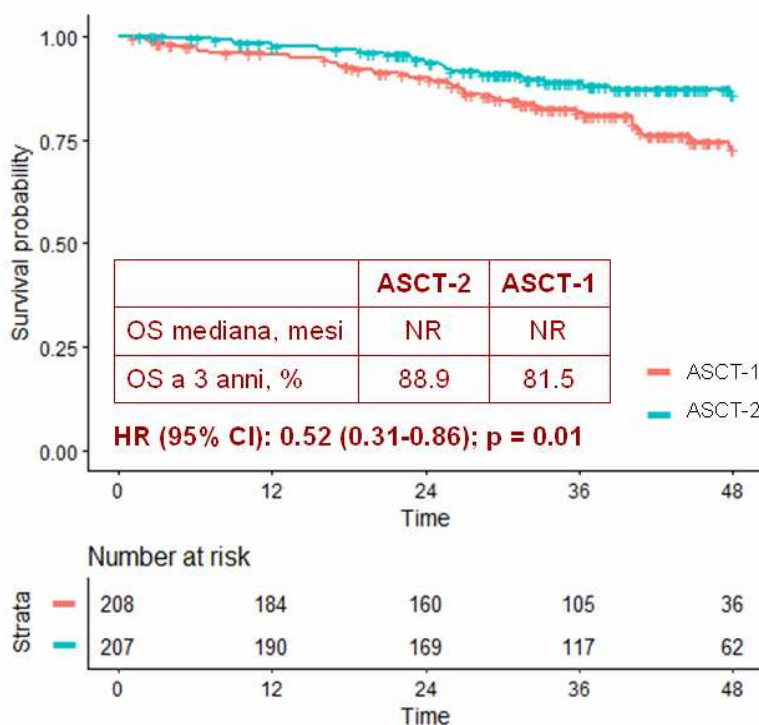


Figura 20: OS secondo randomizzazione (ASCT-1 vs ASCT-2)

Relativamente al profilo di tossicità, 190 pazienti sono risultati valutabili nel braccio ASCT-1 e 160 nel braccio ASCT-2. L'85% e il 91% rispettivamente dei pazienti ha presentato almeno un evento avverso di grado ≥ 3 . Ovviamente prevalente la tossicità ematologica in relazione al regime di condizionamento submieloablativo, senza tuttavia differenze significative nelle percentuali di anemia, piastrinopenia e neutropenia registrate nei 2 gruppi di trattamento.

Le principali tossicità extraematologiche grado ≥ 3 , osservate nel 30% e 28 % circa dei pazienti, sono state di tipo gastroenterico/mucosale ed infettivo (sia in termini di neutropenia febbrile che di infezioni con isolati batterici specifici), con percentuali non dissimili da quanto atteso e documentato in letteratura per la stessa tipologia di pazienti. La mortalità relata al trapianto (TRM) stimata a 100 giorni, è stata dell'1.4% nel braccio ASCT-1 e dello 0.9% nel gruppo ASCT-2.

	ASCT-1	ASCT-2
Pazienti valutabili, n°	190	160
Totale eventi avversi di grado ≥ 3 , n°	410	339
Almeno 1 evento avverso grado ≥ 3 , %	85.3	91.3
- ematologico	84.2	86.9
- extra-ematologico	30.0	27.5
TRM (transplant-related-mortality), %	1.4	0.9

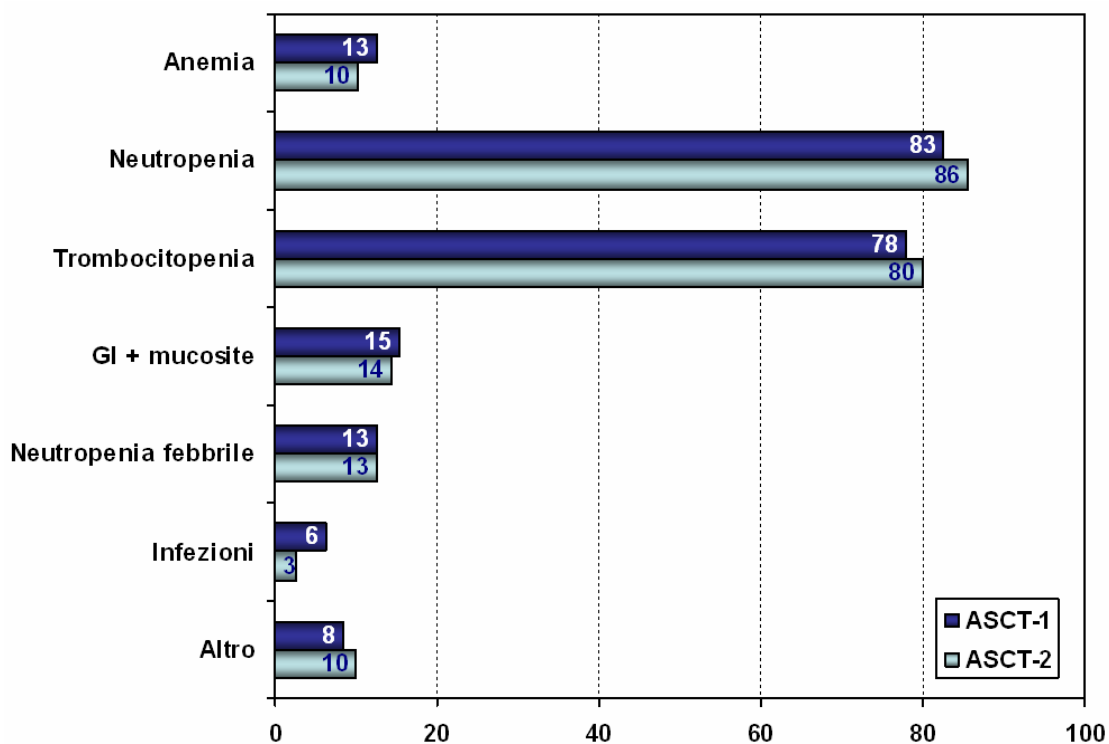


Figura 21: Analisi del profilo di tossicità

10.3.1 ANALISI PER PROTOCOL

Al fine di valutare il reale impatto di un trapianto tandem rispetto ad una singola procedura, è stata condotta un'analisi *per protocol*, in cui sono stati considerati unicamente i pazienti che hanno effettivamente ricevuto in corso di trattamento un singolo o un doppio trapianto. In entrambi i gruppi, la mancata aderenza al programma terapeutico è stata dovuta principalmente ad un rifiuto da parte del paziente, ad una perdita di risposta al trattamento o ad un cambiamento nelle condizioni cliniche del paziente che lo ha reso non più eleggibile alla terapia ad alte dosi. Complessivamente, il 97% dei pazienti nel braccio ASCT-1 e l'80% nel gruppo ASCT-2 ha rispettato ed eseguito la terapia pianificata (vedi figura 22).

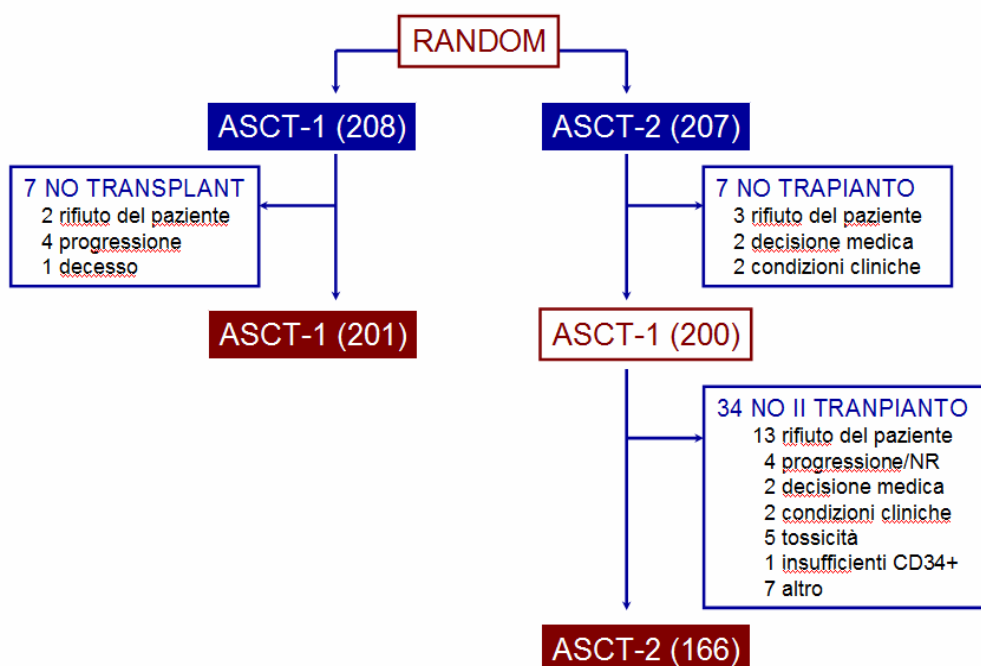


Figura 22: Cause di mancata aderenza al programma terapeutico

Dall'analisi per protocol, con un tempo di osservazione mediana per questo subset di pazienti pari a 38 mesi (IQR 27.6-47.9), emerge come il controllo di malattia esercitato dal doppio trapianto rispetto al singolo sia ancora più evidente e marcato, con PFS mediana non raggiunta per il gruppo ASCT-2 vs 43.9 mesi per il braccio ASCT-1, con stime al follow up mediano del 74.6% vs 64.3% ed una ulteriore riduzione del rischio di recidiva o morte (HR=0.64; CI=0.44-0.93; p=0.0184).

Allo stesso modo si conferma il vantaggio in termine di sopravvivenza globale per i pazienti sottoposti ad ASCT-2, con OS stimata al follow up mediano del 90.6% vs 82.4% per chi ha ricevuto un singolo trapianto (HR=0.43; CI=0.24-0.79); p=0.0065)

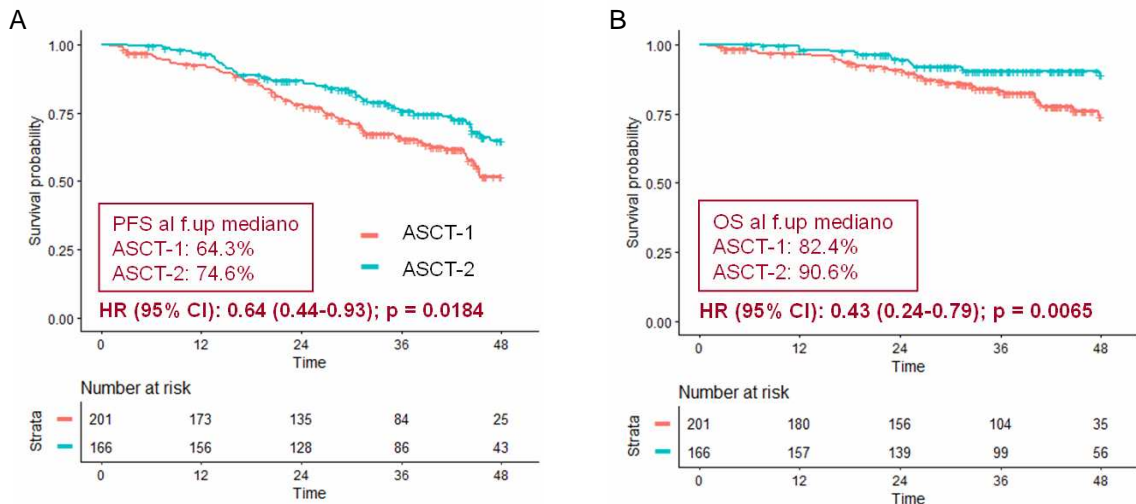


Figura 23: Curve di PFS (A) e OS (B) nell'analisi *per protocol*

Sono stati poi selezionati unicamente i pazienti randomizzati ad ASCT-2 per valutare l'evoluzione della risposta tra primo e secondo trapianto. Su 165 pazienti valutabili, il test di McNemar ha dimostrato l'impatto favorevole del secondo trapianto sulla qualità della risposta al trattamento, con un significativo incremento percentuale di risposte almeno pari a VGPR (64% dopo il ASCT-1, 72% dopo ASCT-2, p=0.017) e superiori alla CR (13% vs 22%, p=0.002)

Risposta, %	ASCT-1	ASCT-2	p value
ORR (\geq PR)	89.8	91.6	ns
\geq CR	13.3	22.3	0.007
\geq VGPR	63.9	71.7	0.002

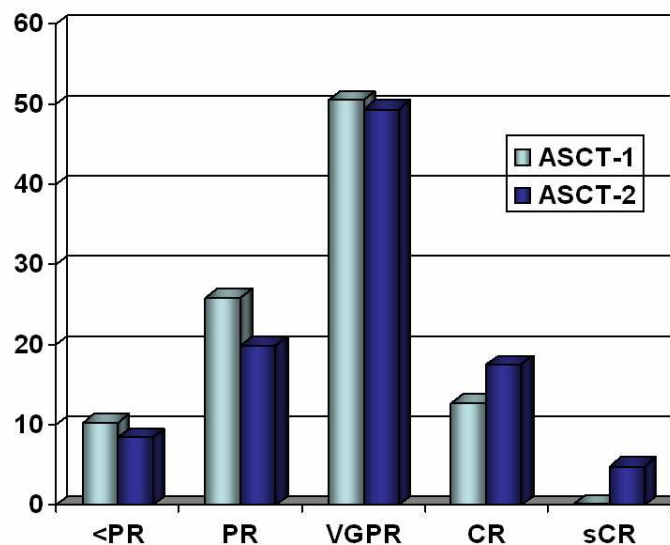


Figura 24: Risposta post trapianto

Complessivamente, circa il 70% dei pazienti ha mantenuto stabile il livello di risposta ottenuto con il primo trapianto, (che in un 10% dei casi era già una CR), un 5% ha riportato una deflessione, mentre circa ¼ dei pazienti ha migliorato la qualità della risposta. In particolare, il 2° trapianto ha consentito di upgradare la categoria di risposta in 39 pazienti, con netta riduzione di risposte subottimali (SD e PR) a favore di un incremento di remissione completa o stringente.

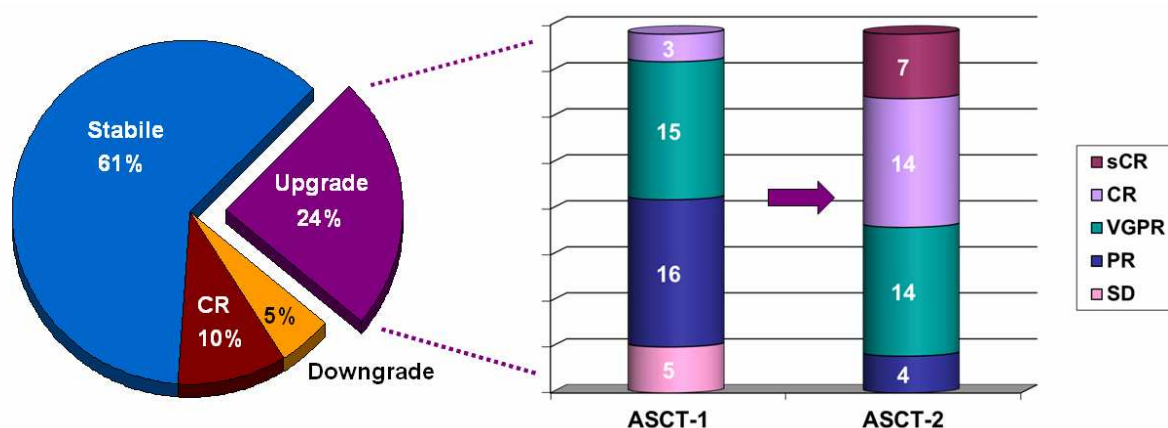


Figura 25: Evoluzione della risposta tra ASCT-1 e ASCT-2

10.4 CONSOLIDAMENTO (R2)

Per completezza, un accenno alla valutazione dell'ultimo endpoint primario dello studio, ovvero l'impatto sulla PFS della terapia di consolidamento con bortezomib-lenalidomide-desametasone (VRD) seguita da mantenimento con lenalidomide versus sola lenalidomide, condotta nello specifico dal gruppo Olandese³³⁷.

903 pazienti sono risultati eleggibili per R2 e sono stati randomizzati a ricevere consolidamento (459) o nessun consolidamento (444). Con un follow up mediano di circa 25 mesi dalla R2, la PFS stimata a 3 anni era del 65% per i pazienti trattati con VRD vs 60% nel gruppo di controllo. La PFS aggiustata per R1 è risultata significativamente superiore nel braccio VRD (HR=0.78; CI=0.61-1.00; p=0.045). Tale vantaggio è stato osservato per pazienti a rischio citogenetico standard (HR=0.68; p=0.03) ma non in pazienti portatori di anomalie citogenetiche ad alto rischio (HR=1.03; p=0.91). Nessuna differenza per quanto riguarda l'OS, risultata dell'87% a 3 anni per entrambi i gruppi. La tossicità osservata in corso di consolidamento è stata limitata, prevalentemente di tipo ematologico (24% di grado ≥ 3).

11. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, la miglior conoscenza della patogenesi della malattia e l'identificazione di nuovi farmaci hanno portato ad una significativa evoluzione del paradigma terapeutico del mieloma multiplo: da un approccio basato sulla chemioterapia convenzionale (e quindi su un'azione citotossica aspecifica contro il clone neoplastico) ad un'era di terapia mirata, in cui nuove molecole e loro combinazioni bersagliano specifici meccanismi di crescita e sopravvivenza plasmacellulare^{134, 338}.

Tra i nuovi farmaci entrati a far parte stabilmente della pratica clinica, agenti immunomodulatori ed inibitori del proteasoma, variabilmente associati tra loro o in combinazione con chemioterapici convenzionali, hanno drasticamente migliorato l'outcome clinico dei pazienti, sia all'esordio che nelle fasi più avanzate di malattia, ed indipendentemente dall'età, consentendo di ottenere rate di risposte di alta qualità senza precedenti ed un significativo prolungamento della sopravvivenza^{1-2, 300, 339-340}.

Questi brillanti risultati hanno portato alcuni gruppi di studio a mettere in discussione il ruolo al giorno d'oggi ed il corretto timing del trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (ASCT), procedura che, pur gravata da una significativa tossicità, rappresenta da oltre 20 anni lo *standard of care* per pazienti giovani all'esordio di malattia. In particolare il quesito è se ASCT impiegato *upfront* rimanga l'approccio migliore o se invece non possa rivelarsi più efficace (e meno tossico) adottare una strategia terapeutica basata su nuovi farmaci, senza chemioterapia ad alte dosi, con la possibilità di proporre il trapianto come terapia di salvataggio al momento della ricaduta di malattia.

I primi dati a tal proposito emergono da uno studio randomizzato di fase III di Palumbo e colleghi, che ha confrontato prospetticamente, su 273 pazienti all'esordio, l'efficacia di un consolidamento con melphalan a basse dosi, prednisone e lenalidomide (MPR) *versus* chemioterapia ad alte dosi ed ASCT, somministrato dopo terapia comune di induzione con lenalidomide-desametasone (Rd). Il disegno dello studio prevedeva inoltre una ulteriore randomizzazione a ricevere o meno una terapia di mantenimento con sola lenalidomide. Con un follow up mediano superiore a 50 mesi, lo studio ha dimostrato un significativo vantaggio associato ad ASCT rispetto ad MPR, sia in termini di PFS (43 vs 22 mesi; HR=0.44, p<0.01), che di OS (stimata a 4 anni dell'82% vs 65%; HR=0.55, p=0.02)²⁹⁵. Da considerare come lo schema MPR abbia fatto registrare un alto rate di tossicità ematologica, pur se significativamente ridotta rispetto al braccio ASCT (neutropenia grado 3-4: 52% vs 94%).

Un secondo studio dello stesso gruppo di ricerca ha poi valutato, sempre in pazienti all'esordio, un consolidamento (post terapia di induzione secondo schema Rd) con

ASCT contrapposto al regime CRD (ciclofosfamide-lenalidomide-desametasone), dimostrando ancora una volta la superiorità del trapianto nell'esercitare un duraturo controllo di malattia (PFS 43 vs 29 mesi, $p < 0.001$) e nel prolungare la sopravvivenza a lungo termine (OS a 4 anni dell'86% vs 73% per il braccio CRD; $p = 0.004$)³⁴¹.

Da sottolineare come, sebbene gli studi sopracitati dimostrino un miglior outcome associato ad ASCT, in entrambi una quota rilevante di pazienti non abbia terminato la terapia di induzione, probabilmente anche per l'utilizzo di un regime subottimale. Esistono infatti numerose evidenze in letteratura a supporto di schemi di induzione a 3 farmaci e comprensivi di inibitori del proteasoma, in virtù della loro provata efficacia nell'indurre precocemente risposte di alta qualità rispetto ad altre combinazioni^{263, 265, 267}.

Più recentemente sono stati condotti, quasi in contemporanea, 2 diversi trials multicentrici di fase III che hanno valutato il ruolo del trapianto autologo upfront nel contesto di un programma di induzione ed intensificazione/consolidamento bortezomib-based: il primo condotto dall'Intergrupe Francophone du Myelome (IFM2009³⁴²) ed il secondo disegnato dell'European Myeloma Network (EMN02/HO95, oggetto del presente elaborato).

Lo studio del gruppo francese ha arruolato complessivamente 700 pazienti, sottoposti a terapia di induzione con 3 cicli secondo schema VRD (bortezomib-lenalidomide-desametasone), seguita da una randomizzazione in rapporto 1:1 tra consolidamento con solo VRD (per ulteriori 5 cicli) o ASCT con 2 cicli addizionali di VRD. Tutti i pazienti ricevevano poi mantenimento con lenalidomide a basse dosi per un anno. I risultati dello studio, recentemente pubblicati, hanno evidenziato un significativo prolungamento della PFS (endpoint primario del trial) per i pazienti randomizzati ad ASCT rispetto a solo VRD (50 vs 36 mesi; HR=0.65, 95%CI=0.53-0.80, $p < 0.001$). Anche la qualità della risposta si è dimostrata significativamente migliore nei pazienti sottoposti ad ASCT, con un rate di CR post consolidamento del 59% vs 48% nel gruppo trattato solo con nuovi farmaci ($p = 0.03$); un vantaggio che si è confermato anche in termini di valutazione della malattia minima residua, con 79% vs 65% di pazienti MRD-negativi in citofluorimetria nei due gruppi, rispettivamente ($p < 0.001$). Nessuna differenza significativa è invece emersa per quanto riguarda l'OS, stimata dell'80% circa a 4 anni; mentre una maggior sopravvivenza è stata dimostrata per pazienti che hanno ottenuto una MRD-negatività rispetto a presenza di malattia ancora detectabile, indipendentemente dal trattamento ricevuto (HR 0.34, $p < 0.001$). La randomizzazione ad ASCT è risultata associata ad una percentuale superiore di eventi avversi di grado 3-4 di tipo ematologico, gastrointestinale ed infettivo; rate sostanzialmente sovrapponibile tra i 2 gruppi invece per quanto riguarda incidenza di neuropatia periferica, seconde neoplasie e morti legate al trattamento³⁴².

Analogamente al trial francese, l'endpoint primario del protocollo EMN02/HO95 era il confronto in PFS tra ASCT (singolo o tandem a seconda della policy dei diversi centri) ed una intensificazione con nuovi farmaci, in questo caso bortezomib associato a prednisone e chemioterapia a dosi standard (schema VMP) somministrati dopo induzione con bortezomib-ciclofosfamide-desametasone (VCD), con la differenza di una popolazione in studio considerevolmente superiore: più di 1500 pazienti arruolati complessivamente – una delle più ampie casistiche riportate sinora nell'ambito degli studi accademici prospettici condotti in questo setting di pazienti.

Con un follow up mediano di circa 38 mesi, la seconda analisi ad interim dello studio, qui riportata in dettaglio, ha dimostrato come la randomizzazione ad ASCT correli con una significativa riduzione della probabilità di recidiva di malattia, con PFS mediana non raggiunta e stimata a 3 anni del 64% per i pazienti sottoposti a trapianto rispetto a 44 mesi (o 57%) per il gruppo VMP (HR=0.76; 95%CI=0.63-0.90; p=0.002). Tale vantaggio è stato osservato indipendentemente da età e sesso dei pazienti, dal profilo citogenetico basale (standard o ad alto rischio, sia valutato sulla positività in analisi FISH per del17 e/o traslocazioni sfavorevoli a carico del cromosoma 14, o su un modello comprensivo anche delle anomalie del cromosoma 1), e dalla presenza di altri parametri con noto impatto sulla prognosi, come alto stadio ISS e R-ISS, elevati livelli di LDH, infiltrato midollare plasmacellulare massivo, bassa concentrazione emoglobinica.

La probabilità di ottenere una risposta di alta qualità è risultata significativamente superiore per il gruppo ASCT rispetto a VMP, così come il rate di MRD-negatività valutata con citofluorimetria di ultima generazione in un sottogruppo di pazienti (64% vs 36%)³⁴³.

L'analisi multivariata secondo modello di Cox ha confermato la randomizzazione ad ASCT come fattore prognostico indipendente predittivo di prolungata PFS, assieme alla presenza al baseline di un profilo citogenetico a rischio standard, basso stadio R-ISS, buoni livelli di emoglobina, ed ottenimento in corso di terapia di una risposta di alta qualità.

La sopravvivenza globale è risultata del tutto sovrapponibile tra i due gruppi di trattamento, mentre un vantaggio significativo è stato osservato in sottogruppi di pazienti ad alto rischio per profilo citogenetico (in particolare positività per delezione del 17) ed alto stadio R-ISS sottoposti ad ASCT.

Come atteso (e riportato in altri studi), il profilo di sicurezza è risultato non omogeneo tra i due trattamenti, con una superiore incidenza di tossicità ematologica severa, mucosite ed infezioni legate al regime di condizionamento submieloablativo nel braccio ASCT rispetto a VMP, che non ha comunque inficiato significativamente l'outcome dei pazienti (TRM pari all'1%).

Una delle possibili criticità del nostro studio può essere rappresentata dall'utilizzo di un regime di induzione non ottimale, se consideriamo che la combinazione bortezomib-IMiDs si è dimostrata superiore a VCD in termini di qualità della risposta ottenuta²⁷¹⁻²⁷² e che la profondità della risposta (soprattutto se raggiunta precocemente) influenza significativamente la durata della remissione^{115, 121, 344}. Ciononostante, il basso rate di remissioni osservate post induzione ed in generale la minor probabilità di raggiungere una risposta di alta qualità nel braccio VMP non ha impedito di ottenere comunque un ottimo controllo di malattia, con una mediana di PFS per questi pazienti inaspettatamente elevata, se rapportata a quanto presente in letteratura e a quanto dimostrato con VRD nello studio francese IFM2009.

I dati sinora emersi dal trial EMN02 indicano come il trapianto upfront si confermi come strategia terapeutica ottimale per pazienti giovani all'esordio di malattia; si tratta in ogni caso di un'analisi preliminare: un follow up più maturo è necessario per validare tali risultati, registrare l'incidenza di eventuali effetti collaterali a lungo termine legati alla chemioterapia ad alte dosi, e valutare l'impatto delle terapie di salvataggio adottate nei due gruppi di trattamento sulla sopravvivenza globale.

Allo stesso tempo occorre considerare che, dal momento dell'ideazione del protocollo, i miglioramenti in ambito terapeutico sono stati molteplici e rapidi, con lo sviluppo di una serie di nuove molecole, come PI di seconda generazione ed anticorpi monoclonali, che sono state ufficialmente approvate dagli enti regolatori nel setting del mieloma ricaduto-refrattario e che stanno già dimostrando una notevole, seppur preliminare, efficacia in prima linea, integrate o meno in un programma trapiantologico. La prospettiva di poter implementare a breve le opzioni terapeutiche per i pazienti in prima linea, porterà sicuramente al tentativo di definire ancora una volta il ruolo del trapianto autologo in un'era di "nuovi" nuovi farmaci. Alcuni studi a tal proposito sono già in corso.

Tra gli obiettivi secondari del protocollo EMN02 c'era anche il confronto prospettico in termini di efficacia, tossicità e fattori prognostici predittivi di outcome tra singolo (ASCT-1) e doppio trapianto autologo (ASCT-2) per pazienti arruolati in centri con una policy di tandem-ASCT. Questo allo scopo di definire, in un'era di grandi cambiamenti, l'appropriatezza e l'indicazione di un doppio trapianto: se procedura standard per tutti i soggetti giovani con malattia all'esordio o riservata solo a determinate categorie di pazienti.

Il ruolo di un doppio ASCT è stato oggetto di dibattito già in era pre-nuovi farmaci. I numerosi studi prospettici randomizzati ideati a tal proposito a partire dagli anni '90 hanno tuttavia prodotto risultati contrastanti, sebbene in alcuni di essi sia emerso un vantaggio significativo in termini di PFS e OS correlato al doppio trapianto. Alcune sottoanalisi hanno riportato come il beneficio fosse particolarmente evidente in pazienti

che fallivano il raggiungimento di una risposta di alta qualità dopo il primo trapianto^{243-247, 345}.

Nell'era dei nuovi farmaci la letteratura disponibile su questa tematica è meno corposa. Alcuni dati preliminari relativi all'impiego upfront del doppio autologo emergono da una recente analisi integrata dei 4 principali trials europei di fase III che negli ultimi anni hanno indagato, e confrontato prospetticamente, regimi di induzione comprensivi o meno di bortezomib per pazienti con mieloma all'esordio candidati a chemioterapia ad alte dosi. Nella coorte di pazienti trattati con bortezomib e sottoposti ad ASCT (singolo o doppio a seconda del disegno di ciascuno studio), l'analisi ha evidenziato come il doppio autologo conferisca il massimo beneficio in termini di prolungamento di PFS e OS nei pazienti portatori di anomalie citogenetiche sfavorevoli, come t(4;14) e del(17p), e che non ottengono una remissione completa post terapia di induzione³⁴⁶.

Il trial StaMINA rappresenta l'unico studio prospettico di fase III volto a confrontare, in pazienti sottoposti ad ASCT dopo induzione con nuovi farmaci e che ricevevano un mantenimento con lenalidomide, un consolidamento con un secondo trapianto autologo, vs terapia con VRD, vs solo mantenimento. L'analisi preliminare del protocollo non ha evidenziato differenze significative in termini di PFS, né di OS, tra i 3 gruppi di randomizzazione, indipendentemente inoltre dalla presenza o meno di anomalie citogenetiche sfavorevoli al baseline. Tali osservazioni hanno portato gli autori a concludere che una intensificazione terapeutica con doppio ASCT, o con terapia di consolidamento comprensiva di nuovi farmaci, non apporti alcun beneficio rispetto ad un trattamento con singolo trapianto autologo e mantenimento con lenalidomide³⁴⁷.

Il nostro studio ha invece dimostrato, su una casistica di pazienti numericamente molto simile, che la randomizzazione ad ASCT-2 correla significativamente con una prolungata PFS rispetto al singolo trapianto (72.5% a 3 anni vs 64%; HR=0.70; CI=0.50-0.98; P=0.040), e che tale vantaggio appare particolarmente evidente in sottogruppi di pazienti a diverso rischio prognostico per presenza di profilo citogenetico basale sfavorevole o alto stadio R-ISS. In particolare, l'esecuzione di un doppio trapianto sembra mitigare l'impatto prognostico negativo conferito dalla positività per del(17p): le stime di PFS sono del tutto sovrapponibili per pazienti portatori o meno della delezione nel braccio ASCT-2 (p=0.354), mentre il controllo di malattia appare significativamente meno duraturo per i pazienti trattati con ASCT-1 (PFS 43% vs 67% in presenza e assenza di delezione, rispettivamente). Il beneficio clinico conferito da ASCT-2 si traduce anche in un significativo prolungamento della sopravvivenza a lungo termine, con OS stimata a 3 anni dell'89% vs 82% nel gruppo ASCT-1 (HR=0.52, CI=0.31-0.86, p=0.011), confermato ancora una volta anche per pazienti ad alto rischio prognostico.

L'esecuzione di 2 linee sequenziali di chemioterapia ad alte dosi non dimostra un effetto additivo sull'incidenza di eventi avversi di grado 3-4 e soprattutto non si associa ad

un'aumentato rischio di mortalità legato alla procedura (TRM dell'1% circa in entrambi i gruppi di trattamento).

Ovviamente non è semplice riuscire ad identificare le ragioni sottese ad un così diverso esito dei 2 trial sopracitati. Molto probabilmente giocano un ruolo importante le differenze nel disegno degli studi, come ad esempio l'impiego di una terapia di induzione comune per tutti i pazienti e con un numero fisso di cicli nel trial EMN02, molto eterogenea invece, sia per tipo e numero di farmaci associati che per durata (sino a 12 mesi), per StaMINA; oppure la possibilità di ricevere nel nostro studio in un 50% dei casi una ulteriore terapia di consolidamento post ASCT sulla base di una seconda randomizzazione. Sicuramente un peso di rilievo riveste anche la diversa aderenza ai trattamenti pianificati nel protocollo: oltre l'80% dei pazienti randomizzati ad ASCT-2 nel trial EMN ha effettivamente ricevuto un doppio trapianto vs il 68% nello studio americano³⁴⁷.

In conclusione la chemioterapia ad alte dosi con trapianto autologo di cellule staminali si associa ad un più duraturo controllo di malattia e ad un miglior rate di risposte di alta qualità rispetto ad una intensificazione con nuovi farmaci. Il vantaggio in termini di PFS si conferma in analisi multivariata ed in sottogruppi di pazienti sia a basso che ad alto rischio prognostico. Il trapianto autologo upfront continua ad essere, al momento, il gold standard terapeutico per il paziente giovane con malattia all'esordio.

In tale contesto, l'esecuzione di un doppio trapianto autologo è in grado di conferire un significativo prolungamento sia di PFS che di OS, beneficio che appare particolarmente evidente in pazienti con caratteristiche basali notoriamente predittive di cattiva prognosi, come stadio R-ISS elevato e presenza di anomalie citogenetiche sfavorevoli. Tali dati preliminari necessitano di essere confermati e validati con un più prolungato periodo di osservazione.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Cavo M, et al. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6063-73
2. San Miguel JF, et al. Bortezomib plus Melphalan and Prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*, 2008. 359(9): p. 906-17
3. Kyle RA. & Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 111, 2962-2972 (2008)
4. Dispenzieri A, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 23, 215-224 (2009)
5. Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 2013;49(6), p.1374
6. Morgan GJ, et al. Inherited genetic susceptibility to multiple myeloma. *Leukemia*, 2014, 28(3):518-524
7. Landgren O, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412-5417
8. Kyle RA, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The New England journal of medicine*. 2002;346(8):564-569
9. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(25):2582-2590
10. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121: 749-57
11. Mateos MV, Hernandez MT, Giraldo P, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2013;369(5):438-447
12. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet oncology*. 2014;15(12):e538-548
13. Terpos E, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2005;16(8):1223-1231
14. Torra R, et al. Patients with multiple myeloma requiring long-term dialysis: presenting features, response to therapy, and outcome in a series of 20 cases. *Br J Haematol* 1995; 91: 854-859
15. Augustson BM, et al. Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council trials between 1980 and 2002 - Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 20;23(36):9219-26
16. Laing AA, Geddes C, Soutar R. Renal impairment at presentation in multiple myeloma continues to be associated with poor survival. *British journal of haematology*. 2015;169(6):901-902
17. Dimopoulos MA, Kastiris E, Rosinol L, Bladé J, Ludwig H. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(8):1485-1493
18. Dimopoulos MA, et al. Renal impairment in patients with multiple myeloma: a consensus statement on behalf of the International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2010;28:4976-4984
19. Hutchison CA, Batuman V, Behrens J, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol* 2011;8:43-51
20. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist UH, et al. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2015;100(1):107-113
21. Hallek M, Bergsagel PL & Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91, 3-21 (1998)
22. Pileri A & Tarocco RP. In vivo kinetic studies in human myeloma. *Haematologica* 59, 10-24 (1974)
23. Bast EJ, van Camp B, Reynaert P, Wiringa G & Ballieux RE. Idiotypic peripheral blood lymphocytes in monoclonal gammopathy. *Clin Exp Immunol* 47, 677-682 (1982)

24. Billadeau D, et al. Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Blood* 80, 1818-1824 (1992)
25. MacLennan IC. In which cells does neoplastic transformation occur in myelomatosis? *Curr Top Microbiol Immunol* 182, 209-214 (1992)
26. Caligaris-Cappio F, et al. Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. *Blood* 77, 2688-2693 (1991)
27. Anderson K.C. Moving disease biology from the lab to the clinic. *Cancer* 97, 796-801 (2003)
28. Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia*. 2009;23(1):10-24
29. Anderson KC. Oncogenomics to Target Myeloma in the Bone Marrow Microenvironment. *Clin Cancer Res* 2011;17(6):1225-33
30. Urashima M, et al. Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood* 87, 1928-1938 (1996)
31. Klein B, et al. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 85, 863-872 (1995)
32. Carroll M. & Abrams CS. Signaling, drugs and apoptosis of myeloma cells. *Cancer Biol Ther* 3, 195-196 (2004)
33. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D. & Anderson K.C. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5991-6000 (2001)
34. Georgii-Hemming P, Wiklund HJ, Ljunggren O. & Nilsson K. Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood* 88, 2250-2258 (1996)
35. Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic Multiple Myeloma Progenitors, Stem Cell Properties and Drug Resistance. *Cancer Res*. 2008; 68: p. 190-197
36. Hanahan D. & Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364 (1996)
37. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82, 4-6 (1990)
38. Talks KL, Harris AL. Current status of antiangiogenic factors. *British Journal of Haematology*, 2000; 109(3): 477-489
39. Lewis C, Murdoch C. Macrophage responses to hypoxia: Implications for Tumor Progression and Anti-Cancer Therapies. *American Journal of Pathology*, 2005, 167(3), p.627-635.
40. Di Raimondo F, et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* 85, 800-805 (2000)
41. Vacca A, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 87, 503-508 (1994)
42. Kumar S, et al. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia*. 2005;19(8):1466-1470
43. Munshi NC & Wilson C. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Semin Oncol* 28, 565-569 (2001)
44. Rajkumar SV, et al. Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia* 13, 469-472 (1999)
45. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia*. 2009;23(3):435-441
46. Abe M, et al. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood*. 2004;104(8):2484-2491
47. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;253(2):395-400
48. Giuliani N, Colla S, Rizzoli V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). *Experimental Hematology*. 2004;32(8):685-691

49. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-176
50. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barillé S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*. 2001;98(13):3527-3533
51. Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002;100(8):3002-3007
52. Terpos E, Politou M, Szydlo R, Goldman JM, Apperley JF, Rahemtulla A. 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):106-109
53. Masih-Khan E, Trudel S, Heise C, et al. MIP-1alpha (CCL3) is a downstream target of FGFR3 and RAS-MAPK signaling in multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(10):3465-3471
54. Tosi P, Terragna C, Testoni N, et al. Evaluation of bone disease in multiple myeloma patients carrying the t(4;14) chromosomal translocation. *European journal of haematology*. 2008;80(1):31-36
55. Ehrlich LA, Chung HY, Ghobrial I, et al. IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106(4):1407-1414
56. Abildgaard N, et al. Biochemical markers of bone metabolism reflect osteoclastic and osteoblastic activity in multiple myeloma. *European journal of haematology*. 2000;64(2):121-129
57. Silvestris F, Cafforio P, Calvani N, Dammacco F. Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells. *British journal of haematology*. 2004;126(4):475-486
58. Giuliani N, Colla S, Morandi F, et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood*. 2005;106(7):2472-2483
59. Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2003;349(26):2483-2494
60. Kaiser M, et al. Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma. *European journal of haematology*. 2008;80(6):490-494
61. Taberero D, et al. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* 149, 153-161(1996)
62. Smadja NV, et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* 12, 960-969 (1998)
63. Fonseca R, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23, 2210-2221 (2009)
64. Fonseca R, et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 102, 2562-2567 (2003)
65. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL & Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 20, 571-596 (2007)
66. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood cancer journal*. 2015;5:e365
67. Chesi M, Bergsagel P. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol*. 2013 March ; 97(3): 313-323
68. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia*. 2012;26(2):349-355
69. Avet-Loiseau H, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 99, 2185-2191 (2002)

70. Avet-Loiseau, H., et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 109, 3489-3495 (2007)
71. Fonseca R, et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood*, 2002;99(10): 3735-41
72. Chesi M, et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*, 1998; 92(9):3025-34
73. Chang H, et al. The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *Br J Haematol* 125, 64-68 (2004)
74. Cavo M, et al. Poor outcome with front-line autologous transplantation in t(4;14) multiple myeloma: low complete remission rate and short duration of remission. *J Clin Oncol* 24, e4-5 (2006)
75. Moreau P, et al. Heterogeneity of t(4;14) in multiple myeloma. Long-term follow-up of 100 cases treated with tandem transplantation in IFM99 trials. *Leukemia* 21, 2020-2024 (2007)
76. Xie Z, et al. MMSET regulates expression of IRF4 in t(4;14) myeloma and its silencing potentiates the effect of bortezomib. *Leukemia*. 2015;29(12):2347-2354
77. Fonseca R, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia* 15, 981-986 (2001)
78. Shaughnessy J, et al. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood* 101,3849-3856 (2003)
79. Facon T, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 97, 1566-1571 (2001)
80. Desikan R, et al. Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood* 95, 4008-4010 (2000)
81. Gutierrez NC, Castellanos MV, Martin ML, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia*. 2007;21(1):143-150
82. Shaughnessy JJ, et al. Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *Br J Haematol* 120, 44-52 (2003)
83. Drach J, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*, 1998, 92(3), p. 802-9
84. Chang H, Qi C, Yi QL, et al. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* 105, 358-360 (2005)
85. Chang H, et al. Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions. *Br J Haematol*, 2004, 127(3), p.280-4
86. Fonseca ., et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia* 20, 2034-2040 (2006)
87. Hanamura I. et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*, 2006, 108(5), p.1724-32
88. Chng WJ, et al. Correlation between array-comparative genomic hybridization-defined genomic gains and losses and survival: identification of 1p31-32 deletion as a prognostic factor in myeloma. *Leukemia* 24, 833-842 (2010)
89. Annunziata CM, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 2007, 12(2), p.115-30

90. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer cell*. 2007;12(2):131-144
91. Chng WJ, et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia*, 2008, 22(12), p. 2280-4
92. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016 Jun 16;127(24):2955-62
93. Chapman MA, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 2011(471) p. 467-72
94. 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):1060-1066
95. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia*. 2014;28(8):1705-1715
96. Dean Smith D, Yong K. Advances in understanding prognosis in myeloma. *Br Journal of Haemat*, 2016, 175, 367-380
97. Durie BG. & Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36, 842-854 (1975)
98. Cassuto JP, Krebs BJ, Viot G, et al: Beta 2 microglobulin, a tumor marker of lymphoproliferative disorders. *Lancet* 2:108-109, 1978
99. Greipp PR, et al. Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood* 81, 3382-3387 (1993)
100. Bataille R, Boccadoro M, Klein B, et al. A. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood* 80, 733-737 (1992)
101. Dimopoulos MA, et al. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med* 115, 931-935 (1991)
102. Barlogie B, Smallwood L, Smith T, et al. High serum levels of lactic dehydrogenase identify a high-grade lymphoma-like myeloma. *Ann Intern Med* 110:521-525, 1989
103. Kyle RA. Prognostic factors in multiple myeloma. *Stem Cells* 13 Suppl 2, 56-63 (1995)
104. Greipp PR, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23, 3412-3420 (2005)
105. Neben K, et al. Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica* 95:1150-1157, 2010
106. Moreau P, Cavo M, Sonneveld P, et al: Combination of international scoring system 3, high lactate dehydrogenase, and t(4;14) and/or del(17p) identifies patients with multiple myeloma (MM) treated with front-line autologous stem cell transplantation at high-risk of early MM progression-related death. *J Clin Oncol* 32:2173-2180, 2014
107. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(26):2863-2869
108. van de Donk NWCJ, Lokhorst HM, Anderson KC, Richardson PG. How I treat plasma cell leukemia. *Blood*. 2012;120(12):2376-2389
109. Usmani SZ et al. Primary plasma cell leukemia: clinical and laboratory presentation, gene-expression profiling and clinical outcome with Total Therapy protocols. *Leukemia* (2012) 26, 2398–2405
110. Fernandez de Larrea C, Kyle RA, Durie BGM, et al; International Myeloma Working Group. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia*. 2013;27(4):780-791

111. Varettoni M, Corso A, Pica G, et al. Incidence, presenting features and outcome of extramedullary disease in multiple myeloma: a longitudinal study on 1003 consecutive patients. *Ann Oncol.* 2010;21(2):325-330
112. Blade J, Fernandez de Larrea C, Rosinol L, et al. Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. *J Clin Oncol.* 2011;29(28):3805-3812
113. Usmani SZ, et al. Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica.* 2012;97(11):1761-1767
114. Touzeau C, Moreau P. How I treat extramedullary myeloma. *Blood.* 2016;127(8):971-976
115. Chanan-Khan AA, Giralt S. Importance of achieving a complete response in multiple myeloma, and the impact of novel agents. *J Clin Oncol.* 2010 May 20;28(15):2612-24
116. van de Velde HJ, et al. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica* 92, 1399-1406 (2007)
117. Gay F, et al. Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. *Blood* 2011;117:3025-31
118. Niesvizky R, Richardson PG, Rajkumar SV, et al. The relationship between quality of response and clinical benefit for patients treated on the bortezomib arm of the international, randomized, phase 3 APEX trial in relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2008 Oct;143(1):46-53
119. Barlogie B, et al. Complete remission sustained 3 years from treatment initiation is a powerful surrogate for extended survival in patients with multiple myeloma. *Cancer* 2008;113:355-359
120. Barlogie B, Van Rhee F, Shaughnessy JD, et al. Making progress in treating multiple myeloma with total therapies: issue of complete remission and more. *Leukemia* 2008;22:1633-1636
121. Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):4017-23
122. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood.* 2014;123(20):3073-3079
123. Zamagni E, Cavo M. The role of imaging techniques in the management of multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2012 Dec;159(5):499-513
124. Walker R, Barlogie B, Haessler J, et al. Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: diagnostic and clinical implications. *J Clin Oncol* 25:1121–1128 (2007)
125. Zamagni E, et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET-CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood* 118(23); 5989-5995 (2011)
126. Laubach JP., Richardson PG. and Anderson KC. The evolution and impact of therapy in multiple myeloma. 2010, *Med Oncol*
127. Alexanian R. & Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 330, 484-489 (1994)
128. Salmon SE, et al. Intermittent high-dose prednisone therapy for multiple myeloma. *Cancer Chemother Rep*, 1967, 51(3), p.179-87
129. Alexanian R, et al. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*, 1992, 80(4), p. 887-90
130. Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Oncol* 16, 3832-3842 (1998)
131. Cavo M, et al. MP versus alternating combination VAD/MP or VND/MP as primary therapy for multiple myeloma: final analysis of a randomized clinical study. *Haematologica*, 2002;(87):934-1342
132. Samson D, Gaminara E, Newland A, et al. Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma. *Lancet (London, England).* 1989;2(8668):882-885

133. Barlogie B, Hall R, Zander A, Dicke K & Alexanian R. High-dose melphalan with autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma. *Blood* 67, 1298-1301 (1986)
134. Raab MS, et al. Multiple myeloma. *Lancet*. 2009 Jul 25;374(9686):324-39.
135. Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, et al. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):525-42
136. Neil Vargesson. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2015 105(2), p.140-156
137. D'Amato RJ, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994; 91: 4082-85
138. Shingal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of Thalidomide in refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 1999; 341: 1565-1571
139. Neben K, et al. Response to thalidomide in progressive multiple myeloma is not mediated by inhibition of angiogenic cytokine secretion. *British Journal of Haematology*, 2001; 115: 605-608
140. Payvandi F, Wu L, Gupta D, et al. Effects of a thalidomide analog on binding activity of transcription factors and cell cycle progression of multiple myeloma cell lines. *Blood*, 2000; 96: 579a
141. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, et al. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *Journal of Experimental Medicine*, 1993; 177: 1675-80
142. Hideshima T, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*, 2001, 20(33), p.4519-27
143. Geitz H, Handt S, Zwingenberger K. Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. *Immunopharmacology*, 1996; 31: 213-221
144. Gupta D, Treon SP, Shima Y, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*. 2001;15(12): 1950-1961
145. Mitsiades N, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood*, 2002; 99: 4525-30
146. Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *Journal of Experimental Medicine*, 1998; 187: 1885-92
147. Davies FE, Raje N, Hideshima T, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, 2001;(98):210-216
148. Ghobrial IM, Rajkumar SV. Management of thalidomide toxicity. *J Support Oncol*, 2003; 1: 194-205
149. Chaudhry V, Cornblath DR, Corse A, Freimer M, Simmons-O'Brien E, Vogelsang G. Thalidomide-induced neuropathy. *Neurology*, 2002; 59: 1872-75
150. Isoardo G, Begui M, Durelli L, Barbero P, Boccadoro M, Bertola A, Ciaramitaro P, Palumbo A, Bergamasco B, Cocito D. Thalidomide neuropathy: clinical, electrophysiological and neuroradiological features. *Acta Neurol Scand*, 2004; 109: 188-193
151. Plasmati R., Pastorelli F., Cavo M. et al. Neuropathy in multiple myeloma treated with thalidomide: A prospective study., *Neurology*, 2007;(69):573-581
152. Tosi P, Zamagni E, Cellini C, et al. Neurological toxicity of long-term (>1 yr) thalidomide therapy in patients with multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, 2005; 74(3): 212-216
153. Rodeghiero F, Elice F. Thalidomide and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003; 33(suppl.1): 15-18
154. Zamagni E, et al. Multiple myeloma, venous thromboembolism, and treatment-related risk of thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2011;37:209-219
155. Palumbo A, et al. Aspirin, warfarin, or enoxaparin thromboprophylaxis in patients with multiple myeloma treated with thalidomide: a phase III, open-label, randomized trial. *J Clin Oncol*, 2011;29:986-993

156. Kotla V, Goel S, Nischal S, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*. 2009;2:36
157. Anderson K. Lenalidomide and thalidomide: mechanisms of action--similarities and differences. *Semin Hematol*, 2005,42(4 Suppl 4),p.S3-8
158. Quach H, Ritchie D, Stewart AK. et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*, 2010;(24):22-32
159. Pawlyn C, et al. Lenalidomide-induced diarrhea in patients with myeloma is caused by bile acid malabsorption that responds to treatment. *Blood*, 2014;124(15):2467-8
160. Lacy MQ, Hayman SR, Gertz MA, et al. Pomalidomide (CC4047) plus low-dose dexamethasone as therapy for relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 2009; 27: 5008-5014
161. San Miguel J, Weisel K, Moreau P et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2013; 14:1055-1066
162. Hoffman M, Kasserra C, Reyes j et al. Absorption, metabolism and excretion of [¹⁴C]pomalidomide in humans following oral administration. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013;71: 489-501
163. Schey S, Ramasamy K. Pomalidomide therapy for myeloma. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011; 117:691-700
164. Lacy MQ et al. Pomalidomide (CC4047) plus low dose dexamethasone (Pom/dex) is active and well tolerated in lenalidomide refractory multiple myeloma (MM). *Leukemia*, 2010; 24(11):1934-1939
165. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*. 2011;118(18):4771-4779
166. Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia*. 2012;26(11):2326-2335
167. Gandhi AK, et al. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4 (CRBN). *British journal of haematology*. 2014;164(6):811-821
168. Schuster SR, et al. Cereblon Expression Predicts Response, Progression Free and Overall Survival After Pomalidomide and Dexamethasone Therapy in Multiple Myeloma. *Blood*. 2012;120(21):194-194
169. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014;124(4):536-545
170. Kortüm KM, Zhu YX, Shi CX, Jedlowski P, Stewart AK. Cereblon binding molecules in multiple myeloma. *Blood reviews*. 2015;29(5):329-334
171. Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B & Orłowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 9, 6316-6325 (2003)
172. Crawford LJ, et al. Targeting the ubiquitin proteasome system in haematological malignancies. *Blood Rev*, 2013; 27(6):297-304
173. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, et al. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 2006;107:4907-4916
174. Vincenz L, Jager R, O'Dwyer M, and Samali A. Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response: Targeting the Achilles Heel of Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(6): 831-43
175. Adams J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med* 8, S49-54 (2002)
176. Hideshima T, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61, 3071-3076 (2001)
177. Orłowski RZ, et al. NF- κ B as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8, 385-389 (2002)
178. Bruno B, et al. New drugs for treatment of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 5, 430-442 (2004)
179. Li B. e Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. 97, 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, p. 3850-3855

180. Salvat C, Aquaviva C, Jariel-Encontre I, et al. Are there multiple proteolytic pathways contributing to c-Fos, c-Jun and p53 protein degradation in vivo?: *Mol Biol Rep* 1999;(26):45-51
181. Mitsiades N, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*, 2003;(101):2377-2380
182. Ri M. Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Int J Hematol*, 2016
183. Gu H, et al. Caspase-2 functions upstream of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by bortezomib in human myeloma cells. *Mol Cancer Ther*, 2008,7(8), p.2298-307
184. Dent P, Jarvis WD, Birrer MJ. et al. The roles of signaling by the p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway; a potential route to radio- and chemo-sensitization of tumor cells resulting in the induction of apoptosis and loss of clonogenicity. *Leukemia*, 1998;(12):1843-1850
185. Loo TW, Clarke DM. The human multidrug resistance P-glycoprotein is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(13):1724-1732.
186. Mohty M, Malard F, Mohty B, Savani B, Moreau P, Terpos E. The effects of bortezomib on bone disease in patients with multiple myeloma. *Cancer*. 2014;120(5):618-623
187. Zhu W, Chen W. Bortezomib-based treatment for multiple myeloma patients with renal impairment: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Medicine*. 2016;95(46):e5202
188. Cavo M. Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 2006(20):1341–1352
189. Mateos MV. Management of treatment-related adverse events in patients with multiple myeloma. *Cancer treatment reviews*. 2010;36 Suppl 2:S24-32
190. Dimopoulos MA, et al. Risk factors for, and reversibility of, peripheral neuropathy associated with bortezomib-melphalan-prednisone in newly diagnosed patients with multiple myeloma: subanalysis of the phase 3 VISTA study. *Eur J Haematol* 2011; 86, p.23-31
191. Richardson PG, et al. Reversibility of symptomatic peripheral neuropathy with bortezomib in the phase III APEX trial in relapsed multiple myeloma: impact of a dose-modification guideline. *Br J Haematol* 2009; 144, p.895-903
192. Tacchetti P, et al. Bortezomib- and thalidomide-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: clinical and molecular analyses of a phase 3 study. *Am. J. Hematol*. 2014; 89:1085-91
193. Richardson PG, Xie W, Mitsiades C, et al. Single-agent bortezomib in previously untreated multiple myeloma: efficacy, characterization of peripheral neuropathy, and molecular correlations with response and neuropathy. *J Clin Oncol*, 2009;27:3518-3525.
194. Corthals SL, Kuiper R, Johnson DC, et al. Genetic factors underlying the risk of bortezomib induced peripheral neuropathy in multiple myeloma patients. *Haematologica*, 96, 1728-1732 (2011)
195. Cavaletti G. Bortezomib-induced peripheral neuropathy: facts and genes. *Lancet Oncol*, 12, 120-121 (2011)
196. Moreau P, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol*, 2011;12(5): 431-40
197. Murai K, et al. Bortezomib induces thrombocytopenia by the inhibition of proplatelet formation of megakaryocytes. *Eur J Haematol*, 2014, 93(4), p.290-6
198. Heider U, Rademacher J, Kaiser M. et al. Decrease in CD4+ T-cell counts in patients with multiple myeloma treated with bortezomib. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 10,134-137 (2010)
199. Swaika A, Paulus A, Miller KC, et al. Acyclovir prophylaxis against varicella zoster virus reactivation in multiple myeloma patients treated with bortezomib-based therapies: a retrospective analysis of 100 patients. *J Support Oncol*. 2012 Jul-Aug;10(4):155-9
200. Kortuem KM and Stewart AK. Carfilzomib. *Blood*, 2013; 121: 893-897
201. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res*, 2007; 67:6383-6391

202. Hurchla MA, Garcia-Gomez A, Hornick MC, et al. The epoxyketone-based proteasome inhibitors carfilzomib and orally bioavailable oprozomib have anti-resorptive and bone-anabolic activity in addition to anti-myeloma effects. *Leukemia*. 2013;27(2):430-440
203. Siegel DS, Martin T, Wang M, et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*, 2012;120(14):2817-25.
204. Vij R, Wang M, Kaufman JL, et al. An open-label, single-arm, phase 2 (PX-171-004) study of single-agent carfilzomib in bortezomib-naive patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5661-70.
205. Stewart, et al. Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;372:142-52
206. Dimopoulos, 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. *Lancet Oncol*. 2016;17:27-38
207. Hájek R et al. A substudy of the phase 3 ENDEAVOR study: serial echocardiographic assessment of patients with relapsed multiple myeloma (RMM) receiving Carfilzomib plus Dexamethasone or Bortezomib plus Dexamethasone. *Haematologica*, 2016;101(s1):263
208. Rosenthal A et al. Carfilzomib and the cardiorenal system in myeloma: an endothelial effect? *Blood Cancer Journal* (2016) 6, e384
209. Mikhael J, et al. Management of Carfilzomib-Associated Cardiac Adverse Events. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 2016, Vol. 16, No. 5, 241-5
210. Kupperman E, et al. Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer. *Cancer Res* 2010;70:1970-80
211. Lee EC, et al. Antitumor Activity of the Investigational Proteasome Inhibitor MLN9708 in Mouse Models of B-cell and Plasma Cell Malignancies. *Clin Cancer Res* 2011;17:7313-23
212. Chauhan D, Tian Z, Zhou B, Kuhn D, Orlowski R, Raje N, Richardson P, Anderson KC. (2011) In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clin Cancer Res*. 15; 17(16): 5311-21
213. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, et al. Oral ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England journal of medicine*. 2016;374(17):1621-1634
214. Kumar 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. *Lancet Oncol* 2014;15:1503-1512
215. Afifi S, et al. Role of Histone Deacetylase Inhibitors in Relapsed Refractory Multiple Myeloma: A Focus on Vorinostat and Panobinostat. *Pharmacotherapy*. 2015;35(12):1173-1188
216. Harada T, Hideshima T, Anderson KC. Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: from bench to bedside. *Int J Hematol* (2016) 104:300–309
217. Richardson PG, et al. Panobinostat: a novel pan-deacetylase inhibitor for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Expert review of anticancer therapy*. 2015;15(7):737-748
218. San-Miguel JF, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 1195–206
219. Richardson PG, Schlossman RL, Alsina M, et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood*. 2013;122(14):2331-2337
220. Touzeau C, Moreau P, Dumontet C. Monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017 May;31(5):1039-1047
221. van de Donk NW, Moreau P, Plesner T, et al. Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma. *Blood*. 2016;127(6):681-695
222. Laubach JP, et al. Daratumumab, Elotuzumab, and the Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies in Multiple Myeloma. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 Jan;101(1):81-88

- 223.van de Donk NW, Janmaat ML, Mutis T, et al. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev.* 2016 Mar; 270(1): 95-112
- 224.Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373: 1207-19
- 225.de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol* 2011; 186: 1840-8
- 226.Overdijk MB, et al. Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *MAbs* 2015; 7: 311-21
- 227.Krejci J, et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood.* 2016;128(3):384-394
- 228.Lonial S, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2016; 387: 1551-60
- 229.Usmani SZ, Weiss BM, Plesner T, et al. Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood.* 2016;128(1):37-44
- 230.Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England journal of medicine.* 2016;375(8):754-766
- 231.Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England journal of medicine.* 2016;375(14):1319-1331
- 232.McCudden C, et al. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 1095-104
- 233.Einsele H, Schreder M. Treatment of multiple myeloma with the immunostimulatory SLAMF7 antibody elotuzumab. *Therapeutic advances in hematology.* 2016;7(5):288-301
- 234.Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *The New England journal of medicine.* 2015;373(7):621-631
- 235.Attal M, et al. Intensive combined therapy for previously untreated aggressive myeloma. *Blood* 79, 1130-1136 (1992)
- 236.Attal M, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 335, 91-97 (1996)
- 237.Child JA, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 348, 1875-1883 (2003)
- 238.Fernand JP, Ravaud P, Chevret S, et al. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood.* 1998;92(9):3131-3136
- 239.Barlogie B, et al. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2006;24(6):929-936
- 240.Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, et al. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 1999;93(1):55-65
- 241.Bladé J, Rosiñol L, Sureda A, et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood.* 2005;106(12):3755-3759
- 242.Palumbo A, et al. Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial. *Blood.* 2004;104(10):3052-3057
- 243.Attal M, et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 349, 2495-2502 (2003)
- 244.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* 25, 2434-2441 (2007)

245. Ferman J, et al. Single versus tandem high dose therapy (HDT) supported with autologous blood stem cell (ABSC) transplantation using unselected or CD34-enriched ABSC: results of a two by two designed randomized trial in 230 young patients with multiple myeloma (MM). *Haematologica* (IXth International Myeloma Foundation Workshop). 2003;88(4(1)):s297 (a268)
246. Goldschmidt H. Single vs double high-dose therapy in multiple myeloma: second analysis of the GMMG-HD2 trial. *Haematologica*. 2005(90)
247. Sonneveld P, van der Holt B, Segeren CM, et al. Intermediate-dose melphalan compared with myeloablative treatment in multiple myeloma: long-term follow-up of the Dutch Cooperative Group HOVON 24 trial. *Haematologica*. 2007;92(7):928-935
248. Moreau P, et al. Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myelome 9502 randomized trial. *Blood* 99, 731-735 (2002)
249. Samson D, Gaminara E, Nenland A, et al. Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first line therapy for multiple myeloma. *Lancet*, 1989;86(Vol.II):882-885
250. Rajkumar SV. Multiple myeloma: the death of VAD as initial therapy. *Blood*, 2005;(106):2-3
251. Cavo M, Zamagni E, Tosi P, et al. Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma. *Blood*, 2005;106:35-39
252. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol*, 2010;28:4621-4629
253. Cavo M, et al. Short-term thalidomide incorporated into double autologous stem-cell transplantation improves outcomes in comparison with double autotransplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 27, 5001-5007 (2009)
254. 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* 115, 1113-1120 (2010)
255. Morgan GJ, et al. Cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone as induction therapy for newly diagnosed multiple myeloma patients destined for autologous stem-cell transplantation: MRC Myeloma IX randomized trial results. *Haematologica*, 2012; 97(3):442-450
256. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E, et al. Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2006; 354:1021-1030
257. Barlogie B., Pineda-Roman M., Van Rhee F. et al. Thalidomide arm of Total Therapy 2 improves complete remission duration and survival in myeloma patients with metaphase cytogenetic abnormalities. *Blood*, 2008; 112(8):3115-3121
258. Barlogie B., Attal M., Crowley J. et al. Long-term follow-up of autotransplantation trials for multiple myeloma: update of protocols conducted by the Intergroup Francophone du Myelome, Southwest Oncology Group, and University of Arkansas for Medical Sciences. *JCO*, 2010; 28(7) :1209-1214
259. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IGH, Van der Holt B. et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON65/GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*, 2012; 30(24):2946-2955
260. Popat R, et al. Bortezomib, Doxorubicin and Dexamethasone (PAD) front-line treatment of multiple myeloma: updated results after long term follow-up. *Br J Haematol*, 2008; 141(4):512-516
261. Reeder CB, et al. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia* 23, 1337-1341 (2009)
262. Jakubowiak AJ, Kendall T, Al-Zoubi A, et al. Phase II trial of combination therapy with Bortezomib, pegylated liposomal doxorubicin, and dexamethasone in patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol*, 2009; 27(30):5015-5022

263. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al: Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet*, 2010;376:2075-2085
264. Pantani L, Pezzi A, Patriarca F, et al. Persistent PFS benefit and superior PFS2 with VTD vs TD for newly diagnosed, transplant eligible, multiple myeloma (MM) patients: updated analysis of GIMEMA MMY-3006 study. *Haematologica*, 2014; 99 (s1): 109 (P362)
265. Rosinol L, Oriol A, Teruel AI, et al: Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase III PETHEMA/GEM study. *Blood*, 2012; 120:1589-1596
266. Moreau P, et al. Bortezomib plus dexamethasone versus reduced-dose bortezomib, thalidomide plus dexamethasone as induction treatment before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 118, 5752-5758; quiz 5982 (2011)
267. Sonneveld P, et al: Bortezomib-based versus non-bortezomib-based induction treatment prior to autologous stem cell transplant in patients with previously untreated multiple myeloma: meta-analysis of phase 3 randomized, controlled trials. *J.Clin. Oncol* : 2013;31:3279-3287
268. Barlogie B, et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: early results of total therapy 3. *British journal of haematology*. 2007;138(2):176-185
269. Pineda-Roman M, et al. Sustained complete remissions in multiple myeloma linked to bortezomib in total therapy 3: comparison with total therapy 2. *Br J Haematol*, 2008. 140(6): p.625-34
270. Mai EK, Bertsch U, Durig J, et al. Phase III trial of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone (VCD) versus bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAd) in newly diagnosed myeloma. *Leukemia*. 2015;29(8):1721-1729
271. Cavo M, Pantani L, 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
272. Moreau P, Hulin C, Macro M, et al. VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood*. 2016;127(21):2569-2574
273. Ludwig H, et al. Randomized phase II study of bortezomib, thalidomide and dexamethasone with or without cyclophosphamide as induction therapy in previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 2013; 31(2):247-255
274. Richardson PG, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 116, 679-686 (2010).
275. 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 Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncology*. 2014;32(25):2712-2717
276. Durie BG, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389:519-527
277. Kumar SK, et al. Bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide and lenalidomide combination for newly diagnosed multiple myeloma: phase 1 results from the multicenter EVOLUTION study. *Leukemia* 24, 1350-1356 (2010)
278. 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): p.1801-9
279. Mellqvist UH, et al. Bortezomib consolidation after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a Nordic Myeloma Study Group randomized phase 3 trial. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4647-54

280. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S et al. Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J. Clin. Oncol* : 2010;28(12):2077-84
281. Terragna C, Zamagni E, Petrucci MT et al. Molecular remission after Bortezomib-Thalidomide-Dexamethasone Compared with Thalidomide-Dexamethasone as Consolidation Therapy Following Double Autologous Transplantation for Multiple Myeloma: Results of a Qualitative and Quantitative Analysis. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2010; 116: 861
282. Cavo M, Pantani L, Petrucci MT, et al. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone is superior to thalidomide-dexamethasone as consolidation therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2012 Jul 5;120(1):9-19
283. Leleu X, Hebraud B, Fouquet G et al. Consolidation with VTD significantly improves the complete remission rate following VTD induction and single autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2012; 120: 3096
284. Sonneveld P, Asselbergs E, Zweegman S, et al. Phase 2 study of carfilzomib, thalidomide, and dexamethasone as induction/consolidation therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(3):449-456
285. Jakubowiak A, et al. Improved efficacy after incorporating autologous stem cell transplant (ASCT) into KRD treatment with carfilzomib (CFZ), lenalidomide (LEN), and dexamethasone (DEX) in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* 2016;101(s1):abs S101
286. Myeloma Trialists' Collaborative Group. Interferon as therapy for multiple myeloma: an individual patient data overview of 24 randomized trials and 4012 patients. *Br J Haematol* 2001;113(4):1020-34
287. Ludwig H, Durie BG, McCarthy P, et al. IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood* 2012; 119(13): 3003-15
288. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, et al. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 2006;108(10):3289-94
289. Spencer A, Prince HM, Roberts AW, et al. Consolidation Therapy With Low-Dose Thalidomide and Prednisolone Prolongs the Survival of Multiple Myeloma Patients Undergoing a Single Autologous Stem-Cell Transplantation Procedure. *J Clin Oncol* 2009;27(11):1788-93
290. Morgan GJ, Gregory WM, Davies FE, et al. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC Myeloma IX results and meta-analysis. *Blood* 2012;119(1):7-15
291. Kagoya Y, Nannya Y, Kurokawa M. Thalidomide maintenance therapy for patients with multiple myeloma: meta-analysis. *Leukemia research*. 2012;36(8):1016-1021
292. Morgan G J et al. Long-term Follow-up of MRC Myeloma IX Trial: Survival Outcomes with Bisphosphonate and Thalidomide Treatment. *Clin Cancer Res* 2013;19:6030-6038
293. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2012;366(19):1782-91
294. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2012;366(19):1770-81
295. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Eng J Med*. 2014;371(10):895-905
296. McCarthy PL, et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2017; 35(29):3279-3289
297. Offidani M, et al. Oral ixazomib maintenance therapy in multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2016. 16(1): p. 21-32
298. Palumbo A, et al. Geriatric assessment predicts survival and toxicities in elderly myeloma patients: an International Myeloma Working Group report. *Blood*. 2015;125(13):2068-2074
299. Palumbo A, et al. Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*. 2011;118(17):4519-4529
300. Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell

- transplantation. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20;32(6):587-600
301. Facon T, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*, 2007; 370(9594): 1209-1218
302. Palumbo A, et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet*, 2006; 367(9513):825-831
303. Wijermans P, et al. Phase III study of the value of thalidomide added to melphalan and prednisone in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma: the HOVON 49 study. *J Clin Oncol*, 2010; 28(19):3160-3166
304. Fayers PM, et al. Thalidomide for previously untreated elderly patients with multiple myeloma: meta-analysis of 1685 individual patient data from 6 randomised clinical trials. *Blood*, 2011; 118(5):1239-1247
305. Brinchen S, Larocca A, Rossi D, et al. Efficacy and safety of once-weekly bortezomib in multiple myeloma patients. *Blood*, 2010; 116(23): 4745-53
306. Mateos MV, Brinchen S, Richardson PG, et al. Bortezomib cumulative dose, efficacy, and tolerability with three different bortezomib-melphalan-prednisone regimens in previously untreated myeloma patients ineligible for high-dose therapy. *Haematologica* 2014; 99(6) 1114-22
307. Palumbo A, et al. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 28, 5101-5109 (2010)
308. Mateos MV, et al. Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol* 11, 934-941 (2010)
309. Zonder JA, Crowley J, Hussein MA, et al. Lenalidomide and high-dose dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for multiple myeloma: a randomized Southwest Oncology Group trial (S0232). *Blood*. 2010;116(26):5838-5841
310. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *The Lancet oncology*. 2010;11(1):29-37
311. Benboubker L, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *The New England journal of medicine*. 2014;371(10):906-917
312. Magarotto V, Brinchen S, et al. Triplet vs doublet lenalidomide-containing regimens for the treatment of elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 2016; 127(9), p.1102-8
313. Brinchen S, Petrucci MT, Larocca A, et al. Carfilzomib, cyclophosphamide, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a multicenter, phase 2 study. *Blood*. 2014;124(1):63-69
314. Sonneveld P, Broijl A. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Haematologica* 2016;101(4):396-406
315. Laubach et al. Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 2016;30:1005-1017
316. Mohty B, et al. Treatment strategies in relapsed and refractory multiple myeloma: a focus on drug sequencing and 'retreatment' approaches in the era of novel agents. *Leukemia*, 2012; 26(1):73-85
317. Nooka AK, Kastiris E, Dimopoulos MA, Lonial S. Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3085-3099
318. Kumar SK, Lee JH, Lahuerta JJ et al. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study. *Leukemia*, 2012; 26: 149-157

319. Weber DM, Chen C, Niesvizky R, et al. Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma in North America. *N. Engl. J. Med.* 357(21), 2133–2142 (2007)
320. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, et al. Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 357(21), 2123–2132 (2007)
321. Dimopoulos MA, Chen C, Spencer A, et al. Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Leukemia.* 2009; 23:2147-52
322. Stadtmauer EA, Weber DM, Niesvizky R, et al. Lenalidomide in combination with dexamethasone at first relapse in comparison with its use as later salvage therapy in relapsed or refractory multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2009 Jun;82(6):426-32
323. Dimopoulos MA et al. Full Dose of Lenalidomide for 12 Months Followed by a Lower Maintenance Dose Improves Progression-Free Survival in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood.* 2009;114:[abstract 2874]
324. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *NEJM* 2003; 348(26):2609- 2617
325. Jagannath S, Barlogie B, Berenson JR, et al. Updated survival analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 2008; 143: 537–540
326. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 352(24), 2487–2498 (2005)
327. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood.* 110(10), 3557–3560 (2007)
328. Corso A, et al. Bortezomib plus dexamethasone is highly effective in relapsed and refractory myeloma patients but responses are short-lived. *Eur J Haematol*, 2009; 83(5):449–454
329. Pantani L, Zamagni E, et al. Bortezomib and dexamethasone as salvage therapy in patients with relapsed/ refractory multiple myeloma: analysis of long-term clinical outcomes. *Ann Hematol* (2014) 93:123–128
330. Garderet L, et al. Superiority of the Triple Combination of Bortezomib-Thalidomide-Dexamethasone Over the Dual Combination of Thalidomide-Dexamethasone in Patients With Multiple Myeloma Progressing or Relapsing After Autologous Transplantation: The MMVAR/IFM 2005-04 Randomized Phase III Trial From the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J. Clin. Oncol.* 30(20), 2475–2482 (2012)
331. Orłowski RZ, et al. Randomized Phase III Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin Plus Bortezomib Compared With Bortezomib Alone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: Combination Therapy Improves Time to Progression. *J. Clin. Oncol.* 25(25), 3892–3901 (2007)
332. Offidani M, et al. Efficacy and tolerability of bendamustine, bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed-refractory multiple myeloma: a phase II study. *Blood Cancer J.* 3(11), e162 (2013)
333. Ludwig H, et al. Bendamustine-bortezomib-dexamethasone is an active and well-tolerated regimen in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood.* 123(7), 985–991 (2014)
334. Leleu X, Attal M, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone is active and well tolerated in bortezomib and lenalidomide-refractory multiple myeloma: Intergroupe Francophone du Myelome 2009-02. *Blood*, 2013. 121(11), p. 1968-75
335. Zonder JA, et al. A phase I, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 552-559
336. Kumar S, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016;17:e328-46
337. Sonneveld P, Beksac M, van der Holt B, et al. Consolidation Followed By Maintenance Therapy Versus Maintenance Alone in Newly Diagnosed, Transplant Eligible Patients with Multiple Myeloma (MM): A Randomized Phase 3 Study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95

- MM Trial). *Blood* 2016;128:242
338. Greene JA, Jones DS, Podolsky SH. Therapeutic evolution and the challenge of rational medicine. *N. Engl. J. Med.* 367(12), 1077–1082 (2012).
339. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 111(5), 2516–2520 (2008).
340. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014 May;28(5):1122-8.
341. Gay F, et al. Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: a randomized, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:1617-29
342. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with transplantation for Myeloma. *N Eng J Med* 2017;376:1311-20
343. Oliva S, Hofste op Bruinink D, et al. Minimal residual disease (MRD) monitoring by multiparameter flow cytometry (MFC) in newly diagnosed transplant eligible multiple myeloma (MM) patients: Results from the EMN02/HO95 phase 3 trial. *J Clin Oncol. ASCO meeting 2017, Vol. 35, No. 15_suppl, abstract 8011*
344. Moreau P, Attal M, Pégourié B, et al. Achievement of VGPR to induction therapy is an important prognostic factor for longer PFS in the IFM 2005-01 trial. *Blood*. 2011;117(11):3041-3044
345. Mai EK, Benner A, Bertsch U, et al. Single versus tandem high-dose melphalan followed by autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma: long-term results from the phase III GMMG-HD2 trial. *BJH* 2016;173(5):731-41
346. Cavo M, Salwender H, Rosiñol L et al. Double Vs Single Autologous Stem Cell Transplantation After Bortezomib-Based Induction Regimens For Multiple Myeloma: An Integrated Analysis Of Patient-Level Data From Phase European III Studies. *Blood* 2013, 122:767
347. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B, et al. Comparison of Autologous Hematopoietic Cell Transplant (autoHCT), Bortezomib, Lenalidomide (Len) and Dexamethasone (RVD) Consolidation with Len Maintenance (ACM), Tandem Autohct with Len Maintenance (TAM) and Autohct with Len Maintenance (AM) for up-Front Treatment of Patients with Multiple Myeloma (MM): Primary Results from the Randomized Phase III Trial of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN 0702 - StaMINA Trial). *Blood*. 2016;128:LBA-1-LBA-1