



Studio osservazionale multicentrico sul trattamento di  
pazienti affetti da osteosarcoma localizzato  
**AIEOP/ISG OS2 Oss**

**Investigatore Principale: Prof.ssa Franca Fagioli**

S.C. Oncoematologia Pediatrica - AOU Città della Salute e della Scienza  
Presidio Ospedaliero Infantile Regina Margherita (Torino)

**Co-Chair: Dr.ssa Emanuela Palmerini**

S.C. Osteoncologia, Sarcomi dell'osso e dei tessuti molli, e Terapie Innovative  
IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli (Bologna)

**Codice dello studio: AIEOP/ISG OS2 Oss**

**Codice NCT: NCT04890067**

**Versione n. 1 del 12.03.2021**

## **Indice**

1. Sinossi	3
2. Razionale	5
3. Disegno dello studio	8
4. Durata dello studio	9
5. Obiettivi ed endpoints	9
6. Raccolta dati	9
7. Selezione dei pazienti	10
8. Statistica	10
9. Gestione della sperimentazione	11
10. Bibliografia	12

Consenso informato adulti

Consenso informato minori minori

## 1. Sinossi

<b>Titolo</b>	Studio osservazionale multicentrico sul trattamento di pazienti affetti da osteosarcoma localizzato AIEOP/ISG OS2 Oss
<b>Razionale</b>	<p>L'osteosarcoma (OS) è il tumore osseo maligno primitivo più frequente nell'età pediatrica ed adolescenziale ed è considerato una patologia rara. L'incidenza complessiva dell'OS è di 0,2-3/100.000 abitanti all'anno con una distribuzione bimodale per età, con un primo picco nell'età adolescenziale.</p> <p>Attualmente, la strategia di trattamento per l'OS localizzato include cicli di chemioterapia neo-adiuvante basati su 3 agenti: doxorubicina (ADM), cisplatino (CDP) e alti dosi di metotrexate (HDMTX) seguito dalla rimozione chirurgica del tumore primario e dal successivamente trattamento chemioterapico adiuvante. Il regime MAP (metotrexate, doxorubicina, cisplatino), con o senza ifosfamide (IFO) ed etoposide (ETO), viene considerato il "gold standard" di trattamento dell'osteosarcoma localizzato.</p> <p>Vista la rarità della patologia si ritiene opportuno a raccogliere le informazioni in modo prospettico sulla diagnosi, trattamento chemioterapico e chirurgico ed outcome sui pazienti trattati dalla rete dei Centri AIEOP ed ISG secondo le raccomandazioni sul trattamento dell'OS localizzato AIEOP/ISG OS 2021.</p> <p>Questo studio sarà attivo in attesa del prossimo protocollo prospettico interventistico mirato sulla terapia dell'OS ad alto grado, non metastatico.</p>
<b>Popolazione</b>	Pazienti con età $\leq 40$ anni affetti da osteosarcoma ad alto grado di malignità trattati secondo le raccomandazioni AIEOP/ISG OS 2021
<b>Obiettivo primario</b>	Valutazione dell'efficacia del trattamento secondo le raccomandazioni AIEOP/ISG OS 2021
<b>Obiettivo secondari</b>	- valutazione della tossicità a breve e lungo termine del trattamento secondo le raccomandazioni AIEOP/ISG OS 2021 - confronto storico con i risultati dello studio AIEOP/ISG OS2
<b>End-point primario</b>	Event Free Survival (EFS)
<b>End-points secondari</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Progression Free Survival (PFS)</li><li>✓ Overall Survival (OS)</li><li>✓ Tossicità</li><li>✓ Qualità della vita</li></ul>
<b>Disegno dello studio</b>	<p>Studio multicentrico, osservazionale, prospettico</p> <p>Scopo dello studio è valutare, tramite raccolta dati, l'efficacia e la tossicità del trattamento con scheda MAP nella fase preoperatoria e scheda MAP nella fase postoperatoria nei pazienti "good responder" (GR, necrosi chemio indotta</p>

	<p>≥90%), HD IFO per i pazienti “fair responder” (FR, necrosi chemio indotta tra 60-89%) e HD IFO + Mifamurtide per i pazienti “very poor responder” (VPR, necrosi chemio indotta &lt; 60%)</p> <p>Per i pazienti affetti da Os localizzato non dell’estremità è prevista solamente la raccolta scheda dati.</p>
<b>Durata dello studio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Inizio previsto dello studio: giugno 2021</li> <li>➤ Prevista la registrazione di tutti i pazienti che soddisfano i criteri di eleggibilità per una durata totale di 3 anni.</li> </ul>
<b>N° pazienti</b>	Considerando i dati di arruolamento dei precedenti studi ISG ed AIEOP è prevista l’inclusione di circa 40 pazienti/anno.
<b>Centri partecipanti</b>	Centri AIEOP ed ISG

## 2. Razionale

L'osteosarcoma (OS) è il tumore osseo maligno primitivo più frequente nell'età pediatrica ed adolescenziale (1,2). Derivato dal tessuto mesenchimale, è descritto come una neoplasia caratterizzata dalla produzione di nuova matrice osteoide immatura (3).

L'incidenza complessiva dell'OS è di 0,2-3/100.000 abitanti all'anno (0,8-11/100.000 in età compresa tra 15 e 19 anni), con una distribuzione bimodale per età (4, 5). I maschi sono colpiti più delle femmine, con un rapporto di 1,6: 1 (5-8). Le sedi coinvolte più frequentemente sono le ossa lunghe delle estremità, particolarmente nella zona meta-diafisaria: femore distale (42% dei casi), tibia prossimale (19%) e omero prossimale (10%) (5,9). Circa il 70-80% dei pazienti con OS all'esordio sono forme localizzate, sebbene non sia del tutto escludibile la presenza di micro-metastasi ancora subcliniche e non rilevabili ai primi esami diagnostici (8,10). Attualmente, la strategia di trattamento per l'OS localizzato include cicli di chemioterapia neo-adiuvante e adiuvante basati su 3 farmaci: doxorubicina (ADM), cisplatino (CDP) e alti dosi di metotrexate (HDMTX). Il regime MAP (metotrexate, doxorubicina, cisplatino), con o senza ifosfamide (IFO) ed etoposide (ETO), viene considerato il "*gold standard*" di trattamento dell'osteosarcoma, in associazione alla rimozione chirurgica completa del tumore primario (11-21).

Con l'introduzione della chemioterapia, il tasso di sopravvivenza a 5 anni per i pazienti con tumore localizzato è passato dal 15% al 70% e la necrosi tumorale indotta dalla chemioterapia è diventata un fattore prognostico chiave (22-25). In effetti, il miglioramento della sopravvivenza dei pazienti poor responder, ovvero con necrosi chemio-indotta < 90%, è stato uno degli obiettivi principali degli ultimi studi, pur senza trovare un accordo sull'efficacia terapeutica (11,17,18).

Nel 2012, Ferrari et al. hanno pubblicato i risultati dello studio dell'Italian Sarcoma Group, ISG-OS1, per l'osteosarcoma localizzato, che aveva l'obiettivo di confrontare l'efficacia e la tossicità di due regimi chemioterapici entrambi basati su HDMTX, CDP, ADM e IFO con la stessa dose cumulativa ma schemi di somministrazione differenti. Nel braccio A, IFO veniva aggiunto al regime MAP nella chemioterapia adiuvante nei pazienti poor-responder (PR, necrosi < 90%), mentre nel braccio B, IFO veniva somministrato in tutti i pazienti sia in regime neo-adiuvante sia adiuvante. Ad un follow-up mediano di 66 mesi, non sono state osservate differenze significative per quanto riguarda la sopravvivenza globale a 5 anni. I pazienti good responder (GR, necrosi ≥90%) avevano una probabilità significativamente maggiore di sopravvivenza libera da eventi (EFS) rispetto ai pazienti PR: EFS a 5 anni 69% (95% CI, dal 60% al 78%) per i pazienti GR *versus* 52% (95% CI, Dal 44% al 61%) per i pazienti PR. Va sottolineato che la tossicità riportata è stata maggiore nel braccio B, con conseguente minore compliance da parte dei pazienti.

I risultati hanno mostrato che l'aggiunta di IFO al regime MAP nella chemioterapia neo-adiuvante non ha comportato un miglioramento del tasso di pazienti con buona risposta istologica di malattia. Poiché non sono state osservate differenze significative in termini di sopravvivenza globale, gli autori

dello studio hanno concluso che l'aggiunta di Ifosfamide andrebbe considerata solo nei pazienti con scarsa risposta istologica alla chemioterapia con HDMTX, CDP e ADM (11).

Conclusioni simili sono state apportate dai risultati dello studio INT-0133 condotto dal Children's Cancer Group (CCG) e dal Pediatric Oncology Group (POG), studio randomizzato di fase III con un disegno fattoriale 2x2. L'obiettivo principale dello studio INT-0133 è stato valutare se la somministrazione del regime MAP in associazione a IFO e/o mifamurtide (liposomal muramil tripeptide fosfatidiletanolamina; L-MTP-PE), un immunomodulatore non specifico che determina una attivazione monocitica e macrofagica (27-29), determinasse un miglioramento dell'EFS nei pazienti con nuova diagnosi di OS localizzato. I risultati dello studio sono stati oggetto di due successive pubblicazioni. Nella prima pubblicazione, risalente al 2005, emerse un'interazione positiva tra il trattamento con L-MTP-PE e l'utilizzo d'IFO: nei pazienti in cui IFO era stato aggiunto al regime MAP (gruppo B-), l'EFS diminuiva; nei pazienti in cui Ifosfamide era stato aggiunto al regime MAP + L-MTP-PE (gruppo B+), l'EFS aumentava. Questa interazione precludeva l'analisi secondo il disegno fattoriale originario, ovvero la valutazione reale dell'impatto del L-MTP-PE sull'EFS (13,29-31).

Dati più maturi, elaborati sulla base di un follow-up più lungo (89 mesi) e pubblicati nel 2008, posero in evidenza un significativo vantaggio in termini di sopravvivenza globale ed un trend positivo in termini di sopravvivenza libera da eventi a favore dei pazienti in cui era stato aggiunto MTP alla chemioterapia. In Europa, Mifamurtide è stato autorizzato a marzo 2009 per i pazienti con OS non metastatico, di età inferiore a 30 anni liberi da malattia dopo l'intervento chirurgico (13,29,31).

Più recentemente sono stati pubblicati anche i dati del protocollo EURAMOS-1, che rappresenta ad oggi il più grande studio randomizzato controllato sull'osteosarcoma localizzato di nuova diagnosi (32). Lo scopo primario di questo studio è stato quello di ottimizzare le strategie terapeutiche per osteosarcoma di alto grado sulla base della risposta istologica alla chemioterapia preoperatoria. Tutti i pazienti arruolati hanno ricevuto trattamento neo-adiuvante secondo il regime MAP. Il trattamento chemioterapico scelto nella fase post-chirurgica poteva essere MAP o MAPIE (MAP+Ifosfamide+Etoposide) in base alla risposta istologica tumorale alla chemioterapia neoadiuvante. Lo studio ha arruolato 2260 pazienti da marzo 2005 a giugno 2011. Con un follow-up mediano di 54 mesi, l'EFS a 5 anni è stato del 54% (95% CI: dal 52% al 56%) e la sopravvivenza globale a 5 anni è stata del 71% (95% CI: dal 68% al 73%). I risultati hanno mostrato che il trattamento con MAPIE ha determinato una sopravvivenza libera da eventi simile al regime MAP, ma con maggiore tossicità e più alta percentuale di insorgenza di secondi tumori maligni (dieci casi contro tre casi). Secondo gli autori, il regime MAP rimane pertanto il "gold standard" di trattamento per l'osteosarcoma (10,21,25,33,34).

Infine, a marzo 2018 si è concluso il protocollo ISG OS2 (NCT 01459484; Eudract: 2011-001659-36), condotto dall'Italian Sarcoma Group, in cui è stato studiato il ruolo di Mifamurtide in aggiunta a MAP ± IFO nei pazienti con sovra-espressione di ABCB1/P-glicoproteinina (PgP).

Obiettivi dello studio sono stati:

1. Valutare l'impatto sulla sopravvivenza libera da eventi di un trattamento che utilizza tutti i farmaci attualmente registrati l'osteosarcoma non metastatico delle estremità (methotrexate, cisplatino, adriamicina, ifosfamide, MTP-PE) nei pazienti che sovra-esprimono ABCB1/P-glycoprotein.
2. Valutare l'impatto sulla sopravvivenza libera da eventi di un trattamento che utilizza methotrexate, cisplatino, adriamicina, nei pazienti con osteosarcoma non metastatico delle estremità che non sovra-esprimono ABCB1/P-glycoprotein.
3. Valutare la sopravvivenza globale in una popolazione omogenea di pazienti affetti da osteosarcoma non metastatico delle estremità trattata secondo modalità chemioterapiche differenti in funzione dell'espressione di ABCB1/P-glycoprotein.
4. Valutare prospetticamente la qualità della vita nei pazienti arruolati nel protocollo.

Il protocollo ha previsto una iniziale centralizzazione del materiale biotico istologico c/o il Servizio di Anatomia Patologica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli per la valutazione immunohistochemica dell'espressione di ABCB1/P-glycoprotein (PGP). I pazienti hanno ricevuto un'unica terapia neo-adiuvante che consisteva in due blocchi con methotrexate, cisplatino e adriamicina (MAP). Successivamente al trattamento chirurgico, in base al grado della necrosi tumorale chemio-indotta valutata sul materiale asportato e l'espressione della PGP, i pazienti sono stati divisi in:

- Gruppo di pazienti che non sovra-esprimono PGP, i quali hanno ricevuto un trattamento a tre farmaci (methotrexate, cisplatino e adriamicina) della complessiva durata di 27 settimane.
- Gruppo di pazienti che sovra-esprimono PGP, i quali hanno ricevuto un trattamento intensificato con Mepact nella fase post-operatoria. Nel caso di buona risposta istologica (necrosi tumorale uguale o superiore al 90%), il trattamento chemioterapico post-operatorio è stato MAP e Mepact per una durata complessiva di 48 settimane. Nel caso di scarsa risposta istologica (necrosi tumorale inferiore al 90%), i pazienti sono stati sottoposti ad una terapia con 4 cicli di alte dosi di ifosfamide e Mepact per una durata complessiva di 48 settimane.

Il protocollo ISG-OS2 ha previsto una stratificazione terapeutica dei pazienti sulla base dell'espressione tumorale di PGP al momento della diagnosi. Tale scelta era stata definita in seguito a precedenti studi condotti presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli che evidenziavano il ruolo prognostico di PGP (35,36). E' stato dimostrato, infatti, che i pazienti con malattia PGP positiva presentavano maggiore resistenza ai farmaci chemioterapici. Nel 2013 il protocollo è stato emendato aumentando il numero di cicli di HD-MTX da 5 a 10 in seguito ad un'analisi preliminare che ha messo in evidenza un peggioramento dell'EFS rispetto allo studio precedente.

I risultati dello studio sono in fase di pubblicazione con un follow-up mediano di 58 mesi. Da giugno 2011 a marzo 2018, sono stati inclusi 279 pazienti. L'espressione della Pgp è risultata valutabile in

264 pazienti; 110 (42%) sono stati Pgp- e 154 (58%) Pgp +. L'EFS e la sopravvivenza globale a 3 anni sono state rispettivamente del 65,5% e dell'85,8%.

L'EFS è stata significativamente peggiore nei pazienti trattati prima dell'emendamento rispetto ai pazienti trattati post emendamento (EFS a 3 anni 57,6, IC 95% 45,4-67,9 vs 68,4%, IC 95% 61,4-74,5;  $p = 0,009$ ). È stato riconfermato il ruolo fondamentale nella prognosi della risposta istologica alla chemioterapia neo-adiuvante con un peggioramento significativo dell'EFS nel gruppo PR vs GR (EFS a 3 anni 55,1, IC 95% 47-62,5 vs 80%, IC 95% 71,3-86,4;  $p < 0,001$ ). Analizzando nel dettaglio i pazienti con una risposta istologica molto scarsa (VPR, necrosi  $< 60\%$ ) l'EFS a 3 anni è stato significativamente migliore per i pazienti Pgp + (Pgp + 59,1% vs Pgp- 21,2%,  $p = 0,0057$ ) contrariamente ai pazienti con una risposta istologica intermedia (FR, necrosi 60-89%), per i quali l'EFS non ha presentato differenze significative.

La maggior tossicità riscontrata è stata di tipo ematologico (96% dei pazienti hanno presentato una neutropenia grado 3-4, ed un paziente è deceduto per sepsi). La maggior tossicità non ematologica è stata la neuropatia periferica (5 pazienti) e centrale (2 pazienti).

In conclusione, lo studio ha dimostrato che il Mifamurtide combinato con IFO nel caso dei pazienti VPR alla chemioterapia neoadiuvante può compensare il valore prognostico negativo della sovra-espressione di Pgp nell'osteosarcoma. Nei pazienti PR che ricevevano Ifosfamida in adiuvante, è stato riportato un esito peggiore in caso di dose cumulativa di mifamurtide inferiore. Nei pazienti GR che ricevono un regime MAP adiuvante, la compliance al trattamento con mifamurtide non sembra influenzare il risultato. Infine, un risultato aggiuntivo ha messo in evidenza il ruolo importante della dose cumulativa del MTX nel trattamento dell'OS.

### **3. Disegno dello studio**

Studio multicentrico, osservazionale, prospettico.

Scopo dello studio è la raccolta prospettica dei dati riferiti all'efficacia e alla tossicità del trattamento di pazienti affetti da OS localizzato secondo le raccomandazioni nazionali ISG/AIEOP OS 2021. Gli endpoints presi in considerazione sono i dati di presentazione della malattia, la risposta istologica e radiologica alla terapia neoadiuvante ed adiuvante, la tossicità a breve e lungo termine. Inoltre saranno valutati la sopravvivenza libera da eventi, la sopravvivenza libera da progressione e la sopravvivenza globale dal momento della diagnosi.

Per i pazienti affetti da Os localizzato non dell'estremità è prevista solamente la raccolta scheda dati.

Considerando che è uno studio osservazionale non è previsto un numero massimo di pazienti. In base alla numerosità registrata nei pregressi protocolli ISG/AIEOP consideriamo una media di arruolamento di 40 pazienti/anno.



#### **4. Durata dello studio**

Prevista la registrazione di tutti i pazienti che soddisfano i criteri di eleggibilità in attesa dell'apertura del nuovo protocollo prospettico interventistico mirato sulla terapia dell'OS ad alto grado, non metastatico. Nel caso di novità di rilievo dal punto di vista terapeutico oppure l'attivazione di un nuovo trial il presente studio verrà chiuso, altrimenti proseguirà per una durata totale di 3 anni. I pazienti arruolati saranno sottoposti ad un minimo di 2 anni di osservazione.

#### **5. Obiettivi ed endpoints dello studio**

##### **Obiettivo primario**

Valutazione dell'efficacia del trattamento secondo le raccomandazioni AIEOP/ISG OS 2021

##### **Obiettivi secondari**

- valutazione della tossicità a breve e lungo termine del trattamento secondo le raccomandazioni AIEOP/ISG OS 2021
- confronto storico con i risultati dello studio AIEOP/ISG OS2

I risultati attesi da questo studio saranno utilizzati per migliorare la buona pratica clinica in una patologia rara.

##### **Endpoint primario**

- Event Free Survival (EFS)

##### **Endpoints secondari**

- Progression Free Survival (PFS)
- Overall Survival
- Tossicità
- Qualità della vita

#### **6. Raccolta dati**

Dopo la firma del Consenso informato da parte del paziente o di un suo tutore/legale rappresentante, verranno raccolte prospetticamente le informazioni tramite documentazione relative a:

- Dati demografici all'esordio
- Cicli di chemioterapia effettuati
- Tipologia della terapia locale

- Rivalutazioni di malattia effettuate secondo i criteri RECIST 1.1 e PERCIST
- Tossicità dei trattamenti ricevuti secondo CTCAE v5
- Sopravvivenza dopo la conclusione del trattamento

Per ogni paziente verrà compilata la scheda raccolta dati (Case Report Form – CRF) dove verranno inseriti le informazioni previste.

## **7. Selezione dei pazienti**

### **Criteri di inclusione:**

- Diagnosi, istologicamente confermata, di osteosarcoma ad alto grado dell'estremità
- Eta ≤ 40 anni al momento della diagnosi
- Malattia localizzata o eventuale presenza di skip metastasis
- Normale funzionalità d'organo secondo le Raccomandazioni AIEOP/ISG OS 2021
- Sottoscrizione del modulo di consenso alla partecipazione allo studio da parte del soggetto interessato e da chi esercita la potestà.

### **Criteri di esclusione:**

- Presenza di metastasi polmonari alla TC del torace, presenza di metastasi in altre sedi
- Osteosarcoma periosteale, parostale, osteosarcoma secondario
- Controindicazioni mediche all' uso dei farmaci previsti dal protocollo

## **8. Statistica**

La casistica verrà descritta utilizzando frequenze e percentuali per le variabili continue e mediana e range interquartile per le variabili continue.

EFS, PFS e OS verranno stimate mediante il metodo del prodotto limite di Kaplan-Meier e confrontate con i risultati dello studio ISG OS 2 utilizzando un log-rank test a due code (37).

La presenza di associazione fra i diversi potenziali fattori prognostici e i tre precedenti endpoint verrà valutata all'analisi univariata mediante il log rank test. Le stime di hazard ratio, che permetteranno di quantificare l'effetto relativo di ciascun predittore, rispetto allo specifico gruppo di controllo, verranno calcolate mediante il modello di regressione di Cox a rischi proporzionali. Lo stesso modello di Cox consentirà di ottenere stime di effetto aggiustate di ciascun predittore mediante analisi multivariata. Il modello finale verrà definito in base agli indici di Brier score, l'area sotto la curva di ROC (AUC) e il C-index calcolati con metodo bootstrap.

## **Dimensione del campione**

Si stima che 17 centri aderiranno allo studio, pertanto si stima un tasso di arruolamento di circa 120 pazienti. Tale numerosità permette di stimare una maggiore probabilità di sopravvivenza libera da eventi del 66% rispetto a una probabilità del 55% nel gruppo storico, con una potenza del 90% ed un livello di significatività del 5%.

## **9. Gestione della sperimentazione**

### **Data management**

Le schede raccolta dati adeguatamente compilate dal personale autorizzato presso il centro partecipante, dovranno essere trasmesse con frequenza mensile agli stessi recapiti.

Ciascun ricercatore partecipante conserverà i record medici e di ricerca appropriati per questo studio, in conformità con norme di buona pratica clinica e i requisiti normativi e istituzionali per la tutela della riservatezza dei soggetti. I dati saranno archiviati su un supporto sicuro, in stanze ad accesso limitato. Le iniziali o i nomi dei pazienti non verranno registrati: i pazienti saranno associati a un identificatore univoco.

### **Considerazioni etiche e regolatorie**

Questo studio sarà condotto in piena conformità con i principi della "Dichiarazione di Helsinki", della Buona pratica clinica (GCP) e con le leggi italiane, a seconda di quale garantisca la maggiore protezione per l'individuo. Pertanto, un'ispezione da parte dei rappresentanti delle autorità regolatorie potrebbe essere eseguita in qualsiasi momento. Lo sperimentatore deve accettare l'ispezione di tutti i documenti correlati allo studio e deve consentire l'accesso diretto.

Tutti i soggetti formalizzeranno la propria partecipazione firmando e datando appositi consensi informati per la partecipazione allo studio e per l'autorizzazione al trattamento dei propri dati personali.

Tutte le informazioni che riguardano il soggetto saranno mantenute riservate e, nella misura consentita dalle leggi e / o dai regolamenti applicabili, non saranno rese disponibili al pubblico.

È garantita la piena anonimizzazione del partecipante, che verrà identificato unicamente da un codice numerico composto da 4 cifre, due ad identificare il centro sperimentale di appartenenza e due relative all'ordine cronologico di arruolamento nello studio; i risultati verranno archiviati in conformità con le leggi locali sulla protezione dei dati.

## 10. Bibliografia

1. Picci P, Manfrini M, Fabbri N, et al. Classic osteosarcoma in: Picci P, Manfrini M, Fabbri N, editors. Atlas of musculoskeletal tumors and tumorlike lesions. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2014. p. 147-152.
2. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA, Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009; 115:1531-1543.
3. Marina N, Gebhart M, Teot L, et al. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist*. 2004; 9:422-441.
4. Casali PG, Bielack S, Abecassis N, et al. Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018 Oct 1; 29(Suppl 4):iv79-iv95.
5. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009; 152:3-13.
6. Gatta G, Botta L, Rossi S, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of Eurocare-5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):35-47.
7. Mirabello L, Troisi RJ, Savage AR. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescence, middle ages, and elderly persons. *Int J cancer*. 2009; 125:229-234.
8. Geller DS, Gorlick R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management and treatment strategies. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2010; 8:705-718.
9. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma group protocols. *J Clin Oncol*. 2002; 20:776-790.
10. Luetke A, Meyers PA, Lewis I, et al. Osteosarcoma treatment: where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat Rev*. 2014; 40:523-532.
11. Ferrari S et al. Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, and doxorubicin with or without ifosfamide in nonmetastatic osteosarcoma of the extremity: an Italian sarcoma group trial ISG/OS-1. *J Clin Oncol*. 2012 Jun 10;30(17):2112-8.
12. Ferrari S et al. Nonmetastatic osteosarcoma of the extremity. Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, doxorubicin and ifosfamide. An Italian Sarcoma Group study (ISG/OS-Oss). *Tumori*. 2014 Nov-Dec; 100(6):612-9.
13. Meyers PA et al. Children's Oncology Group. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 1; 26(4):633-8.
14. Bacci G et al. Primary chemotherapy and delayed surgery for nonmetastatic osteosarcoma of the extremities. Results in 164 patients preoperatively treated with high doses of methotrexate followed by cisplatin and doxorubicin. *Cancer*. 1993 Dec 1; 72(11):3227-38.

15. Bacci G et al. Neoadjuvant chemotherapy for extremity osteosarcoma-preliminary results of the Rizzoli's 4th study. *Acta Oncol.* 1998;37(1):41-8.
16. Ferrari S et al. Neoadjuvant chemotherapy with high-dose Ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 1; 23(34):8845-52.
17. Smeland S et al. Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study SSG VIII: prognostic factors for outcome and the role of replacement salvage chemotherapy for poor histological responders. *Eur J Cancer.* 2003 Mar; 39(4):488-94.
18. Lewis et al. Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: a randomized phase III trial of the European Osteosarcoma Intergroup. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Jan 17; 99(2):112-28.
19. Le Deley MC et al. Société Française d'Oncologie Pédiatrique (SFOP). SFOP OS94: a randomised trial comparing preoperative high-dose methotrexate plus doxorubicin to high-dose methotrexate plus etoposide and ifosfamide in osteosarcoma patients. *Eur J Cancer.* 2007 Mar; 43(4):752-61.
20. Piperno-Neumann S et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Aug; 17(8):1070-1080.
21. Smeland S, Bielack SS, Whelan JS et al. Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. *Eur J Cancer.* 2019(3); 109:36-50.
22. Rosen G, Caparros B, Huvos AG, et al. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer.* 1982;49:1221-1230.
23. Ferrari S, Bacci G, Picci P, et al. Long-term follow-up and post-relapse survival in patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol.* 1997; 8:765-771.
24. Bishop MW, Cheng Y, Krailo MD, et al. Assessing the prognostic significance of histologic response in osteosarcoma: a comparison of outcomes on CCG-782 and INT0133 – a report from the Children's Oncology Group Bone Tumor Committee. *Pediatr Blood Cancer.* 2016; 63:1737-1743.
25. Harrison DJ, Geller DS, Gill JD, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy,* 2018; 18:1, 39-50.
26. Nardin a, Lefebvre ML, Labroquere K, et al. Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine: targeting and activating macrophags for adjuvant treatment of osteosarcoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6:123-33
27. Kleinerman ES, Erickson KL, Schroit AJ, et al Activation of tumoricidal properties in human blood monocytes by liposomes containing lipophilic muramyl tripeptide. *Cancer Res* 1983; 43:2010-14.

28. Anderson P. Liposomal muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine: ifosfamide-containing chemotherapy in osteosarcoma. *Future Oncol* 2006; 2:333-43
29. Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):3029-3035.
30. Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, et al. Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high dose methotrexate. *J Clin Oncol* 2005; 23:2004-11.
31. Ando K, Mori K, Corradini N, et al. Mifamurtide for the treatment of nonmetastatic osteosarcoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2011; 12:2,285-292.
32. Marina N, Bielack S, Whelan J, et al. International collaboration is feasible in trials for rare conditions: the EURAMOS experience. *Cancer Treat Res*. 2009; 152:339-53.
33. Bishop MW, Janeway KA, Gorlick R. Future Directions in the Treatment of Osteosarcoma. *Curr Opin Pediatr*. 2016; 28(1):26-33.
34. Marina NM, Smeland S, Bielack SS, et al. Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomized controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(10):1396-1408.
35. Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, et al. Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities. *J Clin Oncol*. 2003 Feb 1;21(3):536-42.
36. Serra M, Pasello M, Manara MC et al. May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int J Oncol*. 2006 Dec;29(6):1459-68
37. Schmidt R, Kwiecien, R, Faldum A et al. (2015), Sample size calculation for the one-sample log-rank test, *Statist. Med*. 2015; 34:1031– 1040