

Università degli studi di Firenze

Dipartimento di Scienze Neurologiche e Psichiatriche

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze XX ciclo

Settore disciplinare Med-26

STUDIO CLINICO APERTO, RANDOMIZZATO, SULLA UTILIZZAZIONE DELL'ASSOCIAZIONE DI β IFN1a ED AZATIOPRINA, IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA RECIDIVANTE-REMITTENTE

Coordinatore

(Prof. Domenico Inzitari)

Tutor

Prof. Luca Massacesi

Esame finale XX ciclo

Dr. Alessandro Barilaro

Anno accademico 2006-2007

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag.5
1.1 EZIOPATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA (SM)	Pag.5
1.2 TERAPIE CONSOLIDATE	Pag.5
1.3 GLI INTERFERONI NEL TRATTAMENTO DELLA SM	Pag.5
1.4 ASSOCIAZIONE DI FARMACI NEL TRATTAMENTO DELLA SM	Pag.7
1.5 L'AZATIOPRINA NEL TRATTAMENTO DELLA SM	Pag.7
1.6 BASI RAZIONALI PER UNA SOMMINISTRAZIONE COMBINATA DI AZA E β IFN	Pag.8
1.7 METODOLOGIE PROPOSTE	Pag.8
2.OBIETTIVI DELLO STUDIO	Pag.9
3.MATERIALI E METODI	Pag.10
3.1. DIMENSIONE DEL CAMPIONE	Pag.11
3.2. PAZIENTI	Pag.11
3.2.1. CRITERI DI INCLUSIONE	Pag.11
3.2.2. CRITERI DI ESCLUSIONE	Pag.12
3.3. TRATTAMENTI	Pag.13
3.3.1 TRATTAMENTI IN STUDIO	Pag.13
3.3.2. MODIFICAZIONI DEL TRATTAMENTO	Pag.14
3.3.3. TRATTAMENTI CONCOMITANTI	Pag.14
3.4. CONDUZIONE DELLO STUDIO E PARAMETRI DI VALUTAZIONE	Pag.15
3.4.1.TOLLERABILITÀ	Pag.16
3.4.1.1. REGISTRAZIONE DEGLI EVENTI AVVERSI	Pag.17

3.4.1.2.SEGNALAZIONE DI EVENTI AVVERSI NON GRAVI	Pag.17
3.4.1.3. SEGNALAZIONE DI EVENTI AVVERSI GRAVI	Pag.18
3.5.VALUTAZIONE STRUMENTALE (RM)	Pag.18
3.6.VALUTAZIONE CLINICA	Pag.21
3.7. DOSAGGIO AB NEUTRALIZZANTI ANTI- β -IFN	Pag.22
3.8. VALUTAZIONE IMMUNOLOGICA (SOLO CENTRO DI FIRENZE)	Pag.22
3.9. VISITE NEUROLOGICHE ESAMI STRUMENTALI E DI LABORATORIO: TEMPI E MODALITÀ.	Pag.23
3.10. ANALISI STATISTICA	Pag.27
3.10.1. TOLLERABILITÀ CLINICA	Pag.27
3.10.2 EFFICACIA SULLE LESIONI ENCEFALICHE	Pag.27
3.10.3. EFFICACIA CLINICA	Pag.28
4. RISULTATI	Pag.30
4.1. TOLLERABILITÀ E SICUREZZA DEL TRATTAMENTO	Pag.30
4.2. MARKERS SURROGATI DI RM	Pag.31
4.2.1 LESIONI GD+	Pag.31
4.2.2. SCAN	Pag.33
4.2.3. NUOVE LESIONI T2 W (NT2W)	Pag.33
4.2.4. CARICO LESIONALE TOTALE	Pag.34
4.3.VALUTAZIONE CLINICA	Pag.34
4.4 VALUTAZIONE IMMUNOLOGICA	Pag.35
4.4.1 NABS	Pag.35
4.4.2.ALTRI ASPETTI IMMUNOLOGICI	Pag.36
5. DISCUSSIONE	Pag.37

5.1 TOLLERABILITÀ	Pag-38
5.2. MARKERS SURROGATI DI RM	Pag.38
5.2.1. LESIONI GD+	Pag.39
5.2.2. NT2W	Pag.39
5.2.3. ALTRI END-POINTS	Pag.40
5.3 LA FARMACODINAMICA	Pag.40
5.4. RILEVANZA DEGLI END-POINTS E DEL DISEGNO DELLO STUDIO	Pag.41
6.CONCLUSIONI	Pag.42
BIBLIOGRAFIA	Pag.43
TABELLE E FIGURE	Pag.56
ALLEGATI	Pag.66

1. INTRODUZIONE

1.1. Eziopatogenesi della Sclerosi Multipla (SM)

La SM è una malattia infiammatoria-demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) con elevato impatto sociale ed economico in quanto, dopo i traumi, costituisce la più frequente causa di invalidità nei giovani adulti (1). Nonostante l'impegno della ricerca, l'eziologia della malattia rimane tuttora sconosciuta anche se molteplici evidenze nel campo dell'istopatologia, della genetica e dell'immunologia indicano che un meccanismo patogenetico di tipo immunitario sia responsabile del danno tissutale (2-4).

1.2. Terapie consolidate

In considerazione dell'incerta patogenesi della SM, le terapie correnti prevedono l'uso dei cortisonici, impiegati per il trattamento delle esacerbazioni acute e di diversi tipi di farmaci immunomodulanti e immunosoppressori, utilizzati nel tentativo di ridurre le fasi di attività clinica e rallentare la progressione dei disturbi (3-6).

1.3. Gli interferoni nel trattamento della SM

Gli interferoni (IFN) rappresentano farmaci in grado di modulare la risposta immunitaria. Tutti e tre i tipi di IFN (α -IFN, β -INF, γ -IFN) sono stati studiati come possibili agenti terapeutici nella SM (7-17). Mentre l' α -IFN nella SM sembra avere un basso indice terapeutico (7), e il γ -IFN determina addirittura un aumento del numero di ricadute cliniche (8), alcuni studi completati negli anni '90 mostrano un'efficacia terapeutica di vari tipi di β -IFN (7-17). L'insieme dei dati a nostra disposizione induce a ritenere che gli effetti del β -IFN nella SM siano mediati dalle proprietà immunoregolatrici di questa sostanza, piuttosto che dall'attività antivirale. Il β -IFN, infatti, in vitro, blocca la sintesi del γ -IFN, diminuisce la proliferazione dei linfociti T, inibisce la liberazione di citochine che danneggiano gli oligodendrociti e inibisce il passaggio di cellule infiammatorie attraverso la barriera ematoencefalica (17).

Già da molti anni sono disponibili i risultati di un trial nord-americano multicentrico, randomizzato, controllato, in doppio cieco su oltre 350 pazienti con SM in forma recidivante-remittente (9, 10). In questo studio la somministrazione per via sottocutanea di β -IFN 1b ricombinante (Betaseron), produceva una significativa riduzione del tasso annuale di ricadute (tasso annuo di recidive = 0.84) nei pazienti trattati con 8 milioni di unità a giorni alterni, rispetto ai pazienti trattati con 1.6 milioni di unità (tasso annuo di recidive = 1.27). Nei pazienti trattati con il dosaggio più elevato si rilevava anche una riduzione significativa della gravità degli attacchi. In un sottogruppo di 52 pazienti studiati con esami RM eseguiti in modo seriato ogni 6 settimane, si confermava una significativa riduzione dell'attività di malattia, valutata in base al carico complessivo di lesioni nella sostanza bianca del SNC. Un altro studio evidenziava inoltre una notevole efficacia di questo trattamento nel ridurre il numero di lesioni encefaliche attive, evidenziate con RM eseguite mensilmente (11). E' stata osservata inoltre la comparsa di anticorpi neutralizzanti (Nabs) anti- β -IFN1b in circa 1/3 dei casi trattati con questo farmaco (13). Mentre la più bassa immunogenicità si è registrata con IFN β 1 a a frequenza monosettimanale i.m (12). Numerosi studi successivi hanno evidenziare invece la presenza di anticorpi neutralizzanti anti β -IFN1a e b (Nabs) in circa un terzo dei casi (14) e, almeno in alcuni casi la presenza di una risposta anticorpale neutralizzante sembra associata ad un aumento del numero di lesioni cerebrali attive osservabili con RM (12-14-15-16-17) ed un incremento del numero di relapse (14-15-16). Tali dati hanno indotto un panel internazionale di esperti a suggerire delle linee guida (18). Finora alcune strategie sono state proposte per prevenire la formazione dei Nabs con risultati tuttavia non sempre proponibili nella pratica clinica. (19-20-21)

Sulla base dei risultati ottenuti è noto che il β -IFN naturale (tipo 1a) possiede un'efficacia misurata sia come attività antivirale sia come azione sui marcatori sierici e una tollerabilità analoga al β IFN1b. Inoltre dati recentemente pubblicati indicano un'analogia attività del β IFN1a rispetto al β -IFN1b nella SM, anche valutata in termini di efficacia

terapeutica (14-16). Inoltre il β -IFN1a sembra indurre anticorpi neutralizzanti in una percentuale minore di pazienti (circa 15%), (12) e che tale dato sembra essere in piccola parte influenzato dalla via d'inoculazione o dal dosaggio o dalla frequenza di somministrazione. (14) Negli studi sperimentali citati il β -IFN è sempre stato somministrato a dosi fisse e precisamente il β IFN1b a 8 MUI a giorni alterni e il β IFN1a a 6 MUI (30 mcg) /settimana. E' anche documentato che l'efficacia di dosi diverse di β IFN1a (22 mcg e 44 mcg /settimana) sono connesse ad una diversa risposta terapeutica, in particolare in molti studi (22-48) nel gruppo di pazienti trattati con la dose maggiore si è verificata una riduzione del relapse/rate ad un anno e dell'attività infiammatoria alla RM e pertanto risulta chiaro già dal 1998 (23) che, quando l'IFN1a è stato somministrato a differenti dosaggi (66 e 132 mcg/settimana, esiste una relazione dose-risposta non solo sulla percentuale di riduzione delle ricadute ma anche sul carico lesionale totale alla RM.

Tuttavia la possibilità di personalizzare la dose utilizzando l'associazione dell'IFN ad altri farmaci come l'azatioprina, non è stata ancora esplorata e potrebbe presentare vantaggi in termini di tollerabilità, compliance e, anche di costi.

1.4. Associazione di farmaci nel trattamento della SM

L'associazione del β IFN con altri farmaci, con meccanismi d'azione diversi, attivi nella SM, potrebbe aumentare l'efficacia della terapia con β IFN e potrebbe, almeno in linea teorica, consentire, a parità di efficacia, di abbassare la dose ottimale di β IFN, anche in questo caso, con possibili conseguenti risparmi sia in termini di tollerabilità ed eventualmente di costi.

1.5. L'Azatioprina nel trattamento della SM

L'Azatioprina (AZA) è un farmaco immunosoppressore largamente usato sia nella terapia del rigetto del trapianto che di malattie autoimmuni, inclusa l'SM. L'AZA agisce con meccanismo d'azione citostatico (24), è ben tollerato (25), è maneggevole ed è efficace su alcuni markers clinici e strumentali di SM. Infatti, analizzando due studi

randomizzati controllati in doppio cieco svolti negli anni ottanta, si osserva come l'AZA abbia un'efficacia clinica analoga a quella dei vari IFNs (26-29). Tuttavia i questi studi furono condotti in epoca pre-RM, per cui gli unici dati disponibili sull'efficacia di questo trattamento sul parametro RM sono quelli di una valutazione retrospettiva di una serie clinica di pazienti trattati e di controlli appaiati. Questo suggerisce la presenza di una notevole efficacia della terapia con AZA sul decorso delle lesioni cerebrali valutate con RM (30). E' stato dimostrato inoltre che questo farmaco, almeno nella SM, non aumenta il rischio di neoplasie per dosi cumulative inferiori ai 600 g, che corrispondono a circa 10 anni di terapia (25,31). Infine è probabile che l'attività immunosoppressiva di questo farmaco possa determinare una riduzione della percentuale di pazienti che sviluppano anticorpi neutralizzanti contro l'IFN. Un recente studio realizzato dal nostro gruppo ha impiegato markers surrogati di MRI di RM documentando in una coorte di 12 pazienti una considerevole riduzione dell'attività infiammatoria con un'efficacia paragonabile a quella dei migliori interferoni (32). Inoltre un successivo studio, non ancora pubblicato, documenta un'equivalente attività sui markers surrogati di RM tra Aza e IFN β 1 a 22 mcg x3/w (33).

1.6 Basi razionali per una somministrazione combinata di AZA e β IFN

Quando usati singolarmente, sia l'AZA che il β IFN hanno entrambi evidenziato risultati terapeutici non ottimali nella SM. E' probabile che la loro somministrazione combinata possa avere un effetto additivo e forse anche moltiplicativo. Uno dei potenziali effetti sinergici potrebbe essere rappresentato dalla soppressione della produzione di anticorpi anti- β IFN, che in alcuni pazienti potrebbe essere associata ad una riduzione dell'efficacia terapeutica del β IFN

1.7 Metodologie proposte

Lo studio è stato condotto secondo un disegno sperimentale in aperto ed in accordo a quanto descritto da McFarland (34), attraverso una valutazione clinico-strumentale longitudinale. Sono state eseguite valutazioni RM mensili dell'encefalo con mezzo di contrasto (gadolinio-

Gd). Questa metodica è in campo internazionale riconosciuta come ottimale per la valutazione dell'efficacia di nuove terapie in pazienti affetti da SM (34-37). E' stata eseguita infine una valutazione dell'attività dei trattamenti su markers immunologici e sull'eventuale produzione di anticorpi (Ab) neutralizzanti anti- β IFN.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Primario:

Valutazione della tollerabilità e della sicurezza dei trattamenti in pazienti affetti da SM

Secondari:

- riduzione del numero e volume delle lesioni encefaliche attive rilevate con RM encefalica
- riduzione del numero, durata ed intensità delle esacerbazioni cliniche valutate tramite scala EDSS
- produzione di anticorpi (Ab) anti- β IFN1a
- modificazioni dei markers di attivazione immunitaria .

3. MATERIALI E METODI

3.1 Dimensione del campione

La dimensione del campione per lo studio di RM è stata stimata sulla base delle tabelle per il calcolo della dimensione del campione in studi clinici nella SM descritte da McFarland (34), per uno studio con confronti tra periodo di osservazione iniziale e periodo di trattamento che preveda l'effettuazione di RM seriate mensili (6 durante il periodo di osservazione e 6 durante il periodo di trattamento). Quaranta pazienti totali permettono di osservare una riduzione nel numero medio di lesioni attive, tra periodo di trattamento e periodo di osservazione, di oltre il 50% con un valore di alfa di 0.05 e di beta di 0.80.

3.2. Pazienti

Sono stati inclusi 41 pazienti affetti da SM a decorso recidivante remittente che rispettavano i criteri clinici di seguito riportati.

I pazienti afferivano dai centri SM del centro coordinatore di Firenze n° 22 (7M/15F); dal centro SM del "Policlinico Umberto I" di Roma N° 11 pazienti (3M/ 8F) e dalla Clinica Neurologica dell'Università di Pisa n° 8 (3M/5F).

Le caratteristiche cliniche e demografiche dei 41 pazienti (27F/12M) sono state omogenee in ciascun gruppo. L'età mediana globale è di 35 anni (valore medio 34,9 \pm 9,5 95%CI 31,8-37,9) La durata mediana di malattia all'inizio dello studio è di 3 anni(95% CI 2-11,9). Il numero mediano di ricadute negli ultimi due anni era di 2 (95%CI 2-18) . L'EDSS mediano è di 1,5. Il numero mediano di ricadute per anno è di 2. e L'EDSS mediano all'inizio dello studio era di 1,5.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono rappresentate nei diversi gruppi nelle figure 1-5

3.2.1. Criteri di inclusione

Sono stati inclusi pazienti che hanno soddisfatto TUTTI i seguenti criteri:

- età compresa tra 18 e 50 anni (ambosessi);
- diagnosi di SM definita clinicamente o con il supporto del laboratorio (38);
- decorso recidivante-remittente, con almeno due episodi acuti documentati entro i due anni precedenti l'inclusione nello studio;
- grado di disabilità valutato sulla EDSS < 5.5;
- durata di malattia non superiore a 10 anni;
- negatività dell'HbsAg, HCV-RNA, HIV
- consenso informato

3.2.2 Criteri di esclusione

Sono esclusi i pazienti che presentino ANCHE SOLO UNO dei seguenti criteri:

- Pazienti con diagnosi di SM di tipo recidivante progressivo
- Forme di SM non definita (probabile o possibile)
- Pazienti in fase di esacerbazione clinica al momento della visita iniziale
- Intolleranza accertata al β -IFN 1a e/o azatioprina
- Anamnesi positiva per neoplasie o neoplasie in atto
- Ricadute neurologiche o terapia cortisonica nel mese precedente
- Terapia immunosoppressiva nei 24 mesi precedenti la visita iniziale
- Precedente trattamento con copolimero per un periodo < 3 mesi e trattamento con IFN per un periodo < 2 anni
- Disturbi cognitivi o psichici rilevanti (in particolare depressione)
- Presenza di patologie epatiche

- Presenza di patologie di rilievo a carico di altri organi o apparati (insufficienza renale, gravi cardiopatie, patologia tiroidea, emopatie, leuco-piastrinopenie)
- Controindicazione all'esecuzione dell'esame RM (portatori di protesi metalliche)
- Allergia alla gentamicina o ai suoi analoghi, o al gadolinio
- Gravidanza o allattamento
- Assenza di efficaci misure contraccettive (donne in età riproduttiva)
- Fattori di tipo medico, personali del paziente o di altra natura che possano compromettere la volontà del paziente a seguire le indicazioni stabilite dal protocollo.

Note: E' opportuno precisare che i pazienti sono stati inclusi con i criteri di Poser (38) in quanto quelli effettivamente in uso al momento della stesura del protocollo e al momento dell'inclusione del primo paziente; tuttavia è stata valutata la concordanza a posteriori con quelli in uso al momento (39-40); per tutti i pazienti è stato possibile porre diagnosi di Sclerosi Multipla anche in accordo ai nuovi criteri.

3.3. Trattamenti

3.3.1 Trattamenti in studio

Per i trattamenti in studio sono state utilizzate siringhe preriempite contenenti β -IFN1a, predisposte per la somministrazione sottocute (s.c.).

Sono stati previsti 2 gruppi di pazienti secondo lo schema seguente basato su diverse posologie:

Gruppo 1: β -IFN1a ricombinante 66 mcg /settimana;

Gruppo 2: β -IFN1a 11 mcg (3 MUI) 3 volte/settimana, s.c. In associazione ad AZA compresse per os ad un dosaggio fino a 3

3

mg/kg/die in accordo alla conta linfocitaria (linfociti) ≥ 900 /mm³ ;

3.3.2. Modificazioni del trattamento

Lo studio prevedeva che in seguito alla comparsa di effetti collaterali importanti (gradi 3-4 della classificazione CTC, ALLEGATO 2) correlati al trattamento, fosse consentito, a giudizio del clinico responsabile, ridurre la dose/frequenza di somministrazione. Qualora, nonostante la riduzione posologica o di frequenza di somministrazione, si osservasse la ricomparsa di tossicità di grado 3 CTC nello stesso paziente, si sarebbe dovuto procedere all'interruzione del trattamento. Il soggetto avrebbe dovuto ricevere il trattamento migliore disponibile e seguito fino alla scomparsa/risoluzione dei segni di tossicità.

Inoltre il paziente dovrebbe rimanere nello studio senza ricevere il trattamento sperimentale indicato al momento della randomizzazione e seguito con le stesse procedure previste per i pazienti riceventi il trattamento stesso. I dati relativi al paziente fuori terapia saranno considerati nell'analisi "intention-to-treat".

Ogni modifica del protocollo terapeutico è stata registrata nella sezione relativa della scheda raccolta dati (CRF).

3.3.3. Trattamenti concomitanti

I trattamenti concomitanti che sono considerati necessari per il benessere del paziente e che non interferiscono con i trattamenti in studio sono stati permessi a discrezione dello Sperimentatore responsabile (terapie antispastiche, antidepressive o ansiolitiche, terapia fisica, farmaci per il controllo di disturbi sfinterici, antibiotici, etc.).

Le ricadute cliniche sono state trattate con 1000 mg di metilprednisolone ev/die per un massimo di 5 gg, seguito da metilprednisolone per os per 6 giorni, dosaggio personalizzato per paziente sulla base della risposta individuale.

In caso di necessità (sindrome simil-influenzale), è consentito l'uso di paracetamolo o FANS anche continuativamente.

L'eventuale somministrazione di ogni farmaco concomitante è stata segnalata sulla cartella clinica e sul CRF, indicando il dosaggio, data di somministrazione e motivi di impiego.

Non sono state autorizzate terapie concomitanti con:

- farmaci immunosoppressori (ad eccezione di AZA);
- farmaci immunomodulanti (tranne β -IFN 1a);
- ogni altro IFN per qualsiasi via di somministrazione.

3.4. Conduzione dello studio e parametri di valutazione

I pazienti inclusi nello studio hanno tutti firmato il consenso informato ed hanno nel periodo di osservazione, soddisfatto tutti i criteri d'inclusione e criteri di esclusione già descritti (Sezioni 3.2.1 e 3.2.2) e sono stati sottoposti alle valutazioni cliniche, strumentali e di laboratorio descritte nella sezione 3.9. I controlli strumentali e di laboratorio sono avvenuti entro un periodo massimo di 2 settimane prima dell'esecuzione della visita medica per ogni periodo dello studio. I risultati di tutte le valutazioni di screening, per determinare l'eleggibilità di un paziente nello studio, sono stati controllati dallo sperimentatore prima dell'arruolamento di ogni paziente. Inoltre ogni paziente è stato ampiamente informato, da parte dello sperimentatore, riguardo ad ogni aspetto dello studio, compreso il programma di trattamento e quello delle visite/controlli periodici. Il consenso informato è stato firmato e datato da ogni paziente prima di procedere con l'effettuazione delle procedure di registrazione. Ogni paziente ritenuto eleggibile per il protocollo e che abbia concesso il proprio consenso scritto, è stato sottoposto al periodo di osservazione /pre trattamento della durata di sei mesi e successivamente il paziente è stato randomizzato in uno dei due gruppi di trattamento previsti. Tutti i pazienti sono stati quindi identificati da un numero, in accordo con il codice di randomizzazione. La numerazione dei pazienti è stata sequenziale in ogni centro di

sperimentazione, e la randomizzazione è stata effettuata presso il centro coordinatore di Firenze.

Il periodo di trattamento ha avuto una durata di 8 mesi. Al termine degli 8 mesi i pazienti sono stati seguiti per un successivo periodo di due anni di follow-up comunque a carico del SSN. Sono stati previsti 2 gruppi di trattamento. L'allocazione dei pazienti ai rispettivi gruppi è avvenuta in base ad una lista di randomizzazione bilanciata con assetto 1:1. Il trattamento è stato iniziato entro 7 giorni dalla randomizzazione.

Nel gruppo 2, dopo la visita 7 (mese 6) del periodo di osservazione e prima della visita 8 (mese 1) del periodo di trattamento, al fine di prevenire fenomeni di sovradosaggio nei pazienti che hanno scarsa capacità di metabolizzazione dell'azatioprina perché omozigoti (0.33% della popolazione) o eterozigoti (11% della popolazione) per un difetto del gene dell'enzima tiopurina metil-transferasi (41), il farmaco è stato somministrato singolarmente per 15 giorni alla dose di 1 mg/kg/die e sono stati valutati i parametri di tossicità emopoietica, epatica e di colestasi prima di intraprendere la somministrazione di β -IFN 1a. Successivamente, sulla base della tossicità, la dose è stata aumentata a 2.5 mg/kg/die ed eventuali successivi aggiustamenti di dose (~ 0.5 mg/kg/die) sono stati eseguiti sulla base della conta linfocitaria o della tossicità. Inoltre è stata eseguita una RM il mese successivo alla fine del periodo di trattamento (mese 9). La durata massima totale dello studio, per ciascun paziente, è stata pertanto di 15 mesi.

Lo schema dello studio (flow chart) è descritto nell'ALLEGATO 3.

3.4.1. Tollerabilità

Lo Sperimentatore è responsabile della corretta registrazione e segnalazione di tutti gli eventi avversi osservati durante e dopo il trattamento con il farmaco.

3.4.1.1. Registrazione degli eventi avversi

Ad ogni visita, dopo che è stata data al paziente l'opportunità di riferire eventuali problemi, lo Sperimentatore si è accertato che non si fossero

verificati eventi clinici indesiderati, ponendo al paziente le seguenti domande standard:

- Ha avuto qualche (altro) problema di salute dall'ultima visita?
- Ha assunto nuovi farmaci oltre a quelli previsti, dall'ultima visita?

In particolare sono stati indagati gli effetti indesiderati più comuni che possono insorgere durante il trattamento con β -IFN in particolare febbre, malessere, brividi, mialgie, cefalea e debolezza, che compaiono alle prime somministrazioni di β -IFN e generalmente recedono con il continuare della terapia.

La funzionalità epatica e renale sono state valutate tramite esami laboratoristici. Nel caso di sintomatologia tiroidea (gonfiore alle estremità e al volto, secchezza della cute, bradicardia, ipertensione, gozzo, incremento ponderale, alterazioni dell'atteggiamento psichico, ecc.) dovranno essere eseguiti gli esami di funzionalità tiroidea (FT3, FT4, TSH). In aggiunta a quanto già indicato nel protocollo (Visita 1 e alla fine del trattamento, Visita 15). Ogni manifestazione clinica indesiderata deve essere riportata sulla CRF. Deve essere documentato anche l'evento indesiderato che viene ritenuto non correlato al trattamento con β IFN1a.

3.4.1.2. Segnalazione di eventi avversi non gravi

Gli eventi indesiderati non gravi sono stati registrati dallo Sperimentatore.

3.4.1.3. Segnalazione di eventi avversi gravi

Per la valutazione della gravità degli eventi avversi è stata utilizzata la tabella CTC (ALLEGATO.2).

Gli eventi indesiderati gravi, indipendentemente se ritenuti ascrivibili al trattamento in studio, comprendono:

- a) l'exitus
- b) eventi che pongono il paziente in pericolo di vita

- c) eventi che causano lesione permanente
- d) eventi che richiedono o prolungano l'ospedalizzazione
- e) qualunque anomalia congenita, cancro o sovradosaggio
- f) gravi anomalie di laboratorio, direttamente associate a segni/sintomi clinici.

E' indispensabile, da parte dello Sperimentatore, la fedele ed accurata registrazione di ogni evento indesiderato

3.5.Valutazione strumentale (RM)

I dati RM sono stati esaminati in maniera indipendente da due neuroradiologi, in cieco rispetto al trattamento assegnato ed allo stato clinico del paziente (nel caso di discordanza sarà coinvolto un terzo neuroradiologo con funzione da arbitro), ai seguenti tempi:

1. alla fine del periodo di osservazione pre-trattamento (visita 7, mese 6 di osservazione).
2. al termine dello studio (visita 15, mese 8 del periodo di trattamento).

In occasione dell'effettuazione dell'ultimo controllo RM previsto nel periodo di osservazione pre-trattamento, è stato riportato sulla scheda di raccolta dati (CRF) il numero totale delle lesioni attive captanti Gd riscontrate nel periodo di osservazione / pre-trattamento per ogni paziente.

Gli esami RM dovranno sono stati eseguiti in accordo con le seguenti:

- potenza del magnete: 1.5 Tesla;
- spessore delle sezioni: 4 o 2 mm;
- "inter-slice gap": nessuno
- orientamento delle sezioni: assiale;
- matrice: 256 x 256; FOV: 25.6 cm; 2 excitations;
- sequenze per le immagini senza mezzo di contrasto:
- doppio echo T2-pesate, spessore 4 mm:

- TE breve (TR =2400 ms; TE = 15 ms); Turbo SE (3-4000 ms TR/ 90-150 TE ms)
- TE moderatamente lento (TR = 2400 ms; TE = 90 ms);
- fFLAIR-fast Fluid Attenuated Inversion Recovery (spessore 4 mm):
- TE 120 ms; TR 8000 ms; IR 2500; Turbo Factor, 18;
- sequenze per le immagini con mezzo di contrasto T1-pesate (spessore 2mm)
- TR = 600 ms; TE = 17 ms, da acquisire 7 min dopo la somministrazione del mezzo di contrasto;
- mezzo di contrasto: tripla dose di gadolinio (Gd) somministrato e.v., 0.3 mmol/kg di peso del paziente, in accordo a Filippi et al. (42);
- protocollo di acquisizione:
 1. survey;
 2. survey T1w;
 3. T2 spin eco, doppio eco;
 4. T1 spin eco;
 5. somministrazione di mezzo di contrasto
 6. fFLAIR;
 7. attesa di 10 minuti;
 8. T1 spin eco

Riposizionamento: si è usato come repere la linea bicommissurale. A tal fine, dopo la acquisizione di sezioni sagittali a bassa risoluzione, sono state ottenute delle sezioni sagittali T1-pesate ad alta risoluzione per il riconoscimento delle commissure anteriore e posteriore. Il pacchetto delle immagini assiali è stato posizionato parallelamente alla linea bicommissurale con la sezione centrale (immagine 17 di 32 fette) posizionata sulla linea bicommissurale medesima. L'immagine con il posizionamento delle sezioni assiali così ottenuta è essere confrontata con l'esame basale, riportato su lastra.

Tutte le RM di ogni singolo paziente dovranno essere acquisite con gli stessi parametri e le immagini sono state archiviate, in doppia copia, su sistemi digitali, in modo da consentire la quantificazione delle lesioni.

Mensilmente è stato valutato il numero ed il volume delle lesioni encefaliche attive definite come:

- lesioni che si impregnano con Gd quando osservate in T1;
- lesioni nuove in T2 ed in fFLAIR rispetto all'esame precedente;
- lesioni nuove in T2 ed in fFLAIR semestrali

La valutazione del numero e del volume di lesioni attive è stata eseguita con tecniche di "contouring" semiautomatico attraverso programmi di gestione di immagine automatizzati come descritto da Smith (36).

Gli esami RM sono stati eseguiti ai seguenti tempi: Visite 2 - 7 (1° - 6° mese di osservazione); Visite 10 - 15 (dal 2° all'8° mese di trattamento) e in più il mese successivo il termine dello studio (mese 9 di trattamento).

Alle visite 2 e 7 (effettuate rispettivamente al 2° ed al 6° mese di osservazione) ed alle visite 10 e 15 (eseguite al 2° e 8° mese di trattamento) si è valutato il valore di carico lesionale totale valutato nelle immagini acquisite in T2 ed in fFLAIR in termini di volume;

La valutazione del carico lesionale è stata eseguita con tecniche di "segmentazione" automatiche attraverso programmi di gestione di immagine automatizzati come descritto da Filippi (43).

3.6.Valutazione clinica

La valutazione clinica è stata effettuata nei tempi previsti dal protocollo da un neurologo, a conoscenza del trattamento assunto da ciascun paziente, che valuterà gli aspetti relativi agli obiettivi dello studio (ricadute cliniche, EDSS), la "compliance" dei pazienti e gli eventuali effetti collaterali.

Valutazione delle ricadute neurologiche.

Definizione:

Una ricaduta è definita come la comparsa di nuovi sintomi neurologici o il peggioramento di sintomi precedenti, attribuibili alla SM, associata ad una variazione dell'esame obiettivo, che duri almeno 24 ore in assenza di febbre e che sia preceduta da un periodo di stabilità o miglioramento dello stato clinico nei precedenti 30 giorni.

Valutazione:

Ogni ricaduta, per essere accettata come tale, deve essere documentata dal neurologo responsabile della valutazione clinica entro 10 gg dall'esordio. In caso di impossibilità motivata del paziente a raggiungere il Centro, è stata accettata anche la documentazione di un neurologo esterno.

Al fine della compilazione dell'Integrated EDSS Index (IEI), la valutazione delle ricadute ha compreso:

- una visita neurologica non prevista dal protocollo (a meno che la ricaduta non esordisca in vicinanza ad una visita programmata) con compilazione dell'EDSS;
- una ricostruzione anamnestica della data dell'esordio;
- una ricostruzione anamnestica dell'EDSS sviluppato nei giorni precedenti la visita;
- una valutazione telefonica dell'EDSS eseguita a giorni alterni nei giorni successivi alla visita fino alla risoluzione o alla stabilizzazione del quadro neurologico (Questionario telefonico EDSS, a cura del Prof. Ludwig Kappos, Kantonspital, Basel) ;
- esecuzione di una visita di controllo al momento della stabilizzazione del quadro neurologico.

Episodi che rispondano a tutte le caratteristiche richieste, ma che non si traducano in modificazioni obiettivamente dall'esame neurologico, sono state riportati a parte in un'apposita sezione della CRF.

Variazioni della EDSS (almeno 1 punto all'interno di punteggi ≤ 5.5 , almeno 0.5 punti per punteggi superiori) devono essere confermate, per essere accettate come tali, nel corso di due visite consecutive (44, 45).

3.7. Dosaggio Ab neutralizzanti anti- β -IFN

Il dosaggio degli Ab neutralizzanti anti- β -IFN (Nabs) (basale e dopo 3, 6 ed 8 mesi) sarà eseguito in campioni di siero dal Dr. Antonelli del Dipartimento di Virologia dell'Università di Pisa attraverso una metodica ELISA per la rilevazione di Ab anti- β -IFN. Nei campioni positivi l'effetto neutralizzante l'attività del β -IFN, sarà ricercato attraverso un test basato sulla ricerca di inibizione dell'attività antivirale del siero in esame come descritto da Antonelli (46).

3.8. Valutazione immunologica (solo centro di Firenze)

Allo scopo di monitorare gli effetti biologici del β IFN 1a, prima dell'inizio del trattamento (non più tardi di 15 giorni dalla prima somministrazione di β IFN1a) ed al completamento del 2°, 5°, 8° mese di trattamento, sono stati effettuati in alcuni dei soggetti trattati (10 pazienti in tutto, 5 del gruppo 1 e 5 del gruppo 2) le seguenti valutazioni immunologiche:

- analisi citofluorimetrica del fenotipo linfocitario. Ogni campione ematico è stato sottoposto a separazione dei leucociti in gradiente di densità, e conservato a -160 °C. Dopo scongelamento, da ogni campione è stata prelevata un aliquota di 5×10^5 cellule. Queste sono state incubate con anticorpi specifici fluorescenti anti CD4 o CD8 o CD3. Al termine dell'incubazione le cellule sono state risospese in PBS e analizzate con un citofluorimetro EPICS XL (Beckman Coulter).
- L'espressione di citochine e recettori è stata analizzata con metodiche citofluorimetriche in diverse sottopolazioni linfocitarie, prima e durante il trattamento in 5 pazienti (3 del gruppo β IFN e 2 del gruppo β IFN + AZA): CRTH2, CCR4, CCR5, CXCR3, CCR7, CD25.

- espressione di linfocine , markers di funzione Th1 (es. IL-2 , β IFN) e di funzione Th2 (es. IL-4, IL-10); tale espressione è stata valutata attraverso marcatura con anticorpi monoclonali , previa fissazione e permeabilizzazione delle cellule , come descritto da Annunziato (47)

3.9. Visite neurologiche esami strumentali e di laboratorio: tempi e modalità.

Valutazione iniziale (Periodo di osservazione, Visita 1, Basale)

In questa occasione si è raccolto dal paziente il consenso informato scritto.

E' stata eseguita una completa valutazione clinica, strumentale e di laboratorio, per assicurare il rispetto dei criteri di eleggibilità. L'effettuazione dei controlli strumentali e di laboratorio è avvenuta entro un periodo massimo di 2 settimane prima dell'esecuzione della visita medica per ogni periodo dello studio.

L'esame RM basale è stato eseguito con una tolleranza di 15 giorni rispetto alla visita basale.

Le valutazioni alla Visita 1 (Basale) includono:

a) raccolta dei dati demografici, dell'anamnesi medica, ginecologica e chirurgica;

b) esame obiettivo generale, comprensivo di:

parametri vitali;

visita neurologica (inclusa EDSS).

c) esami strumentali:

ECG;

d) esami di laboratorio:

a) emocromo con formula, biochimica (glicemia, azotemia, AST, ALT, fosfatasi alcalina, γ -GT, bilirubina totale, creatininemia) ed esame urine (con sedimento);

b) dosaggio FT3,FT4,TSH;

- c) anticorpi anti-tireoglobulina, anti-nucleo, anti-microsomi, anti-cardiolipina;
- d) HbsAg, HCV-RNA, HIV
- e) test di gravidanza (nelle donne in età fertile).

Periodo di osservazione (pre-trattamento, durata 6 mesi)

Valutazioni da ripetere tutti i mesi (mesi 1, 2, 3, 4, 5, 6):

- L'emocromo con la formula leucocitaria (espressa in valore assoluto e non in percentuale) e la biochimica
- RM con Gd. L'esame deve essere eseguito con una tolleranza di ± 4 giorni rispetto alla visita prevista.

Valutazioni da ripetere alle Visite 3 e 7 (mesi 2, 6 del periodo di osservazione):

- a) esame obiettivo generale comprensivo di: parametri vitali e visita neurologica (incluso EDSS);
- b) esami di laboratorio: emocromo con formula, biochimica (glicemia, azotemia, AST, ALT, fosfatasi alcalina, γ -GT, bilirubina totale, creatininemia) ed esame urine (con sedimento).

Valutazioni eseguite durante tutto il periodo:

- a) monitoraggio e registrazione delle ricadute cliniche;
- b) registrazione di eventi medici di rilievo e terapie concomitanti;

Valutazioni eseguite durante il 6° mese:

a) valutazione dei parametri di funzionalità epatica ed esecuzione di un emocromo (visita 7, 6° mese). Tali parametri saranno valutati dopo trattamento con AZA 1 mg/kg/die (pazienti del gruppo 2), intrapreso due settimane prima della visita 7, al fine di prevenire fenomeni di sovradosaggio nei pazienti che hanno scarsa capacità di metabolizzazione di AZA.

b) valutazione immunologica:

eseguita durante l'ultimo mese del periodo di osservazione entro 15 giorni dalla prima somministrazione di β IFN 1a .

In occasione dell'effettuazione dell'ultimo controllo RM del periodo di osservazione al paziente verrà consegnata la prima confezione di trattamento relativo al primo mese di terapia, in base alla lista di randomizzazione. Ai pazienti del gruppo 2, l'AZA al dosaggio di 1 mg/kg/die, è stata iniziata nella seconda metà dell'ultimo mese di osservazione.

Periodo di trattamento (durata 8 mesi)

Valutazioni ripetute tutti i mesi (mesi 1, 2, 3, 4, 5, 6,7, 8):

L'emocromo con la formula leucocitaria (espressa in valore assoluto e non in percentuale) e la biochimica.

Valutazioni da ripetere ai mesi 3, 4, 5, 6:

RM con Gd. L'esame è stato eseguito con una tolleranza di \pm 4 giorni rispetto alla visita prevista.

Valutazioni da ripetere alle Visite 9 e 12 (mesi 2 e 5 del periodo di trattamento):

- a) esame obiettivo comprensivo di visita neurologica (EDSS) ;
- b) esami strumentali:RM con Gd
- c) esami di laboratorio: emocromo con formula, biochimica (glicemia, azotemia, AST, ALT, fosfatasi alcalina, γ GT, bilirubina totale, creatininemia) ed esame urine (con sedimento).
- d) valutazione immunologica in 10 pazienti trattati (5 del gruppo 1 e 5 del gruppo 2)
- e) monitoraggio e registrazione delle ricadute cliniche durante il periodo di trattamento
- f) registrazione di effetti collaterali e terapie concomitanti.

Valutazioni da ripetere alla Visita 15 (mesi 8 del periodo di trattamento, fine dello studio):

- a) esame obiettivo generale, comprensivo di:
 - parametri vitali;
 - visita neurologica (inclusa EDSS).

b) esami strumentali:

-RM con Gd, ECG;

c) esami di laboratorio:

-emocromo con formula, biochimica (glicemia, azotemia, AST, ALT, fosfatasi alcalina, γ -GT, bilirubina totale, creatininemia) ed esame urine (con sedimento);

-dosaggio FT3, FT4, TSH;

-anticorpi anti-tireoglobulina, anti-nucleo, anti-microsomi, anti-cardiolipina;

-HbsAg, HCV-RNA, HIV

d) monitoraggio e registrazione delle ricadute cliniche durante il periodo di trattamento

e) registrazione effetti collaterali e terapie concomitanti

Alla scadenza di ogni mese di trattamento, il paziente è tornato al centro di trattamento ed ha restituito la confezione di terapia relativa al mese trascorso, possibilmente con le fiale di IFN vuote utilizzate, ed ha ricevuto il quantitativo di farmaco necessario per il mese di terapia successivo.

3.10. Analisi statistica

I dati quantitativi sono stati descritti come medie e deviazioni standard e i dati qualitativi saranno riportati come percentuali. Sono stati inoltre calcolati gli intervalli di confidenza al 95%.

3.10.1. Tollerabilità clinica.

Alla fine dello studio tipo, frequenza e durata degli effetti collaterali raccolti durante il periodo di trattamento dello studio sono stati confrontati con i dati ottenuti durante il periodo di osservazione e con i

dati disponibili dagli studi finora condotti e completati con il composto.

La valutazione è stata fatta con tabelle di contingenza e test del χ^2 .

Per gli esami di laboratorio sono stati considerati i valori medi e come misure di dispersione la deviazione standard e gli intervalli di confidenza al 95% per confrontare i valori ottenuti durante il periodo di osservazione con quelli durante il periodo di trattamento.

3.10.2 Efficacia sulle lesioni encefaliche.

Con 120 osservazioni per gruppo (20 pazienti seguiti con 6 osservazioni l'uno) lo studio può individuare con l'80% di probabilità differenze $\geq 30\%$, potenza sufficiente a proteggere da risultati falsamente negativi (errori tipo II).

In accordo ai precedenti studi (46-47-48) l'analisi dei risultati è stata calcolata usando statistica non parametrico; le differenze tra il pre-trattamento e il periodo di trattamento per quanto riguarda il numero e il volume di tutte e solo delle nuove lesioni Gd+ è stata calcolata utilizzando signed rank-test; la differenza tra i due gruppi è stata valutata utilizzando il delta (inteso come differenza tra periodo di trattamento e periodo di osservazione per ogni singolo gruppo) delle lesioni gd+ totali e nuove con il test U di Mann-Whitney.

Sono stati rappresentati inoltre il numero di scan che non presentavano lesioni (scan negativi) rispetto a quelli che ne presentavano (scan positivi) e questi ultimi sono stati ulteriormente divisi in base al numero di lesioni Gd+ presenti in quell'esame questi dati sono stati valutati mediante il Mantel-Haentzel test.

La differenza di frequenza tra i pazienti che non riducono di almeno il 50% le lesioni encefaliche ($\Delta \leq 50\%$) e quelli che invece le riducono ($\Delta \geq 50\%$) è stata valutata mediante il χ^2 per confronto tra due proporzioni. Il numero e il volume delle lesioni è stato espresso come mediane e quartili come parametri discontinui delle loro distribuzioni.

Per la valutazione di efficacia sono stati considerati il numero ed il volume di lesioni encefaliche attive captanti Gd in T1. Inoltre, in maniera

descrittiva, per ciascun esame eseguito, viene descritto oltre al numero totale delle lesioni anche il numero delle nuove lesioni in T2 ed in fFLAIR.

L'efficacia sul numero delle lesioni captanti Gd è stata valutata per ciascun gruppo di trattamento, come descritto da McFarland (34), utilizzando un test non-parametrico (Wilcoxon signed rank test) in considerazione del ridotto numero di pazienti per gruppo. L'efficacia per il carico lesionale totale è stata valutata confrontando le rette di regressione ottenute nel periodo di osservazione ed in quello di trattamento.

3.10.3. Efficacia clinica.

Il campione non è sufficientemente dimensionato per evidenziare differenze tra gruppi, in termini di numero di ricadute cliniche, di Integrated EDSS Index e di EDSS. I valori del periodo di osservazione e del periodo di trattamento sono stati riportati in maniera descrittiva.

L' EDSS è stato valutato distanza di almeno un mese e confermato solo se presente in due successive valutazioni in due successive valutazioni, qualora la valutazione fosse avvenuta in corso di ricaduta clinica, la successiva valutazione è stata confermata da un controllo ad almeno due mesi dalla fine della relapse.

Non essendo disponibili dati in merito in letteratura, il confronto è stato effettuato tra dati ottenuti nel periodo di trattamento vs il periodo di osservazione all'interno di ciascun gruppo.

4. RISULTATI

4.1. Tollerabilità e sicurezza del trattamento

In totale su 41 pazienti in esame sono stati registrati 52 eventi avversi intesi come effetti collaterali o alterazioni dei parametri chimici o ematologici di laboratorio con una mediana di 1 evento per paziente (media $1,26 \pm 1,5$ con 95%CI 0,7-1,7). 19/41 (48%) pazienti non hanno presentato alcun evento avverso. Il 50% 11/22 dei pazienti appartenenti al gruppo I (IFN) ha sviluppato almeno un effetto collaterale e il 42 % (8/19) del II gruppo (AZA+IFN). Il primo gruppo (IFN) ha presentato un totale di 24 eventi avversi con una mediana di 0.5 (CI 95% 0,4-1,7 media $1 \pm 1,47$); mentre nel gruppo AZA+IFN sono stati registrati 28 eventi avversi con una mediana di 1 (CI 95% 0,6-2,2 con media di $1,4 \pm 1,74$). La differenza tra i due gruppi non è risultata statisticamente significativa. Confrontando la comparsa della “flu-like”, intesa come sindrome simil-influenzale ma necessariamente correlata alla comparsa di febbre, nei due gruppi di pazienti, tale evenienza si è presentata in 4/19 pari al 21,1% (mediana 0 95% CI 0-0.4) nel gruppo di pazienti IFN β 1a + AZA e 11/22 pazienti una frequenza del 50% (mediana 0,5 95%CI 0,2-0,7) nel gruppo di pazienti che assumeva β IFN alla dose maggiore. La differenza tra il gruppo Aza + β IFN e il gruppo con β IFN 22mgrX3 risulta statisticamente significativa utilizzando il test di Fischer (p= .05). Durante il periodo di trattamento si sono verificati nei due gruppi di pazienti altri effetti collaterali (infezioni, leucopenia, anemia) la cui differente frequenza di comparsa in nessun caso ha raggiunto la significatività statistica. Nei due gruppi di trattamento si è registrata una bassa comparsa di reazione cutanea da inoculo del β IFN, senza differenza di frequenza; anche la tollerabilità epatica, è stata molto bassa (0% nel I gruppo e 5,3% nel II gruppo).

Sono state registrate 3 segnalazione di alterazioni dei globuli bianchi in corso di trattamento con IFN, e 4 per quanto riguarda il gruppo di associazione di Aza e Ifn.

Durante il periodo di osservazione, in cui i pazienti non assumevano alcun trattamento sono state segnalate 4 disturbi (2 episodi di bronchite, 1 infezione delle vie urinarie e un episodio di dermatite).

In tabella 3-4 sono elencati nel dettaglio gli eventi avversi.

Intensità degli eventi avversi:

Gli eventi avversi sono stati 18/24 (75%) di grado I e 23/24 (95%) di grado I-II nel primo gruppo, mentre il gruppo di associazione ha fatto registrare eventi avversi per 86% 24/28 di grado I e per il 97 % 27/28 di grado I-II.

Pertanto risulta essere presente un unico evento avverso per gruppo di grado III, che ha in nessun caso compromesso il prosieguo del trattamento.

49 dei 52 eventi avversi sono scomparsi alla fine del periodo di trattamento, (entro 6 mesi) i 3 eventi che erano ancora presenti alla fine del trattamento erano tutti di grado 1 e sono intercorsi 1 nel gruppo I (anemia) e 2 nel gruppo II (entrambi rappresentati da anemia). In tutti i casi di febbre si è ottenuto un discreto controllo della sintomatologia con la terapia sintomatica.

4.2. Markers surrogati di RM

4.2.1 Lesioni Gd+

Gli esami di RM, relativi al periodo di osservazione, di due pazienti del gruppo di Pisa non sono state valutate in quanto non sono pervenuti al centro coordinatore di Firenze. Entrambi i pazienti appartenevano al I gruppo. (BU e DA). Nel primo gruppo sono stati acquisiti in 118 dei 120 totali previsti durante il periodo di osservazione. La mediana del numero di lesioni Gd+ /scan è stata per il gruppo IFN durante il periodo di osservazione di 2 (quartili 1-5 media 5,3. 95% CI 3,6-6,8) e di 0 (quartili 0-1 media 1,4; 95% CI 0,6-2,2) durante il periodo di trattamento; con una riduzione mediana di 2 lesioni/scan; statisticamente significativa (Signed-Rank Test $p < 0,00000$). Questo dato è dovuto a una riduzione delle lesioni Gd+ del 74% e cioè da 625 durante il baseline a 165 durante il periodo di trattamento,

corrispondente ad una mediana lesione/paziente di 16,5 (95% C.I.7,9-54) durante il periodo di osservazione e di 2,5 (95% C.I.1-19) durante il periodo di trattamento.

Per il gruppo 2 che ha ricevuto invece l'associazione farmacologia di Aza e IFN la mediana del numero delle lesioni nel periodo di osservazione è stata 2 (quartili 0-4 media 3,6; 95% C.I.2,7-4,2) e nel periodo di trattamento 0 (quartili 0-1 media 0,77 95% C.I. 0,5-0,9) con una riduzione mediana di 2 lesioni scan (Signed-rank test $p < 0,00000$). Il numero di lesioni attive si è ridotto da 417 durante il periodo di osservazione a 86 con una riduzione percentuale del 80%, corrispondente ad una mediana lesione/paziente di 11 (quartili 8,6-35) nel periodo di osservazione e di 2 (quartili 1,9-7) nel periodo di trattamento. (Fig.8)

E' opportuno precisare che un paziente del gruppo I (IFN) ha presentato una abnorme attività infiammatoria da solo maggiore dei rimanenti 19 pazienti. Considerata l'atipicità del dato abbiamo ritenuto opportuno effettuare un'analisi parallela senza il paziente in esame. I dati riguardanti i restanti 19 pazienti di questo gruppo (gruppo IFN) hanno presentato un numero mediano di 2 lesioni durante il periodo di osservazione (valore medio 3,5 95%CI 2,6-4,3) e il valore mediano di 0 lesioni (valore medio 0,5 95%CI 0,34-0,68) nel periodo di trattamento, con una riduzione di mediana di 2 lesioni/paziente . Il numero di lesioni attive si è ridotto da 402 a 59 lesioni con una riduzione pari all'86% (Signed-rank test $p < 0,00000$) corrispondente ad una mediana lesione/paziente di 14 (quartili 6-23) nel periodo di osservazione e di 2 (quartili 0-5) nel periodo di trattamento. (Fig.9)

Durante il periodo di osservazione in entrambi i gruppi, il numero medio di lesioni è rimasto sostanzialmente stabile nel tempo senza evidenziare trend di regressione dei valori estremi verso la media. Il numero totale delle lesioni gd+ è stato ridotto del 50% o più in 18 su 20 pazienti per il gruppo IFN (90% dei pazienti), mentre nel gruppo AZA+IFN il numero totale delle lesioni è stato ridotto del 50% o più in 16 pazienti su 19 (85%). (χ^2 $p = n.s.$)

Il Delta delle lesioni Gd+, inteso come valore delle lesioni Gd+ misurate durante il periodo di trattamento normalizzate rispetto al corrispondente valore osservato nel periodo basale, dei due gruppi è stato confrontato senza evidenziare differenze (Test U di Mann-Whitney $p=n.s.$)

4.2.2. Scan

Durante il periodo di osservazione abbiamo evidenziato 22/118 (18%) scan negativi (senza alcuna lesione) nel gruppo IFN e 33/113 nel gruppo Aza+ IFN (29%) mentre durante il periodo di trattamento rispettivamente 74/117 (63%) e 69/112 (61%) con un aumento degli scan negativi (Mantel-Haenszel test: $p<0.00000$ per il gruppo Ifn e $p<0.00000$ per Aza+IFN) statisticamente significativo.

L'aumento degli scan negativi è simile nei due gruppi (test di Fisher $p< n.s.$).(Fig.10-11-12-13)

4.2.3. Nuove lesioni T2 w (nT2w)

L'analisi delle lesioni nelle sequenze T2w è stata effettuata tra il primo mese e l'ultimo del periodo di osservazione e del periodo di trattamento, inoltre è stata valutato anche tra l'ultimo scan del periodo di trattamento e la prima risonanza del periodo di estensione o follow-up a sei mesi di distanza ed ad un anno dalla fine del "frequent MRI" che corrispondono a 12 e 18 mesi dall'inizio della terapia (T12-T18) . I dati disponibili al momento si riferiscono ad un numero limitato di pazienti a 15 pazienti per braccio (altri 6 pazienti sono in corso di analisi). Nel gruppo IFN abbiamo assistito ad una riduzione mediana delle lesioni per scan da 6 (quart. 3-11,5 media 9,6 95%C.I.3,7-15,6) nel periodo di osservazione, a 1 (quart.0-3 media 1,6 95%C.I. 0,16-2,9) nel periodo di trattamento, ed ancora a 1 (quart.0-1,5 media 1,6 95%C.I.0,1-3) nel periodo di estensione T6. All'ultimo follow-up T 18 valore mediano di lesioni è stato 0 con una media di 0,3 lesione paziente. La riduzione rispetto al al basale di osservazione è stata dell'83% nel periodo di trattamento (Wilcoxon paired test $p<0,0009$) e ($p<0,001$), raggiungendo il 97% nel follow-up a T 18 ($p <0,05$), pur con una importante ulteriore riduzione dei pazienti.

Analogo risultato si è verificato nel gruppo Aza+IFN con un numero mediano di lesioni per scan che è passato da 5 (quart. 1,5-15,5 media 10 95%C.I.3,8-16,2) a 1 (quart 0-2 media 2,3 95% C.I. 0,1-4,5) a 2 (quart 0-2 media 1,6 95%C.I. 0,6-2,7) e ancora un valore mediano a 18 mesi di 0 (0,2 media) con una riduzione (Wilcoxon paired test $p < 0,0035$) dell'87% nel periodo di trattamento e del 86% ($p < 0,0033$) nel periodo di estensione a 12 mesi (T12) e addirittura del 97,5% a 18 mesi ($p < 0,001$), ma anche in questo caso con una riduzione del numero dei pazienti (Fig.14). Le nuove lesioni in T2 rispetto al periodo basale sono state confrontate nei due gruppi, ma non hanno evidenziato alcuna variazione (Test U di Mann e Whitney $p = n.s$ nel periodo di trattamento e $p = n.s$ nel periodo di estensione).

Analoghi risultati sono stati ottenuti con il volume delle nuove lesioni T2 valutate ogni 6 mesi.

Tutti i pazienti eccetto 1 del gruppo IFN hanno evidenziato una riduzione di almeno il 50% delle lesioni tra il periodo di trattamento e il periodo di osservazione, mentre nel periodo di estensione tutti i pazienti hanno ridotto di almeno il 50% le lesioni rispetto al basale.

4.2.4. Carico lesionale totale

Le variazioni di carico lesionale totale misurato con il metodo tradizionale e con il metodo di Lee e coll. (49) modificato ha mostrato risultati in linea con gli altri dati.

4.3. Valutazione clinica

Durante il periodo di trattamento e nel successivo follow-up si è assistito in tre pazienti ad un miglioramento di almeno 0.5 nella scala EDSS e in due pazienti ad un peggioramento, in entrambi i gruppi. Il campione è scarsamente dimensionato per qualsiasi analisi statistica.

Le ricadute nei due anni precedenti nei pazienti del gruppo I sono state di 76 con una mediana di 3 (quartili 2-4 media 3,6) e un valore medio mensile di 0,13 ricadute. Durante il periodo di osservazione le ricadute sono state 10 con un valore mediano di 0 (0-1) media 0,45. Durante il

periodo di trattamento e follow-up a 12 e 24 mesi le ricadute registrate sono state rispettivamente 2, 5, 7 con un valore mediano sempre di 0.

Mentre nel II gruppo le ricadute totali nei due anni precedenti sono state 43 con un valore mediano di 2 (quart 2-3 e media 2,5) con un valore mediano mensile di 0,08 ricadute. Durante il periodo di osservazione le ricadute sono state 7 (valore mediano di 0 e media 0,3), nel periodo di frequent MRI le ricadute registrate sono state 4 (mediana 0, media 0,21) e nel follow-up 12 mesi dall'inizio del trattamento e 24 mesi sempre di 3 ricadute (mediana 0 e media 0,18). Le ricadute espresse per valore mediano e medio/mensile/paziente sono nella figura 15-16.

4.4 Valutazione immunologica

4.4.1 Nabs

25 pazienti, di cui 11 appartenenti al gruppo I e 14 al gruppo II sono stati sottoposti al dosaggio di anticorpi anti-IFN. In 19/25 dei pazienti non sono stati riscontrati Nabs; mentre 6/25 hanno presentato Nabs; 3 pazienti ad alto titolo (>100 TRU) e 3 a basso (<100 TRU). Di tali pazienti 1/14 solo apparteneva al gruppo di associazione farmacologica gruppo II e 5/11 al gruppo I IFN ($p=0,03$ test di Fisher). Inoltre l'unico paziente positivo nel gruppo II aveva in passato sospeso terapia con Betaferon per inefficacia. Tutti e due i pazienti del gruppo I, che hanno sviluppato anticorpi neutralizzanti ad alto titolo, non hanno ridotto a 12 mesi le nT2w del 50%. La tabella 5 riassume i pazienti sottoposti al dosaggio dei Nabs.

4.4.2-Altri aspetti immunologici

In entrambi i gruppi si è assistito ad una riduzione media del numero dei linfociti rispetto al valore osservato nel periodo di osservazione, nel gruppo Aza (40% $p < 0,0005$ t-student sia nel periodo di osservazione che durante l'estensione di 6 mesi) tale la riduzione è stata più netta e

congrua con la più lenta cinetica. Nel gruppo IFN tale riduzione è stata del 28% ($p < 0,006$ t-student periodo di trattamento).

L'analisi immunologia non ha evidenziato significative alterazioni tra i due gruppi delle sottopopolazioni linfocitarie né della produzione di citochine. Il campione limitato aveva la funzione solo di poter evidenziare eventi sentinella.

5.DISCUSSIONE

In questo studio la sicurezza e l'efficacia dell'associazione Aza+IFN è stata confrontata con la sicurezza e l'efficacia dell'agente immunomodulante IFN β 1a 22 mcg x3, in 41 pazienti divisi in due coorti, dopo randomizzazione, rispettivamente di 22 (IFN) e 19 (Aza +IFN). Tali pazienti sono affetti da SM a decorso RR, e presentano alta attività di malattia, breve durata, basso EDSS. Il primario end-point dello studio era confrontare nei due gruppi la comparsa di eventi avversi intesi come effetti collaterali o alterazione dei parametri ematologici e chimici di laboratorio. Alcuni studi nel corso degli ultimi anni si sono occupati di terapie di associazione nel trattamento della SM. L'aspetto critico dell'impiego di associazioni farmacologiche è rappresentato dalla dimostrazione che il secondo farmaco associato al primo non solo possa essere inefficace, ma possa anche antagonizzare l'effetto del primo farmaco. L'impiego di un immunosoppressore in associazione all'interferone è stato impiegato solo in pochi studi, e sono stati utilizzati Metotrexate per os insieme a L'IFN β 1 a (50). In un altro studio invece è stato impiegato il Mitoxantrone come terapia di salvataggio di IFN β 1b con una riduzione dell'attività di malattia e un buon profilo di tollerabilità e sicurezza (51). Il maggior numero di studi è stato realizzato proprio tra Azatioprina e IFN sia in pazienti con forme a decorso SP che RR (52, 53).

Tali studi contemporanei al presente lavoro, sembrano suggerire una sostanziale sicurezza, associata ad una buona efficacia di trattamento.

L'impiego della terapia di associazione suggerisce delle riflessioni in merito alla scelta del dosaggio per ottimizzare le prestazioni dei farmaci. In particolar modo il gruppo di Baltimora (54) ha associato l'Aza alla dose massima di 3 mg/Kg all'IFN β 1b, in accordo alla alterazioni ematologiche o epatiche in una coorte di 15 pazienti affetti da SM sia a decorso RR che SP. Anche in questo studio il monitoraggio, così come nella nostra esperienza, il monitoraggio degli effetti collaterali o delle modificazioni ematologiche o alterazione dei

parametri chimici di laboratorio consente una personalizzazione del dosaggio del trattamento. Analogo lavoro è stato realizzato dal gruppo di McFarland (55) in cui 6 pazienti che presentavano una forma clinica refrattaria al trattamento con IFN beta 1 b, hanno ricevuto l'aggiunta di Aza, a dosaggio sub-massimale ottenendo una buona efficacia e tollerabilità nel tempo.

5.1 Tollerabilità

Nel nostro studio l'impiego dell'associazione non ha determinato un incremento degli effetti collaterali, anzi il dimezzamento del dosaggio dell'interferone ha ridotto in maniera significativa ($p = .05$) la comparsa della "flu-like" rispetto al gruppo che assumeva l'IFN a dosaggio pieno. La tollerabilità gastrica ed epatica è risultata molto buona (5,3%) e l'incidenza di infezioni da immunosoppressione per quanto numericamente non trascurabili (15%) sono state transitorie e di basso grado.

Anche se effetti collaterali, modifiche di parametri ematologici o chimici di laboratorio sono intercorsi in circa la metà dei pazienti, tali eventi sono stati di grado I-II e non hanno compromesso il prosieguo del trattamento (0% drop-out). L'evento critico è rappresentato dalla necessità di un corretto aggiustamento posologico del dosaggio del farmaco a 3 mg/Kg in accordo ai criteri di tossicità soprattutto ematologica.

5.2. Markers surrogati di RM

Il secondo end point doveva valutare l'impiego dei convenzionali markers surrogati di attività di malattia usando un disegno cross-over che confrontava sei RM encefalo mensili acquisite durante il periodo di osservazione, o baseline, e lo stesso numero di scan (preceduti da una RM basale), durante tutto il periodo di trattamento sia in termini di lesioni mensili che assumono potenziamento dopo somministrazione di mdc (triplice dose) sia la variazioni delle nuove lesioni in T2w (NT2W), variazioni di carico lesionale totale, i dati clinici, la misurazione dei Nabs avversi e i fattori immunologici; inoltre l'analisi di alcuni parametri di RM è stata estesa ad un successivo follow-up di 24 mesi.

5.2.1 Lesioni Gd+

In questo studio il trattamento con IFN induce una riduzione, che va dal 74 all'86% (se si esclude un paziente atipico) delle lesioni encefaliche rispetto al periodo di osservazione e nel gruppo di pazienti che hanno ricevuto l'associazione di farmaci Aza+Ifn una riduzione del 80%.

Il numero mediano di lesioni Gd+/scan cambia da 2 a 0 in entrambi i gruppi con una riduzione di 2 lesioni/scan ($p < 0,00000$ e $0,000000$ rispettivamente per AZA e IFN).

Il confronto tra i due gruppi espresso come Delta (cioè lesioni osservate nel periodo di trattamento rispetto al periodo di osservazione) sia delle lesioni Gd+ totali che delle nuove non ha evidenziato differenze tra i due gruppi (test U di Mann-Whitney $p = n.s.$).

Questi dati indicano una importante soppressione dell'accumulo di nuove lesioni in entrambi i gruppi di trattamento e nella maggior parte dei pazienti, ma non differenze nei due gruppi di trattamento.

Questi risultati sono simili a quelli osservati in studi simili con lo stesso disegno per altri farmaci approvati nel trattamento della SM (11-56-57).

5.2.2. nT2w

Anche le nuove lesioni in T2w sono ugualmente soppresse da entrambi i trattamenti, questo effetto è sostanzialmente simile alla soppressione delle lesioni Gd+, e sembra leggermente maggiore dei dati delle lesioni Gd+, anche se il numero dei pazienti si è lievemente ridotto in quest'analisi, senza evidenziare differenze tra i due gruppi.

L'esame di RM eseguita a sei mesi dalla fine del periodo di RM mensili consente di monitorizzare l'attività infiammatoria del periodo di estensione e documenta un'efficacia che sembra rimanere stabile nel tempo per i due trattamenti, anche dodici mesi dopo la fine del "frequent MRI" e pertanto ben 18 mesi dall'inizio del trattamento. Tale dato era atteso per il secondo gruppo in quanto congruo con la lenta cinetica del meccanismo d'azione dell'Azatioprina, come già noto in letteratura (32).

5.2.3. Altri end-points

I dati clinici non sono sufficientemente dimensionati per consentirci di documentare un effetto del trattamento e le sue eventuali variazioni nei due gruppi.

E' noto che la presenza di Nabs ad alto titolo sia associato ad una riduzione dell'efficacia del trattamento interferonico (14). L'effetto non è correlato al dosaggio del farmaco (14). Numerose strategie sono state proposte per ridurre la produzione di anticorpi (19,20,21). Il campione in esame del nostro studio ci consente solo di poter trarre spunto per eventuali studi, alcuni sull'argomento sono attualmente in corso da parte del nostro gruppo. Il dato che colpisce l'attenzione è rappresentato dal basso numero di pazienti 1/14 che presenta Nabs. Inoltre il paziente in esame aveva già sospeso in passato terapia con IFN β 1b per inefficacia. Come è noto l'IFN β 1b rappresenta quello con più alto indice d'induzione di Nabs. I dati preliminari di un successivo studio che ha preso spunto da questa osservazione confermerebbero il basso indice di comparsa di Nabs in pazienti sottoposti a terapia di associazione con un immunosoppressore e che l'aggiunta di Aza ad un trattamento con IFN, in corso di Nabs, non sarebbe in grado di abbattere il titolo anticorpale, né tanto meno di negativizzarlo.

Pertanto appare ipotizzabile che l'immunosoppressione "ab inizio" possa essere in grado di inibire o di ridurre la risposta primaria contro il farmaco, ma non quella secondaria.

5.3 La farmacodinamica

La riduzione del numero dei linfociti appare maggiore nel gruppo di pazienti che riceve anche Aza (40% vs 28%) e tale riduzione inizia a comparire abbastanza precocemente, raggiungendo un valore massimo dopo circa 8 mesi di trattamento. Tale indice di riduzione non correla con l'abbattimento delle lesioni encefaliche che invece è costante. Inoltre l'aggiunta dell'IFN nel gruppo di associazione sembra anticipare temporalmente la riduzione dei linfociti a differenza di quanto avviene con la sola Aza (32).

5.4. Rilevanza degli end-points e del disegno dello studio

Il primario end-point è rappresentato dalla tollerabilità e dall'incidenza, la gravità e dalla durata degli eventi avversi espressi in termini di effetti collaterali e modificazioni di parametri chimici o ematologici. Tale end-point riveste un ruolo critico nell'impiego di trattamenti "non approvati" ed appare fondamentale un profilo di tollerabilità e sicurezza prima dell'impiego di tale strategia in uno studio su larga scala.

Il secondario end point dello studio, lesioni Gd+ è un marker surrogato di attività di malattia. La lesione Gd+ è un sensibile e specifico marker di danno della barriera emato-encefalica (BEE), che generalmente avviene precoce e dura da 2 a 8 settimane, tale attività infiammatoria correla con le variazioni della disabilità neurologica e con l'indice di relapse (58-60 29,32,35)

La soppressione delle nuove lesioni infiammatorie cerebrali e il loro accumulo è un evento clinicamente e biologicamente rilevante e congruo con i meccanismi immunosoppressivi e immunomodulanti dei farmaci. La valutazione delle lesioni Gd+ è considerato un marker sufficientemente robusto per essere valutato attraverso uno studio a disegno cross-over.

Le lesioni NT2W sono routinariamente usate come marker di accumulo delle lesioni ed è raccomandato da alcune linee-guida come marker surrogato di attività di malattia. (35,58). Inoltre nei pazienti con SM con breve durata di malattia, questo marker correla con disabilità clinica a lungo termine (60).

Un possibile elemento di confusione del disegno dello studio è rappresentato dal fenomeno della regressione verso la media. Per questa ragione questo disegno è considerato utile per una preliminare valutazione dei trattamenti; tuttavia in questo studio il numero medio di lesioni Gd+ rimane stabile in tutto il periodo di osservazione. Inoltre nel presente disegno le lesioni Gd+ comparse in sei mesi di terapia sono valutate in riferimento ad un analogo periodo di storia naturale; il tempo di osservazione e il numero delle lesioni; sembrano sufficienti a prevenire artificiali selezioni di valori estremi e il fenomeno della

regressione verso la media. (60,55). Tali risultati dati sono stati confermati successivamente dai risultati ottenuti anche nel periodo di estensione.

6.CONCLUSIONI

Entrambi i trattamenti in esame IFN beta 1a 22mcgr somministrato 1fl x3 a settimana s.c. ed Aza al dosaggio massimo di 3 mg/Kg + IFN beta 1a 11 mcgx3 a settimana hanno presentato un buon profilo di tossicità. Non si sono registrati eventi avversi che abbiamo imposto la sospensione del trattamento nei 41 pazienti in esame. L'impiego dell'associazione nel gruppo II ha indotto una riduzione significativa ($p=0,05$) dell'effetto collaterale più frequente: la "flu-like".

Entrambe le strategie terapeutiche proposte hanno evidenziato una riduzione dell'attività infiammatoria cerebrale valutata mediante markers surrogati di RM, senza tuttavia differenze tra i due gruppi. Tale riduzione dell'attività infiammatoria cerebrale sembra persistere nel tempo anche a 12 e 18 mesi dall'inizio del trattamento.

La terapia di associazione, per quanto siano necessari studi più numerosi, potrebbe rappresentare una valida alternativa alla monoterapia con IFN e una utile strategia nella riduzione della comparsa dei Nabs, che come è noto, rappresenta una delle cause più frequenti d'insuccesso del trattamento Interferonico.

BIBLIOGRAFIA

1. Poser C.M. (1994). The epidemiology of Multiple Sclerosis: a general overview. *Ann. Neurol.* 36 (S2): S180-S193.
2. Reder AT, Arnason BGV. (1985). Immunology of multiple sclerosis. In: Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HC, eds. *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science Publishers. Vol. 47: 337-396.
3. Martin R, McFarland H. and McFarlin D. (1992). Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 153-187.
4. Hohlfeld R., Londei M., Massacesi L. and Salvetti M. (1995). T-cell autoimmunity in multiple sclerosis. *Immunology Today*, 16:259-261.
5. Weiner HL, Hafler DA. (1988). Immunotherapy of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 23: 211-222.
6. Massacesi L., Amato M.P. and Amaducci L. (1994). Immunosuppression in Multiple Sclerosis: state of the art and future perspectives. In "A multidisciplinary approach to myelin diseases.II", S. Salvati ed. Plenum Press (New York), pp. 255-259.
7. Durelli L, Bongioanni MR, Cavallo R et al. (1994). Chronic systemic high- dose recombinant interferon alfa 2a reduces exacerbation rate, MRI signs of disease activity and lymphocyte interferon gamma production in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 44: 406-413.
8. Panitch MS, Hirsch RL, Schindler J and Johnson KP. (1987). Treatment of Multiple Sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37:1097-1102.
9. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993). Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43:655-661.

10. Paty DW, et al. (1993). Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo- Controlled trial. *Neurology* 43:662-667.
11. Stone L.A., Frank J.A., Albert P.S. et al. (1995). The effect of interferon- β on blood-brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* 37: 611-619.
12. Calabresi PA. (1997). Association between NAB to IFNB and contrast enhancing lesions in MS patients. In *Current Trends in the Treatment of Multiple Sclerosis, Presentation in Focus of the 49th American Academy of Neurology Meeting - Boston (USA)*.
13. Rudick R. Lower Immunogenicity Seen with Avonex (1997). In *Current Trends in the Treatment of Multiple Sclerosis, Presentation in Focus of the 49th American Academy of Neurology Meeting - Boston (USA)*.
14. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K, Kristensen O, Petersen T, Rasmussen S, Ravnborg M, Stenager E, Koch-Henriksen N; Danish Multiple Sclerosis Study Group. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet.* 2003 Oct 11;362(9391):1184-91.
15. Panitch H, Goodin DS, Francis G, Chang P, Coyle PK, O'Connor P, Monaghan E, Li D, Weinshenker B; EVIDENCE Study Group. Evidence of Interferon Dose-response: European North American Comparative Efficacy; University of British Columbia MS/MRI Research Group. Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology.* 2002 Nov 26;59(10):1496-506.
16. Francis GS, Rice GP, Alsop JC; PRISMS Study Group. Interferon beta-1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. *Neurology.* 2005 Jul 12;65(1):48-55
17. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K, Frederiksen JL, Jensen K, Kristensen O, Petersen T, Rasmussen S, Ravnborg M, Stenager E, Koch-Henriksen N; Danish Multiple Sclerosis Study Group; Danish Interferon-beta Project. Antibodies to IFN-beta: the Danish National IFN-beta Project. *Neurology.* 2003 Nov 11;61(9 Suppl 5):S27-8.

18 Sørensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J, Polman C, Pozzilli C, Ross C; EFNS Task Force on Anti-IFN-beta Antibodies in Multiple Sclerosis. Guidelines on use of anti-IFN-beta antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-beta antibodies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2005 Nov;12(11):817-27

19 Bertolotto A, Malucchi S, Milano E, Castello A, Capobianco M, Mutani R. Interferon beta neutralizing antibodies in multiple sclerosis: neutralizing activity and cross-reactivity with three different preparations. *Divisione Universitaria di Neurologia, Ospedale San Luigi, Regione Gonzole 10, 10043 Orbassano (TO), Italy.*

20 Calabresi PA. Considerations in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology.* 2002 Apr 23;58(8 Suppl 4):S10-22

21 Pozzilli C, Antonini G, Bagnato F, Mainero C, Tomassini V, Onesti E, Fantozzi R, Galgani S, Pasqualetti P, Millefiorini E, Spadaro M, Dahlke F, Gasperini C. Monthly corticosteroids decrease neutralizing antibodies to IFNbeta1 b: a randomized trial in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2002 Jan;249(1):50-6.

22 Francis GS, Rice GP, Alsop JC; PRISMS Study Group. Interferon beta-1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. *Neurology.* 2005 Jul 12;65(1):48-55

23 PRISM Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* (1998), 352:1498-1504

24 Handshumaker R.E. (1990). Immunosuppressive agents. In Goodman Gilman A., Rall T.W., Nies A.S. and Taylor P. eds., *The pharmacological basis of therapeutics.* Pergamon Press, New York (USA): 1264-1276.

25 Amato MP, Pracucci G, Ponziani G, Siracusa G, Fratiglioni L, Amaducci L. (1993). Long-term safety of Azathioprine therapy in multiple sclerosis. *Neurology* 43: 831-833.

26 British and Dutch Multiple Sclerosis Azathioprine Trial Group (1988). Double-Masked Trial of Azathioprine in Multiple Sclerosis. *The Lancet*: 179-183.

27 Goodkin DE, Bailly RC, Teetzen ML, Hertsgaard D, Beatty WW. (1991).The efficacy of Azathioprine in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 41:20-25

28 Yudkin PL, Ellison GW, Ghezzi A, et al. (1991). Overview of Azathioprine treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 338:1051-1055.

29 Palace J. and Rothwell P. (1997) . New treatments and azathioprine in multiple sclerosis. *Lancet* 350 : 261 .

30 Cavazzuti M, Merelli E, Tassone G, Mavilla L. (1997).Lesion Load Quantification in Serial MR of Early Relapsing Multiple Sclerosis Patients in AZathioprine Treatment. *Eur. Neurol* 38: 284-290.

31 Confavreux C. , Saddier P. , Grimaud J., Moreau T., Adeleine P. , Aimard J. (1996) . Risk of cancer from azathioprine therapy in multiple sclerosis : a case control study . *Neurology* 46 : 1607 - 1612 .

32 Massacesi L, Parigi A, Barilaro A, Repice AM, Pellicanò G, Konze A, Siracusa G, Taiuti R, Amaducci Efficacy of azathioprine on multiple sclerosis new brain lesions evaluated using magnetic resonance imaging.L.*Arch Neurol.* 2005 Dec;62(12):1843-7.

33 A.Barilaro, A. Repice, A. Parigi, R. Taiuti, G. Pellicanò and L. Massacesi. Direct comparison of Azathioprine and Interferon β 1ab efficacy on prevention of new brain lesions in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* Volume 154 September 2004 (suppl.) pag.215 . International Society of Neuroimmunology 7° International Congress Venice, Italy 28 September- 2 October 2004.

34. McFarland HF, Frank JA, Albert PS, et al. (1992). Using gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging lesions to monitor disease activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 32: 758-766.

35. Harris JO, Frank JA, Patronas N, et al. (1991). Serial gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging scans in patients with early, relapsing-remitting multiple sclerosis: implications for clinical trials and natural history. *Ann Neurol* 29: 548-555.

36. Smith, M.E., Stone L.A., Albert P.S., et al. (1993). Clinical Worsening in Multiple Sclerosis is associated with increased frequency

and area of Gadopentetate Dimeglumine-enhancing magnetic resonance imaging lesions. *Ann. Neurol.* 33: 480-489.

37. Tresley RM, Stone LA, Fields N, Maloni H, McFarland H, Frank JA (1997). Clinical safety of serial monthly administrations of gadopentetate dimeglumine in patients with multiple sclerosis: implications for natural history and early-phase treatment trials. *Neurology* 48(4): 832-835.

38 Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227–231.

39 McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121–127.

40 Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 2005; 58:840–846.

41 Szumlansky C.L., Honchel R. , Scott M.C. , Weinshilboum R.M. (1992). Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics : biochemical properties , liver erythrocyte correlation and presence of isoenzymes . *Pharmacogenetics* 2 : 148 - 159 .

42 . Filippi M, Yousry T, Campi A, Kandziora C, Colombo B, Voltz R, Martinelli V, Spuler S, Bressi S, Scotti G, Comi G (1996). Comparison of triple dose versus standard dose gadolinium-DTPA for detection of MRI enhancing lesions in patients with MS. *Neurology* 46: 379-384.

43. Filippi M, Horsfield MA, Ader HJ, Barkhof F, Bruzzi P, Evans A, Frank JA, Grossman RI, McFarland HF, Molyneux P, Paty DW, Simon J, Tofts PS, Wolinsky JS, Miller DH (1998). Guidelines for using quantitative measures of brain magnetic resonance imaging abnormalities in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol*;43(4):499-506

44. Amato MP, Fratiglioni L, Groppi C, Siracusa GF, Amaducci L. (1988). Interrater reliability in assessing functional systems and disability on the Kurtzke scale in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 45: 746-748.

45. Noseworthy JH, Vandervoort MK, Wong CJ, Ebers GC (1990). The Canadian Cooperative MS Study Group. Interrater variability with the Expanded Disability Status Scales (EDSS) and Functional System (FS) in a multiple sclerosis clinical trial. *Neurology* 40: 971-975.

46. Antonelli G. (1997). In vivo development of antibody to interferons: an update. *J Interferon Cytokine Res* 17 (S 1): S39-S46.

47. Annunziato F, Manetti R, Cosmi L, Galli G, Heusser CH, Romagnani S, Maggi E (1997). Opposite role for interleukin-4 and interferon-gamma on CD30 and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) expression by activated naive T cells. *Eur J Immunol* 27(9): 2239-2244

48. Freedman MS for the OWINS study Group: Dose dependent clinical and magnetic resonance imaging efficacy of interferon beta-1a (Rebif) in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* (1998) 44: 992

49. Lee MA, Smith S, Palace J, Matthews PM. Defining multiple sclerosis disease activity using MRI T2-weighted difference imaging. *Brain.* 1998 Nov;121 (Pt 11):2095-102.

50. Calabresi PA, Wilterdink JL, Rogg JM, Mills P, Webb A, Whartenby KA. An open-label trial of combination therapy with interferon beta-1a and oral methotrexate in MS. *Neurology.* 2002 Jan 22;58(2):314-7

51. Jeffery DR, Chepuri N, Durden D, Burdette. A pilot trial of combination therapy with mitoxantrone and interferon beta-1b using monthly gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging. *J. Mult Scler.* 2005 Jun;11(3):296-301.

52. Fernández O, Guerrero M, Mayorga C, Muñoz L, Leán A, Luque G, Hervás M, Fernández V, Capdevila A, de Ramón E. Combination therapy with interferon beta-1b and azathioprine in secondary progressive multiple sclerosis. A two-year pilot study. *J Neurol.* 2002 Aug;249(8):1058-62.

53. Lus G, Romano F, Scuotto A, Accardo C, Cotrufo R. Azathioprine and interferon beta(1a) in relapsing-remitting multiple sclerosis patients: increasing efficacy of combined treatment. *Eur Neurol.* 2004;51(1):15-20.

54. Pulicken M, Bash CN, Costello K, Said A, Cuffari C, Wilterdink JL, Rogg JM, Mills P, Calabresi PA. Optimization of the safety and efficacy of interferon beta 1b and azathioprine combination therapy in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2005 Apr;11(2):169-74.

55. Markovic-Plese S, Bielekova B, Kadom N, Leist TP, Martin R, Frank JA, McFarland HF. Longitudinal MRI study: the effects of azathioprine in MS patients refractory to interferon beta-1b. *Neurology*. 2003 Jun 10;60(11):1849-51.

56. Sormani MP, Molyneux PD, Barkhof F, et al. MRI enhancing lesion frequency from patients with MS enrolled in the placebo arms of clinical trials or in natural history studies. *Magn Reson Imaging* 1999; 17:1236-7.

57. Sormani MP, Molineaux PD, Gasperini C., et al. Statistical power of MRI monitored trials in multiple sclerosis: new data and comparison with previous results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999; 66: 465-469.

58. Miller D, Grossmann R, Reingold S and McFarland H. The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998; 121: 3-24

59. Arnold DL and Matthews PM. MRI in the diagnosis and management of multiple sclerosis. *Neurology* 2002; 58: S23-S31.

60. Kappos L, Moeri D, Radue EW, et al. Predictive value of magnetic resonance imaging for relapse rate and changes in disability or impairment in multiple sclerosis: a meta-analysis. *Lancet* 1999; 353: 964-969.

TABELLE E FIGURE

ID	Iniziali	età	aa malattia	ricadute 2 aa	sezzo	terapia	EDSS T-6	EDSS V1
2	MMG	25	1	2	F	1	3,5	3,5
3	GS	50	2	4	F	1	3	3,5
6	SM	19	3	3	F	1	1,5	2
7	LT	41	7	2	F	1	1	1
9	VB	30	2	3	F	1	0	0
10	MC	25	2	2	F	1	1	1
13	EB	33	7	6	F	1	1	1
14	MA	44	2	2	F	1	1,5	1,5
15	RB	47	2	3	F	1	1,5	1,5
17	RO	28	5	3	M	1	0	0
18	LR	23	1	3	F	1	0	1,5
19	SB	46	2	2	M	1	0	0
23	AG	47	2	2	F	1	3	3
24	SP	40	1	2	M	1	1,5	1,5
25	MN	29	6		F	1	2	3
32	GDI	17	1	2	M	1	1,5	2
33	RP	48	1	2	F	1	1,5	1,5
34	SC	42	14	9	F	1	1,5	1,5
37	MA	30	13	7	F	1	1,5	1,5
38	DM	48	9	5	M	1	1,5	1,5
39	BU	44	4	4	M	1	2	2,5
40	D'A	27	7	8	M	1	1,5	1,5
mediana		36,5	2	3	7M/15F	1	1,5	1,5

ID	Iniziali	età	aa malattia	ricadute 2 aa	sezzo	terapia	EDSS T-6	EDSS V1
1	CS	21	1	2	F	2	0	2
4	MV	20	1	4	M	2	1,5	2
5	PC	35	1	4	F	2	2	3,5
8	FC	21	4	3	M	2	1,5	1,5
11	LR	31	3	2	M	2	1	1
12	EB	31	4	2	F	2	1	1,5
16	SZ	30	2	2	M	2	2	2,5
20	LR	28	3	2	M	2	1	1
21	MT	39	7	4	F	2	0	0
22	VMP	38	7	2	F	2	1,5	1,5
26	AF	33	2	2	F	2	1,5	1,5
27	GS	43	11	2	F	2	1,5	2,5
28	SR	38	14	2	F	2	2,5	3
29	SI	28	6		F	2	2	2,5
30	GC	36	3	2	M	2	1,5	2
31	MS	42			F	2	2	1,5
35	RO	38	1	3	F	2	1,5	1,5
36	GP	44	3	3	F	2	3,5	3,5
41	AMC	52	18	2	F	2	2,5	2,5
mediana		35	3	2	6M/13F	2	1,5	2

Tabella 1-2 Caratteristiche cliniche dei pazienti.

ID	NOME	COGNOME	TOTALE	ERITEMA	FEBBRE	FEGATO	ROSSI	BIANCHI	TIROIDE	FOTOSENS	GASTRICI	DEPRESS	INFEZION
2	M	MG	3	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
3	G	S	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
6	S	M	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
7	L	T	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
9	V	B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
10	M	C	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
13	E	B	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14	M	A	5	0	1	0	1	1	0	0	0	0	2
15	R	B	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
17	R	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	L	R	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
19	S	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	A	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	S	P	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
25	M	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	GD	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	R	P	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
34	S	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	M	A	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
38	D	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	B	U	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	D'	A	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Somma			24	3	11	0	1	3	2	0	0	1	6
Mediana			0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 3 Eventi avversi registrati nel gruppo I (IFN β 1a 22 mcgr.x3 a settimana).

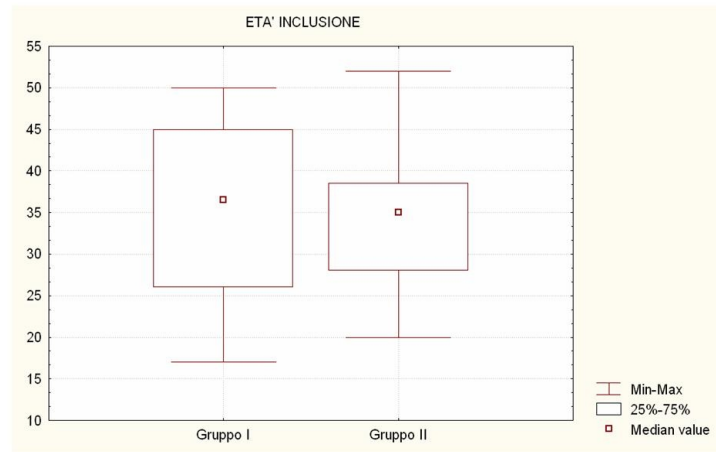
ID	NOME	COGNOME	TOTALE	ERITEMA	FEBBRE	FEGATO	ROSSI	BIANCHI	TIROIDE	FOTOSENS	GASTRICI	DEPRESS	INFEZION
1	C	S	4	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
4	M	V	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	P	C	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
8	F	C	3	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
11	L	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	E	B	6	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1
16	S	Z	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	L	R	3	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
21	T	M	3	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
22	V	MP	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
26	A	F	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
27	G	S	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
28	S	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	S	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	G	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	M	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	R	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	G	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	AM	C	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Somma			28	7	4	1	3	4	1	3	2	0	3
Mediana			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 4 Eventi avversi registrati nel gruppo II (Aza+IFB β 1a 11 mcg x3 a settimana).

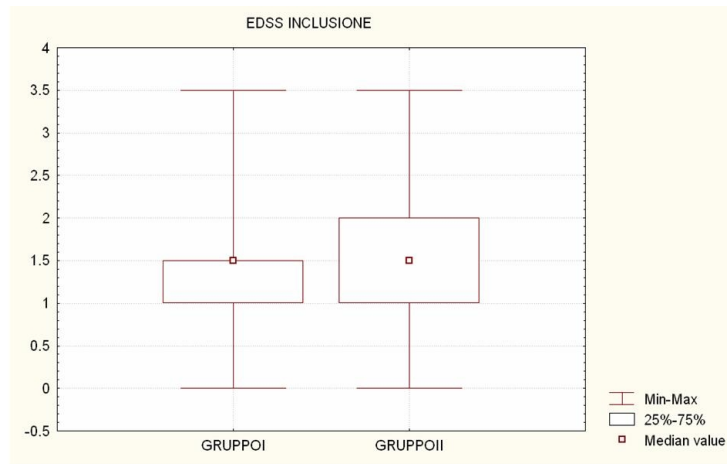
IDpazienti	Nome	Cognome	NABS	Titolo	sezzo	terapia	nT2wpost6/pre	nT2wpost12/pre
2	M	MG	positivo	<100	F	1	0,44	0,33
6	S	M	negativo	0	F	1	0,25	0
7	L	T	negativo	0	F	1	0,13	0,13
9	V	B	positivo	>100	F	1	0,17	1,33
10	M	C	positivo	>100	F	1	0,36	0,64
14	M	A	negativo	0	F	1	0	0
17	R	O	negativo	0	M	1	0,83	0,33
18	L	R	positivo	<100	F	1	0,08	0,08
23	A	G	negativo	0	F	1	0	0,06
24	S	P	positivo	<100	M	1	0	0
25	M	N	negativo	0	F	1	0,07	0
1	C	S	negativo	0	F	2	0	0,16
4	M	V	negativo	0	M	2	0,37	0,05
5	P	C	negativo	0	F	2	0,5	0,5
8	F	C	negativo	0	M	2	0	0
11	L	R	negativo	0	M	2	0	1
12	E	B	negativo	0	F	2	0	0
16	S	Z	negativo	0	M	2	0	0
20	L	R	negativo	0	M	2	0,31	0,38
21	T	M	negativo	0	F	2	2	nd
26	A	F	negativo	0	F	2	0,13	0
28	S	R	positivo	>100	F	2	nd	nd
29	S	I	negativo	0	F	2	0,2	0,2
30	G	C	negativo	0	M	2	0,4	0,4
31	M	S	negativo	0	F	2	0	0

Tabella 5. Incidenza dei Nabs nei due gruppi e confronto con l'attività infiammatori espressa come le nuove lesioni in T2 (nT2w). Le nT2wpost/pre indica il rapporto tra le nuove lesioni del periodo di trattamento diviso per il numero di lesioni registrate prima della terapia nello stesso paziente.

FIGURE



	Valid N	Mean	Confid. -95.000%	Confid. +95.000%	Lower Median	Upper Median	Quartile Range	Std. Dev.
GRUPPO I	22	35.59091	30.86739	40.29443	36.50000	26.00000	45.00000	19.00000
GRUPPO II	19	34.10526	30.02846	38.18206	35.00000	28.00000	38.50000	10.50000



	Valid N	Mean	Confid. -95.000%	Confid. +95.000%	Lower Median	Upper Median	Quartile Range	Std. Dev.
GRUPPO I	22	1.431818	1.014012	1.849624	1.500000	1.000000	1.500000	0.500000
GRUPPO II	19	1.578947	1.183257	1.974638	1.500000	1.000000	2.000000	0.820961

Fig.1-2 Caratteristiche cliniche dei pazienti all'inclusione

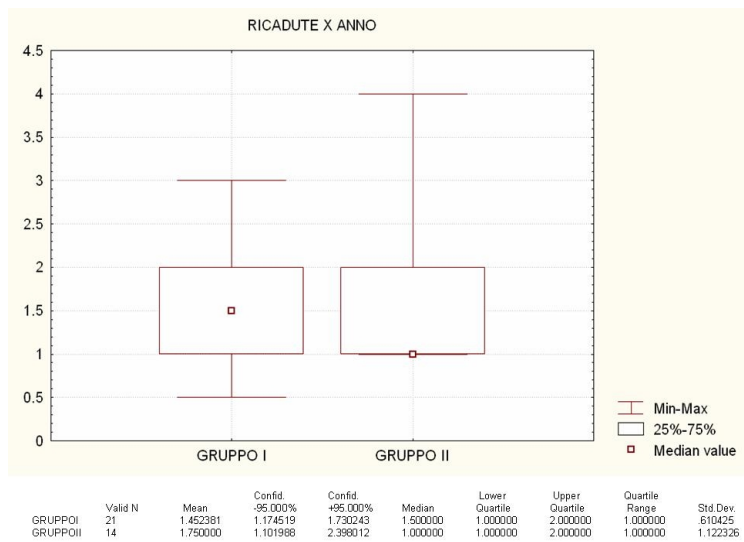
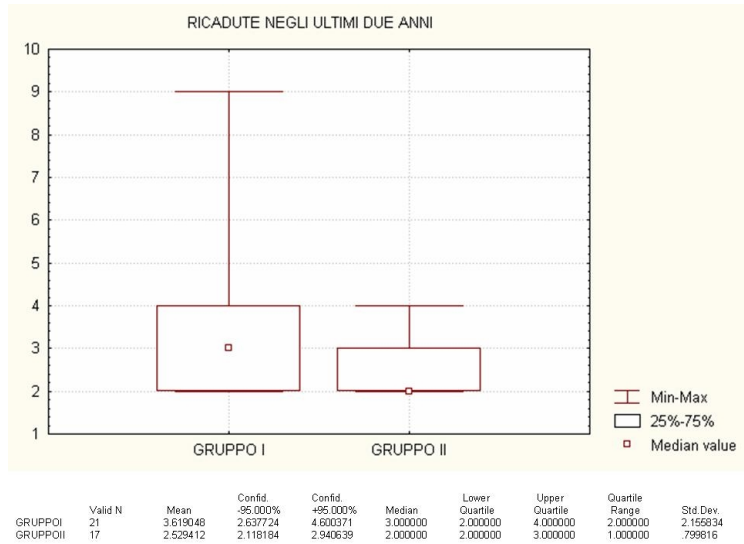
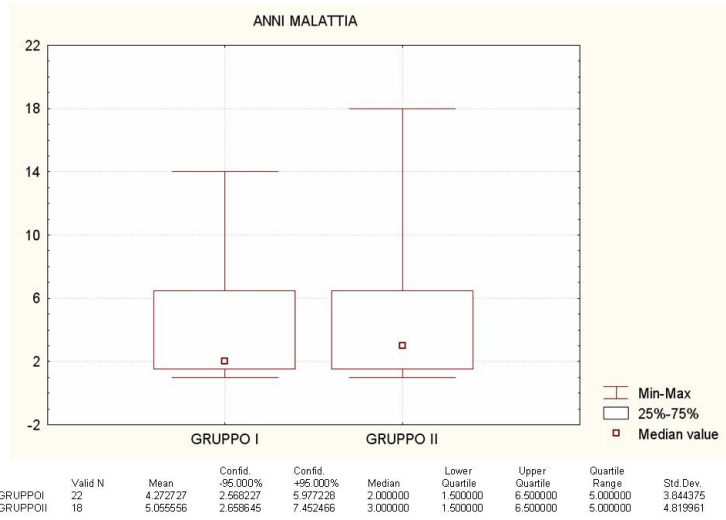


Fig.3-4-5. Caratteristiche cliniche dei pazienti all'inclusione

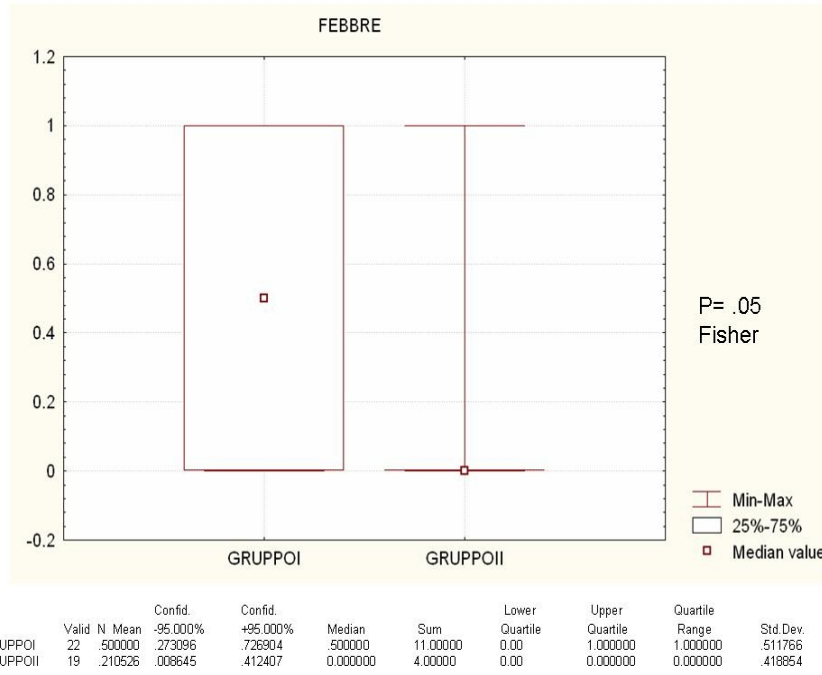
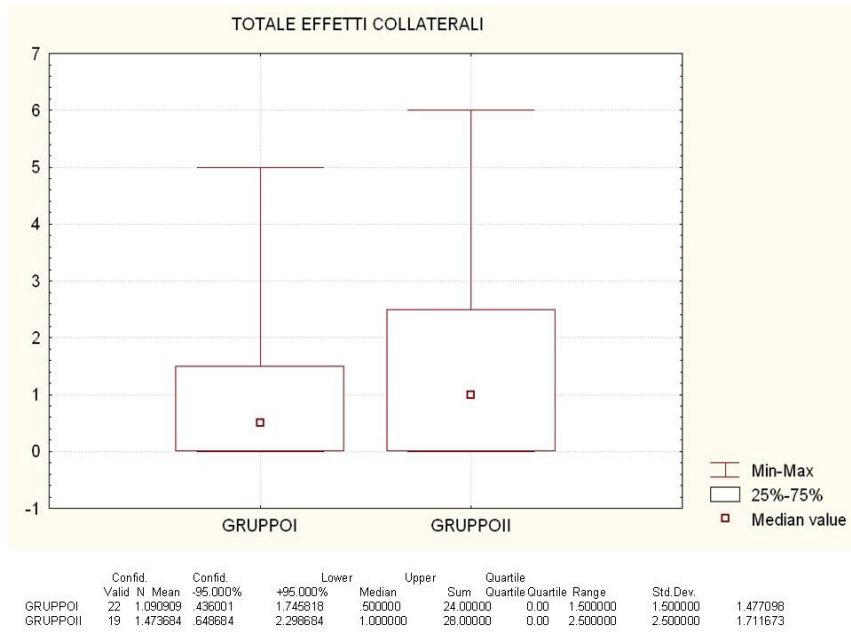
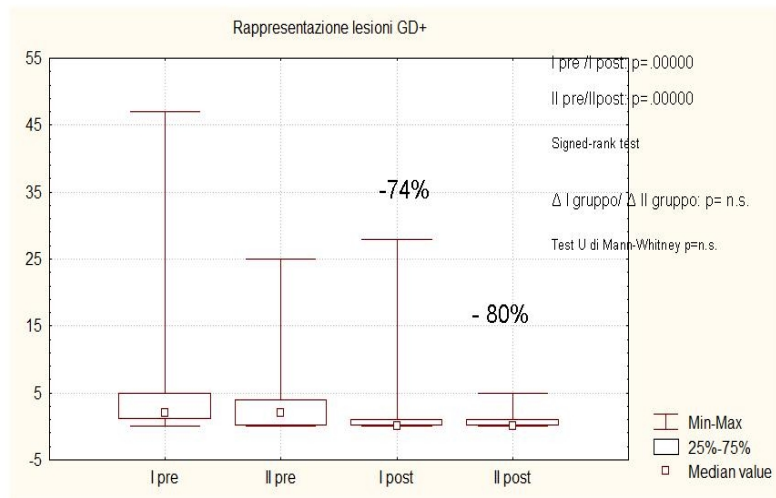
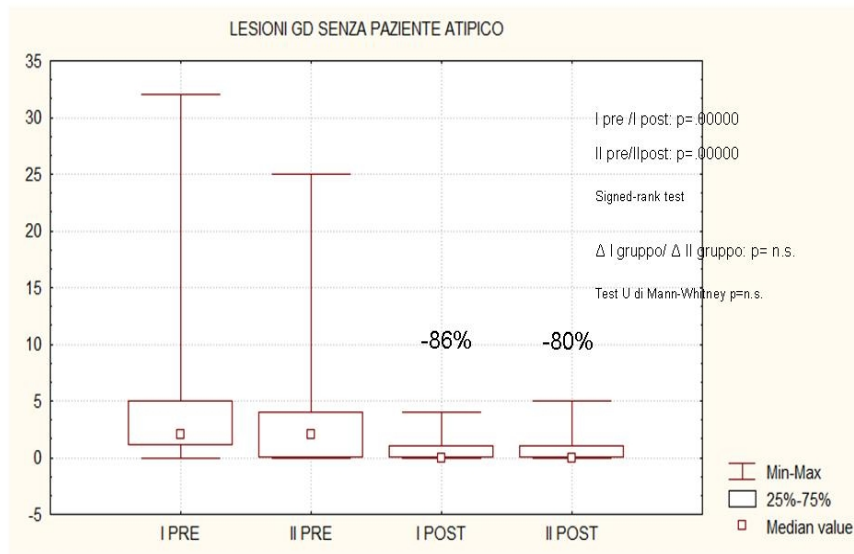


Fig.6-7. Effetti collaterali nei singoli gruppi. Sono rappresentati i valori mediani di tutti gli eventi occorsi e la mediana dell'effetto collaterale "flu-like" (indicato con febbre).



	Valid N	Mean	Confid. -95.000%	Confid. +95.000%	Median	Sum	Quartile Range	Std.Dev.
I PRE	120	5.208333	3.633241	6.783426	2.000000	625.0000	4.000000	8.713841
II PRE	114	3.657895	2.702510	4.613280	2.000000	417.0000	4.000000	5.146810
I POST	120	1.375000	.594251	2.165749	0.000000	165.0000	1.000000	4.319319
II POST	114	.754386	.536981	.971791	0.000000	86.0000	1.000000	1.171652



	Valid	N	Mean	Confid. -95.000%	Confid. +95.000%	Median	Sum	Lower Quartile	Upper Quartile	Quartile Range
I PRE	114	3.526316	2.664710	4.387921	2.000000	402.0000	1.000000	5.000000	4.000000	
II PRE	114	3.657895	2.702510	4.613280	2.000000	417.0000	0.000000	4.000000	4.000000	
I POST	114	5.17544	.349694	6.85394	0.000000	59.0000	0.000000	1.000000	1.000000	
II POST	114	.754386	.536981	.971791	0.000000	86.0000	0.000000	1.000000	1.000000	

Fig.8-9 Rappresentazione delle lesioni Gd+ nel periodo di osservazione (pre) di "frequent MRI" e nei sei mesi dopo l'inizio della terapia (post) nei due gruppi di trattamento.

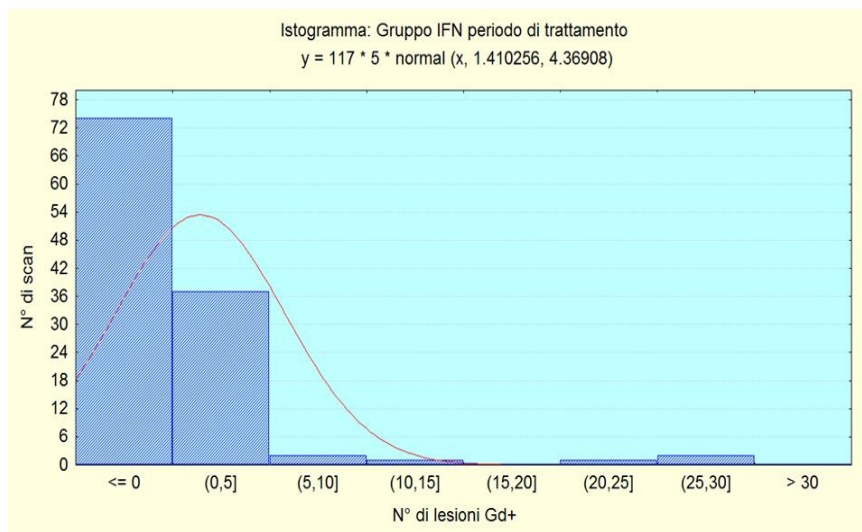
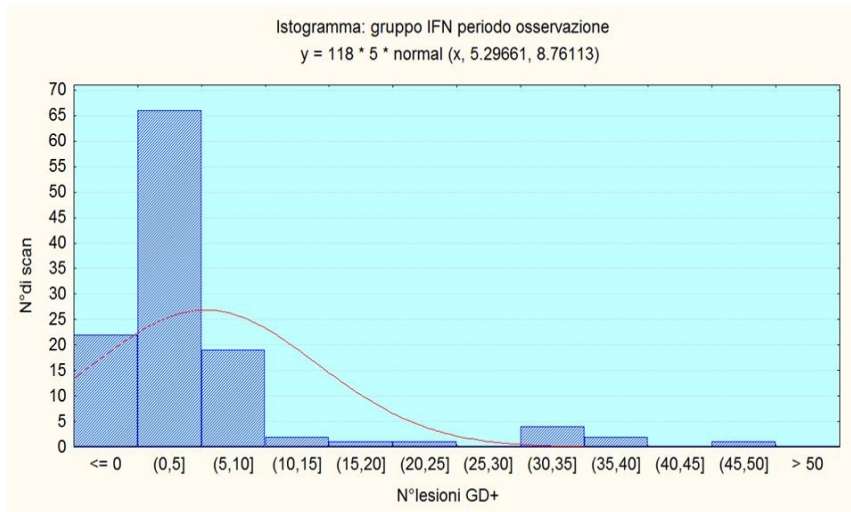


Fig. 10-11 Gruppo I è raffigurato il numero di scan che presentano un numero specifico di lesioni. Con 0 lesioni sono indicati gli scan negativi, che aumentano dopo l'inizio della terapia.(fig,11)

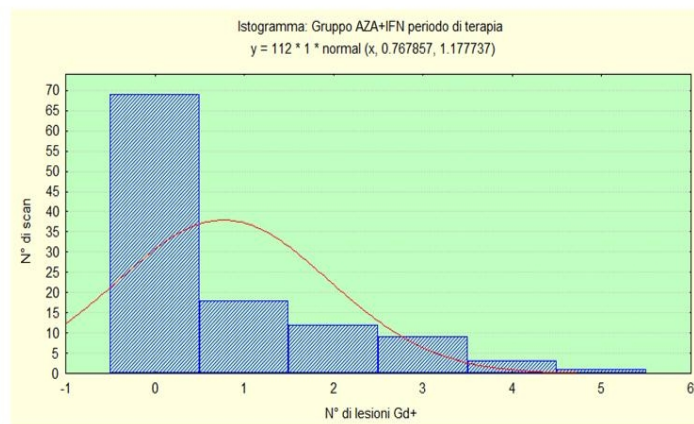
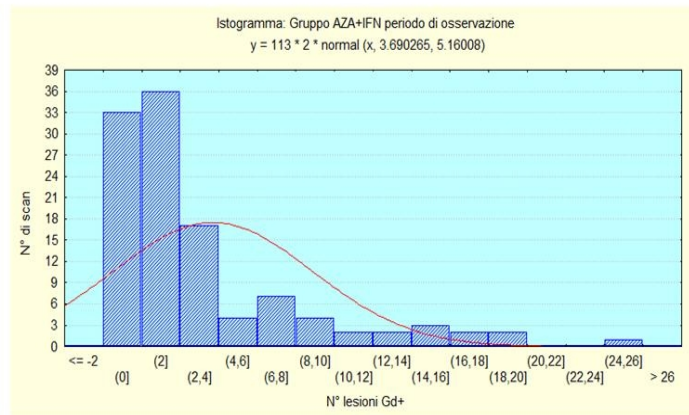


Fig.12-13 Gruppo II. E' raffigurato il numero di scan che presentano un numero specifico di lesioni. Con 0 lesioni sono indicati gli scan negativi, che aumentano dopo l'inizio della terapia (fig.13).

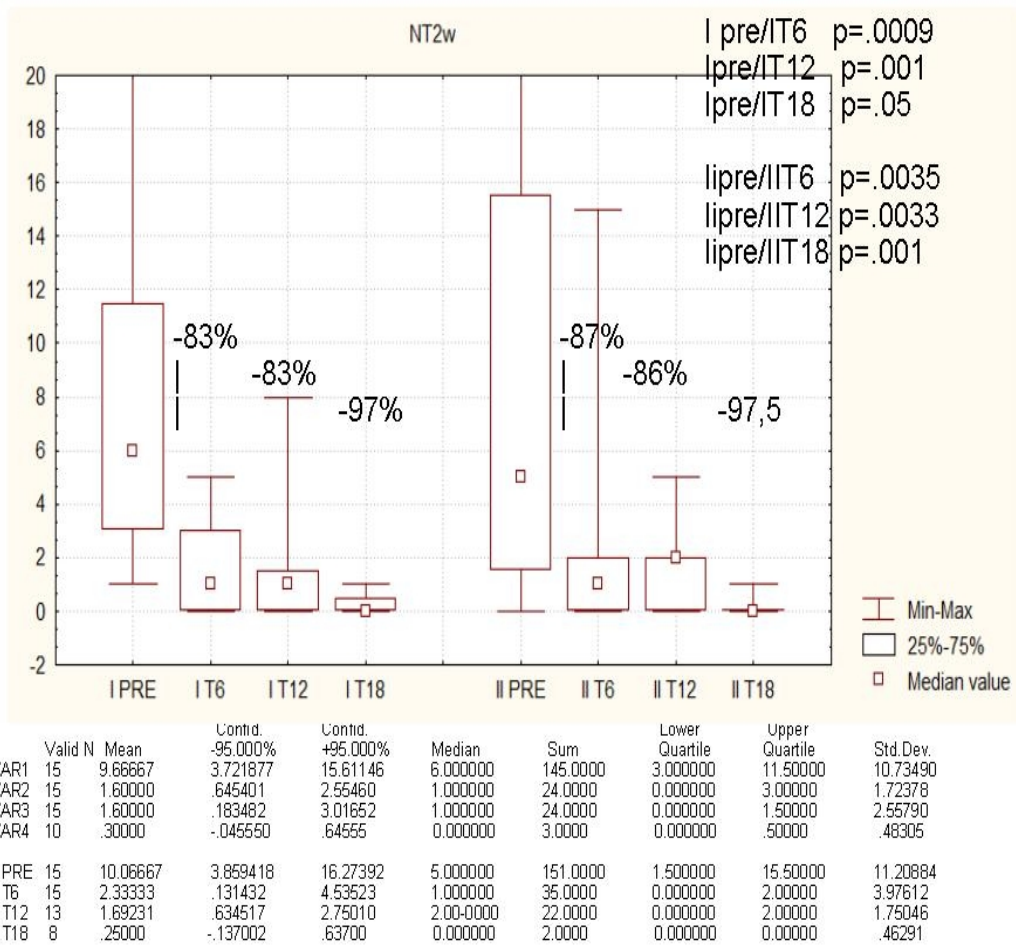


Fig.14 Rappresentazione delle nT2w nei due gruppi nel periodo di osservazione (pre) e dopo l'inizio della terapia (post)

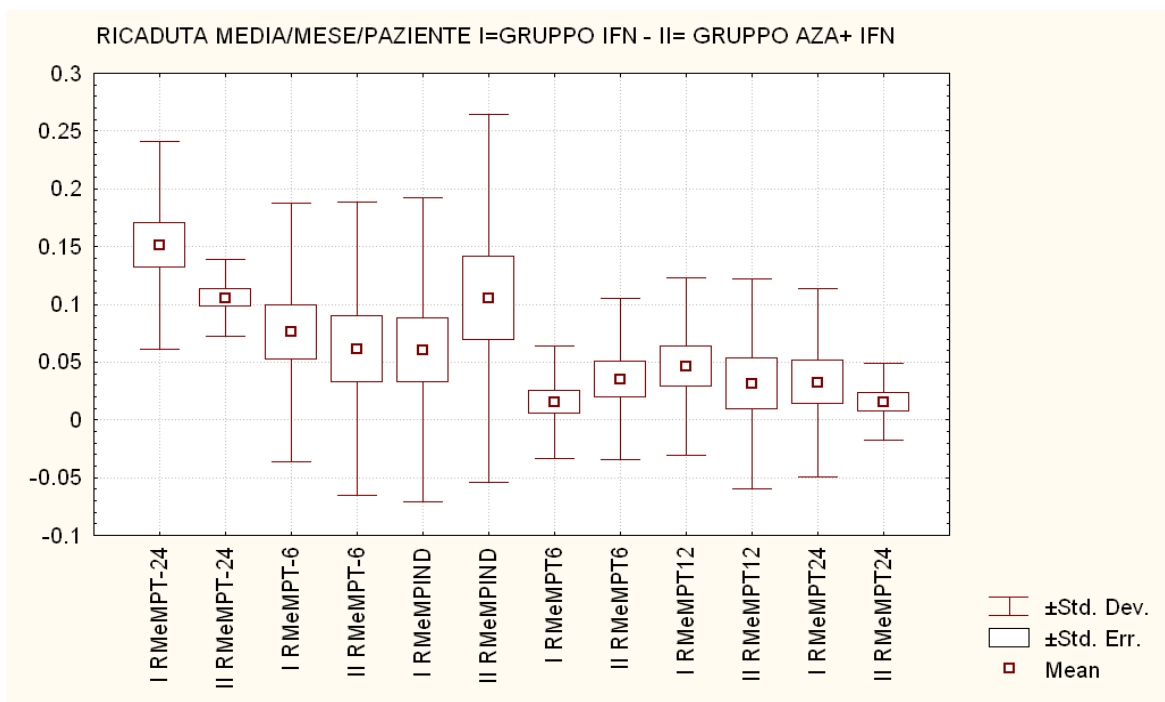
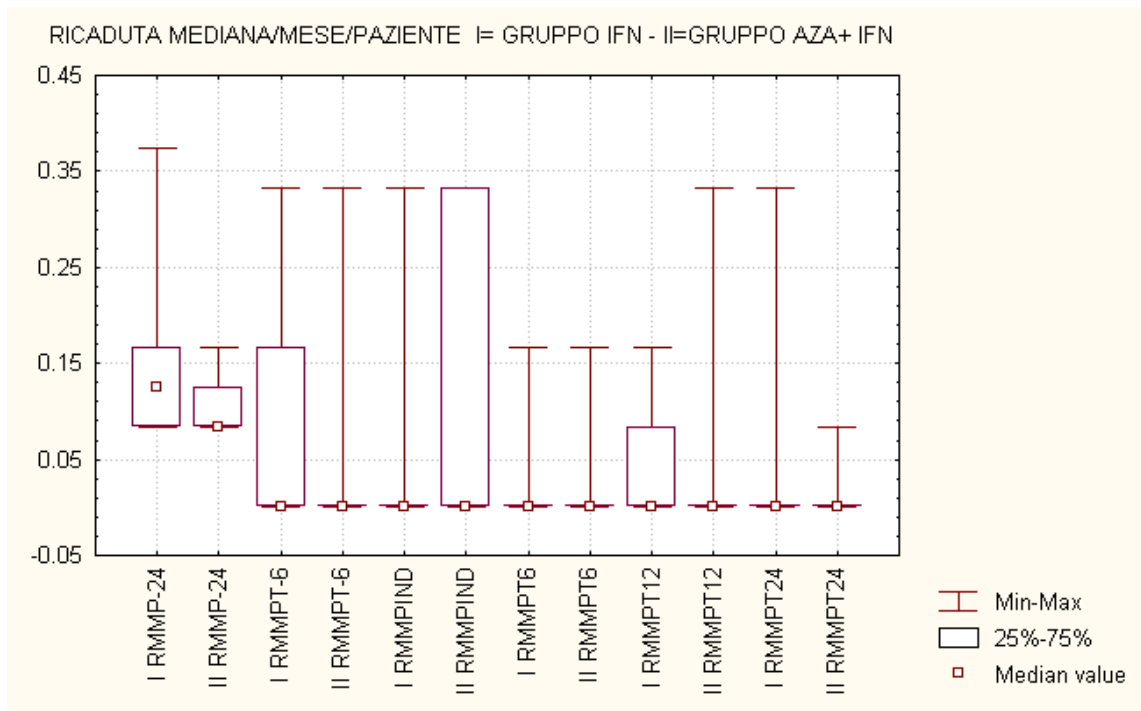


Fig. 15-16 E' indicato il numero delle ricadute mediane e medie /mese/paziente, nel gruppo I e II nei due anni prima dell'inizio dello studio (T-24), nel periodo di osservazione (T-6), nel periodo d'induzione (IND), nei sei mesi dopo l'inizio della terapia (T6) e nel follow-up a 12 e 24/mesi (T12-T24).

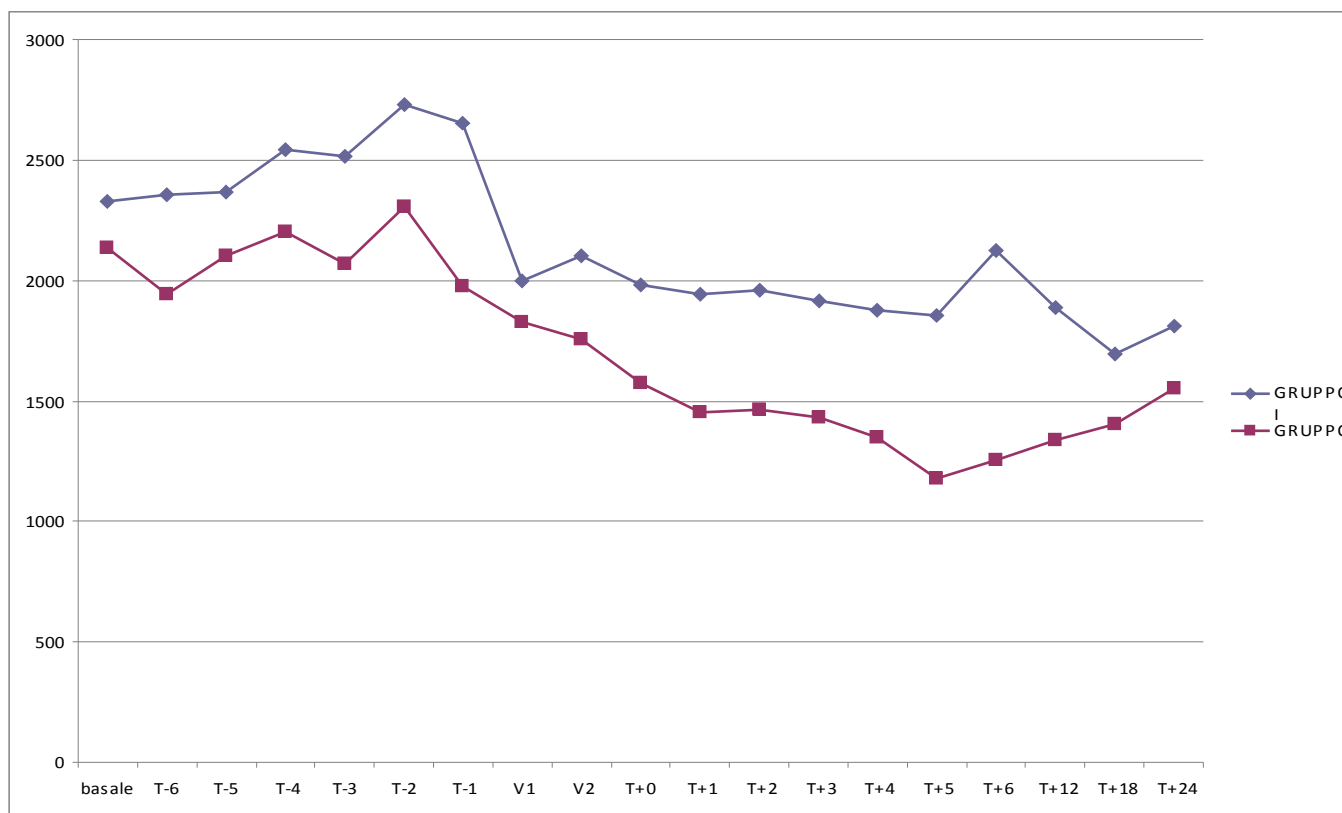


Fig.17 Andamento del numero medio dei linfociti nei due gruppi-

ALLEGATI

ALLEGATO 1: KURTZKE EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE (EDSS)

KURTZKE EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE (EDSS)

- 0.0** = Normal neurological exam (all grade 0 in FS *)
- 1.0** = No disability , minimal signs in one FS * (i.e. grade 1)
- 1.5** = No disability , minimal signs in more than one FS * (more than one FS grade 1)
- 2.0** = Minimal disability in one FS (one FS grade 2 , others 0 or 1)
- 2.5** = Minimal disability in two FS (two FS grade 2 , others 0 or 1)
- 3.0** = Moderate disability in one FS (one FS grade 3, others 0 or 1) or mild disability in three or four FS (three or four FS grade 2, others 0 or 1) though fully ambulatory
- 3.5** = Fully ambulatory but with moderate disability in one FS (one grade 3) and one or two FS grade 2; or two FS grade 3; or five FS grade 2 (others 0 or 1)
- 4.0** = Fully ambulatory without aid , self-sufficient , up and about some 12 hours a day despite relatively severe disability consisting of one FS grade 4 (others 0 or 1), or combinations of lesser grades exceeding limits of previous steps; able to walk without aid or rest some 500m
- 4.5** = Fully ambulatory without aid, up and about much of the day, able to work a full day, may otherwise have some limitation of full activity or require minimal assistance; characterized by relatively severe disability usually consisting of one FS grade 4 (others 0 or 1) or combinations of lesser grades exceeding limits of previous steps; able to walk without aid or rest some 300m.
- 5.0** = Ambulatory without aid or rest for about 200m; disability severe enough to impair full daily activities (e.g. to work a full day without special provisions); (Usual FS equivalents are one grade 5 alone, others 0 or 1; or combinations of lesser grades usually exceeding specifications for step 4.0)
- 5.5** = Ambulatory without aid or rest for about 100m; disability severe enough to preclude full daily activities; (Usual FS equivalents are one grade 5 alone, others 0 or 1; or combination of lesser grades usually exceeding those for step 4.0)
- 6.0** = Intermittent or unilateral constant assistance (cane, crutch , brace) required to walk about 100m with or without resting; (Usual FS equivalent are combinations with more than two FS grades 3+)
- 6.5** = Constant bilateral assistance (canes, crutches, braces) required to walk about 20 without resting ; (Usual FS equivalents are combinations with more than two FS grades 3 +)

- 7.0** = Unable to walk beyond approximately five meters even with aid, essentially restricted to wheelchair; wheels self in standard wheelchair and transfers alone; up and about in wheelchair some 12 hours a day; (Usual FS equivalents are combinations with more than one FS grade 4+ ; very rarely pyramidal grade 5 alone)
- 7.5** = Unable to take more than a few steps; restricted to wheelchair; may need aid in transfer; wheels self but cannot carry on in standard wheelchair a full day; May require motorized wheelchair; (Usual FS equivalents are combinations with more than one FS grade 4 +)
- 8.0** = Essentially restricted to bed or chair or perambulated in wheelchair, but may be out of bed itself much of the day; retains many self-care functions; generally has effective use of arms; (Usual FS equivalents are combinations generally grade 4+ in several systems)
- 8.5** = Essentially restricted to bed much of day has some effective use of arm(s); retains some self-care functions; (Usual FS equivalents are combinations generally 4 + in several systems)
- 9.0** = Helpless bed patient; can communicate and eat; (Usual FS equivalents are combinations, mostly grade 4 +)
- 9.5** = Totally helpless bed patient; unable to communicate effectively or eat/swallow; (Usual FS equivalents are combinations , almost all grade 4 +)
- 10.0** = Death due to MS

* Excludes cerebral function grade 1

LINEE GUIDA PER L'EDSS

NOTA 1:

EDSS steps 1.0 to 4.5 refer to patients who are fully ambulatory , and the precise step number is defined by the Functional Systems (FS) score(s) . EDSS steps 5.0 to 9.5 are defined by the impairment to ambulation and usual equivalents in Functional Systems scores are provided .

NOTA 2 :

EDSS should not change by 1.0 step unless there is a change in the same direction of at least one step in at least one FS . Each step (e.g. 3.0 to 3.5) is still part of the DSS scale equivalent (i.e. 3). Progression from 3.0 to 3.5 should be equivalent to the DSS score of 3.

NOTA 3 :

Category 1 in the functional systems usually implies that the patient is not aware of the deficit and this deficit does not interfere with normal daily activities .

NOTA 4 :

EDSS grades 6.0 and 6.5 contain both a description of assistance required and walking range . In general the descriptions given at these EDSS scores are valid .

However the following exceptions are made :

- If a patient is able to walk considerably longer than 100m with 2 sticks , crutches or braces , he is in category 6.0
- If a patient is able to walk more than 10m and less than 100m with 2 sticks , crutches or braces, he is in grade 6.5
- If he needs assistance by another person and is not able to walk more than 50m with 1 stick , crutch or brace he is in grade 6.5

NOTA 5 :

For calculation of the EDSS grades of the visual function system are introduced as follows : 6 as 4 , 5 and 4 as 3 and 2 as 2 , 1 as 1 .

VALUTAZIONE NEUROLOGICA KURTZKE FUNCTIONAL SYSTEMS (FS)

(Descriptors have been added to the Kurtzke items for additional clarification and are in parentheses .)

1. PYRAMIDAL FUNCTIONS

- 0 = Normal
- 1 = Abnormal signs without disability
- 2 = Minimal disability
- 3 = Mild to moderate paraparesis or hemiparesis (detectable weakness but most function sustained for short periods , fatigue a problem); severe monoparesis (almost no function)
- 4 = Marked paraparesis or hemiparesis (function is difficult), moderate quadriparesis (function is decreased but can be sustained for short periods); or monoplegia
- 5 = Paraplegia , hemiplegia , or marked quadriparesis
- 6 = Quadriplegia
- 9 = Unknown

2. CEREBELLAR FUNCTIONS

- 0 = Normal
 - 1 = Abnormal signs without disability
 - 2 = Mild ataxia (tremor or clumsy movements easily seen , minor interference with function)
 - 3 = Moderate truncal or limb ataxia (tremor or clumsy movements interfere with function in all spheres)
 - 4 = Severe ataxia in all limbs (most function is very difficult)
 - 5 = Unable to perform coordinated movements due to ataxia
 - 9 = Unknown
- Record \neq 1 in small box when weakness (grade 3 or worse on pyramidal) interferes with testing

3. BRAINSTEM FUNCTIONS

- 0 = Normal
- 1 = Signs only
- 2 = Moderate nystagmus or other mild disability
- 3 = Severe nystagmus , marked extraocular weakness , or moderate disability of other cranial nerves
- 4 = Marked dysarthria or other marked disability
- 5 = Inability to swallow or speak
- 9 = Unknown

4. SENSORY FUNCTIONS

0 = Normal

1 = Vibration or figure-writing decrease only in one or two limbs

2 = Mild decrease in touch or pain or position sense , and / or moderate decrease in vibration in one or two limbs ; or vibratory (c/s figure writing) decrease alone in three or four limbs

3 = Moderate decrease in touch or pain or position sense , and/or essentially lost vibration in one or two limbs; or mild decrease in touch or pain and/or moderate decrease in all proprioceptive tests in three or four limbs

4 = Marked decrease in touch or pain or loss of proprioception , alone or combined , in one or two limbs; or moderate decrease in touch or pain and/or severe proprioceptive decrease in more than two limbs

5 = Loss (essentially) of sensation in one or two limbs; or moderate decrease in touch or pain and/or loss of proprioception for most of the body below the head

6 = Sensation essentially lost below the head

9 = Unknown

5. BOWEL AND BLADDER FUNCTIONS

(Rate on the basis of the worse function , either bowel or bladder)

0 = Normal

1 = Mild urinary hesitancy, urgency , or retention

2 = Moderate hesitancy , urgency , retention of bowel or bladder or rare urinary incontinence (intermittent self-catheterization , manual compression to evacuate bladder , or finger evacuation of stool)

3 = Frequent urinary incontinence

4 = In need of almost constant catheterization (and constant use of measures to evacuate stool)

5 = Loss of bladder function

6 = Loss of bowel and bladder function

9 = Unknown

6. VISUAL (OR OPTIC) FUNCTIONS

0 = Normal

1 = Scotoma with visual acuity (corrected) better than 20/30

2 = Worse eye with scotoma with maximal visual acuity (corrected) of 20/30 to 20/59

3 = Worse eye with large scotoma , or moderate decrease in fields , but with maximal visual acuity (corrected) of 20/60 to 20/99

4 = Worse eye with marked decrease of fields and maximal visual acuity (corrected) of 20/100 to 20/200 ; grade 3 plus maximal acuity of better eye of 20/60 or less

5 = Worse eye with maximal visual acuity (corrected) less than 20/200 ; grade 4 plus maximal acuity of better eye of 20/60 or less

6 = Grade 5 plus maximal visual acuity of better eye of 20/60 or less

9 = Unknown

Record \neq 1 in small box for presence of temporal pallor

7. CEREBRAL (OR MENTAL) FUNCTIONS

0 = Normal

1 = Mood alteration only (does not affect DSS score)

2 = Mild decrease in mentation

3 = Moderate decrease in mentation

4 = Marked decrease in mentation (chronic brain syndrome - moderate)

5 = Dementia or chronic brain syndrome - severe or incompetent

9 = Unknown

8. OTHER FUNCTIONS

(Any other neurological findings attributable to MS)

A) Spasticity

0 = None

1 = Mild (detectable only)

2 = Moderate (minor interference with function)

3 = Severe (major interference with function)

9 = Unknown

B) Others

0 = None

1 = Any other neurological findings attributed to MS : Specify _____

9 = Unknown

ALLEGATO 2: Common Toxicity Criteria (CTC)

Severity of adverse experiences and tumor-related symptoms should be graded using the NCI Common Toxicity Criteria as determined by the investigator or reported to him/her by the patient.

For adverse experiences and tumor-related symptoms not included in the common Toxicity Criteria, a grade will be assessed as follows:

Mild = Grade 1
 Moderate = Grade 2
 Severe = Grade 3
 Life Threatening = Grade 4

	GRADES				
	0	1	2	3	4
BLOOD/BONE-MARROW					
Hemorrhage (clinical)	none	mild, no transfusion	gross, 1 – 2 units transfusion per episode	gross, 3 – 4 units transfusion per episode	massive, >4 units transfusion per episode
Infection	none	Mild	moderate	severe	life-threatening
GASTROINTESTINAL					
Nausea	none	able to eat reasonable intake	intake significantly decreased but can eat	no significant intake	-
Vomiting	none	1 episode in 24 hours	2 – 5 episodes in 24 hours	6 – 10 episodes in 24 hours	>10 episodes in 24 hours or requiring parenteral support
Diarrhea	none	increase of 2 – 3 stools/day over pre-Rx	increase of 4- 6 stools/day, or nocturnal stools, or moderate cramping	increase of 7- 9 stools/day, or incontinence, or severe cramping	increase of ≥10 stools/day, or grossly bloody diarrhea, or need for parenteral support
Stomatitis	none	painless ulcers, erythema, or mild soreness	painful erythema, edema, or ulcers, but can eat	painful erythema, edema or ulcers, and cannot eat	requires parenteral or enteral support

NCI COMMON TOXICITY CRITERIA (continued)

	GRADES				
	0	1	2	3	4
LIVER					
Liver (clinical)	no change from baseline	-	-	precoma	hepatic coma
KIDNEY/BLADDER					
Hematuria	neg	micro only	gross, no clots	gross + clots	requires transfusion
ALOPECIA	no loss	mild hair loss	pronounced or total hair loss	-	-
PULMONARY	none or no change	asymptomatic, with abnormal PFT's	dyspnea on significant exertion	dyspnea at normal level of activity	dyspnea at rest
HEART					
Cardiac dysrhythmias	none	asymptomatic transient, requiring no therapy	recurrent or persistent, no therapy required	requires treatment	requires monitoring, or hypotension, or ven-tricular TChycardia, or fibrillation
Cardiac function	none	asymptomatic decline of resting ejection fraction by less than 20% of baseline value	asymptomatic decline of resting ejection fraction by more than 20% of baseline value	mild CHF, responsive to therapy	severe or refractory CHF
Cardiac ischemia	none	non-specific T-wave flattening	asymptomatic ST and T wave changes suggesting ischemia	angina without evidence for infarction	acute myocardial infarction
Cardiac pericardial	none	asymptomatic effusion, no intervention required	pericarditis (rub, chest pain, ECG changes)	Symptomatic effusion, drainage required	tamponade: drainage urgently required

NCI COMMON TOXICITY CRITERIA (continued)

	GRADES				
	0	1	2	3	4
BLOOD PRESSURE					
Hypertension	none or no change	asymptomatic, transient increase by greater than 20 mm Hg (D) or to >150/100 if previously WNL. No treatment required	recurrent or persistent increase by greater than 20 mm Hg (D) or to >150/100 if previously WNL. No treatment required	requires therapy	hypertensive crisis
Hypotension	none or no change	changes requiring no therapy (including transient orthostatic hypotension)	requires fluid replacement or other therapy but not hospitalization	requires therapy and hospitalization; resolves within 48 hours of stopping the agent	requires therapy and hospitalization for >48 hrs after stopping the agent
NEUROTOXICITY					
Neuro-sensory	none or no change	mild paresthesia, loss of deep tendon reflexes	mild or moderate objective sensory loss: moderate paresthesias	severe objective sensory loss or paresthesias that interfere with function	
Neuro-motor	none or no change	subjective weakness: no objective findings	mild objective weakness without significant impairment of function	objective weakness with impairment of function	paralysis
Neuro-cortical	none	mild somnolence or agitation	moderate somnolence or agitation	severe somnolence, agitation, confusion, disorientation or hallucinations	coma, seizures, toxic psychosis
Neuro-cerebellar	none	slight incoordination, dysdiadokinesia	intention tremor, dysmetria, slurred speech, nystagmus	locomotor ataxia	cerebellar necrosis
Neuro-mood	none	mild anxiety or depression	moderate anxiety or depression	severe anxiety or depression	suicidal ideation

NCI COMMON TOXICITY CRITERIA (continued)

	GRADES				
	0	1	2	3	4
Neuro-headache	none	mild	moderate or severe but transient	unrelenting and severe	-
Neuro-constipation	none or no change	mild	moderate	severe	ileus > 96 hours
Neuro-hearing	none or no change	asymptomatic, hearing loss on audiometry only	tinnitus	hearing loss interfering with function but correctable with hearing aid	deafness not correctable
Neuro-vision	none or no change	-	-	symptomatic subtotal loss of vision	blindness
SKIN	none or no change	scattered macular, or papular eruption, or erythema that is asymptomatic	scattered macular, or papular eruption, or erythema with pruritus, or other associated symptoms	generalised symptomatic macular papular or vesicular eruption	exfoliative dermatitis or ulcerating dermatitis
ALLERGY	none	transient rash, drug fever < 38°C, 100.4°F	urticaria, drug fever = 38°C, 100.4°F mild bronchospasm	serum sickness, bronchospasm, requires parenteral meds	anaphylaxis
FEVER IN THE ABSENCE OF INFECTION	none	37.1°- 38.0°C 98.7° - 100.4°F	38.1° - 40.0°C 100.5°-104.0°F	>40.0°C >104.0°F for less than 4 hours	>40.0°C >104.0°F for more than 24 hours or fever accompanied by hypotension
LOCAL	none	pain	pain and swelling, with inflammation, or phlebitis	ulceration	plastic surgery indicated
WEIGHT GAIN/LOSS	<5.0%	5.0 – 9.9%	10.0 – 19.9%	>20.0%	-

NCI COMMON TOXICITY CRITERIA (continued)

		GRADES				
	UNITS	0	1	2	3	4
BLOOD/BONE-MARROW						
WBC	9 10 /L	≥ 4.0	3.0 – 3.9	2.0 – 2.9	1.0 – 1.9	<1.0
PLT	9 10 /L	WNL	75.0 - normal	50.0 – 74.9	25.0 – 49.9	< 25.0
Hb	g/dL	WNL	10.0 - normal	8.0 – 9.9	6.5 – 7.9	< 6.5
Granulocytes / Bands	9 10 /L	≥ 2.0	1.5 – 1.9	1.0 – 1.4	0.5 – 0.9	< 0.5
Lymphocytes	9 10 /L	≥ 2.0	1.5 – 1.9	1.0 – 1.4	0.5 – 0.9	< 0.5
LIVER						
Bilirubin		WNL	-	< 1.5 x N	1.5 – 3.0 x N	> 3.0 x N
Transaminases (SGOT, SGPT)		WNL	≤ 2.5 x N	2.6 – 5.0 x N	5.1 – 20.0 x N	> 20.0 x N
Alkaline phosphatase or 5'Nucleotidase		WNL	≤ 2.5 x N	2.6 – 5.0 x N	5.1 – 20.0 x N	> 20.0 x N
KIDNEY/BLADDER						
Creatinine		WNL	< 1.5 x N	1.5 – 3.0 x N	3.1 – 6.0 x N	> 6.0 x N
Proteinuria		no change	1 + or < 0.3 g% or < 3g/L	2 – 3+ or 0.3–1.0g% or 3 – 10 g/L	4+ or > 1.0 g% or > 10 g/L	nephrotic syndrome
METABOLIC						
Hyperglycemia	mg/dL	< 116	116 -160	161 – 250	251 - 500	> 500 or ketoacidosis
Hypoglycemia	mg/dL	> 64	55 - 64	40 – 54	30 - 39	< 30
Amylase		WNL	< 1.5 x N	1.5 – 2.0 x N	2.1 – 5.0 x N	> 5.1 x N
Hypercalcemia	mg/dL	< 10.6	10.6 – 11.5	11.6 – 12.5	12.6 – 13.5	≥ 13.5
Hypocalcemia	mg/dL	> 8.4	8.4 – 7.8	7.7 – 7.0	6.9 – 6.1	≤ 6.0
Hypomagnesemia	mEq/L	> 1.4	1.4 – 1.2	1.1 – 0.9	0.8 – 0.6	≥ 0.5
COAGULATION						
Fibrinogen		WNL	0.99–0.75 xM	0.74–0.50 xM	0.49–0.25 x M	≤ 0.24 x M
Prothrombin time		WNL	1.01-1.25 x N	1.26 – 1.50x N	1.51 – 2.00 x N	> 2.00 x N
Partial thromboplastin time		WNL	1.01– 1.65 x N	1.66 – 2.33x N	2.34 – 3.00 x N	> 3.00 x N

N = upper limit of normal value

WNL = within normal limits

M = lower limit of normal value

ALLEGATO 3: schema dello studio (flow-chart).

Mese Visita	Osservazione							Trattamento								
	0 1*	1 2	2 3	3 4	4 5	5 6	6 7	1 8	2 9	3 10	4 11	5 12	6 13	7 14	8 15	9 16
RM	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x	x	x	x	x
Controlli Previsti			❶				❶		❶			❶			❶	
							❷		❷			❷			❷	

Fig. 1: I pazienti inclusi saranno seguiti con esami RM mensili per sei mesi senza terapia (periodo di osservazione) e successivamente dopo la randomizzazione per otto mesi con terapia (periodo di trattamento) di cui i primi due ("induzione") senza esami RM e gli ultimi sei con esami RM eseguiti mensilmente. La durata totale dello studio, per ciascun paziente, sarà pertanto di 15 mesi.

CONTROLLI PREVISTI / VISITA

* DATI DEMOGRAFICI ; PARAMETRI VITALI ; ANAMNESI MEDICA , GINECOLOGICA , CHIRURGICA ; E.O. GENERALE; VISITA NEUROLOGICA (EDSS); ECG; GLICEMIA , AZOTEMIA , AST , ALT , BIL.TOT., FOSFATASI ALCALINA, γ GT, CREATININA; EMOCROMO CON FORMULA; ES. URINE STANDARD CON SEDIMENTO; FT3 , FT4, TSH; Ab: ANTI-TIREOGLOBULINA, ANTI-NUCLEO,ANTI-MICROSOMI, ANTI-CARDIOLIPINA; HBsAg , HCV RNA , HIV; GRAVITEST .

❶ E.O. GENERALE; PARAMETRI VITALI;VISITA NEUROLOGICA (EDSS);GLICEMIA, AZOTEMIA, AST, ALT, BIL.TOT., FOSFATASI ALCALINA, γ GT, CREATININA;EMOCROMO CON FORMULA;ES. URINE STANDARD CON SEDIMENTO .

❷ VALUTAZIONE IMMUNOLOGICA IN 10 PAZIENTI TRATTATI (5 DEL GRUPPO 2 E 5 DEL GRUPPO 3 - VEDERE SEZIONE 9.2.4 PAG 16)

❸ FT3,FT4,TSH; Ab: ANTI-TIREOGLOBULINA,ANTI-NUCLEO,ANTI-MICROSOMI,ANTI-CARDIOLIPINA (al completamento dell'8° mese di terapia o in ogni momento qualora si osservasse una sintomatologia clinica suggestiva) .

SEMPRE : MONITORAGGIO/REGISTRAZIONE RICADUTE CLINICHE , EFFETTI COLLATERALI ,