

Università degli Studi di Firenze

Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali

Scuola di Dottorato di Ricerca in Oncologia Sperimentale e Clinica

XXIII Ciclo

(MED/04)

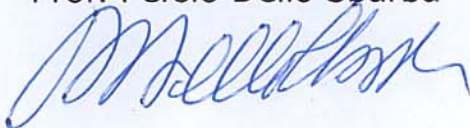
Tesi di Dottorato di Ricerca

NUOVI TARGET TERAPEUTICI NELLE
MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE
CRONICHE PHILADELPHIA-NEGATIVE

Candidato: Dr.ssa Elisabetta Antonioli

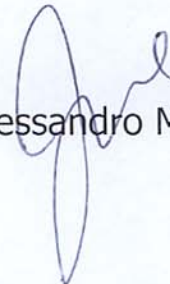


Coordinatore del Dottorato:
Prof. Persio Dello Sbarba



Tutor:

Prof. Alessandro M Vannucchi



30 Dicembre 2010

INDICE

• LE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE	3
• LA TERAPIA PER LE MPN	10
• SCOPO DELLA TESI	17
• MATERIALI E METODI	19
• LA TERAPIA CON GLI INIBITORI DI JAK2	30
• LA TERAPIA CON GLI INIBITORI DI mTOR	44
• LA TERAPIA CON GLI INIBITORI DELLE ISTON DEACETILASI	68
• LA TERAPIA CON APLIDINA	78
• CONCLUSIONI	86
• BIBLIOGRAFIA	90

CAPITOLO 1

LE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE

Le neoplasie mieloproliferative croniche (MPN) rappresentano un gruppo di disordini ematologici che originano dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale pluripotente, e sono caratterizzati dalla proliferazione clonale di uno o più progenitori emopoietici nel midollo osseo e in sedi extramidollari.

Nel 1951 W. Demeshek raggruppò sotto il termine di malattie mieloproliferative croniche quattro disordini tra loro correlati fisiopatologicamente e clinicamente: la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (ET), la mielofibrosi cronica idiopatica (PMF) e la leucemia mieloide cronica (CML)¹. L'identificazione del trascritto bcr-abl e la presenza di caratteristiche cliniche peculiari hanno successivamente indotto a considerare quest'ultima come un'entità nosologica a parte. Infatti, è una neoplasia caratterizzata da un'alterazione citogenetica e molecolare specifica: t(9;22) (q34; q11) - Cromosoma Philadelphia - e il prodotto di fusione chimerico BCR-ABL codifica per una fosfoproteina anomala di 210 kD (p210) ad attività tirosinchinasica.

In seguito nel 2001 la World Health Organization (WHO) ha incluso sotto il termine di malattie mieloproliferative croniche Ph-negative (MPDc) anche entità meno frequenti come la leucemia neutrofilica cronica (CNL), la sindrome ipereosinofila (HES), la leucemia eosinofila cronica (CEL) e la mastocitosi sistemica (SMCD)². La Tabella I riporta invece l'attuale classificazione WHO 2008 per queste patologie (Tabella I)³.

Tabella I. La classificazione WHO 2008 per le neoplasie mieloproliferative

Neoplasie mieloproliferative

- Leucemia mieloide cronica (CML)
- Policitemia vera (PV)
- Trombocitemia essenziale (ET)
- Mielofibrosi primitiva (PMF)
- Leucemia neutrofilica cronica (CNL)
- Leucemia eosinofila cronica (CEL), non altrimenti classificata
- Sindromi ipereosinofile (HES)
- Mastocitosi (MCD)
- MPN, inclassificabili (MPN-u)

Le MPN sono malattie ad appannaggio soprattutto dell'età media e avanzata, con tassi d'incidenza compresi tra 3.5 e 12.6 nuovi casi per 100.000 abitanti l'anno. Peraltro, l'incidenza sembra in rapida evoluzione, da un lato a causa del progressivo aumentare dell'età, dall'altro in virtù dell'affinamento delle tecniche diagnostiche. La PV e la ET sono malattie con un decorso relativamente indolente con una modesta riduzione della sopravvivenza, la PMF invece è caratterizzata da un decorso molto più aggressivo con una sopravvivenza mediana di circa 5 anni, sebbene alcuni pazienti superino poi i 10. Da un punto di vista clinico le principali manifestazioni di PV e ET sono rappresentate dalle complicanze trombotiche, arteriose e venose, che ancora oggi rimangono la principale causa di morbidità e di mortalità in questi pazienti, e dalle manifestazioni emorragiche; più rare l'evoluzione in forme di mielofibrosi post-PV e post-ET e la trasformazione in leucemia acuta. Nei pazienti con mielofibrosi le cause di mortalità sono rappresentate principalmente da insufficienza midollare, eventi vascolari, infezioni ed evoluzione in leucemia.

La diagnosi differenziale tra le MPN risultava spesso difficile a causa della mancanza di alterazioni citogenetiche specifiche e della frequente sovrapposizione dei quadri clinici tra MPN, sindromi mielodisplastiche/mieloproliferative (ad es. la leucemia mieloide cronica atipica e la leucemia mielomonocitica cronica) e forme cosiddette reattive. L'analisi citogenetica dimostra la presenza di anomalie cromosomiche in meno del 30% dei casi e nessuno dei difetti riscontrati ricorre abbastanza frequentemente da poter essere considerato specifico per una di queste patologie. Caratteristico è il coinvolgimento dei cromosomi 8, 9 e 20; la perdita dell'eterozigosi del braccio corto del cromosoma 9 è stata riportata come l'anomalia citogenetica più frequente nella PV⁴. Le alterazioni cromosomiche alla diagnosi non hanno un ruolo nella prognosi, mentre sono indice di evoluzione se compaiono in corso di malattia.

Da un punto di vista biologico, gli elementi che accomunano queste patologie sono il coinvolgimento di un progenitore emopoietico multipotente, la predominanza del clone neoplastico sui progenitori ematopoietici non trasformati, l'eccessiva proliferazione di una o più linee cellulari emopoietiche in assenza di uno stimolo noto, la crescita in vitro di colonie indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita (EPO, IL-3, SCF, GM-CSF, IGF-1), l'emopoiesi extramidollare, che raggiunge il suo massimo nella mielofibrosi idiopatica, alterazioni sempre più profonde dei processi non solo maturativi ma anche di quelli inerenti la differenziazione cellulare, col risultato finale di un incremento progressivo della componente cellulare blastica fino alla possibile configurazione di un quadro midollare e periferico sovrapponibile a quello della leucemia acuta⁵.

La patogenesi molecolare di questi disordini è stata ulteriormente definita nel 2005 con la scoperta della prima alterazione genetica ricorrente, che consiste in una mutazione puntiforme G>T alla posizione 1849 nell'esone 14 del gene *JAK2*, caratterizzata dalla sostituzione di una valina con una fenilalanina nel codone 617 (V617F) cui consegue un'attivazione costitutiva del recettore con una conseguente anormale risposta alle citochine⁶. Infatti, le cellule trasdotte con il gene mutato acquisiscono indipendenza dai fattori di crescita e mostrano una risposta abnorme a concentrazioni fisiologiche della citochina specifica. Studi *in vitro* hanno evidenziato come, in seguito all'attivazione costitutiva del recettore dovuta alla mutazione, i progenitori eritroidi acquisiscano la capacità di crescita e maturazione indipendentemente dall'eritropoietina e da fattori di crescita come IL-3⁷⁻⁹.

La mutazione *JAK2*V617F è riscontrata nella quasi totalità dei pazienti affetti da PV^{7,9-14} mentre è descritta nel 50-70% dei pazienti con TE¹⁵ o con PMF¹⁶.

Circa il 25-30% dei pazienti affetti da PV o da PMF, e soltanto il 2-4% dei pazienti affetti da TE, presenta la mutazione V617F di *JAK2* in uno stato di omozigosi, secondaria a un meccanismo di ricombinazione mitotica a livello del cromosoma 9p con duplicazione dell'allele mutato, e non a una delezione allelica. Kralovics riporta un'associazione significativa tra la presenza di omozigosi e una più lunga durata di malattia nelle diverse forme di MPN; l'osservazione è stata confermata da altri studi⁶ sollevando la possibilità che lo stato omozigosi possa essere un evento evolutivo che sopraggiunge nel tempo. Quindi è stato studiato l'impatto dello stato di omozigosi sul fenotipo clinico di pazienti con PV e ET in un ampio studio retrospettivo multicentrico eseguito su 962 pazienti, dove, a prescindere dalla diagnosi, i pazienti con uno stato di omozigosi risultavano più anziani, con valori più elevati di leucociti e piastrine alla diagnosi e maggiore volume splenico, con un maggior rischio di evolvere in forme di mielofibrosi secondaria¹⁷. In pazienti con PV è stato visto come la quota di carica allelica correli direttamente con i valori di leucociti, ematocrito, LDH e ALP, e i livelli di espressione di PRV-1 ed inversamente con MCV e la conta piastrinica. Inoltre pazienti con livelli elevati di quota allelica (*JAK2*V617F >75%) presentavano un quadro clinico fortemente sintomatico, caratterizzati più frequentemente da splenomegalia, prurito, eventi trombotici e necessità di effettuare terapia citoriduttiva oltre ai salassi per controllare la malattia¹⁰. Lo stesso tipo di valutazione eseguita su 260 pazienti affetti da TE confermava che i pazienti *JAK2*^{V617F} positivi presentavano livelli elevati di ematocrito e leucociti e ridotti livelli di piastrine¹⁸. Inoltre numerosi studi, supportati poi da metanalisi, hanno documentato l'associazione tra la presenza della mutazione di *JAK2* e un aumentato rischio di trombosi arteriosa e venosa in pazienti con ET (HR 1.8-2) rispetto ai WT¹⁹ soprattutto se la mutazione è presente in forma omozigote. Al contrario nei pazienti con PMF la mutazione di *JAK2* è associata a livelli aumentati di Hb, mentre lo stato di omozigosi ad una aumentata conta leucocitaria, ad un

maggior volume splenico, e maggior necessità di terapia citoriduttiva oltre ad un maggior rischio di evoluzione in leucemia acuta.

In seguito, nel 2007, sono state caratterizzate le mutazioni a carico del gene *MPL*, codificante per il recettore della trombopoietina, rappresentate principalmente dalla sostituzione nucleotidica *W>L/K/A* al codone 515 del cromosoma 1. Sono mutazioni riscontrate in circa il 5% dei casi di PMF e nell'1% di ET, talvolta presenti in pazienti *JAK2V617F* positivi^{20,21}, mai descritte invece nei pazienti con PV. I pazienti con ET mutati per *MPL* presentano ridotti livelli di emoglobina (allele *W515L*) e elevata conta piastrinica (allele *W515K*), presentano più frequentemente disturbi del microcircolo, ma non un aumentato rischio trombotico, e alla biopsia osteomidollare una ridotta cellularità con un numero significativamente elevato di megacariociti, micromegacariociti e di cluster megacariocitari²². I pazienti con PMF *MPL* positivi presentano anemia più severa ma non caratteristiche cliniche peculiari²³.

Sempre nel 2007 in pazienti affetti da policitemia vera risultati *JAK2V617F* negativi (circa il 3%) sono state descritte le mutazioni, inserzioni o delezioni a carico dell'esone 12 del gene *JAK2*. Anche in questo caso le diverse mutazioni riscontrate portano ad una attivazione costitutiva del recettore conferendo una crescita indipendente da EPO sia in vitro che in vivo, ed in modelli murini portando un fenotipo mieloproliferativo caratterizzato da una eritrocitosi molto pronunciata. I pazienti con questi tipo di mutazioni presentano caratteristiche cliniche intermedie tra la policitemia vera e la eritrocitosi idiopatiche. Sono mutazioni quasi sempre presenti in forma eterozigote e la più frequente è la *JAK2 N542-E543del*. Sono più frequenti nelle femmine, presentano un'importante eritrocitosi, spesso associata ad elevati livelli di piastrine e a bassi livelli di EPO, la biopsia ossea mostra una moderata ipercellularità risultato dell'iperplasia eritroide e una lieve atipia dei MK, presentano sempre EEC positive^{24,25}.

Evidenze sperimentali hanno messo in luce il frequente coinvolgimento, in quadri mieloproliferativi atipici, di altri geni di fusione ad attività tirosinchinasica che, come *BCR-ABL*, sono implicati in vie di traduzione del segnale aberranti. Tra questi quelli che interessano, con partner diversi, i geni *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* e *JAK2* in rari casi di leucemia mieloide cronica atipica (aCML), leucemia mielomonocitica cronica (CMML) e sindromi mieloproliferative associate ad eosinofilia; e il gene *KIT* nelle forme di mastocitosi sistemica. Anomalie delle vie di trasmissione del segnale sono certamente implicate nell'ipersensibilità delle cellule mieloidi a fattori di crescita e citochine, nell'incremento dell'espressione del fattore antiapoptotico *Bcl-XL* e nella attivazione di *STAT3* o *STAT5*, elementi a valle della via di segnalazione tirosin chinasica, osservazioni tutte associate da tempo a patologie mieloproliferative incluse le MPN. Inoltre la possibilità che altri geni, oltre a quelli appena descritti, siano coinvolti nella patogenesi delle MPN è sostenuta non solo dal fatto che circa il 40% dei pazienti con ET e PMF non presenti un marcatore molecolare noto, ma anche dalla mancata correlazione fra il carico

dell'allele V617F e la quantificazione dell'ematopoiesi clonale attraverso l'analisi del pattern di inattivazione del cromosoma X (X-CIP) o la quota di cellule che presentano uno specifico difetto cromosomico, come del20q-. Durante la ricerca di ulteriori alterazioni molecolari, l'utilizzo dell'analisi ad alta risoluzione di SNP ha permesso di identificare una regione a livello del cromosoma 4 (4q24) dove mappa il gene TET2. La precisa funzione di TET2 non è nota, anche se potrebbe avere un ruolo di oncosoppressore, può essere presente sia in pazienti JAK2 positivi che negativi; si ritiene che queste alterazioni potrebbero anticipare l'acquisizione della mutazione di JAK2V617F, in alcuni, ma non tutti, i casi²⁶. Le mutazioni di TET2 sono state identificate solo nel 10-15% dei pazienti con MPN²⁷ e non sono state associate ad alcun fenotipo clinico, e sono comunque presenti anche in altre patologie come nelle sindromi mielodisplastiche e nella CMML²⁸⁻³². Mutazioni ancora meno frequenti, ma comunque descritte, sono quelle a carico dei geni *ASXL1*, *IDH1/IDH2*, *CBL*, *EZH2*, *LNK*³³, e *IKZF1*³⁴. Le mutazioni del gene *ASXL1* (20q11.1) sono riportate in circa 8% dei pazienti con MPN, mentre sono molto più frequenti nei casi di leucemia acuta mieloide secondaria; possono essere associate o meno alla mutazione di JAK2V617F³⁵. Le mutazioni dei geni *IDH1* e *IDH2* (2q33.3 e 15q26.1 rispettivamente) frequenti soprattutto nella fase blastica delle MPN, sono presenti anche in associazione alle mutazioni di JAK2, TET2 e MPL, e si ritiene siano coinvolte nell'attività enzimatica di conversione da alfa-chetoglutarato in 2-idrossiglutarato³⁶. Le mutazioni del gene *CBL* (11q23) descritte principalmente in pazienti affetti da CMML recentemente sono state identificate anche in casi di PMF (6%)³⁷⁻⁴⁰. Le mutazioni a carico del gene *EZH2* sono state descritte in casi di disordini mieloidi e rappresentano il 12% nelle forme di MDS/MPN e il 13% nei casi di mielofibrosi⁴¹.

L'identificazione di queste mutazioni coinvolte nella patogenesi delle malattie, oltre a permettere un nuovo approccio classificativo delle MPN (Tabella I)³, ha messo in discussione l'opportunità di una revisione dei criteri diagnostici fino ad oggi utilizzati, basati sul PVSG e/o sulla classificazione WHO. Per tale motivo recentemente sono stati proposti i nuovi criteri WHO 2008 (Tabella II)⁴².

Tabella II: World Health Organization, 2008, criteri diagnostici per policitemia vera (PV), trombocitemia essenziale (ET) e mielofibrosi primitiva (PMF).

2008 WHO Diagnostic Criteria						
		PV*		ET*		PMF*
Major criteria	1	Hgb > 18.5 g/dL (men) > 16.5 g/dL (women) <u>or</u> Hgb > 17 g/dL (men), or > 15 g/dL (women) if associated with a sustained increase of ≥ 2 g/dL from baseline that can not be attributed to correction of iron deficiency <u>or**</u>	1	Platelet count $\geq 450 \times 10^9/L$	1	Megakaryocyte proliferation and atypia*** accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis, <u>or</u> In the absence of reticulin fibrosis, the megakaryocyte changes must be accompanied by increased marrow cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis (i.e. pre- fibrotic PMF)
	2	Presence of <i>JAK2V617F</i> or similar mutation	2	Megakaryocyte proliferation with large and mature morphology. No or little granulocyte or erythroid proliferation	2	Not meeting WHO criteria for CML, PV, MDS, or other myeloid neoplasm
			3	Not meeting WHO criteria for CML, PV, PMF, MDS or other myeloid neoplasm	3	Demonstration of <i>JAK2V617F</i> or other clonal marker <u>or</u> no evidence of reactive marrow fibrosis
			4	Demonstration of <i>JAK2V617F</i> or other clonal marker <u>or</u> no evidence of reactive thrombocytosis		
Minor criteria	1	BM trilineage myeloproliferation			1	Leukoerythroblastosis
	2	Subnormal serum Epo level			2	Increased serum LDH
	3	EEC growth			3	Anemia
					4	Palpable splenomegaly

*Diagnosis of PV requires meeting either both major criteria and one minor criterion or the first major criterion and 2 minor criteria.

*Diagnosis of ET requires meeting all 4 major criteria

*Diagnosis of PMF requires meeting all 3 major criteria and two minor criteria.

Le più significative modificazioni apportate si basano sulla ricerca delle anomalie molecolari a carico di *JAK2* e *MPL* come elemento chiave della diagnosi, pur non essendo specifiche delle singole entità cliniche. Nel caso della PV, si è ritenuto che la presenza contemporanea della mutazione V617F, o di altre anomalie molecolari clonali quali le mutazioni dell'esone 12, e di un evidente incremento della massa eritrocitaria, associato ad uno dei criteri minori, permetta di diagnosticare la pressoché totalità dei casi di malattia. Possibili eccezione sono i rari pazienti con bassi livelli di alleli mutati tale da risultare falsamente negativi, o, ipoteticamente, con altre mutazioni non note; in tal caso, è richiesta la contemporanea presenza di due criteri minori associati alla evidenza di incremento della massa eritrocitaria. La situazione è più complessa nel caso di TE e PMF, dato che quasi la metà dei pazienti risulta negativa alla ricerca della mutazione V617F, e ancor più rari sono quelli con mutazioni di *MPL*. In queste condizioni è considerata necessaria la valutazione istopatologica, che mostrerà le caratteristiche alterazioni morfologiche e di distribuzione topografica (cluster serrati) dei megacariociti nella mielofibrosi, associate (forma tipica fibrotica) o meno (forma pre-fibrotica) alla fibrosi reticolinica o collagenica, rispetto ai grandi megacariociti maturi, generalmente dispersi o raggruppati in piccoli cluster lassi, tipici della TE, non associati a proliferazione mieloide. La diagnosi richiede anche che siano soddisfatti ulteriori criteri clinici e laboratoristici (Tabella II).

CAPITOLO 2

LA TERAPIA PER LE MPN

Attualmente l'unica terapia potenzialmente in grado di curare un paziente affetto da MPN è il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, il cui utilizzo è limitato ai casi selezionati di mielofibrosi per l'elevata mortalità e morbilità della procedura. Quindi gli obiettivi principali della terapia nei pazienti affetti da PV o ET sono ridurre l'incidenza o la ricorrenza di eventi trombotici o emorragici, ridurre il rischio di evoluzione in mielofibrosi o in leucemia acuta, controllare i sintomi sistemici, trattare e gestire le complicanze. Nel caso invece di pazienti affetti da mielofibrosi l'obiettivo principale è prolungare la sopravvivenza e migliorare la qualità di vita^{44,45}.

DEFINIZIONE DEI PAZIENTI AD ALTO RISCHIO

Per i soggetti affetti da PV o ET il sistema di classificazione del rischio è quindi basato sull'identificazione di quei pazienti ad alto rischio per complicanze vascolari. Numerosi studi prospettici e retrospettivi hanno identificato l'età maggiore di 60 anni ed un precedente evento trombotico come i principali fattori di rischio vascolare. Non è mai stata dimostrata una chiara associazione tra il rischio trombotico e il numero di piastrine, invece una situazione di trombocitosi estrema (>1.500/mm³) può essere associato ad un maggior rischio di sanguinamento per lo svilupparsi di una forma Von Willebrand acquisito. Inoltre non è mai stata dimostrata un'associazione tra il valore dell'ematocrito e il rischio trombotico, mentre recentemente la leucocitosi o la presenza della mutazione di *JAK2*^{V617F} sono risultate essere associate a questo tipo di complicanze⁴⁶. Rimane ancora dibattuto, nonostante le recenti evidenze, il ruolo di altri fattori di rischio cardiovascolari noti e di condizioni di trombofilia ereditaria e acquisita (Tabella III)⁴⁷.

Tabella III. Stratificazione dei pazienti con PV o ET in accordo con il rischio trombotico

Categoria di rischio	Età >60 o Precedente evento trombotico	Generici fattori di Rischio Cardiovascolare
Bassa	NO	NO
Intermedia	NO	SI
Alta	SI	Irrilevante

Nei pazienti affetti da PMF il rischio viene valutato con l'International Prognostic Score System (IPSS)⁴⁸ che utilizza variabili definite al momento della diagnosi (età, valore di emoglobina e leucociti, sintomi costituzionali e blastosi periferica) e le stesse variabili possono essere utilizzate per stratificare i pazienti durante la malattia (IPSS dinamico) (Tabella IV). Recenti studi hanno anche dimostrato che il fabbisogno trasfusionale nel primo anno dalla diagnosi o la presenza di specifiche alterazioni citogenetiche come +8, +9, 13q-, 20q- identificano pazienti con una ridotta aspettativa di vita, così come la bassa carica allelica di JAK2 V617F e gli aumentati livelli di alcune citochine (IL8, IL-2R, IL15)^{49,50}. Non è ancora stato definito invece come stratificare i pazienti con forma di mielofibrosi secondaria, tuttavia l'età avanzata, la leucocitosi, la piastrinopenia e l'anemia sono state associate a una ridotta sopravvivenza.

Tabella IV. Stratificazione dei pazienti con PMF in accordo con IPSS (IWG-MRT score)

Categoria di rischio	No. di fattori di rischio	Sopravvivenza mediana in mesi (95%CI)
Basso	0	135 (117-181)
Intermedio-I	1	95 (79-114)
Intermedio-II	2	48 (43-59)
Alto	≥3	27 (23-31)

Fattori di rischio: Età >65 anni; presenza di sintomi sistemici; emoglobina <10 g/dL; leucociti >25x10⁹/L; blastosi periferica ≥1%.

TRATTAMENTO DEI PAZIENTI CON PV

La terapia di scelta nei pazienti con PV a basso rischio è rappresentata dai salassi (Tabella V), il cui obiettivo è di mantenere livelli di ematocrito che attualmente sono stati stabiliti a 45% per l'uomo e 42% per la donna; questo a lungo termine induce una condizione ferrocarenziale che si traduce con un calo dell'eritropoiesi. Questo target è stato stabilito in seguito ad un trial clinico randomizzato, il "Polycythemia Vera Study Group (PVSG) 01 trial", che confrontava salassoterapia e terapia citoriduttiva con radiofosforo o clorambucil⁵¹. Il numero e la frequenza dei salassi sono variabili per ogni paziente; tuttavia i sintomi legati alla severa carenza di ferro, in particolare l'astenia, o la poca compliance del paziente spesso si traducono in livelli di ematocrito non sempre ben controllati; nello studio europeo ECLAP (European Collaboration on low-dose Aspirin in Polycythemia Vera)^{52,53} solo il 48% di 1638 pazienti con PV arruolati

riusciva a mantenere l'ematocrito in range. Inoltre un'analisi multivariata tempo-dipendente in questo stesso studio non riusciva a dimostrare una correlazione tra gli eventi trombotici e il valore dell'ematocrito. Attualmente è attivo tra i centri ematologici italiani per il gruppo GIMEMA un trial clinico multicentrico randomizzato "CytoPV study" (registrato EudraCT 2007-006694-91) che ha lo scopo di valutare prospetticamente l'appropriatezza di due diversi range predefiniti di ematocrito rispetto al rischio trombotico: un braccio Hct>45% e un secondo braccio HCT compreso tra 45-50%.

Nei pazienti ad alto rischio invece l'indicazione è di iniziare una terapia citoriduttiva, il farmaco di scelta è l'idrossiurea, principalmente per la sua efficacia nel ridurre l'incidenza degli eventi cardiovascolari e per la mancanza dell'evidenza di un potenziale leucemogeno (Tabella V). Questi dati derivano dallo studio PVSG, in cui 51 pazienti con PV seguiti per 8.6 anni trattati con HU hanno presentato, rispetto al gruppo di controllo storico di pazienti trattati con solo salassi, una riduzione significativa dell'evento morte e trasformazione in mielofibrosi; il tasso di evoluzione in leucemia era leggermente aumentato rispetto ai controlli, ma comunque in maniera non significativa (9.8% vs 3.7%)⁵⁴. La sicurezza dell'idrossiurea riguardo la possibile trasformazione leucemica è stata supportata anche dai risultati dello studio ECLAP, dove il rischio di evoluzione valutato mediante hazard ratio è risultato essere di 0.86 nel gruppo HU rispetto al gruppo di controllo dei salassi⁵⁵. Il rischio di evoluzione leucemica aumenta invece in caso di esposizione del paziente ad altri farmaci citotossici come busulfano o al radiofosforo.

Le basse dosi di aspirina (80-100 mg/die) sono raccomandate in tutti i pazienti con PV, indipendentemente dal rischio (Tabella V), non ci sono evidenze che ciò porti ad un aumentato rischio emorragico; eventualmente nel caso di intolleranza gastrica può essere associata una terapia con inibitori di pompa protonica. Queste indicazioni sono supportate dai risultati della studio ECLAP, dove 518 pazienti con PV sono stati arruolati e randomizzati a doppio cieco tra l'uso di aspirina a basse dosi quotidiano vs placebo. Dopo un follow-up medio di 2.8 anni l'incidenza di eventi cardiovascolari è stato significativamente inferiore per i pazienti trattati con ASA (rischio relativo 0.40; 95%CI, 0.18-0.91; P=0.02); la mortalità da evento trombotico è stata ridotta al 46% dal 59%, mentre non aumentava il rischio di un sanguinamento maggiore indotto dall'ASA (rischio relativo, 1.62; 95%CI, 0.27-9.71; P=0.60).

Particolare considerazione deve essere applicata ad alcune categorie di pazienti: 1) pazienti giovani (< 40 anni) considerati ad alto rischio per pregresso evento trombotico; 2) pazienti a basso rischio ma che necessitano di terapia citoriduttiva per controllare la splenomegalia, la leucocitosi o la trombocitosi; 3) pazienti con alterazioni citogenetiche che dovrebbero evitare l'esposizione a farmaci citotossici; 4) pazienti considerati resistenti o intolleranti all'idrossiurea. In questi casi l'interferone-alfa (IFN- α) potrebbe essere una alternativa ragionevole. Sebbene questo farmaco sia stato usato a lungo nei pazienti con PV per il suo effetto di inibizione della

proliferazione dei progenitori emopoietici e della crescita dei fibroblasti midollari, non sono presenti studi randomizzati. L'IFN sembra avere un'azione preferenziale nei confronti del clone neoplastico, come dimostrato dalle remissioni documentate in alcuni pazienti con la conversione da emopoiesi clonale a emopoiesi policlonale. Alcuni studi dimostrano anche la riduzione delle EEC^{56,57} e la normalizzazione dell'espressione del gene PRV-1⁵⁸. Una rivalutazione su 279 pazienti riporta nel 50% dei casi il controllo dell'ematocrito senza salassi e nel 77% il controllo della splenomegalia; IFN- α sembra avere un ruolo anche nel controllo del prurito acquagenico. I risultati di trattamenti a lungo termine (mediana 13 anni) indicano che la quasi totalità dei pazienti ottiene un buon controllo dell'ematocrito e della conta piastrinica, in nessun caso è stata descritta una complicanza trombotica-emorragica⁵⁹. Interessanti sono anche i dati riportanti recentemente dallo studio francese multicentrico sull'uso di IFN- α -2a peghilato in 40 pazienti con PV. Il 95% dei pazienti ha raggiunto la risposta ematologica completa, con un follow-up mediano di 31 mesi, senza eventi tromboembolici. Inoltre, circa il 90% dei pazienti ha mostrato una progressiva riduzione della percentuale della carica allelica di JAK2 nei granulociti e in 7 su 29 pazienti è stata ottenuta la remissione molecolare⁶⁰. Questo rappresenta il primo caso di terapia in grado di eradicare il clone mutato JAK2, risultato altrimenti solo riportato in pazienti affetti da PMF con terapia convenzionale seguita da trapianto allogenico di cellule staminali⁶¹. Inoltre, l'utilizzo della forma peghilata di IFN- α sembra essere associata a un minor numero di effetti collaterali che si traduce in una maggior compliance da parte del paziente.

Infine, in tutti i pazienti con PV, indipendentemente dal rischio, dovrebbero essere valutati gli altri fattori di rischio cardiovascolare e dove possibile corretti, in particolare il fumo.

Tabella V. Trattamento per pazienti con PV e ET

Categorie di rischio	PV	ET
Bassa	<ul style="list-style-type: none"> • Salassi 	<ul style="list-style-type: none"> • Niente o Aspirina a basse dosi
Intermedia	<ul style="list-style-type: none"> • Aspirina a basse dosi 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspirina a basse dosi
Alta	<ul style="list-style-type: none"> • Citoriduzione \pm Salassi • Aspirina a basse dosi 	<ul style="list-style-type: none"> • Citoriduzione • Aspirina a basse dosi

TRATTAMENTO DEI PAZIENTI CON ET

I pazienti a basso rischio con forme di ET asintomatiche non necessitano di terapia. In questa categoria di pazienti non c'è nemmeno evidenza sull'uso profilattico dell'aspirina a basse dosi mentre è assolutamente raccomandata nei pazienti a rischio intermedio (Tabella V).

L'aspirina deve inoltre essere utilizzata in presenza di disturbi microvascolari e a dosi elevate (fino a 500 mg /die) per il controllo del dolore nella fase acuta di eritromelalgia, nell'emicrania o in presenza di altri sintomi neurologici. Sebbene non esistano studi prospettici controllati sull'efficacia e la sicurezza dell'ASA nella ET, l'esperienza ottenuta per i pazienti affetti da PV dopo lo studio ECLAP suggerisce comunque l'appropriatezza delle basse dosi di ASA nella maggior parte dei pazienti a rischio intermedio - basso. La piastrinosi estrema è invece considerata una controindicazione all'ASA per l'elevato rischio di sanguinamento dovuta alla malattia di vonWillebrand acquisito, anche se non esistono prove formali⁶²⁻⁶⁵.

I pazienti ad alto rischio sono invece candidati a terapia mielosoppressiva, l'idrossiurea è il farmaco di scelta (Tabella V), come dimostrato dai risultati di due studi randomizzati. 114 pazienti con ET ad alto rischio sono stati randomizzati tra HU e nessun trattamento, il farmaco si è dimostrato efficace nel ridurre la percentuale di pazienti che hanno sviluppato uno o più eventi trombotici dal 24% al 3.6%⁶⁶. L'idrossiurea si è anche dimostrata superiore all'anagrelide nello studio randomizzato PT-1, che ha arruolato 809 pazienti ad alto rischio; le trombosi arteriose, le emorragie e la trasformazione in mielofibrosi erano significativamente aumentate nel braccio dell'anagrelide, non le trombosi venose, mentre il tasso di trasformazioni leucemiche era uguale nei due bracci⁶⁷. Il range terapeutico nel quale dovrebbero essere mantenute la conta piastrinica nei pazienti ad alto rischio con terapia citoriduttrice non è mai stato definito, tuttavia è stato posto a 400-450.000 per mmc⁶⁸.

In pazienti con età inferiore a 40 anni, l'uso di IFN- α dovrebbe essere preso in considerazione per evitare di utilizzare terapia citotossica; come nella PV, non ci sono studi randomizzati che confrontano IFN- α con altre terapie convenzionali. In una revisione della letteratura che comprende 11 studi internazionali e 212 pazienti con ET, il tasso di risposta è di circa 85%; comunque effetti collaterali tali da interrompere il farmaco vengono riportati in circa il 25% dei pazienti e ad una riduzione del dosaggio in un altro 20%. Tuttavia l'uso dell' IFN- α peghilato potrebbe migliorarne la tolleranza e anche in questo caso sono riportati possibili effetti sulla carica allelica di JAK2V617F⁶⁹⁻⁷¹.

I pazienti che non tollerano l'idrossiurea per gli effetti collaterali dovrebbero spostarsi verso altri agenti chemioterapici, l'anagrelide in questo caso è il farmaco di scelta. E' un farmaco in grado di ridurre il numero delle piastrine inibendo la maturazione dei megacariociti e riducendone la ploidia⁷², senza effetti leucemogeni^{73,74}. Anagrelide dovrebbe essere quindi

utilizzato in pazienti intolleranti all'idrossiurea o il cui valore piastrinico nonostante la dose di oncarbide non raggiunge i livelli target; dovrebbe inoltre essere presa in considerazione l'efficacia dell'associazione tra HU e anagrelide.

TRATTAMENTO DEI PAZIENTI CON PMF

La gestione del paziente affetto da mielofibrosi si modifica sulla base del rischio: i pazienti a basso rischio vengono normalmente non trattati⁷⁵, per gli altri tipi di pazienti la scelta della terapia deve essere ben contestualizzata. Attualmente l'unico trattamento in grado di curare la PMF è il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. Lo studio principale in questo tipo di pazienti è quello presentato dal Center for International Bone Marrow Transplant Research su 289 casi, con vari tipi di donatore e vari regimi di condizionamento, in cui a 5 anni la sopravvivenza libera da malattia è del 33% e la mortalità legata al trattamento è del 35%⁷⁶; l'outcome non migliora nel caso di regimi ad intensità ridotta (RIC). Uno studio EBMT su 103 pazienti trattati con RIC aveva una percentuale di cGVhD del 49% e un tasso di ricaduta del 29%⁷⁷. Il rischio di questa procedura può quindi essere giustificato solo in pazienti giovani con un'aspettativa di vita inferiore ai 5 anni.

In tutti gli altri casi la terapia della mielofibrosi viene impostata sul controllo dei sintomi.

Anemia: frequentemente trattata con androgeni, prednisone o danazolo⁷⁸. Non viene raccomandato l'uso di eritropoietina perché spesso peggiora la splenomegalia e si è dimostrata inefficace in casi di trasfusione-dipendenza⁷⁹.

Splenomegalia: il farmaco di scelta è l'idrossiurea, in grado inoltre di controllare la trombocitosi o la leucocitosi. La riduzione della milza è riportata in circa il 40% dei casi. Nelle forme refrattarie all'idrossiurea possono essere utilizzati altri farmaci citotossici come la cladribina e busulfano, IFN è poco tollerato e poco efficace; la radioterapia sulla milza non porta alcun beneficio. La splenectomia è indicata nei casi di refrattarietà alla terapia con idrossiurea, di ipertensione portale sintomatica e di frequenti trasfusioni di emazie, la mortalità perioperatoria è intorno al 5-10%, l'incidenza di complicanze post-operatorie è di circa il 50%⁸⁰.

Recentemente per il trattamento della mielofibrosi è stata introdotta la talidomide e i suoi analoghi, che si sono dimostrati efficaci in monoterapia o in associazione a prednisone sull'anemia⁸¹. La lenalidomide ottiene un miglioramento dell'anemia e della splenomegalia nel 20-30% dei casi, tuttavia è gravata da un'importante mielotossicità⁸². Un altro studio ha indicato come la combinazione tra lenalidomide e prednisone sia meglio tollerata, le risposte più durature con una significativa riduzione anche della carica allelica di JAK2⁸³. La miglior

risposta, intesa anche come durata è quella che si vede nei pazienti con mielofibrosi con una alterazione cromosomica, la delezione del braccio lungo del cromosoma 5, in questo tipo di pazienti la lenalidomide dovrebbe rappresentare la terapia di prima linea⁸⁴. Un terzo analogo della talidomide, la pomalidomide, ha iniziato ad essere utilizzato in uno studio multicentrico randomizzato in doppio cieco. Il farmaco si è dimostrato efficace sull'anemia nel 36% dei casi, con una minima tossicità ematologica e extraematologica; non sono stati documentati cambiamenti sulla mutazione di JAK2 V617F⁸⁵.

CAPITOLO 3

SCOPO DELLA TESI

L'identificazione di queste alterazioni molecolari sicuramente si è dimostrata utile per lo studio della patogenesi delle MPN, ma ha inoltre permesso di focalizzare l'attenzione su meccanismi di chinasi mutate, suggerendo come le tirosin-chinasi possano rappresentare un valido bersaglio terapeutico; mimando l'efficacia di imatinib e dei nuovi inibitori di seconda generazione nella LMC.

Non deve quindi sorprendere che in meno di 3 anni dalla prima descrizione della mutazione di *JAK2V617F* molti gruppi abbiano iniziato a sviluppare e testare piccole molecole attive nei confronti della mutazione, alcune di queste attualmente in fase di sperimentazione. Queste molecole possono essere divise sulla base della loro azione in selettive su JAK2 (per esempio TG101209⁸⁶, TG101348^{87,88}, INCB018424⁸⁹, XL019⁹⁰) o "non selettive per JAK2". Attualmente non è ancora disponibile un inibitore specifico per la forma mutata di JAK2, i farmaci disponibili generalmente inibiscono anche la molecola wild-type. Il fatto che la mutazione sia localizzata nel dominio pseudochinasico piuttosto che in quello attivo catalitico comporta una vera difficoltà per il disegno di un inibitore selettivo specifico. Inoltre nessuna delle molecole descritte è un inibitore di JAK2 "puro", ma agiscono inibendo anche l'attività di JAK1. Tuttavia si ritiene che l'inibizione della cascata citochinica controllata da JAK1 contribuisca comunque significativamente ai benefici clinici ottenuti dagli inibitori di JAK1 e JAK2. Solo TG101348, descritto come inibitore di JAK2 specifico, induce un significativo calo della quota di carica allelica di *JAK2V617F* ma con minimi effetti sulle citochine, suggestivo di un maggior effetto diretto sulla cellule clonali.

Le molecole non selettive per JAK2 sono quelle sviluppate originariamente per altri bersagli molecolari e successivamente dimostratisi inibitori di JAK2, tra questi gli inibitori di FLT3, CEP-701⁹¹, e gli inibitori delle farnesiltransferasi come il tipifarnib⁹². Una classe di farmaci completamente diversa che inaspettatamente ha dimostrato un'attività anti-JAK2 è quella degli inibitori dell'istone-deacetilasi. Il ruolo delle alterazioni epigenetiche nella patogenesi delle MPN è un nuovo campo di ricerca⁹³, uno studio recente riporta che JAK2 possiede un'attività nucleare e di regolazione della fosforilazione dell'istone H3. Nonostante l'utilizzo della 5-azacitidina si sia dimostrato inefficace in due diversi trial clinici in pazienti con la mielofibrosi^{93,94}, una nuova molecola, ITF2357⁹⁵ ha dimostrato una attività preferenziale nei confronti delle cellule *JAK2V617F* mutate, sia in vitro su linee cellulari e su cellule appartenenti

a pazienti con PV, sia in vivo ottenendo un buon controllo dell'emocromo e dei sintomi sistemici in pazienti con PV e ET⁹⁶.

Recentemente è stata introdotta anche Aplidina, un farmaco tantitumorale di origine marina, isolato da un tunicato mediterraneo *Aplidium albicans* che ha dimostrato una potente attività citotossica *in vitro* e in vivo in diverse neoplasie solide e ematologiche.

Tuttavia quando nuove classi di farmaci si rendono disponibili devono essere fatte alcune considerazioni.

- La prima riguarda la sicurezza e l'efficacia: per esempio sebbene i composti INCB018424 siano molto ben tollerati, la completa inibizione della via JAK/STAT per le diverse funzioni cellulari potrebbe sollevare alcuni dubbi riguardo alla tossicità ematologica e extra-ematologica a lungo tempo, in particolare per quello che riguarda la funzione del sistema immunitario. Potrebbe essere quindi più appropriato pensare di utilizzare queste nuove molecole in pazienti a cattiva prognosi, come in casi di PMF o di mielofibrosi post-PV/post-ET. Tuttavia essendo molecole ben tollerate e attualmente considerate con un profilo di bassa tossicità potrebbero essere anche valutate in casi di PV o ET ad alto rischio.

- Inoltre se le mutazioni *JAK2* o *MPL* non rappresentassero il primo evento patogenetico della malattia ed esistesse una condizione cellulare patologica "pre-*JAK2*" questi farmaci non potrebbero essere in grado di curare queste patologie. Un punto cruciale sarà quindi cercare di capire se questi farmaci possono andare a modificare la storia naturale della malattia, per esempio prevenire l'evoluzione in mielofibrosi o in AML

- Infine la recente dimostrazione che IFN- α induce una remissione molecolare completa in pazienti con PV porta ad una nuova possibilità di impiego di questo farmaco e ad un paragone del IFN con le nuove molecole per valutare che abbiano la stessa efficacia sulla carica allelica.

Lo scopo dello studio sviluppato in questi tre anni è stato quindi quello di utilizzare alcune di queste nuove molecole, come i JAK1 e JAK2 inibitori, gli inibitori di mTOR, gli inibitori delle iston deacetilase e l'aplidina, sia in vitro, sia in vivo, in pazienti affetti da MPN per valutarne la sicurezza e l'efficacia, come nuovi potenziali trattamenti.

Per la parte degli esperimenti in vitro i farmaci sono stati utilizzati su cellule di controlli sani, su linee cellulari, su cellule di origine murina, su cellule di pazienti affetti da MPN, a questo tipo di esperimenti sono state affiancate una serie di osservazioni cliniche risultato di trial clinici sperimentali che abbiamo seguito presso la Divisione di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Careggi.

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

LINEE CELLULARI

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state ottenute dalla American Type Culture Collection (Manassas, VA). Le cellule sono state mantenute in terreno RPMI supplementato con 10% FCS.

HEL

La linea cellulare HEL è stata derivata dal sangue periferico di un uomo di 30 anni con leucemia acuta eritroblastica (LAM-M6) recidivante dopo trattamento per linfoma di Hodgkin nel 1980. Le cellule mostrano una morfologia tondeggiante, appaiono grandi, occasionalmente giganti e polinucleate; mostrano capacità di sintesi indotta e spontanea di globina, non possiedono i marcatori cellulari CD3 e CD19, mentre sono positive per i marcatori CD13, CD41, CD42, CD71, GlyA. La linea HEL presenta nel proprio genoma più copie della mutazione $JAK2^{V617F}$. Possono presentare le seguenti alterazioni citogenetiche: cariotipo triploide umano con 2.3% di poliploidia; 63(60-64)<3n>XYY, -2, -9, -10, -10, -11, -14, -16, -16, -17, -19, +20, +21, +2mar, del(2)(q32), t(3;6)(p13;q16), der(5)t(t(5;17)(q10;q10), der(6)t(1;6)(p13;p21), der(7)add(7)(p14;q32), add(8)(p21), der(9)t(9;?)(?;11)(p24;?)(?;q13), del(11)(q13), add(15)(p11), del(20)(q13), r(20)(p11q11), dup(21)(q11q22.3-qter), psu dic(22;9)t(9;?)(?;22)(p24;?)(?;p11-13).

K562

La linea cellulare K562 è stata derivata dal versamento plurale di una donna caucasica di 53 anni affetta da leucemia mieloide cronica; le cellule hanno una morfologia linfoblastica. Presentano un cariotipo diploide umano con 46 cromosomi in cui si riscontra la delezione terminale del braccio lungo del cromosoma 22 (del(22)(q12), cromosoma Philadelphia; si riscontra inoltre una traslocazione reciproca sbilanciata di uno dei cromosomi 17 sul braccio lungo di uno del cromosoma 15. La maggioranza delle cellule mononucleate sono indifferenziate e non producono immunoglobuline, non mostrano attività di fosfatasi alcalina e mieloperossidasi e non sono in grado di fagocitare particelle inerti.

Ba/F3

La linea cellulare Ba/F3 è stata derivata da cellule murine pro-B IL-3 dipendenti da sangue periferico della razza murina BALB/c. Mostrano morfologia rotonda, alcune appaiono polimorfe, si ritrovano singolarmente in sospensione o occasionalmente in gruppi. Mostrano un cariotipo diploide murino con 33% di poliploidia (40 (36-42) 2n).

PAZIENTI

Dopo aver ottenuto il consenso informato, è stato prelevato sangue periferico e midollare da pazienti affetti da mielofibrosi primaria, policitemia vera e trombocitemia essenziale, e da soggetti volontari sani; e' stata eseguita una revisione dei dati clinici, laboratoristici e istologici originali per una ulteriore conferma della diagnosi prima di utilizzare il campione per gli esperimenti. Tutti i pazienti sono risultati negativi alla ricerca del riarrangiamento BCR/ABL con RT-PCR o con tecnica FISH su cellule del sangue midollare o periferico. Nei pazienti in cui è stata eseguita un'analisi del cariotipo non si sono evidenziate anomalie di struttura o di numero.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per la valutazione dei marker molecolari e cellulari sono stati prelevati 30 ml di sangue periferico per raccogliere le cellule mononucleate, i granulociti e le sottopopolazioni cellulari.

○ **RECUPERO ANELLO LEUCOCITARIO**

Il campione di sangue periferico è stato stratificato su Lymphoprep e centrifugato a 1600 rpm per 30 min a 18°. E' stato recuperato l'anello delle cellule mononucleate, che sono state lavate in PBS sterile a 4° e centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti a 8° per due volte. Le cellule sono state contate mediante camera di Burke con un fattore di diluizione di 1:200.

○ **RECUPERO DEI GRANULOCITI**

Per il recupero dei granulociti, dopo la centrifugazione su gradiente di densità ed il recupero della frazione mononucleata, è stato aspirato il sopranatante, e la pellet dei globuli rossi è stata risospesa in 40 ml di NaCl 0.2% per la lisi eritrocitaria. Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti a 8°, il sopranatante è stato eliminato ottenendo la pellet granulocitaria, che è stata sottoposta ad una seconda lisi in 40 ml di NaCl 0.2% e nuova centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti a 8°. La pellet risospesa in 2 ml di PBS è stata poi trasferita in due eppendorf sterili e centrifugata a 3000 rpm per 5 minuti.

○ **PURIFICAZIONE DELLE CELLULE CD34+**

Reagenti:

- Buffer 1 (tampone di lavaggio e diluizione): PBS Ca-Mg free, EDTA 2mM

- Buffer 2 (tampone di separazione): PBS Ca-Mg free, 0,5% BSA, EDTA 2mM
- FcR blocking reagent. Human IgG.
- MACS CD34 microbeads: Microbeads super-paramagnetiche coniugate a anticorpi monoclonali murini anti-human CD34 (isotipo: mouse IgG1)

La pellet delle cellule mononucleate viene sottoposta a due lavaggi con buffer 1, centrifugata a 1000rpm per 10 minuti e poi risospesa in buffer 2 per un volume finale di 300µl contenenti 10^8 cellule mononucleate.

Alla sospensione in buffer 2 abbiamo poi aggiunto 100µl di FcR blocking reagent e 100µl di CD34 microbeads per ogni 10^8 cellule totali; il tutto è incubato per 30 minuti a 4° e periodicamente agitato. Terminata l'incubazione abbiamo aggiunto buffer 2 fino ad un volume di 10ml e centrifugata a 1000rpm per 10 minuti a 8°; rimosso molto accuratamente il soprannatante, abbiamo risospeso la pellet in un volume finale di 500µl di buffer 2 ogni 10^8 cellule totali.

Dopo aver lavato la colonna MACS MS+ di separazione inserita nel supporto magnetico con 500µl di buffer 2, abbiamo applicato alla colonnina la sospensione cellulare che viene lasciata defluire per gravità recuperando la frazione CD34-negativa; abbiamo effettuato poi 3 lavaggi della colonnina ciascuno con 500µl di buffer 2 e si sono lasciati defluire raccogliendo ancora come frazione CD34-negativa. Quindi sono stati aggiunti ulteriori 500µl di buffer 2 nella colonnina, che è stata velocemente staccata dal supporto magnetico per recuperare la frazione CD34-positiva tramite pressione con un pistone all'interno della colonnina. In alcuni casi è stato necessario eseguire ulteriori passaggi di purificazione della frazione CD34-positiva recuperata in una nuova colonnina fino ad un massimo di tre purificazioni; ulteriori purificazioni non aumentano la purezza.

○ VALUTAZIONE DELLA PUREZZA DELLE CELLULE IMMUNOSELEZIONATE

Reagenti:

- Tampone FACS: per 50 ml: 0,8 ml EDTA 0,5M, 49,2 ml Cell Wash
- Anticorpi specifici per la frazione cellulare valutata
- 7 AAD

La valutazione della purezza è stata effettuata tramite analisi citofluorimetrica comparando un'aliquota contenente 100µl di tampone FACS e 5×10^4 cellule prelevate dalla sospensione cellulare prima della separazione immunomagnetica, ad un'aliquota contenente 100µl di tampone FACS e 5×10^4 cellule prelevate dalla frazione recuperata.

L'aliquota contenente la sospensione cellulare prelevata prima della separazione immunomagnetica è stata utilizzata come controllo ed è stata marcata con 2µl di anticorpo γ1/γ1, mentre le aliquote prelevate dalle frazioni recuperate, sono state marcate con 2µl di anticorpo specifico, in particolare:

- Ab anti-human CD34 e CD45 per la frazione CD34-positiva

Una volta aggiunto l'anticorpo è stata eseguita un'incubazione al buio a 6°C per 20 minuti, quindi si è effettuato un lavaggio con 1 ml di tampone FACS a 1000rpm per 10 minuti.

Eliminato il sovrantante la pellet è stata risospesa in 100µl di tampone FACS, sono stati poi aggiunti 5µl di 7 AAD e si è proceduto alla valutazione citofluorimetrica riscontrando per tutte le frazioni recuperate un valore di purezza compreso fra il 97 e il 99%.

○ ESTRAZIONE DI DNA

Il DNA genomico è stato estratto dai granulociti con QIAmp DNA Blood kit (Quiagen, Germany). La pellet granulocitaria è stata risospesa in 200 µl di PBS e sono stati aggiunti 200 µl di Proteinase K e 200 µl di Buffer AL. Dopo incubazione a 56° per 10 minuti sono stati aggiunti 200 µl di etanolo e la mix è stata trasferita su colonnina Qiagen e centrifugata a 6000 rpm per 2 minuti e successivamente a 12.000 rpm per 1 minuto. Dopo aver trasferito la colonnina su un nuovo tubo sono stati aggiunti 500 µl di BUFFER AW1. Dopo centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto sono stati aggiunti 500 µl di BUFFER AW2. Dopo centrifugazione a 12.000 rpm per 4 minuti sono stati aggiunti 100 µl di BUFFER AE e si è lasciata la mix a incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Infine dopo centrifugazione a 12.000 per 1 minuto l'eluato ottenuto è stato trasferito in eppendorf sterile, e il DNA raccolto misurato mediante assorbimento spettrofotometrico a 260 nm(tecnologia NanoDrop).

○ ESTRAZIONE DI RNA

L'RNA totale cellulare è stato ottenuto mediante un'estrazione con Trizol. La pellet granulocitaria è stata risospesa in 1 mL di Trizol (guanidina tiocianato/fenolo, Gibco, Paisley, Scotland), un denaturante che permette la lisi cellulare e l'inibizione di RNAsi. Sono stati aggiunti 0.2 mL di cloroformio e dopo averlo lasciato a temperatura ambiente per 3 minuti il campione è stato centrifugato a 12.000 rpm per 15 minuti a 4°. Delle tre fasi ottenute è stata quindi recuperata la superiore contenente RNA e trasferita in eppendorf sterile. Sono stati aggiunti 2 µl di glicogeno e 0.5 ml di isopropanolo e il campione è stato agitato delicatamente per inversione, incubato a temperatura ambiente per 10 min e centrifugato a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°. Dopo aver eliminato il sovrantante la pellet di RNA è stata lavata con 1 ml di

etanolo al 75 % e infine centrifugata a 7500 rpm per 5 minuti a 4°. Dopo l'asportazione del sovranatante la pellet è stata lasciata ad asciugare a temperatura ambiente per 5 minuti, e infine risospesa in 20 µl di H₂O sterile (Sigma). È stato quindi effettuato il dosaggio spettrofotometrico dell' RNA a 260 nm (Ultraspec 2000, Phamacia Biotech, Milano).

RETROTRASCRIZIONE

La tecnica di retrotrascrizione permette di ottenere cDNA partendo da RNA in una reazione che prevede l'utilizzo di buffers, nucleotidi, esameri random, inibitori di RNAsi e l'enzima trascrittasi inversa MuLV (Applied Biosystems) catalizzatore della reazione. 100ng di RNA di ogni campione vengono retrotrascritti in una reazione a step (10 minuti a 22°C, 40 minuti a 42°C, 5 minuti a 95°C) utilizzando l'High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). La mix di reazione è stata realizzata in un volume finale di 25 µL in presenza di reaction Buffer 1x (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 200 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, RNasi Inhibitors.

Real Time-PCR QUANTITATIVA (TaqMan)

Caratteristiche della metodica PCR RTq:

La reazione di PCR RTq si esplica sfruttando l'attività 5' esonucleasica della AmpliTaq Gold DNA polimerasi che permette di tagliare la sonda durante la fase di amplificazione della PCR. La sonda è un oligonucleotide contenente un marcatore fluorescente, il reporter, all'estremità 5' (FAM dye) e un marcatore, il quencer, all'estremità 3' (TAMRA dye) legati covalentemente. Durante la reazione, il taglio della sonda separa il marcatore fluorescente reporter dal quencer, con il risultato di un aumento della fluorescenza emessa dal reporter a ciascun ciclo del processo di PCR. L'accumulo dei prodotti di PCR è valutato direttamente monitorando l'aumento della fluorescenza emessa dal reporter ed è registrato dallo strumento ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Tale metodo si basa sull'uso di due primers specifici per la sequenza di interesse e di una sonda fluorogena la cui sequenza target è localizzata dentro l'amplicone generato tra i primers.

Quando la sonda è intatta, la vicinanza del reporter fluorescente e del quencer determina la soppressione della fluorescenza del reporter in seguito al fenomeno di trasferimento di energia Förster-type (Förster, 1948; Lakowics, 1983). Durante la PCR, se il target di interesse è presente, la sonda si lega in maniera specifica alla sequenza presente tra il primer reverse e il forward. L'attività 5'-3' esonucleasica dell'enzima AmpliTaq Gold taglia la sonda tra il reporter ed il quencer solo se la sonda ibridizza con il target. I frammenti della sonda sono poi staccati

dal target e la polimerizzazione dell'elica continua. L'estremità 3' del probe è bloccata per prevenire l'estensione del probe durante la PCR. Questo processo avviene ad ogni ciclo e non interferisce con l'accumulo esponenziale del prodotto di PCR. L'aumento del segnale fluorescente è misurato solo se la sequenza target è complementare alla sonda ed è amplificata durante la PCR. Grazie a queste caratteristiche, la specificità delle reazioni è elevata.

Il buffer utilizzato contiene un marcatore di riferimento passivo (ROX) che non partecipa alla reazione di PCR. Questo fa da standard interno di riferimento con cui il segnale del reporter può essere normalizzato durante l'analisi dei dati. La normalizzazione è necessaria per correggere le fluttuazioni di fluorescenza dovuta ai cambiamenti nelle concentrazioni o nei volumi dei campioni. La normalizzazione è accompagnata dalla divisione dell'intensità di emissione di fluorescenza del reporter per l'intensità di emissione del marcatore passivo, ottenendo un rapporto definito Rn (reporter normalizzato) per ciascun tubo di reazione.

Il quantitativo di cDNA amplificato viene valutato come C_t .

Il C_t o ciclo soglia è il ciclo in cui un aumento statisticamente significativo nel Rn è per primo individuato. La soglia è definita come la deviazione standard media di Rn per i cicli early moltiplicato per un fattore di correzione. Il ciclo soglia è quello corrispondente al momento in cui il sistema di misurazione (Sequence Detection System) inizia a rilevare l'aumento nel segnale associato con una crescita esponenziale del prodotto di PCR.

I risultati della PCR quantitativa sono espressi come differenze nei livelli di espressione tra il gene di interesse e il gene di riferimento (HOUSEKEEPING) per ciascun campione, quindi dalla differenza del ciclo soglia C_t del gene di riferimento con quello del gene di interesse si ottiene il ΔC_t . Per ciascun campione viene poi calcolato il $\Delta\Delta C_t$ sottraendo alla media del ΔC_t del campione del paziente patologico il ΔC_t calcolato nell'intera popolazione di soggetti sani. Il valore di quantificazione relativa (RQ) era espresso come $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

ANALISI DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DEI GENI CCND1 e SLC2A1

La metodica utilizzata è una TaqMan convenzionale in cui 100ng di cDNA di ogni campione sono amplificati in un volume di reazione totale di 20 μ l contenente 9,5 μ l di TaqMan PCR Universal MasterMix (Applied Biosystems), 0,95 μ l dell'assay *CCND1* (ciclina D1) o *SLC2A1* (Glut-1) (Applied Biosystems), 0,95 μ l dell'assay RNaseP control reagent marcato in VIC (Applied) e 7,6 μ l di H₂O sterile (Ambion).

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Reagenti:

Inibitore di proteasi: HALT Protease Inhibitor Cocktail Kit (PIERCE)

Buffer di lisi: M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo scientific)

La sospensione cellulare di ogni campione da analizzare è stata lavata pellettata (2000rpm per 5 minuti) e lavata in PBS, successivamente è stata effettuata l'estrazione delle proteine con M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) utilizzando 1mL di buffer per 100mg di pellet cellulare con l'aggiunta di Halt Protease Inhibitor Cocktail alla concentrazione di 10 μ l /mL. Dopo aver tenuto in agitazione i campioni per 10 minuti, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 7000rpm per 15 minuti ed è stato recuperato il sovrantante contenente le proteine estratte. Il dosaggio proteico è stato effettuato con lo spettrofotometro ELISA EL808 (Biotek) e i dati sono stati analizzati con il software Gen5 1.05 (Biotek).

WESTERN BLOTTING

Reagenti:

Running Buffer per elettroforesi: Tris 15g/L, Glicina 72g/L, SDS 5g/L, H₂O milli-Q

Blotting Buffer per blottaggio: Tris 25 mM, Glicina 192mM, Metanolo 20%, SDS 0,25%, H₂O milli-Q

Sample Buffer (4x) : Tris-HCl pH=6,8 250mM, Glicerolo 10%, SDS 8%, Blu di Bromo-Fenolo

TBS:

Resolving Gel 10%: 3.3ml BisAcilammide, 2.5ml Buffer 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1ml SDS, 4.1ml H₂O milli-Q

Resolving Gel 15%: 5ml BisAcilammide, 2.5ml Buffer 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1ml SDS, 2.4ml H₂O milli-Q

Stacking Gel 4%: 1.3ml BisAcilammide, 2.5ml Buffer 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1ml SDS, 6.1ml H₂O milli-Q

Soluzione di stripping: 62,5mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS, 100mM β -mercaptoetanolo

ECL: directed protein labelling and detection systems Amersham

Reattivo Fissaggio

Reattivo Sviluppo

Anticorpi primari: Rabbit Policlonal anti-Phospho-4EBP1, Rabbit Policlonal anti-4EBP1, Rabbit Policlonal anti-Phospho-mTOR, Rabbit Policlonal anti-mTOR, Rabbit Policlonal anti-Phospho-STAT5, Rabbit Policlonal anti-STAT5 (Cell Signaling Technology), Mouse policlonal anti- α -Tubulina

Anticorpi secondari: Monoclonal anti-Rabbit (Sigma), Monoclonal anti-Mouse (Sigma)

L'analisi con la metodica del western blotting è stata effettuata sulle linee cellulari umane HEL e K562, sulle linee murine Ba/F3, trasfettate con il costrutto wild-type del gene JAK2 murino (Ba/F3 mJ2W) e col costrutto mutato V617F del gene JAK2 murino (Ba/F3 mJ2VF). Le cellule sono state prelevate e lavate in PBS tramite centrifugazione a 900 rpm per 10 minuti, il sovrantante è stato aspirato e la pellet cellulare risospesa in M-PER lysis Buffer per l'estrazione delle proteine.

Dopo il dosaggio, le proteine sono state pellettate e risospese in Sample Buffer 4x e dopo essere state riscaldate a 95°C per 10 minuti, i campioni sono stati applicati su un gel di poliacrilammide al 10% per la rilevazione delle proteine mTOR e STAT5, al 15% per la rilevazione della proteina 4EBP1. Dopo aver eseguito una separazione elettroforetica delle proteine si è proceduti al blotting delle proteine su membrane PVDF e successivo bloccaggio delle membrane per 3 ore a temperatura della stanza con una soluzione TBS-Tween allo 0,1% e BSA all'1%. L'incubazione è avvenuta overnight alla temperatura di 4°C con una diluizione 1:1000 dell'anticorpo in una soluzione TBS-Tween allo 0,1% e BSA al 5%; al termine dell'incubazione sono stati effettuati lavaggi della membrana per rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato con una soluzione TBS-Tween allo 0,5%. L'incubazione con l'anticorpo secondario è stata effettuata con una diluizione 1:7000 in una soluzione TBS-Tween allo 0,1% e BSA all'1% per un'ora a temperatura ambiente quindi sono seguiti lavaggi con una soluzione TBS-Tween allo 0,5%. La rivelazione è avvenuta mediante Image Quant 350 (Ge Health Care) previa incubazione delle membrane per 5 minuti con substrato chemoluminescente. Lo stripping delle membrane è stato effettuato a 60°C per un'ora con la soluzione di stripping con successivi lavaggi delle membrane con una soluzione TBS-Tween allo 0,5%; dopo lo stripping è stata effettuata una nuova saturazione della membrana con una soluzione TBS-Tween allo 0,1% e BSA all'1% per 2 ore a temperatura della stanza a cui sono seguite le incubazioni con anticorpo primario e secondario prima della nuova rivelazione.

COLTURE CELLULARI

Colture liquide

TERRENO SYN.H: Clinical grade human albumin, synthetic iron carrier, rh-insulin, nucleosides, L-glutamine, α -monothioglycerol, synthetic lipids, synthetic Iscove base medium

TERRENO STEM- α : Clinical grade human albumin, synthetic iron carrier, rh-insulin, nucleosides, L-glutamine, α -monothioglycerol, synthetic lipids, synthetic Iscove base medium

Sono state utilizzate colture in due fasi: una prima fase proliferativa di espansione del pool di progenitori ed una seconda fase differenziativa. Cellule CD34 positive isolate da sangue midollare e periferico di pazienti con Policitemia Vera, Mielofibrosi Primaria e donatori sani sono state piastrate alla concentrazione di 2×10^5 /mL in terreno SYN.H (serum-free medium for expansion of hematopoietic cells, AbCys S.A.) con l'aggiunta di Penicillina/Streptomicina all'1%, L-Glutammina all'1% ed un cocktail di citochine composto da: Human IL-3 2ng/mL, Human IL-6 2ng/mL e SCF 10ng/mL (Milteny) per la fase proliferativa. Dopo 6 giorni di coltura le cellule sono state lavate in PBS, contate e nuovamente piastrate per ulteriori 6 giorni alla concentrazione di $1,5 \times 10^5$ per la fase differenziativa; per quest'ultima fase è stato utilizzato il terreno STEM- α (serum-free medium without citokines for human hematopoietic cells, STEM- α) con addizionati Penicillina/Streptomicina all'1%, L-Glutammina all'1% ed un cocktail di citochine composto da: Human IL-3 2ng/mL, Human IL-6 2ng/mL e Epo 3U/mL (Milteny). Per la valutazione degli effetti di RAD001, il farmaco è stato aggiunto al terreno di coltura alla concentrazione di 50nM.

Colture Semisolide

Sono state aggiunte $2,5 \cdot 10^5$ MNCs / mL ad aliquote da 2,5 mL di mezzo semisolido (metilcellulosa), in terreno di coltura IMDM (Cambrex, Belgium), Penicillina/Streptomicina (ICN Biomedicals Inc, USA) e L-Glutammina (Cambrex, Belgium) 2mM, e successivamente piastrate in Capsule Petri (Tissue Culture Dish, 35x10 mm, Falcon, USA).

Sono stati utilizzati due medium semisolidi:

- una preparazione di metilcellulosa contenente una miscela ottimale di citochine (METHOCULT GF H4434, StemCell Technologies Inc, USA) per indurre la crescita di colonie mieloidi (con rh SCF, rh GM-CSF e rh IL-3) ed eritroidi (con rh IL-3 e rh EPO);
- una preparazione di metilcellulosa "base" (METHOCULT H4531, StemCell Technologies Inc, USA), non contenente alcuna citochina, per la crescita delle colonie spontanee;

Sono state aggiunte concentrazioni scalari del RAD001 al medium semisolido. Dopo 14 giorni di coltura in incubatore a 37°C e 5% CO₂, le colonie emopoietiche sono state riconosciute come appartenenti alla linea mieloide o eritroide in base ai criteri morfologici convenzionali e alla presenza o meno di pigmento emoglobinico con l'esame al microscopio invertito e contate. Per la valutazione delle colonie megacariocitarie e' stato utilizzato il terreno MegaCult-C serum-free (Stem Cell Technologies inc, USA) (Tabella III) a cui sono state aggiunte cellule CD34-positive purificate tramite separazione immunomagnetica alla concentrazione di $1,1 \times 10^5$ /ml in un volume finale di 3ml costituito da 0,1ml di sospensione cellulare, 1,7ml di

MegaCult-C Medium non supplementato con citochine e 1,2ml di Collagen Solution. Sono stati poi aggiunti al medium 50ng/ml di Trombopoietina, 10ng/ml di human IL-6 e 10ng/ml di human IL-3.

Sono state aggiunte concentrazioni scalari di RAD001 al medium semisolido e dopo 12 giorni di coltura in incubatore a 37°C e 5% CO₂, sono state riconosciute e contate le colonie megacariocitarie (CFU-MK).

ANALISI DEL CICLO CELLULARE

Sono state recuperate 1x10⁶ cellule e lavate in PBS (Lonza) tramite centrifugazione a 1200rpm per 5 minuti; successivamente è stato aspirato il sovrantante e risospesa la pellet cellulare in 500µL di una soluzione fredda di etanolo al 95% quindi è seguita un'incubazione in ghiaccio per 20 minuti. Al termine dell'incubazione, dopo un lavaggio con PBS, la nuova pellet cellulare è stata risospesa in 500µL di PBS con l'aggiunta di 5µg di RNAsi (Roche) e incubata a 37°C per 20 minuti. Al termine dell'incubazione è stata trasferita la sospensione in un tubo FACS ed è stato effettuato un lavaggio in PBS prima dell'aggiunta di 500µl di una soluzione di Propidio Ioduro marcato con fluoroforo PE alla concentrazione di 10µg/mL e successiva incubazione in ghiaccio per 10 minuti. L'aggiunta dello Ioduro Propidio e la successiva incubazione sono stati effettuati al riparo dalla luce. Al termine dell'incubazione si è proceduti alla valutazione citofluorimetrica al FACS Scan (Becton Dickinson) del ciclo cellulare utilizzando il software Cell Quest Pro (Becton Dickinson) ed un minimo di 30000 eventi; le successive analisi dei dati sono state effettuate con il software WinMDI.

ANALISI DELL'APOPTOSI

Reagenti:

Annexin-V-FLUOS labeling solution (Roche): Annexin-V-Fluorescein, Ioduro Propidio

Incubation buffer: Hapes buffer

Sono state prelevate 1x10⁶ cellule e lavate in PBS tramite centrifugazione a 1200rpm per 5 minuti, la pellet cellulare è stata risospesa in 100µl di Incubation buffer con l'aggiunta di 2µl di Annexin-V-FLUOS labeling solution (Roche) e 2µl di Ioduro Propidio ed incubata a temperatura della stanza per 15 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti ulteriori 500µl di Incubation buffer e si è proceduti alla valutazione citofluorimetrica utilizzando una lunghezza d'onda d'eccitazione pari a 488nm. Le valutazioni sono state effettuate al FACS Scan (Becton Dickinson) utilizzando il software Cell Quest Pro; le successive analisi dei dati sono state effettuate con il software WinMDI.

VALUTAZIONE DELLA DIFFERENZIAZIONE ERITROIDE

Sono state prelevate 1×10^5 cellule per ogni singola valutazione, lavate in 1mL di PBS a 4°C tramite centrifugazione a 1200rpm per 5 minuti ed incubate con 2 μ l di anticorpo in ghiaccio e al riparo dalla luce per 15 minuti. Per il controllo è stato utilizzato l'anticorpo $\gamma 1/ \gamma 1$, per la valutazione della differenziazione la combinazione di anticorpi anti-Glicoforina A (GPA), marcato con fluoroforo PE e anti-CD36, marcato con fluoroforo FITC e la combinazione di anticorpi anti-Glicoforina A, marcato con fluoroforo PE e anti-CD71, marcato con fluoroforo FITC. Tutti gli anticorpi sono stati forniti dalla BD Pharmingen. CD71, recettore della transferrina, è un marcatore della differenziazione eritroide e megacariocitaria; CD36 e GPA sono marcatori rispettivamente precoce e tardivo della differenziazione eritroide. Le valutazioni sono state effettuate al FACS Scan (Becton Dickinson) utilizzando il software Cell Quest Pro; le successive analisi dei dati sono state effettuate con il software WinMDI.

TEST WST-1

Reagenti: Cell Proliferation Reagent WST-1

La valutazione della proliferazione cellulare in presenza del farmaco è stata effettuata utilizzando il saggio colorimetrico WST-1; il principio su cui si basa tale metodica è l'aumento dell'assorbanza rilevabile allo spettrofotometro dovuto ad un aumento dell'attività cellulare come risultato dell'avvenuta proliferazione. Il sale di tetrazolio WST-1 è trasformato nella molecola Formazan dall'attività degli enzimi cellulari. Una espansione nel numero delle cellule nel campione in esame provoca un aumento dell'attività delle deidrogenasi mitocondriali cellulari che porta ad un incremento della formazione di Formazan, tale incremento è direttamente correlato al numero di cellule metabolicamente attive nella coltura. La quantificazione spettrofotometrica della produzione di Formazan stima la proliferazione cellulare del campione. Sono stati aggiunti 10 μ l di WST-1 a 100 μ l di sospensione cellulare delle cellule HEL, K562, BA/F3 piastrate alla concentrazione di 2×10^5 /ml in multiwell da 96 pozzetti (Falcon, USA). L'identificazione della dose IC50 del farmaco è avvenuta attraverso la valutazione della proliferazione cellulare in presenza di dosi scalari del farmaco. I valori di assorbanza a varie dosi del farmaco, paragonati al controllo, sono stati elaborati con il software Origin 7.5 che ha quindi permesso l'identificazione della dose IC50 per ogni tipo cellulare in esame. Ogni singolo test è stato effettuato in triplicato e il dato finale è stato ottenuto come media dei tre test effettuati. Lo spettrofotometro utilizzato è lo strumento ELISA EL808 (Biotek) e i dati sono stati analizzati con il software Gen5 (Biotek).

CAPITOLO 5

LA TERAPIA CON GLI INIBITORI DI JAK2

Le cellule umane esprimono più di 500 chinasi, che fosforilano diverse proteine, principalmente tirosine, serine o treonine. Le chinasi JAK2 sono un membro di una famiglia di 4 tirosin-chinasi citoplasmatiche, che include oltre a JAK2, JAK1, JAK3 e Tyk2⁹⁷. Gli enzimi JAK sono importanti per l'attività di trasduzione del segnale di recettori mancanti di attività chinasi intrinseca in seguito al legame con citochine o fattori di crescita^{98,99}

I ruoli delle proteine della famiglia JAK spesso si sovrappongono e in un'unica pathway ne sono coinvolti diversi, con l'eccezione di alcuni fattori di crescita come l'eritropoietina e la trombopoietina che utilizzano solo JAK2. JAK1 ha un ruolo principalmente nel mediare il segnale di citochine proinfiammatorie, spesso in associazione con altri membri della famiglia JAK; JAK3 è principalmente coinvolto nelle funzioni immunitarie trasmettendo segnali legati al rilascio di IL-2; Tyk2 in associazione con JAK2 e JAK3 è attivo nella trasduzione del segnale in seguito alla produzione di citochine come IL-12 e IL-23. La maggior parte delle nostre conoscenze riguardo i ruoli degli enzimi JAK deriva principalmente da studi su modelli animali a cui veniva silenziata l'attività di ognuno dei membri della famiglia JAK⁹⁹. I topi JAK1 knockout presentano mortalità perinatale, si ritiene per un deficit della suzione e presentano inoltre un'alterazione dello sviluppo e della funzione del compartimento linfoide. Il deficit di JAK2 risulta letale a livello embrionale (al giorno 12) come risultato di una insufficiente eritropoiesi; il deficit di JAK3 porta ad una severa immunodeficienza (SCID).

In seguito allo sviluppo di imatinib, inibitore della chinasi BCR-ABL per la LMC, e dei successivi inibitori di nuova generazione, numerosi avanzamenti sono stati fatti nello sviluppo di questo tipo di farmaci. L'identificazione di una tirosin chinasi mutata nelle MPN ha portato molto ottimismo nel trattamento di questi disordini per l'identificazione e lo sviluppo di nuove molecole¹⁰⁰. Spesso per lo sviluppo di nuovi farmaci gli enzimi JAK2V617F mutati vengono paragonati con la proteina di fusione BCR-ABL¹⁰¹; esiste tuttavia la differenza che non è nota una funzione vitale per la chinasi endogena ABL e quindi gli inibitori di BCR-ABL possono essere somministrati a dosi che inibiscono completamente BCR-ABL e che eliminano le cellule BCR-ABL-positive senza incorrere in alcun tipo di evento avverso. E' importante inoltre ricordare che a causa della localizzazione della mutazione di V617F in una regione fuori dal sito di legame-ATP, un inibitore competitivo di JAK2 non è in grado di distinguere tra la forma wild-type e la forma mutata. Quindi i JAK2 inibitori, in virtù della loro attività anche su JAK2 wild-

type, importante per la normale emopoiesi, potrebbero comportare mielosoppressione al dosaggio in grado di inibire competitivamente la forma mutata, potrebbero portare ad un controllo dell'attività proliferativa emopoietica in caso di PV e ET, ma non eliminare il clone in maniera simile agli inibitori di BCR-ABL¹⁰¹.

Queste molecole possono essere divise sulla base della loro azione in selettive su JAK2, cioè studiate e prodotte come ATP-mimetici per una attività diretta nei confronti della proteina mutata, o "non selettive per JAK2", cioè sviluppate originariamente per altri bersagli molecolari e successivamente dimostratisi inibitori di JAK2.

Uno dei farmaci inibitori di JAK2 più estesamente studiati è stato AG490, membro della famiglia delle tirfostine, che ha dimostrato capacità di indurre apoptosi in cellule di leucemia acuta mieloide e linfoide attivando la caspasi 3 e bloccando l'attività di JAK2-STAT^{102,103}. Nei progenitori CD34+ di pazienti con PV AG490 inibisce la differenziazione eritroide terminale^{104,105} mentre nei modelli murini di PV il trattamento con AG490 porta una significativa riduzione dell'ematocrito e della conta leucocitaria. Tuttavia gli effetti di AG490 sulla proliferazione cellulare sono complicati da una serie di effetti collaterali JAK-independenti per i quali la molecola non è stata ulteriormente sviluppata per l'uso clinico^{106,107}.

Sono diverse le molecole selettive inibitorie di JAK2 che sono state recentemente sviluppate (Tabella VI)

- TG101209

TG101209, molecola disponibile per trattamento per os, inibitore selettivo di JAK2 (IC₅₀ di 6 nM) inibisce anche JAK3 a IC₅₀ di 169 nM. Questa molecola inibisce la crescita delle linee cellulari con mutazione JAK2V617F o MPLW515L a un IC₅₀ di 170 nM e 220 nM, rispettivamente; ha dimostrato minimi effetti legati alla soppressione dell'attività di JAK1 o JAK3. Nelle cellule HEL o in altre linee cellulari transfettate con la mutazione JAK2V617F, TG101209 induce apoptosi, arresto del ciclo cellulare e inibizione della fosforilazione di JAK2V617F, STAT5 and STAT3 (IC₅₀ circa di 300-600 nM). In modelli murini con MPN JAK2V617F positive, il trattamento con TG101209 porta all'aumento della sopravvivenza, alla riduzione della carica allelica e alla riduzione della fosforilazione di STAT5. A concentrazioni simili o addirittura inferiori il farmaco inibisce la crescita di colonie da cellule di pazienti con PV o con PMF MPLW515L positive. Tuttavia l'effetto inibitorio sulla crescita delle colonie di TG101209 è relativamente selettivo per le colonie mutate.

- WP1066

WP1066 è un nuovo analogo del JAK2 inibitore AG490, con una struttura simile al benzil-caffeato, inibisce selettivamente JAK2 senza coinvolgere la fosforilazione degli altri membri

della famiglia JAK. Caratterizzato da un IC_{50} per l'inibizione della proliferazione delle HEL di 2.3 μ mol, mentre non è attivo su altre linee cellulari come quelle di CML, linfomi a cellule T o controlli sani. WP1066 downregola la fosforilazione di STAT3, STAT5 e ERK1/2 (con IC_{50} approssimativamente di 3 μ mol) e induce apoptosi in maniera tempo e dose dipendente nelle HEL, aumentando l'attivazione di caspasi-3. Inoltre l'esposizione a WP1066 causa la riduzione della concentrazione totale di JAK2 dovuta alla degradazione proteica mediante meccanismi di proteolisi. Test ex vivo hanno valutato l'effetto di WP1066 sulle colonie emopoietiche, è stato osservata una significativa riduzione del numero delle BFU-E e CFU-E, con maggior effetto sulle BFU-E. L'effetto apoptotico di WP1066 è stato inoltre confermato con test su cellule di AML (linee cellulari o donate da pazienti); inoltre l'efficacia è stata valutata anche su modelli animali di B-NHL e glioma maligno ottenendo una riduzione della massa neoplastica in tutti i casi.

- **Gö6976**

Gö6976 è un inibitore con una struttura indolo carbazolo con una potente attività nei confronti di JAK2 e JAK3 a concentrazioni nanomolari¹⁰⁸. E' stato testato in linee cellulari di plasmocitoma e di leucemia acuta promielocitica; l' IC_{50} per inibire JAK2 è 130 nM, è stata inoltre definita una riduzione dose-dipendente anche dell'attività di JAK3 per IC_{50} di 370 nmol¹⁰⁹.

Nelle cellule HEL Gö6976 induce apoptosi in maniera dose-dipendente e inibisce la formazione di colonie da progenitori emopoietici normali e JAK2V617F positivi¹⁰⁹.

- **SB1518**

Inibitore orale selettivo di JAK2; l'attività anti-JAK2 è stata stimata a un IC_{50} di 22 nM per le cellule JAK2 wild-type e a un IC_{50} di 19 nM per le JAK2V617F mutate. Causa l'inibizione della fosforilazione di JAK2 e STAT5 in maniera dose-dipendente e blocca la proliferazione delle linee di cellule murine BaF3; nei modelli animali con forme avanzate di MPN porta alla normalizzazione della leucocitosi e alla riduzione delle dimensioni della milza

- **AZ01**

Anche AZ01 è un inibitore selettivo disponibile per os della tirosin chinasi JAK2 ($IC_{50} < 1$ nM) con una potente attività di inibizione della proliferazione sulle linee cellulari JAK2 mutate. Nei topi con MPN JAK2V617F indotta, il trattamento con AZ01 riduce in maniera significativa i livelli di emoglobine e leucociti e la splenomegalia.

Tabella VI. Farmaci inibitori di JAK, ATP mimetici

Farmaci	JAK2 IC ₅₀	JAK2:JAK3	V617F IC ₅₀	Modelli animali
TG101348	3 nM	1:300	300 nM	↓Htc, ↓WBC ↓splenomegalia ↓emopoiesi extramid
INCB018424	<5 nM	1:100	80-150 nM	↓splenomegalia ↓ crescita tumorale
XL019	2 nM	1:50	623 nM	↓ crescita tumorale ↓ neoangiogenesi
TG101209	6 nM	1:28	450 nM	↑ OS ↓ crescita tumorale
Gö6976	130 nM	1:3	Nv	Nv
SB1518	19-22 nM	Nv	81 nM	↓splenomegalia ↓ leucocitosi
AZ01	<1 nM	Nv	Nv	↓Htc, ↓WBC ↓splenomegalia
WP1066	Nv	Nv	2-3 μM	

Nel secondo gruppo di farmaci i “non selettivi per JAK2”, cioè sviluppati originariamente per altri bersagli molecolari e successivamente dimostratisi inibitori di JAK2 sono inclusi gli inibitori di FLT3 (CEP-701), gli inibitori delle aurora chinasi, delle farnesil-transferasi e di EGFR.

MK-0457 è una piccola molecola inibitore delle aurora chinasi A, B, C e altre poche tirosinchinasi come FLT3, BCR-ABL (compresa la mutazione T315I BCR-ABL) e JAK2. In uno studio clinico di fase I condotto in pazienti con varie patologie ematologiche refrattarie, tra questi 8 pazienti con MPN JAK2 positive a 2 pazienti con AML secondaria a MPN-JAK2, MK-0457 sembra abbia portato a delle risposte ematologiche senza eccessiva tossicità.

Erlotinib è una molecola inizialmente sviluppata per il trattamento della neoplasia del polmone a piccole cellule e per metastasi da carcinoma del pancreas, sembra inibire EGFR (in vitro IC₅₀ 0.02 μmol)^{110,111} con attività contro vari membri di recettori di tirosin chinasi della

famiglia erbB. Erlotinib ha dimostrato attività anti-JAK2 (IC₅₀ 4 µM) e in studi preclinici inibisce la crescita delle cellule HEL e di cellule di pazienti con PV a IC₅₀ di 2 µM e 5µM rispettivamente. **Tipifarnib** (R115777) è un inibitore delle farnesil-transferasi (FTI) che si è dimostrato attivo in pazienti con AML resistente/refrattaria¹¹². E' stato valutato anche in vitro su cellule di pazienti con PMF dimostrando un IC₅₀ rispettivamente di 34 e 2.7 nM per le colonie mieloidi e megacariocitarie¹¹³. In uno studio clinico prospettico di fase II, in pazienti con MF, Tipifarnib in monoterapia è stato discretamente tollerato ottenendo il controllo dell'organomegalia, senza tuttavia migliorare l'anemia o la fibrosi midollare.

In aggiunta a questi farmaci attualmente sono 4 gli inibitori di JAK2 utilizzati in trial clinici sperimentali per i quali sono disponibili i primi dati. Principalmente i farmaci sono stati utilizzati in pazienti affetti da mielofibrosi con malattia a rischio intermedio-alto e necessità di trattamento.

TG101348

TG101348 è un farmaco molto simile a TG101209, inibitore potente e selettivo per JAK2. L' IC₅₀ per JAK2 è 3 nM e, quando valutato per 223 chinasi, solo FLT3 e RET hanno mostrato un IC₅₀ < 50 nM. Presenta una selettività di 35 e 334 volte maggiore per JAK2 se paragonato a JAK3 e JAK1. La caratterizzazione di TG101348 è stata condotta con esperimenti in vitro e in vivo⁸⁷; TG101348 porta all'apoptosi le cellule HEL e BaF/3-JAK2V617F positive a concentrazioni di 305 nM e 270 nM, rispettivamente, mentre sono richieste maggiori concentrazioni per indurre apoptosi nei fibroblasti^{88,114}. TG101348 inibisce la proliferazione nelle cellule HEL e BaF3-JAK2V617F inducendo apoptosi in maniera dose-dipendente, riducendo la fosforilazione di STAT5. In modelli murini di PV, TG101348 assunto per via orale controlla l'ematocrito, la conta leucocitaria, l'emopoiesi extramidollare associata a una marcata soppressione dose-dipendente delle BFU-E e EEC e riduzione della carica allelica dei cloni JAK2V617F-positivi⁸⁸. Utilizzando cellule di pazienti affetti da PV è stato visto come TG101348 inibisce la formazione di colonie emopoietiche¹¹⁴. TG101348 è stato valutato in uno studio clinico di fase I/II in pazienti con PMF, post-PV MF e post-ET MF, con somministrazione per os in cicli di 28 giorni¹¹⁵. L'aumento di dose per ogni paziente era previsto dopo il completamento di almeno 3 cicli di terapia. Vent'otto pazienti trattati con dosaggi variabili dai 30 mg agli 800 mg giornalieri. Tutti i pazienti presentavano splenomegalia (valore mediano del diametro verticale 17 cm) e 10 pazienti erano transfusione-dipendenti. L'effetto collaterale non ematologico più frequente è stata una tossicità gastrointestinale grado 1/2 con nausea (64%) e diarrea (50%). E' stata

osservata una trombocitopenia e una neutropenia di grado 3/4 nel 29% e 11% dei pazienti, rispettivamente, e presenza di anemia anche nei non-trasfusione dipendenti (47% aveva un calo di >2 gr/dl di Hb). La tossicità dose-limitante è stata osservata a 800 mg caratterizzata da amilasemia e lipasemia asintomatiche; MTD è stata definita a 680 mg/die. 14 pazienti (50%) hanno ottenuto una riduzione delle dimensioni della milza di almeno il 50%, tra questi in 5 pazienti la milza è diventata non palpabile. Tutti i 14 pazienti con leucocitosi hanno ottenuto una marcata riduzione della conta dei globuli bianchi; di 25 pazienti JAK2V617F-positivi, 8 (32%) hanno ottenuto la riduzione del burden allelico sui granulociti di almeno il 50% in due campioni consecutivi. Attualmente lo studio è in fase di estensione e sono attesi i risultati preliminari.

XL019

XL019 è un potente e selettivo inibitore della chinasi JAK2 ($IC_{50} = 2$ nM) che ha dimostrato efficacia anche nei confronti degli altri membri della famiglia di JAK. In studi preclinici in vitro utilizzando linee cellulari HEL e cellule umane di pazienti con MPN, XL019 mostra particolare efficacia nell'inibizione selettiva ($IC_{50} = 64$ nM) della fosforilazione di STAT5 nelle cellule eritroidi dopo la stimolazione con EPO, rispetto ad altri tipi cellulari (linfociti T, linfociti B). In studi in vivo, XL019 blocca la fosforilazione di STAT5 con un IC_{50} di 42 nM. In studi di fase I su pazienti con PMF e post-PV e post-ET MF, XL019 veniva somministrato per os inizialmente alla dose di 100 mg/die x 21 gg in cicli di 28-gg e poi incrementato a 300 mg. In tutti i pazienti JAK2 o MPL positivi le dimensioni spleniche si riducevano, veniva tuttavia osservata neurotossicità reversibile con lo scalo della dose in tutti i pazienti. Nello studio di fase II sono stati arruolati 30 pazienti, 21 alla dose ≤ 50 mg/die, ottenendo in almeno il 50% dei casi la riduzione del volume splenico, il miglioramento dell'anemia, il controllo della leucocitosi e dei sintomi sistemici come il prurito e la fatigue, e in 3 pazienti la riduzione dei blasti periferici e midollari. Gli effetti collaterali sono stati principalmente non-ematologici, principalmente una neurotossicità di grado lieve-moderato caratterizzata da formicolii, neuropatia periferica, stato confusionale, disturbi dell'equilibrio e parestesie; non sono state registrate tossicità ematologiche. Nonostante la neurotossicità sia rapidamente reversibile preclude l'utilizzo del farmaco a lungo termine in molti pazienti e questo ha bloccato l'ulteriore programmazione di trial futuri.

CEP-701

CEP-701 (lestaurtinib), un derivato dell'indolo-carbazolo K252, è un analogo delle straurosporine, inizialmente sviluppato per il trattamento del cancro alla prostata, ha poi dimostrato potente attività inibitoria nei confronti di FLT3 e quindi utilizzato in studi di fase II/III su pazienti con LAM refrattaria/ricaduta¹¹⁷. Recenti studi hanno descritto una potente

attività di inibizione anche nei confronti di JAK2 (IC_{50} 1 nM) in vitro e in vivo, oltre che nei confronti di altre chinasi come RET and Trk-A. Lestaurtinib è stato valutato su linee cellulari murine BaF/3-JAK2V617F, HEL e su cellule di pazienti affetti da MPN, inibisce la crescita delle cellule HEL, oltre che delle colonie eritroidi ottenute da cellule CD34+ di pazienti affetti da MPN a concentrazioni di 100 nM, la fosforilazione di STAT5; non ha attività su cellule di controlli sani. In uno studio clinico 22 pazienti affetti da MF, resistenti a precedenti trattamenti, con importante splenomegalia e un valore mediano di carica allelica JAK2V617F pari a 53% venivano trattati con CEP-701 al dosaggio di 80 mg BID, dopo 3 mesi di trattamento in 6 pazienti (27%) veniva osservata un miglioramento clinico secondo i criteri IWG-MRT caratterizzato da riduzione della milza in 3 pazienti, indipendenza dalle trasfusioni in 2 casi e miglioramento dell'emocromo in 1 paziente; la carica allelica di JAK2 non si modificava. I principali effetti collaterali erano anemia (grado 3-4: 18%), piastrinopenia (grado 3-4: 18%) e diarrea (grado 1-4: 68%; grado 3-4: 9%). Attualmente è attivo uno studio su pazienti con MF nei quali si sta valutando la sicurezza e l'efficacia di dosaggi maggiori a 80 mg BID. Separatamente, CEP-701 è stato valutato anche su 11 pazienti con ET e 12 con PV in studi di fase II, usando il dosaggio standard di 80 mg BID, la percentuale delle risposte è stata tuttavia limitata.

INCB018424

INCB018424 è un inibitore disponibile per via orale, selettivo delle chinasi della famiglia JAK, attivo principalmente su JAK1 e JAK2 con IC_{50} di 3.3 e 2.8 nM, rispettivamente; ha dimostrato inoltre attività anche nei confronti di Tyk2 e JAK3¹¹⁶, mentre si è dimostrato non efficace verso un pannello di altre 26 chinasi. Inoltre INCB018424 inibisce la crescita di linee cellulari JAK2V617F mutate (IC_{50} 80-150 nM) e la fosforilazione di JAK/STAT su sangue intero con IC_{50} di 300nM: nello specifico IC_{50} a 126 nM per le BaF/3 e per le HEL a 186 nM; non agisce invece su linee cellulari con il trascritto BCR-ABL o con la mutazione del c-KIT fino a concentrazioni di 8 mM. L'attività di INCB018424 è stata valutata anche in vivo su modelli animali in cui erano state inoculate cellule BaF3-JAK2V617F risultando attivo nel controllo della splenomegalia e aumento della sopravvivenza, inibendo la fosforilazione di STAT3 in maniera dose dipendente¹¹⁶. INCB018424 inibisce maggiormente la crescita di progenitori emopoietici da cellule CD34+ di pazienti con PV rispetto a donatori sani, soprattutto in colture in assenza di citochine¹¹⁶. Inoltre è associato al calo importante dei livelli di citochine pro-infiammatorie, IL-6 e TNF- α , che sono implicate nella patogenesi delle MPN.

Il primo e principale studio clinico condotto con inibitori di JAK2 è stato promosso da Incyte, utilizzando INCB018424 nello studio di fase I con dosi a crescere partendo da 25 mg BID

dimostrando un'ottima capacità di riduzione della splenomegalia e miglioramento dei sintomi sistemici nella maggior parte dei pazienti a prescindere dallo status di JAK2. La tossicità limitante la dose è stata la piastrinopenia, collegata all'inibizione dei segnali indotti dalla TPO che utilizzano la via di JAK2. Gli studi di farmacodinamica e sui marker biologici hanno dimostrato una normalizzazione dell'attività di STA3 e una significativa soppressione delle citochine pro-infiammatorie come IL-1, TNF- α , e IL-6, e fattori di crescita angiogenici e fibrogenici come il VEGF e il bFGF. Allo studio è seguita una fase II per valutare differenti dosaggi e schemi di somministrazione di INCB018424 nella quale sono stati arruolati più di 150 pazienti. I pazienti eleggibili erano affetti da PMF, PPV-MF o PET-MF ricaduti o refrattari a precedente trattamento, o a rischio intermedio-alto; lo studio è stato condotto negli USA presso il dipartimento di Ematologia di M.D. Anderson Cancer Center e della Mayo Clinic, Rochester (MN). Sono stati arruolati un totale di 153 pazienti trattati con dosaggi differenti suddivisi in i) 25 mg BID, con la possibilità di scalare a 10 mg BID dopo 2 mesi, ii) 10 mg BID, con la possibilità di aumentare dopo 3 mesi, iii) 10 mg BID, iv) 15 mg BID. Secondo i criteri IWG, 61/140 (44%) con splenomegalia hanno presentato una risposta alla terapia caratterizzata dalla riduzione di almeno il 50% del diametro splenico, questa tipo di risposta è stata descritta già entro i primi 3 mesi di trattamento ed è presente soprattutto in che in fa dosaggi più elevati di farmaco. Nella maggior parte dei casi la risposta è mantenuta per almeno 12 mesi. In 6 pazienti che presentavano anche epatomegalia importante, dopo 6 mesi di trattamento è stato descritta una riduzione del 14%. Dopo una mediana di trattamento di 12 settimane, 4 pazienti (14%) avevano acquisito indipendenza dalle trasfusioni; in chi presentava leucocitosi al baseline, già dopo 3 mesi di terapia, si valutava il miglioramento del parametro che persisteva poi per più di un anno. In 16/17 pazienti con piastrinosi all'arruolamento (media $728 \times 10^9 / L$) 3 mesi di trattamento riducevano significativamente la conta piastrinica (media $336 \times 10^9 / L$), in 10 pazienti si normalizzava e rimaneva tale per più di un anno. Anche il valore della conta delle cellule CD34+ valutato in 25 pazienti iniziava a ridursi in 3 mesi (da una media di 583 a 398 cellule x mmc). Con l'utilizzo di particolari punteggi e scale è stato valutato anche l'impatto del trattamento sui sintomi sistemici. Dopo 1 mese di terapia la maggior parte dei pazienti ha riferito un miglioramento clinico principalmente caratterizzato dalla scomparsa del senso di ingombro addominale, legato alla riduzione della milza, e dalla riduzione dei dolori ossei; il prurito migliorava già dopo 2 settimane di trattamento in maniera significativa rispetto al baseline, mentre il peso iniziava a modificarsi dopo 2 mesi di terapia, con un valori di chilogrammi riacquisiti per pazienti variabile tra i 5 e i 9 a seconda del dosaggio effettuato. Dei 153 pazienti arruolati, dopo un anno 115 pazienti (75%) stanno ancora assumendo il trattamento. Tossicità non ematologica è stata descritta solo in casi sporadici (<10%) , principalmente di grado I-II a coinvolgimento gastrointestinale. Gli effetti collaterali

ematologici sono stati l'anemia e la piastrinopenia di grado 3-4; si assisteva al calo dell'emoglobina durante i primi mesi di trattamento e in seguito si stabilizzava, la piastrinopenia non era correlata allo status di JAK2, era molto più frequente nei pazienti che presentavano già all'arruolamento valori di plt inferiori alle $200 \times 10^9/L$ ed era reversibile in 1-3 settimane con la sospensione del farmaco.

Gli eventi avversi seri sono stati descritti in 59 pazienti, di questi solo 12 correlati al trattamento; ci sono stati 3 casi di evoluzione di AML e 17 decessi (overall survival, 84%) 5 nella fase di trattamento e 3 entro 30 giorni dalla fine della terapia.

Sono stati valutati gli effetti della terapia sulla carica allelica di JAK2 e su altri marker biologici della mielofibrosi; all'arruolamento più del 75% dei pazienti presentava una carica allelica maggiore del 75%, tuttavia è stato ottenuto una diminuzione media di solo il 13% dopo 12 cicli di terapia, solo 4 pazienti hanno presentato una riduzione del 30-40%. I livelli plasmatici di alcune citochine pro infiammatorie al baseline erano significativamente più elevati rispetto alla popolazione sana, mentre i livelli di leptina, un ormone di derivazione del tessuto adiposo e eritropoietina erano inferiori alla norma. Dopo un solo ciclo di terapia i livelli plasmatici delle citochine scendevano, eccetto che EPO e leptina che salivano, queste modifiche non erano correlate allo status mutazionale di JAK2, ma correlavano con il miglioramento del quadro clinico del paziente; veniva osservato inoltre una riduzione dose e tempo dipendente della fosforilazione di STAT3.

In conclusione l'utilizzo di INCB18424 ha portato benefici clinici importanti e duraturi (follow-up maggiore di un anno) caratterizzati dalla riduzione della splenomegalia, controllo dei sintomi sistemici, aumento del peso, riduzione delle citochine pro-infiammatorie, citochine angiogeniche, fattori di crescita nella maggioranza dei pazienti. A dispetto del miglioramento clinico è stato osservato solo un modesto calo del burden di JAK2V617F (13% nel midollo e 9% nei granulociti di sangue periferico), suggerendo quindi che il beneficio clinico del trattamento con INCB018424 potrebbe essere il risultato dell'inibizione di JAK2 mutato e forse anche di JAK1, con la successiva riduzione delle citochine pro-infiammatorie piuttosto che per la riduzione della carica allelica.

Sulla base di questa esperienza clinica è stato proposto sempre da Incyte uno studio di fase II con INCB018424, in pazienti con PV e ET refrattari o intolleranti al HU; lo studio è stato condotto in 6 siti tra Italia e USA, con un totale di 73 pazienti arruolati (Tabella VII); il centro di Firenze è stato il sito con il maggior numero di pazienti inseriti (24). I pazienti venivano randomizzati su due diversi dosaggi (10 mg e 25 mg), poi nel corso del protocollo potevano

essere modificati sulla base della tossicità o della mancata efficacia. La valutazione della risposte era basata sui seguenti criteri ELN:

- per la PV: controllo dell'emocromo, in assenza di salassi, miglioramento o scomparsa della splenomegalia, normalizzazione della leucocitosi e della trombocitosi
- per la ET: miglioramento o normalizzazione della conta dei globuli bianchi e piastrine, scomparsa della splenomegalia.

Tabella VII. Caratteristiche dei pazienti all'arruolamento

	ET (n = 39)	PV (n = 34)
Età, anni	51	58
Femmine	64%	50%
Mesi dalla diagnosi	88	115
Refrattarietà a HU	87%	74%
Precedenti linee di terapia	1 (1-3)	1 (1-3)
Hct %	41.0	46.7
Piastrine x10 ⁹ /L	849	527
WBC x10 ⁹ /L	8.2	13.2
Splenomegalia	4 (10%)	25 (74%)
JAK2 ^{V617F} positivi	65%	100%
JAK2 ^{V617F} allele burden	16%	72%
Salassi negli ultimo 6 mesi	-	76%

Sono disponibili i dati presentati all'ultimo Annual Meeting of the American Society of Hematology (Dicembre 2010), discussi dal principal investigator dello studio, Dr S.Verstovsek, valutati dopo un follow-up mediano di 15 mesi dall'inizio della studio.

Tutti i pazienti con PV (n=34) continuano a mantenere l'indipendenza dai salassi, inoltre il 97% dei casi riesce anche a mantenere valori di ematocrito inferiori al 45%. Per quanto riguarda la splenomegalia, alla diagnosi presente nel 74% dei casi, è stata ottenuta una riduzione di almeno il 50% del volume o la scomparsa nel 59%. La leucocitosi (> 15x10⁹/L) presente nel 47% dei soggetti è migliorata nell'88% e si è normalizzata nel 63% dei pazienti (Figura 1). La piastrinosi (> 600x10⁹/L) presente nel 38% dei casi è migliorata e normalizzata nel 92% e nel

69%, rispettivamente, dei pazienti. Considerando i criteri di ELN il 97% dei pazienti ha ottenuto una risposta, il 59% dei soggetti è in RC di malattia avendo ottenuto l'indipendenza dalle trasfusioni, la normalizzazione di milza, valori di GB e piastrine. Non sono state osservate tossicità di grado 4, le forme di tossicità di grado 3 correlate al trattamento sono state piastrinopenia (2 pazienti), neutropenia (1), neoplasia renale (1), astenia (1), infezioni virali (1), flutter atriale (1).

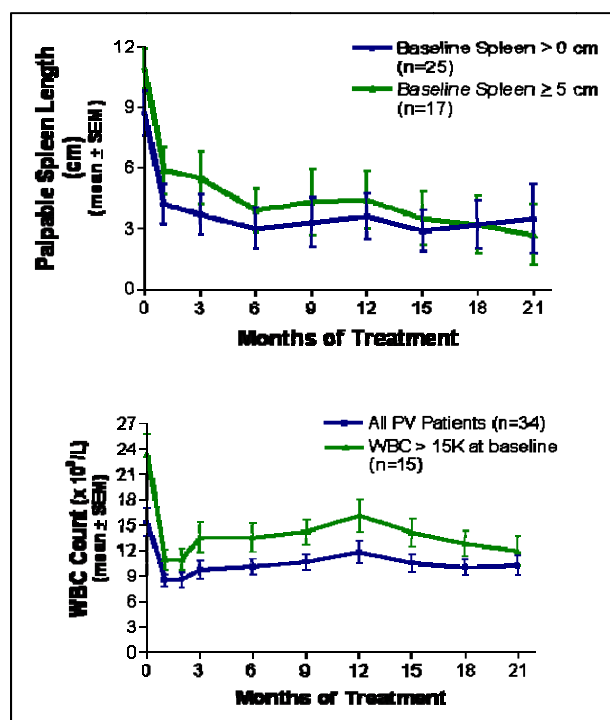


Figura 1: La riduzione della splenomegalia e della leucocitosi nei pazienti affetti da PV in seguito al trattamento con INCB18424

Per i pazienti con ET (n=39), il 49% dei casi ha ottenuto la normalizzazione delle piastrine già dopo una mediana di 0.5 mesi, il 82% ha mantenuto il valore delle piastrine < 600x10⁹/L per una mediana di 9.8 mesi e 13/14 pazienti arruolati con piastrine >1000x10⁹/L hanno ottenuto la riduzione di almeno il > 50% (figura 2). In 3/4 pazienti è scomparsa la splenomegalia e in 1 caso si è ridotta di almeno il >50%. Il 90% dei pazienti ha ottenuto una risposta secondo i criteri ELN, 49% dei soggetti è in RC di malattia ottenendo, la normalizzazione di milza, valori di GB e piastrine. Anche in questo caso non sono state osservate tossicità di grado 4, e le forme di grado 3 correlate al trattamento sono state leucopenia (2 pazienti), neuropatia periferica (1), tossicità gastrointestinale (1).

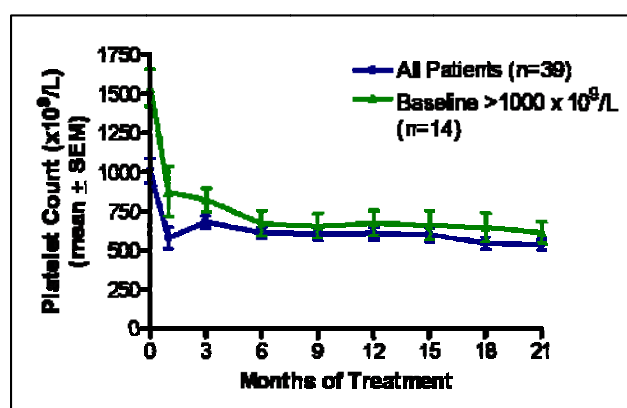


Figura 2: La riduzione della piastrinosi nei pazienti affetti da ET in seguito al trattamento con INCB18424

9 pazienti con ET hanno interrotto il trattamento: 4 per evento avverso serio, 2 per ritiro del consenso e 3 casi di non risposta; mentre 6 pazienti con PV hanno interrotto il trattamento: 3 per evento avverso serio, 2 per ritiro del consenso e 1 caso di non risposta. Attualmente continuano lo studio con un follow-up mediano di 21 mesi (range 8-28) 28/34 (82%) pazienti con PV e 28/39 (72%) pazienti con ET. I dosaggi nel tempo sono stati modificati sulla base delle risposte e possono essere riassunti come nella tabella VIII.

Tabella VIII: dosaggi attuali di INCB18424 nei pazienti inseriti nel protocollo.

	< 5 mg BID	5-10 mg BID	15 mg BID	20-25 mg BID	< 25 mg BID
PV	0	66	14	14	7
ET	3	40	17	33	7

Entrambi i gruppi di pazienti hanno riferito la riduzione dei sintomi sistemici: prurito, sudorazione notturna e dolori ossei, come viene rappresentato nella figura 3.

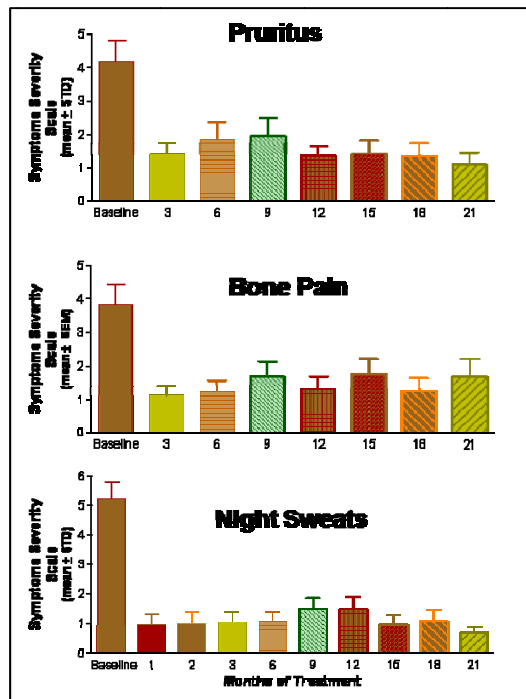


Figura 3: Controllo del prurito, dei dolori ossei e della sudorazione notturna nei pazienti affetti da PV e ET in seguito al trattamento con INCB18424

Per quanto riguarda la valutazione del burden allelico, per ogni paziente, ogni tre mesi di trattamento, veniva bancata una quota di DNA estratto da granulociti su cui poi è stata valutata la carica allelica di JAK2. Il 42% dei casi con PV e il 56% dei pazienti con ET hanno avuto un calo della carica allelica JAK2V617F di almeno il 20%; solo il 6% delle PV e il 12% delle ET ha presentato una riduzione di almeno >50% (figura 4). L'ottenimento di una risposta clinica non era correlato con la presenza/l'assenza della mutazione all'arruolamento o con il calo del burden allelico durante il trattamento.

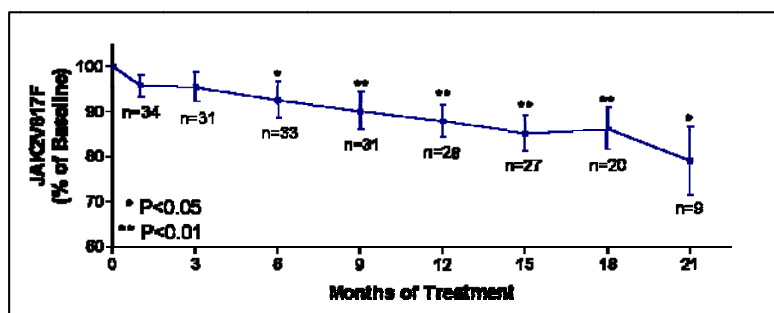


Figura 4: Riduzione del burden allelico di JAK2V617F nei pazienti affetti da PV e ET in seguito al trattamento con INCB18424

In seguito al beneficio ottenuto dai pazienti con mielofibrosi è iniziato circa un anno fa il protocollo di fase III negli Stati Uniti e in Italia “**INCB18424-352, COMFORT-II: CO**ntr**OL**lled **M**yl**o**F**IB**ros**IS** study with **OR**al JAK inhibitor **T**reatment” che prevede la randomizzazione tra inibitore di JAK2 e la miglior terapia disponibile, che al momento nella maggior parte dei pazienti è rappresentata da HU. Sono stati arruolati in 65 centri europei 219 pazienti, Firenze ne ha arruolati 9. L’arruolamento era previsto per pazienti affetti da Mielofibrosi Primaria, Mielofibrosi post-Policitemia Vera, Mielofibrosi post-Trombocitemia Essenziale con classe di rischio IWG intermedio-2 o alta e splenomegalia palpabile ≥ 5 cm dall’arcata costale. L’endpoint primario è la riduzione del volume della milza $\geq 35\%$ a 1 anno di trattamento e la valutazione della sicurezza e tollerabilità, gli endpoint secondari sono Overall survival (OS), Leukemia free survival, Progression free survival, la riduzione del volume della milza $\geq 35\%$ a 6 mesi e la modifica dell’istologia midollare. Tutti i pazienti seguiti presso il nostro centro in terapia con INCB 18424 hanno completato 1 anno di trattamento: in 6/7 casi è stato ottenuto un miglioramento clinico (riduzione splenomegalia), la riduzione del prurito e il miglioramento delle condizioni generali, tuttavia con una certa tendenza all’anemizzazione e un caso piastrinopenia $<100000/\text{mmc}$.

In questi giorni inoltre è in fase di arruolamento il protocollo di fase III, randomizzato, multicentrico, in aperto per lo studio dell’efficacia e della sicurezza di INCB18424 in pazienti affetti da PV resistenti o intolleranti a HU, chiamato The RESPONSE Trial. La figura 5 mostra il disegno dello studio il cui endpoint primario è alla 32° settimana il controllo dell’ematocrito in assenza di salassi e la riduzione della splenomegalia di almeno il 35%, valutato mediante risonanza magnetica; l’endpoint secondario è l’ottenimento della RC alla 32° settimane e il mantenere i risultati nei soggetti alla 32° fino alla 48° settimana.

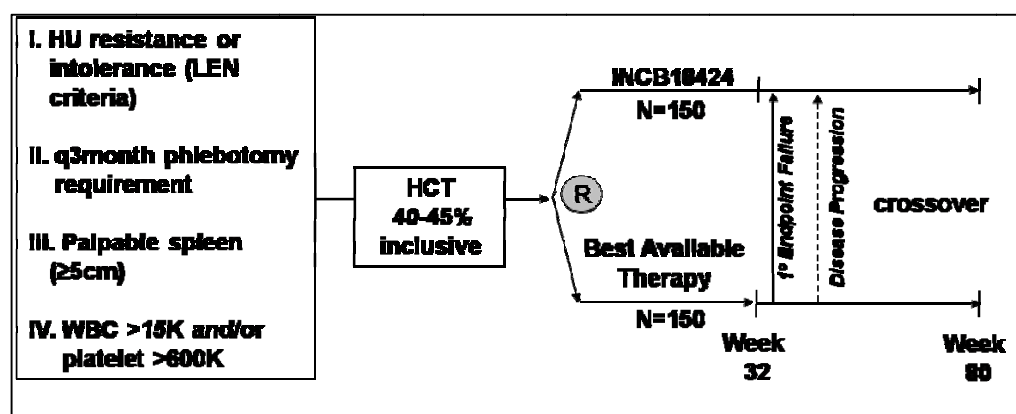


Figura 5: Disegno dello studio The Response

CAPITOLO 5

LA TERAPIA CON GLI INIBITORI DI mTOR

LA PATHWAY PI3K / AKT / mTOR

Per molto tempo la ricerca oncologica ha incentrato la sua attenzione sul ruolo centrale svolto da RAS, primo oncogene identificato come tale, nella trasformazione neoplastica. Approfondite ricerche biochimiche e molecolari sui componenti delle cascate segnalatorie a monte e a valle di questa piccola GTPasi in organismi modello hanno mostrato un importante ruolo svolto dai recettori tirosin chinasi (RTKs) e dalle mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Conservato durante l'evoluzione dagli uccelli ai mammiferi, il ruolo di centrale importanza di questa pathway nella proliferazione di cellule neoplastiche è stato confermato dai successi clinici ottenuto con l'uso di farmaci attivi contro le tirosin kinasi, come ad esempio Trastuzumab (Herceptin) e Imatinib (Glivec). Negli ultimi anni una seconda pathway a valle dei RTK che coinvolge la Phosphatidilinositolo-3 chinasi (PI3K), AKT e mTOR, ha guadagnato un ruolo di pari importanza come regolatrice della proliferazione cellulare e della sopravvivenza cellulare nei mammiferi. Molte componenti della pathway PI3K/AKT/mTOR si trovano alterate nelle cellule neoplastiche; l'attivazione e la conseguente autofosforilazione dei RTK nelle rispettive porzioni intracellulari, particolarmente in corrispondenza dei residui di tirosina, facilita l'interazione con p85, la subunità regolatoria di PI3K. PI3K è un eterodimero costituito da p85, ad attività regolatoria, e p110, la subunità catalitica che trasferisce il gruppo γ -phosphate dall'ATP al phosphatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP2) generando il phosphatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3) e ADP. Il legame di p85 ai residui tirosinici fosforilati dei RTK porta PI3K in prossimità del substrato PIP2 e probabilmente induce anche un cambiamento allosterico necessario all'attivazione. I RTK possono attivare anche direttamente PI3K via RAS, che si lega ed attiva la subunità p110. PI3K è regolata negativamente da fosfatasi cellulari quali ad esempio PTEN, che agisce defosforilando il PIP3 a PIP2; anche una ridotta espressione di PTEN può contribuire all'oncogenesi stimolando indirettamente l'attivazione di PI3K. PIP3 recluta AKT attraverso il legame al suo dominio pleckstrin homology (PH) in prossimità della membrana plasmatica dove AKT viene fosforilata e attivata dalle Serina/Treonina chinasi PIP3-dipendenti 1 (PDK1). L'attivazione di AKT porta la molecola stessa a svolgere a sua volta un'attività serino/treonina chinasi attivando effettori a valle fra i quali mTOR. L'inizio della trascrizione è regolato dallo stato fosforilativo di 4EBP1, una piccola proteina di circa 19KDa, la cui associazione con eIF4E, la subunità cap-binding del

complesso eIF4F, reprime l'inizio della trascrizione. La forma non fosforilata di 4EBP1 lega in maniera specifica eIF4E inibendo la trascrizione e quindi la successiva sintesi proteica, mentre in risposta a stimoli proliferativi 4EBP1 viene fosforilata a livello dei residui di Serina e Treonina da mTOR ed altre chinasi promuovendo il distacco di eIF4E il quale è libero di associarsi con eIF4G, eIF4A e eIF4B per formare il complesso eIF4F facilitando la trascrizione cap-dipendente¹¹⁸. Questa cascata di eventi porta ad un incremento della trascrizione di mRNA caratterizzati dalla presenza di elementi regolatori nelle 5'-untranslated terminal regions (5'-UTR), compresi mRNA codificanti per c-MYC, ciclina D1 e ornitina decarbossilasi; in contrasto, l'assenza di fattori di crescita o il trattamento con la Rapamicina impedisce la traduzione di molecole necessarie alla transizione dalla fase G1 a S del ciclo cellulare, risultando quindi in un arresto della proliferazione. Abbondanti evidenze sperimentali indicano che mTOR è direttamente responsabile della fosforilazione di 4EBP1; è stato infatti dimostrato che inibitori di mTOR bloccano la fosforilazione di 4EBP1 sottolineando così questa stretta associazione¹¹⁹. Alcune osservazioni indicano che mTOR potrebbe anche agire indirettamente come inibitore di Serina/Treonina fosfatasi che agiscono defosforilando 4EBP1 quando la cellula si trova in condizione di progredire dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare^{120 121}.

Le proteine della famiglia TOR hanno funzioni pleiotropiche e sono coinvolte nella regolazione dell'inizio della trascrizione dell'mRNA, nella traduzione proteica, nell'organizzazione del citoscheletro actinico, nel trafficking di membrana, nella degradazione proteica, nel signalling di PKC e nella biogenesi ribosomale. Mammalian target of Rapamycin (mTOR), conosciuto anche come FRAP, RAFT1 e RAP1, è stato identificato come una chinasi chiave che agisce a valle dell'attivazione della PI3K come switch del catabolismo e anabolismo cellulare determinando di fatto la crescita e la proliferazione cellulare; inoltre mTOR sembra avere importanti effetti sul fenomeno dell'apoptosi¹²². La proteina mTOR ha un peso molecolare di circa 289KDa e si associa in due complessi denominati mTORC1, definito dall'interazione con la molecola accessoria regolatoria RAPTOR (150KDa) e mTORC2, definito dall'interazione con RICTOR. Il complesso mTORC1 è sensibile all'inibitore Rapamicina mentre il complesso mTORC2 sembra essere insensibile anche se recenti studi sembrano dimostrare una sensibilità anche del complesso mTORC2 alla Rapamicina¹²³. Il complesso mTORC1 fosforila la chinasi S6 e 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4EBP1) mentre mTORC2 agisce sul citoscheletro actinico. In virtù dell'azione sull'inizio della trascrizione, mTOR svolge un ruolo chiave nel regolare la progressione del ciclo cellulare verso la fase G1; infatti, in risposta a stimoli proliferativi, cellule quiescenti aumentano la trascrizione del subset di mRNA necessari per il ciclo cellulare in risposta alla cascata segnalatoria di cui mTOR è un attore principale. La proteina mTOR contiene numerosi domini con sequenze e posizioni altamente conservate attraverso l'evoluzione: le proteine mTOR nell'uomo, nel topo e nel ratto condividono il 95% dell'identità

di sequenza aminoacidica, a suggerire un ruolo essenziale di questi domini per la attività della proteina. L'estremità amino-terminale di mTOR è costituita da 1200 aminoacidi organizzati in tandem repeats chiamati Huntington domain , elongation factor 3, subunità regolatoria A della protein fosfatasi 2A e Tor 1p (HEAT domain); questi motivi consistono in porzioni di circa 40 aminoacidi con almeno 3 repeats e mostrano un pattern di residui idrofobici ricchi in Prolina, Acido Aspartico e Arginina. L'estremità C-terminale della proteina contiene un dominio FRAP-ataxia telangiectasia-mutated, transformation/transcription domain-associated protein detto FAT e compreso fra gli aminoacidi 1382 e 1928 nell'uomo, un dominio di legame per FKBP12-Rapamicina detto FRB, un dominio catalitico e un dominio carbossi-terminal homology denominato FACT; si ipotizza che i domini FAT e FACT modulino l'attività chinasi attraverso interazioni intramolecolari.

La pathway PI3K/AKT/mTOR e' risultata alterata in un ampio spettro di neoplasie: in tumori solidi ed ematopoietici c'è un diretto coinvolgimento dei RTK, nei carcinomi gastrointestinali si riscontra l'attivazione di RAS, altrimenti sono state evidenziate l'attivazione di chinasi quali S6K1 o eIF4E per mutazioni e amplificazioni geniche o perdita di molecole regolatorie quale PTEN. Non sono tuttavia note mutazioni a carico del gene codificante la proteina mTOR che comunque si riscontra iperattività in molti tumori; la perdita della funzione di p53 potrebbe spiegare la costitutiva attivazione di mTOR in quanto proprio p53 svolge un ruolo di regolazione negativa su tale molecola.

RAD001: PROPRIETA' BIOLOGICHE E APPLICAZIONI CLINICHE

L'utilizzo di inibitori della chinasi mTOR può portare all'inibizione della crescita cellulare inducendo effetti anti-tumorali in molti tipi di disordini maligni; pertanto, negli ultimi anni sono stati numerosi gli sforzi per definire e sviluppare specifici inibitori di tale pathway.

La Rapamicina (Figura XX), conosciuta anche come Sirolimus, e' un macrolattone ciclico prodotto da *Streptomyces Hygroscopicus*; fu scoperta in un campione di terreno proveniente dall'Isola di Pasqua, conosciuta dai suoi abitanti come Rapa Nui, da cui questo composto prende il nome. La Rapamicina e' un composto cristallino di colore bianco non solubile in acqua ma solubile in solventi organici e risulta come una miscela dei due isomeri conformazionali *cis-trans* dovuti alla rotazione di un legame amidico nel suo anello macrolidico composto da 31 membri. Inizialmente ha trovato impiego come farmaco antifungino diretto contro *Candida Albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Asperigillus fumigatus*. Nel 1990 ha ottenuto l'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) come agente immunosoppressore per l'utilizzo nel trapianto di reni. La formazione del complesso attivo consiste nella formazione del complesso di interazione fra Rapamicina e FK506-binding protein 12 (FKBP12); tale complesso media effetti antiproliferativi inibendo l'attività catalitica di mTOR

in seguito al legame sul dominio FRB. Il principale effetto della Rapamicina è l'induzione dell'arresto della crescita in fase G1 del ciclo cellulare; inoltre tale composto induce un effetto pro-apoptotico in numerosi tipi di cellule tumorali se somministrato in alte concentrazioni¹²⁴⁻¹²⁶; e induce apoptosi anche in linfociti B e T non maligni e in linfociti 'double-null' in modelli murini di sindrome linfoproliferativa autoimmune¹²⁵. La Rapamicina è un inibitore specifico di mTOR come confermato da esperimenti su embrioni murini nei quali induce esattamente lo stesso difetto nello sviluppo che si riscontra nei topi knockout per il gene codificante mTOR. In cellule tumorali che hanno una pathway PI3K/AKT/mTOR attivata, il trattamento con Rapamicina o con i suoi derivati blocca il legame di Raptor a mTOR e ciò si riflette in una mancata fosforilazione degli effettori a valle 4EBP1 e S6K1. La defosforilazione della S6K1 causa una riduzione nella sintesi proteica mentre la defosforilazione di 4EBP1 porta ad una ridotta capacità di trascrizione di mRNA codificanti c-MYC, ciclina D1 e ornitina decarbossilasi.

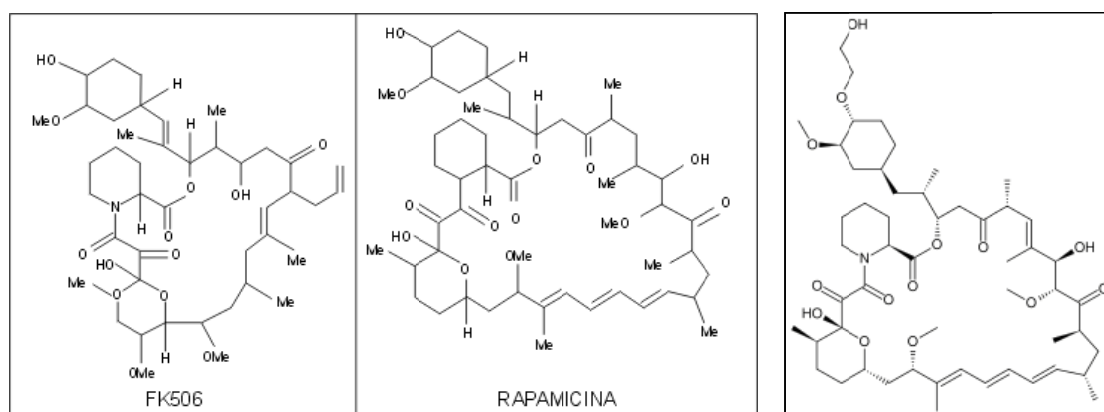


Figura 6: struttura della Rapamicina e della molecola FK506 e RAD001

Nonostante le proprietà citotossiche della Rapamicina fossero note, questo farmaco è sempre stato utilizzato come immunosoppressore, soprattutto per il suo profilo di tossicità e la scarsa solubilità in acqua. Per tale motivo sono state prodotte tre diverse molecole derivate dalla rapamicina, con funzione analoga, in grado di legarsi anch'esse all'immunofillina intracellulare FKBP12 e di interagire con la chinasi mTOR inibendola: CCI-779 (Temsirrolimus), AP23573 (Deforolimus) e RAD001 (Everolimus).

Temsirrolimus e Deforolimus sono esteri solubili analoghi del Sirolimus con attività citostatica in un ampio spettro di cellule tumorali sia *in vitro* che *in vivo* in modelli animali per il carcinoma prostatico e il glioblastoma nel caso di CCI-779 e metastasi ossee o neoplasia primitive dall'osso nel caso di AP23573.

RAD001 (40-O-[2-hydroxyethyl]-rapamycin) o Everolimus (Figura 6) è un macrolide ciclico isolato dallo *Streptomyces Hygroscopicus* e con attività di immunosoppressore naturale. Si

differenza dalla rapamicina per la presenza di una stabile sostituzione 2-hydroxyethyl in posizione 40. Attualmente è l'unico inibitore di mTOR disponibile in forma orale; ha un'alta affinità per la molecola FKBP12 attraverso la quale esercita la sua azione di inibizione della proliferazione e crescita dipendenti da fattori bloccando la transizione dalla fase G1 alla fase S; ha inoltre un effetto sulla crescita delle cellule tumorali tramite l'inibizione dell'angiogenesi, in particolare inibendo la proliferazione delle cellule endoteliali vasali tramite la riduzione della produzione di VEGF. Everolimus viene rapidamente assorbito (C_{max} mediano 1 ora); nel sangue intero, circa 80% del farmaco è sequestrato negli eritrociti, del rimanente 20% presente nella frazione plasmatica solo un quarto non è legato a proteine. Il metabolismo e l'escrezione sono prevalentemente a livello epatico per attività del citocromo P450 (CYP) 3A4, 3A5 e 2C8, l'emivita del farmaco è di circa 30 ore. Studi di fase I in pazienti affetti da neoplasie solide ed ematologiche hanno osservato principalmente tra gli effetti collaterali disturbi gastrointestinali, rash cutanei e stomatiti, fatigue e cefalea. Le più frequenti alterazioni laboratoristiche indotte dall'uso di Everolimus sono l'aumento dei livelli di colesterolo e fibrinogeno, iperlipidemia, riduzione dei livelli di albumina, leuco- e piastrinopenia. Negli animali è stata descritta una tossicità reversibile a carico degli organi sessuali (spermiogenesi) in casi di trattamento cronicizzato. Non c'è evidenza di riduzione della fertilità femminile, embrio/fetotossicità, né di genotossicità. Non c'è induzione alla carcinogenesi.

Dal 1996, RAD001 è stato somministrato a più di 3000 soggetti in almeno 15 studi clinici, compresi quelli di fase III, per valutarne l'attività di immunosoppressore in pazienti sottoposti a trapianto di organo (cuore, rene e polmone). In tutti questi studi è stato associato ad altri immunosoppressori (ciclosporina, corticosteroidi e anticorpi monoclonali) e ne è stata dimostrata l'efficacia nel ridurre l'incidenza del rigetto acuto dopo trapianto, con attività equivalente a quella del micofenolato; attualmente viene utilizzato per il trattamento di profilassi per il rigetto del trapianto renale e cardiaco. Successivamente uno studio di fase II (placebo-controllo) effettuato in 121 pazienti affetti da artrite reumatoide, ha descritto come l'inibizione di mTOR indotta da RAD001 fosse in grado di ridurre la proliferazione sinoviale patologica.

L'identificazione della deregolazione del complesso di mTOR in diversi tipi di neoplasie ha rinforzato l'interesse a valutarne le possibilità terapeutiche in forme avanzate di neoplasia; inizialmente è stato studiato su 24 linee di cellule tumorali, la maggior parte delle quali sono risultate sensibili con IC50 mediano di 8.8 nM.

L'effetto anti-neoplastico di RAD001 coinvolge diversi meccanismi, tra cui l'inibizione della crescita cellulare, l'induzione dell'apoptosi, l'inibizione dell'espressione di geni che controllano l'adesione cellulare, la migrazione e l'angiogenesi; tuttavia il blocco di queste attività cellulari da parte di RAD001 è diverso nei diversi tipi di neoplasie. Everolimus può inoltre essere

utilizzato in associazione con altri chemioterapici, agisce in maniera additiva o sinergica con paclitaxel e doxorubicina, potenzia l'attività del cisplatino e della gemcitabina sia in vivo che in vitro¹²⁷, permettendo il loro utilizzo in linee cellulari altrimenti resistenti e una riduzione del dosaggio. Dal 2002 diversi trial clinici hanno iniziato a testarne l'efficacia e la sicurezza in pazienti con neoplasie solide, principalmente in studi di fase I e II per il carcinoma della mammella, carcinoma del rene e del colon, microcitoma polmonare e tumori neuroendocrini. In uno studio di fase I su 55 pazienti con neoplasia solida in fase avanzata il trattamento con Everolimus a 5 e 10 mg/die oppure a 20, 50, e 70 mg/settimana ha determinato un significativo risultato clinico, tra cui una risposta parziale in un caso di carcinoma del colon¹²⁸.

Nel campo dei disordini ematologici, si ritiene possa avere efficacia sia su tumori di derivazione mieloide che linfoide. E' stato dimostrato come RAD001 sia in grado di inibire in vitro la crescita di cellule di leucemia acuta mieloide tramite il blocco in fase G0/G1 del ciclo cellulare, impedendo l'attività clonogenica delle cellule leucemiche e risparmiando i progenitori normali. In seguito a questi dati, è stato utilizzato nel trattamento di 9 pazienti con leucemia acuta mieloide refrattaria o ricaduta, ottenendo nel 20% dei casi una normalizzazione dell'emocromo e una remissione parziale di malattia nel 50% dei casi. E' stato inoltre effettuato uno studio di fase I/II per determinare la tossicità e la sicurezza del farmaco in pazienti con disordini ematologici refrattari o ricaduti. Sono stati trattati 27 pazienti (9 LAM, 5 MDS, 6 LLC, 4 LHN mantellari, 1 MF, 2 T-NHL) al dosaggio di 5 e 10 mg/die, Everolimus si è dimostrato maggiormente efficace nei pazienti affetti da sindrome mielodisplastica ed è risultato ben tollerato alla dose di 10 mg/die¹²⁹.

Everolimus ha inoltre dimostrato un effetto antileucemico in forme di LMC resistenti all'imatinib; è stato testato in 6 pazienti in ricaduta ematologica ottenendo in due di essi una drastica riduzione della leucocitosi e in altri 2 casi una risposta minore transitoria, in tutti i casi è stata descritta una riduzione dei livelli di mRNA di VEGF nelle cellule leucemiche¹³⁰. Risultati promettenti sono stati descritti nel trattamento dei linfomi non HDG, soprattutto nel linfoma mantellare, in quanto strettamente dipendente dall'attività della ciclina D1, la cui attività è regolata da mTOR. RAD001 inibisce la proliferazione di linee cellulari di linfoma mantellare nel 40-60% dei casi, inoltre ha dimostrato un effetto sinergico con vincristina, doxorubicina, rituximab e bortezomib. Su un campione di 35 pazienti, in stadio IV con malattia in progressione, il trattamento con analoghi della rapamicina ha determinato una percentuale di risposte pari al 38% con 1 caso di remissione completa^{131,132}.

Il razionale per testare Everolimus nei pazienti affetti da mielofibrosi deriva da alcuni studi che hanno dimostrato

1. alcune pathway mTOR-dipendenti sono attivate dalla trombopoietina nelle cellule emopoietiche umane

2. l'inibizione di pathway mediate da mTOR ha effetti negativi sulla proliferazione e la differenziazione megacariocitaria in soggetti sani, come suggerito anche dalla comparsa di piastrinopenia in fase di trattamento
3. l'effetto antiangiogenetico dimostrato in esperimenti in vitro su colture di cellule endoteliali umane e in vivo su modelli animali; evidenze sperimentali dimostrano come la rapamicina e i suoi derivati possano inibire la produzione di VEGF e VEGF-R
4. blocco della proliferazione dei fibroblasti dell'intima vasale

RAD001: STUDI IN VITRO

Gli studi in vitro che abbiamo condotto si sono focalizzati inizialmente sull'inibizione di mTOR e della via di trasmissione del segnale a valle, con molecole come la rapamicina che studi recenti hanno dimostrato come non fosse in grado di andare a bloccare entrambi i complessi di cui mTOR è formato, TORC1 e TORC2.

Per superare le limitazioni e degli svantaggi degli inibitori allosterici di mTOR, sono state sviluppate una serie di nuove molecole che agiscono in maniera competitiva sul sito attivo ATP; tra queste, PP242 è risultata in grado di bloccare sia le attività mediate da TORC1 and TORC2 sia di esercitare una potente attività citotossica nei confronti di cellule leucemiche. Quindi tutti gli studi in vitro sono stati effettuati utilizzando entrambe le molecole.

Gli inibitori di mTOR bloccano la proliferazione delle linee cellulari JAK2V617F positive

Per valutare se le linee cellulari leucemiche umane JAK2V617F positive fossero sensibili agli inibitori di mTOR sono state utilizzate entrambe le molecole: RAD001 e PP142. Abbiamo visto come le linee cellulari HEL e SET2 JAK2V617F positive fossero più sensibili agli inibitori di mTOR delle linee BCR/ABL positive, come le K562: i valori di IC₅₀ erano rispettivamente, 1400 nM, 200 nM, and 16000 nM per RAD001, e 1500 nM, 285 nM and 9300 nM per PP242 (Tabella IX A). Inoltre abbiamo valutato gli effetti del RAD001 anche in cellule murine IL-3-dipendenti (Ba/F3) o EPO-dipendenti (Ba/F3-EPOR) con espressione di JAK2 wild-type o JAK2V617F. Abbiamo notato che le cellule Ba/F3 mutate, sia in assenza (IC₅₀= 10 nM) o in presenza (IC₅₀=10 nM) di IL-3 nel terreno di coltura, erano più sensibili al RAD001 della controparte JAK2 wt (IC₅₀=2600). Ugualmente, nelle cellule Ba/F3-EPOR, IC₅₀ per le cellule JAK2V617F positive è 651 nM e 1213 nM in assenza e in presenza di EPO, rispetto al IC₅₀ >10000nM nelle cellule JAK2 wt. PP242 è risultato avere un'efficacia paragonabile; nelle cellule Ba/F3-EPOR JAK2 wt IC₅₀ era di 5931 nM rispetto 98 nM e 750 nM nelle V617F sia in presenza che in assenza di EPO (Tabella IXB).

Tabella IX. Determinazione di IC₅₀ negli inibitori di mTOR su diverse linee cellulari umane e murine.

A.

Farmaco	K562	HEL	SET2
RAD001 (nM)	16000 ± 2,500	1400 ± 2,800	200 ± 15 **
PP242 (nM)	9300 ± 550	1500 ± 113**	285 ± 11 **

B.

Farmaco	BaF/3 –IL3			BaF/3 –EPO		
	WT	V617F	V617F +IL3	WT	V617F	V617F +EPO
RAD001 (nM)	2600 ± 1200	10 ± 4 **	10 ± 5 **	>10000	651 ± 50 **	1,231 ± 100 **
PP242 (nM)	NA	NA	NA	5,931 ± 1000	98 ± 5 **	750 ± 100 **

*, P<0.05; ** P<0.00.

RAD001 e PP242 alla concentrazione di IC₅₀ causano un aumento delle cellule SET2 e HEL in fase G0/G1 del ciclo cellulare e riducono proporzionalmente la frazione di cellule in fase S (Figura 7). La frequenza delle cellule in fase G0/G1, S e M del ciclo cellulare è stata misurata in citofluorimetria dopo aver incubato le cellule per 18h con la concentrazione di IC₅₀ di RAD001. Dall'altro lato gli inibitori di mTOR non riescono a indurre un significativo aumento dell'apoptosi nelle linee SET2 (Figura 7) o HEL; l'apoptosi è stata misurata in citofluorimetria e valutata come la percentuale di cellule positive all'annessina V, in questo caso sulle cellule SET2 dopo un'incubazione per 48h con vari dosaggi di inibitori mTOR: RAD001 e PP242, la frazione di cellule necrotiche veniva identificata con doppia positività Annessina-propidio. Da ulteriori esperimenti in vitro RAD001 è risultato in grado di ridurre il potenziale clonogenico delle linee cellulari JAK2V617F mutate (HEL, SET2 e UKE-1) più facilmente che le K562. Inoltre la formazione delle colonie dalle cellule Ba/F3 V617F positive era inibita a concentrazioni significativamente inferiori di RAD001, sia in presenza che in assenza di IL-3 nel medium, rispetto alla controparte wt. Questi dati documentano quindi che le cellule con la mutazione JAK2V617F sono più sensibili agli inibitori di mTOR.

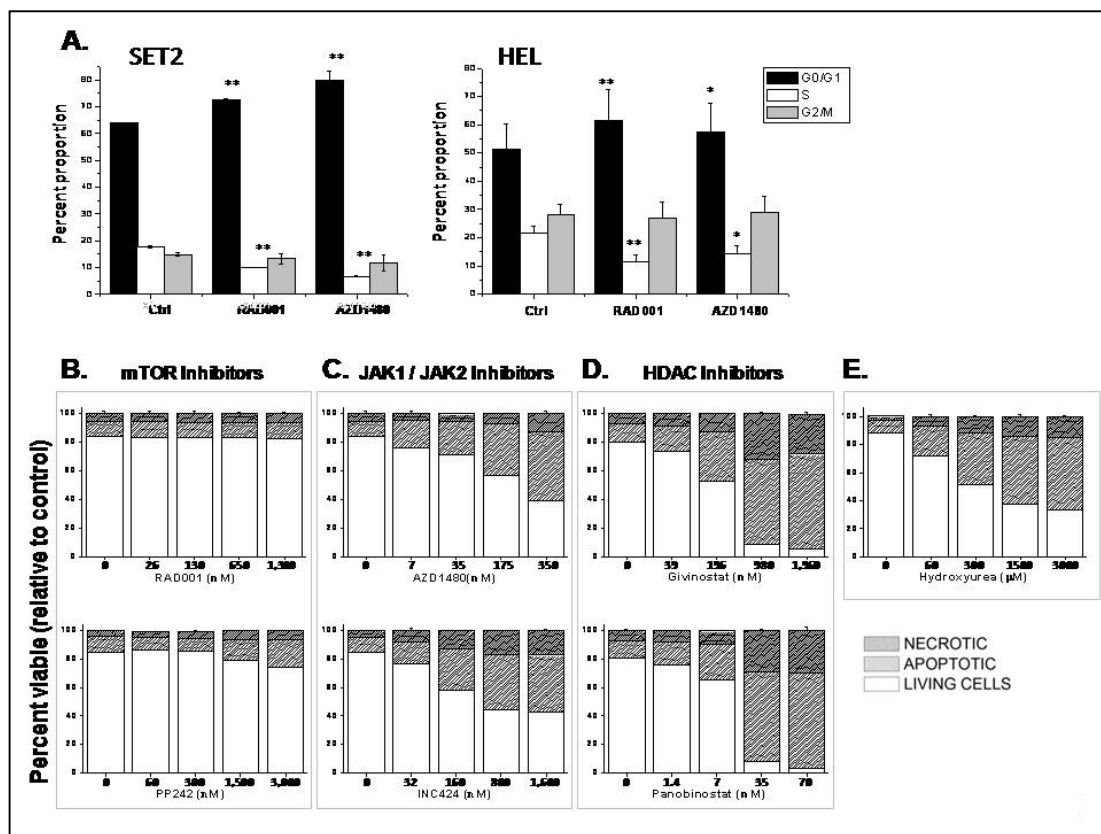


Figura 7: L'effetto degli inibitori di mTOR, di JAK1/JAK2, dell'istone deacetilasi e idrossiurea sull'apoptosi e ciclo cellulare nelle SET2 e HEL . Risultati presentati come media±SD. *, P<0.05; **, P<0.01.

In seguito sono stati confrontati i risultati ottenuti con gli inibitori di mTOR con quelli ottenuti con altri farmaci attualmente in studio come gli inibitori di JAK1/JAK2, AZD1480 e INC424, e gli inibitori dell'istone deacetilasi (HDAC), Givinostat e Panobinostat.

Queste molecole sono state dimostrate essere efficaci nell'inibizione della crescita di cellule HEL e SET2 a concentrazioni di IC₅₀ significativamente inferiori rispetto a quelle nelle linee cellulari K562 (Tabella X), ma a differenza degli inibitori di mTOR, sono anche potenti induttori di apoptosi (Figura 7C,D). Da sottolineare, le cellule HEL (IC₅₀=410 nM) e SET2 (IC₅₀=330 nM) risultano molto più sensibili all'idrossiurea delle K562 (IC₅₀=4,910 nM) (Tabella X); l'inibizione della proliferazione dovuta all'HU è inoltre associata con l'apoptosi in maniera dose dipendente (Figura 7E).

Tabella X: Determinazione di IC₅₀ negli inibitori di mTOR, inibitori di JAK1-JAK2 e istone deacetilasi su diverse linee cellulari umane e murine.

*, P<0.05; ** P<0.00.

Farmaco	K562	HEL	SET2
RAD001 (nM)	16,000 ± 2,500	1,400 ± 2,800	200 ± 15 **
PP242 (nM)	9,300 ± 550	1,500 ± 113 **	285 ± 11 **
AZD1480 (nM)	5,300 ± 100	860 ± 20 *	90 ± 5 **
INC424 (nM)	>20,000	790 ± 150 **	160 ± 24 **
Panobinostat (nM)	31 ± 8	8 ± 3 *	7 ± 2 *
Givinostat (nM)	508 ± 5	175 ± 30 *	196 ± 12 *
HuOH (μM)	4,910 ± 15	410 ± 20 *	330 ± 11 *

- Gli inibitori di mTOR attenuano la trasmissione del segnale nella pathway e riducono la fosforilazione di STAT5 nelle linee cellulari JAK2V617F mutate

Successivamente è stato valutato l'effetto degli inibitori di mTOR sulla trasduzione del segnale nelle cellule JAK2V617F mutate usando come modello la linea cellulare SET2. Le cellule sono state incubate per 24 ore con concentrazioni crescenti di farmaco e il livello della proteina o della sua forma fosforilata (JAK2, STAT5, e 4EBP1) è stato analizzato mediante tecnica di western blot. La tubulina è stata usata come controllo, ogni esperimento è stato ripetuto 2-4 volte. Abbiamo osservato che il trattamento con RAD001 e PP242 riduce in maniera dose-dipendente la fosforilazione dei target di mTOR, 4EBP1 e STAT5, mentre JAK2, e la sua forma fosforilata, non vengono coinvolti. Al contrario gli inibitori di JAK1/JAK2, AZD1480 e INC424, riducono marcatamente e in maniera dose-dipendente la fosforilazione di JAK2 e STAT5, non coinvolgendo 4EBP1 (Figura 8). Gli inibitori delle istone deacetilasi, Panobinostat e Givinostat invece riducono in maniera dose-dipendente JAK2 e la sua forma fosforilata, STAT5 solo fosforilato e con Givinostat sembra esserci una riduzione anche di 4EBP1 fosforilato. L'idrossiurea invece non riduce i livelli di 4EBP1, STAT5 o JAK2 e le loro forme fosforilate (figura 8).

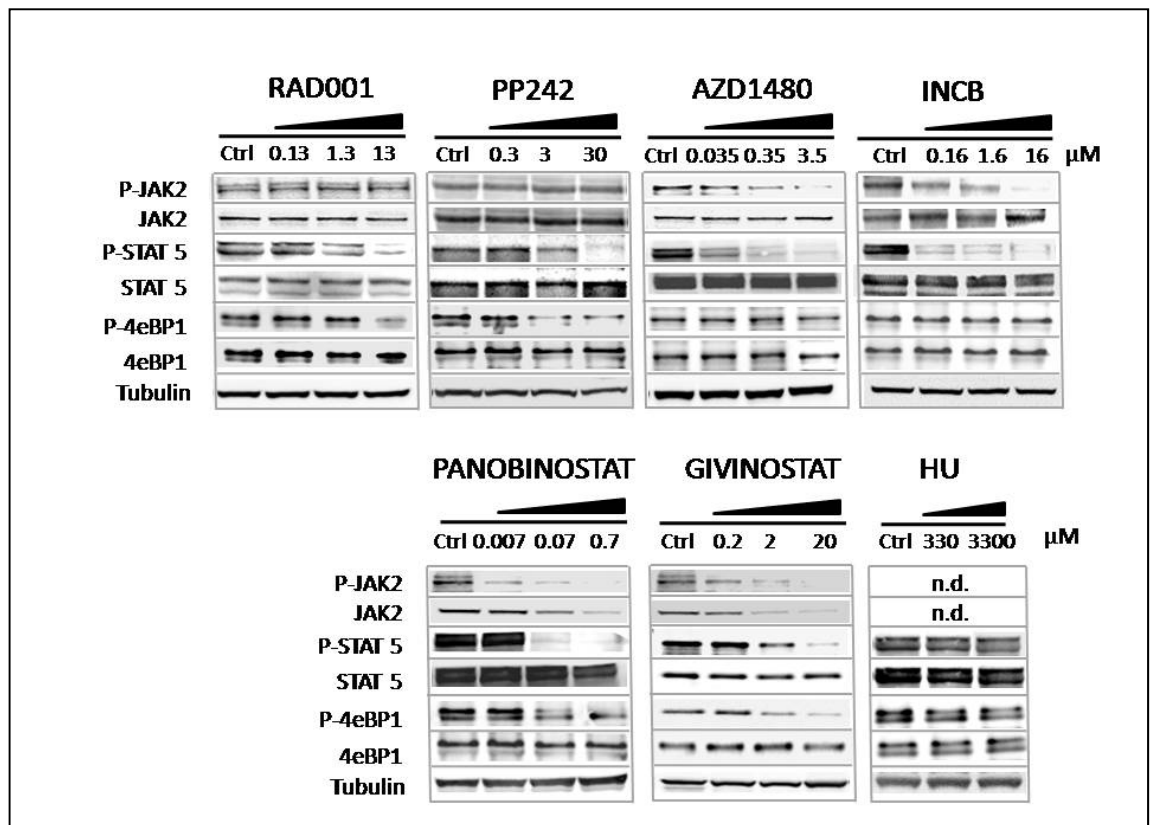


Figura 8: L'effetto degli inibitori di mTOR, degli inibitori di JAK1/JAK2, degli inibitori dell'istone deacetilasi e dell'idrossiurea sulla via di trasmissione del segnale di mTOR e JAK/STAT nelle cellule SET2.

Per meglio caratterizzare la correlazione tra JAK2V617F e l'attivazione della pathway di mTOR, e le successive conseguenze con l'uso degli inibitori, sono state utilizzate le cellule BA/F3 e Ba/F3-EPOR. Le cellule murine Ba/F3-IL3 dipendenti sono state incubate con RAD001 per 60 minuti e per 24 h, in entrambi i casi in presenza e in assenza di IL-3 (10 ng/mL). Tramite metodica di western blotting è stata valutata la presenza delle proteine 4E-BP1 o STAT5, anche nella loro forma fosforilata. Per ogni condizioni sono state programmate tre prove diverse.

Abbiamo osservato che una debole fosforilazione di 4E-BP1 era presente nelle cellule wt mantenute in assenza di IL-3 o EPO, mentre nelle cellule V617F le proteine erano iperfosforilate; inoltre l'aggiunta di IL-3 o EPO portava ad un aumento della fosforilazione di 4E-BP1 sia nelle Ba/F3 JAK2 wt e V617F mutate sia nelle Ba/F3-EPOR (Figura 9).

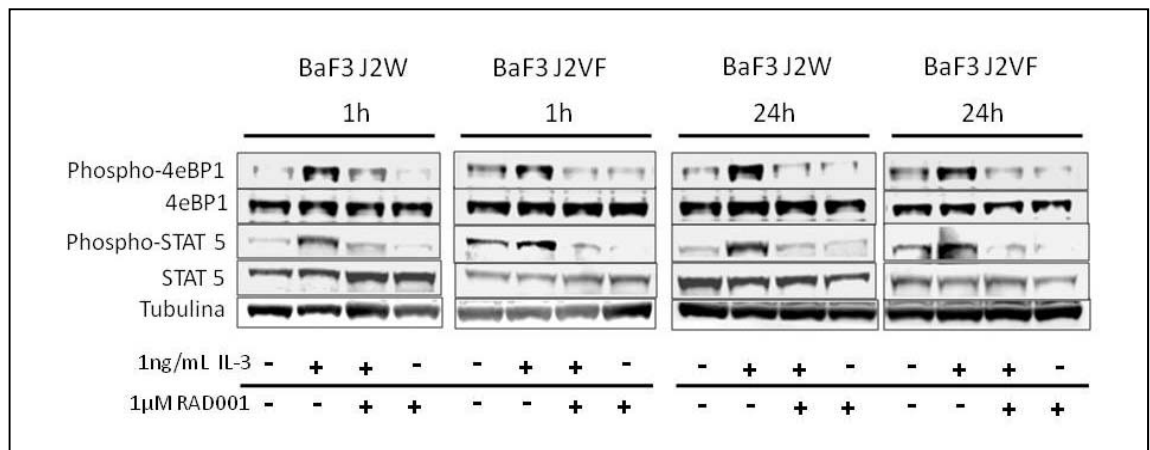


Figura 9. L'inibizione della fosforilazione di 4E-BP1 e STAT5 dopo trattamento con RAD001 nelle cellule Ba/F3 wild-type e JAK2V617F mutate.

Quando RAD001 veniva aggiunto al terreno di coltura veniva documentata una marcata inibizione della fosforilazione di 4E-BP1 già dopo 60 min (Figura 9) e persisteva fino a 24 ore sia nelle cellule Ba/F3 wt e V617F. Come riportato⁴¹, la fosforilazione di STAT5 è maggiore nelle cellule V617F rispetto alle Ba/F3 JAK2 wt senza IL-3 o EPO o le cellule Ba/F3-EPOR, in entrambi i casi ri-aumentava subito dopo l'introduzione della citochina. Si osserva inoltre anche una attenuazione della fosforilazione di STA5 già dopo 60 min dall'introduzione del RAD001, che diventa massima dopo 24 ore di incubazione.

- L'inibizione di mTOR con i siRNA previene la fosforilazione di 4E-BP1 e STAT5

I dati ottenuti mostrano un link funzionale tra l'inibizione di mTOR e la fosforilazione di STAT5. Per confermare che l'attenuazione della fosforilazione di STA5 fosse veramente mediata da mTOR piuttosto che da un effetto diretto del RAD001 su STAT5 o su un altro fattore intermedio, mTOR è stato silenziato con uno specifico siRNA nelle cellule HEL. Le cellule HEL sono state transfettate con siRNA contro mTOR, o con un altro siRNA per un bersaglio cellulare irrilevante, con metodica di western blot dopo 24-48 ore sono state valutate le proteine e la loro forma fosforilata, ogni esperimento è stato eseguito almeno 2 volte. Sebbene il trattamento con siRNA riduca i livelli di mTOR di solo il 50-60% a 24h, il livello di 4E-BP1 fosforilato si riduceva drammaticamente rispetto al controllo; mentre la proteina 4E-BP1 non si modificava (Figura 10). A 48 h, mTOR e 4E-BP1 fosforilati erano appena visibili. Il livello di STAT5 fosforilato era marcatamente ridotto già dopo 24 ore nelle cellule transfettate e dopo 48 h la fosforilazione di STAT5 risultava completamente inibita, senza modifiche alla proteina STA5 (figura 10).

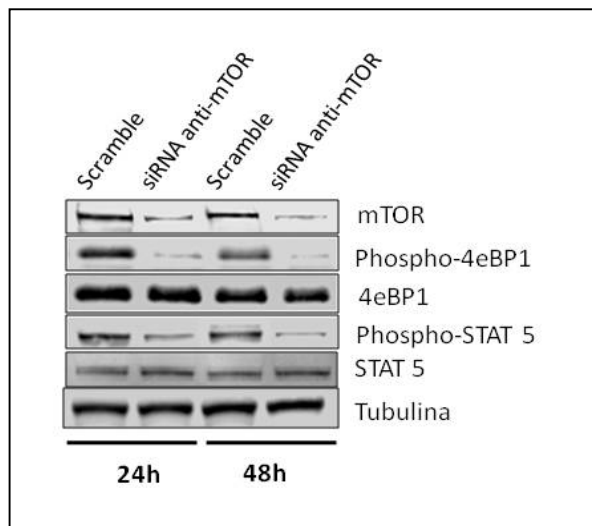


Figure 10. Inibizione della fosforilazione di STAT5 mediante siRNA.

- RAD001 effettivamente inibisce la proliferazione delle cellule CD34⁺ e riduce l'attività clonogenica dei progenitori emopoietici di pazienti con MPN

Per valutare se la proliferazione delle cellule CD34⁺ di pazienti con MPN fosse efficientemente inibita bloccando la pathway di mTOR, abbiamo incubato le cellule CD34⁺ di pazienti con mielofibrosi (n=6) con dosi crescenti di RAD001; utilizzando come controllo cellule CD34⁺ di 4 soggetti sani. Le cellule CD34⁺ sono state piastrate in duplicato alla concentrazione di 10³/mL con terreno di coltura addizionato di citochine ed esposte a varie concentrazioni di farmaco; la valutazione in microscopia veniva eseguita dopo 6 giorni.

Come mostrato nella figura 11, la proliferazione delle cellule CD34⁺ di PMF era inibita a concentrazioni di RAD001 significativamente inferiori (IC₅₀=290 nM) rispetto ai controlli sani (IC₅₀>=5,000 nM) (P<0.001); abbiamo ripetuto lo stesso esperimento utilizzando anche l'inibitore JAK1/JAK2, AZD1480, anche in questo caso per i pazienti con PMF le concentrazioni di farmaco necessarie sono significativamente inferiori (IC₅₀=470 nM vs IC₅₀=900 nM).

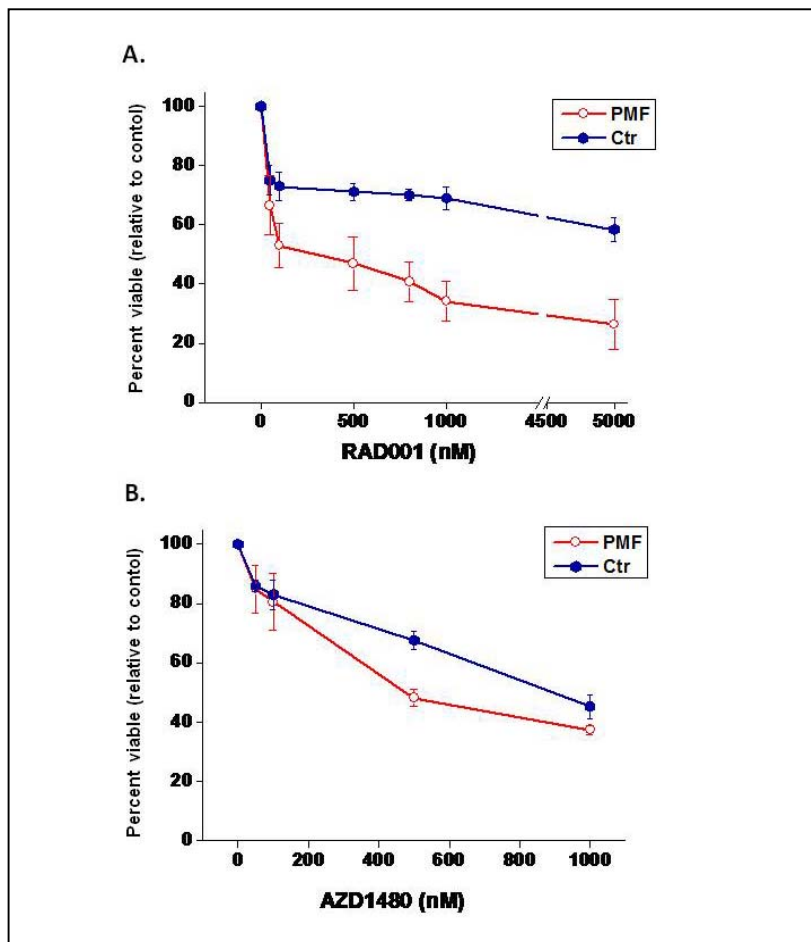


Figura 11. Inibizione della proliferazione delle cellule CD34⁺ di pazienti con PMF mediante trattamento con RAD001 o AZD1480.

L'effetto dell'inibizione di mTOR sul potenziale clonogenico dei progenitori emopoietici di pazienti con MPN è stato valutato mediante coltura di cellule CD34⁺ in presenza di citochine per supportare la crescita di BFU-E, CFU-G/GM, CFU-Mk; sono stati utilizzati le cellule di 10 pazienti con PV JAK2V617F positivi, 5 pazienti con PMF JAK2V617F mutati o JAK2 wild-type, e 10 controlli. Le cellule CD34⁺ sono state piastrate alla concentrazione di 10³/mL in un medium di metilcellulosa con supplemento di citochine, il farmaco è stato aggiunto all'inizio della coltura a concentrazioni crescenti fino a 500 nM. Le colonie venivano valutate al giorno 14. Esperimenti paralleli sono stati condotti utilizzando AZD1480, ma su un numero di casi inferiori, 5 pazienti per PV, 5 per PMF e 5 controlli (Figura 12B).

Le EEC sono state valutate utilizzando un sistema di coltura privo di citochine e aggiungendo RAD001 a dosaggi di 1, 5 e 40 nM e sono state valutate al giorno 12 (Figura 12C), sono state utilizzate cellule di 10 pazienti con PV, 5 con una carica allelica nei granulociti maggiore del 50% (omozigoti) e 5 eterozigoti.

Abbiamo notato che la crescita delle cellule CD34⁺ era inibita a concentrazioni significativamente inferiori di RAD001; IC₅₀ per BFU-E, CFU-GM, e CFU-Mk nei controlli era

rispettivamente 432 ± 22 nM, 335 ± 16 nM, e 572 ± 13 nM, rispetto a 41 ± 15 nM, 75 ± 4 nM, e 50 ± 5 nM nei casi di PV e 42 ± 10 nM, 46 ± 13 nM, 44 ± 5 nM nei casi di PMF; tutte queste differenze sono risultate statisticamente significative ($P < 0.01$) (Figura 12A). Apparentemente non ci sono differenze nella risposta dei soggetti *JAK2* wild-type e V617F mutati. Infine, bassissime concentrazioni nanomolari di RAD001 bloccano la crescita efficientemente delle EEC di pazienti con PV, sia in omozigosi ($IC_{50} = 3.0 \pm 2.0$ nM) che in eterozigosi ($IC_{50} = 33.0 \pm 5.0$ nM) ($n = 5$ pazienti in ogni gruppo) (Figura 12C).

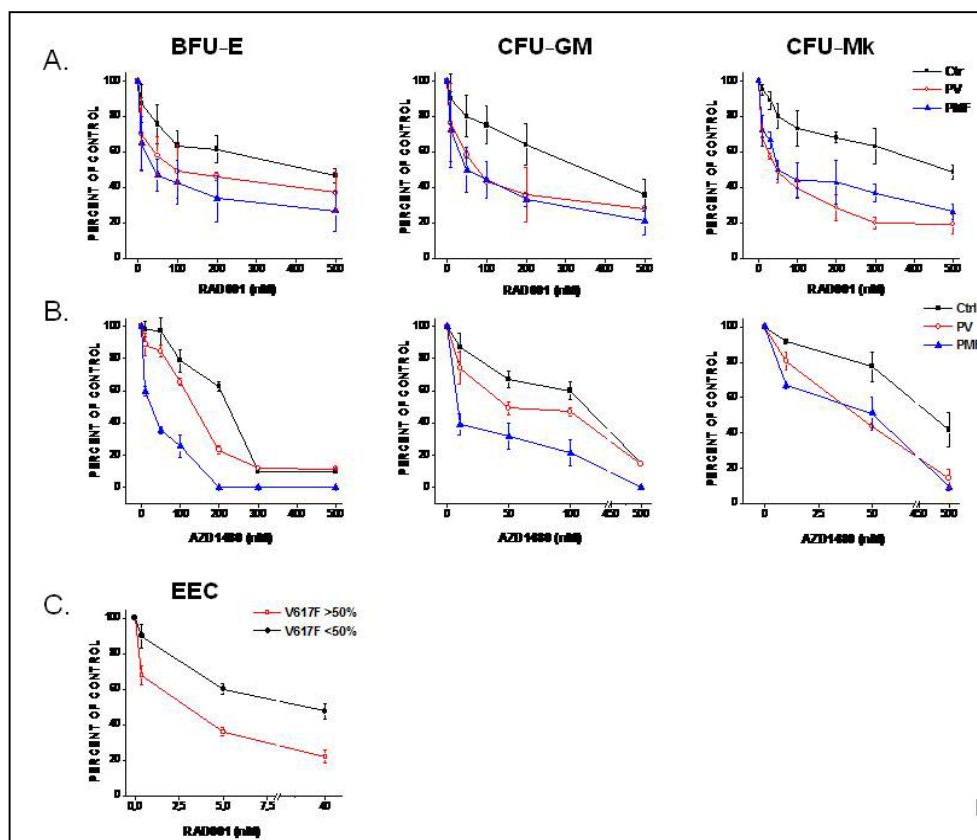


Figura 12. Inibizione della crescita clonogenica dei progenitori emopoietici di pazienti con MPN in seguito a esposizione con inibitori di mTOR, RAD001, e di JAK1/JAK2, AZD1480.

Risultati simili si sono osservati anche in caso di incubazione con l'inibitore JAK1/2, AZD1480. La formazione delle BFU-E era inibita a IC_{50} di 135 ± 19 nM, 27 ± 8 nM, e 226 ± 17 nM in pazienti con PV, PMF e nei controlli rispettivamente ($P < 0.01$); per le CFU-GM le concentrazioni erano 46 ± 5 nM, 9 ± 3 nM, e 193 ± 13 nM ($P < 0.01$), mentre per CFU-MK l' IC_{50} era 44 ± 2 nM per i pazienti con PV, 69 ± 3 nM per PMF e 400 ± 12 nM per i controlli ($P < 0.01$) (Figura 12B).

Valutando la presenza della mutazione di JAK2, in ogni singola colonia, dopo coltura di cellule CD34+ di pazienti con PV in terreno con citochine, abbiamo riscontrato una riduzione delle colonie *JAK2*V617F positive in presenza di 50 nM RAD001 che variava dal 15% al 72% (mediana

21%), suggerendo che la presenza di RAD001 ha un maggior effetto di inibizione della crescita delle cellule *JAK2V617F* mutate (Tabella XI).

Tabella XI: Effetti del RAD001 sulla quota di colonie *JAK2* wild-type e V617F mutate in test clonogenici da cellule CD34+ di pazienti con MPN

Pazienti	RAD001 (50 nM)	% colonie WT	% colonie V617F	% riduzione delle colonie V617F
1	-	80	20	70
	+	94	6	
2	-	53	47	15
	+	60	40	
3	-	28	72	21
	+	43	57	
4	-	52	48	17
	+	58	40	
5	-	68	32	72
	+	91	9	

- Combinazione di RAD001 e AZD1480 per un effetto sinergico di inibizione delle linee cellulari *JAK2V617F* positive e la formazione di EEC

Abbiamo inoltre valutato gli effetti di inibizione simultanea di mTOR e JAK1/JAK2 in cellule SET2 e Ba/F3-EPOR-V617F misurando l'inibizione della proliferazione. Le cellule SET2 sono state incubate con concentrazioni differenti di RAD001 o PP242 e AZD1480 o INC424; usando le diverse combinazioni, successivamente è stato calcolato il Combination Index (CI) in accordo con la metodica Chou and Talaly (CalcuSyn software); trovare $CI < 1$ indica che l'interazione tra i due farmaci è sinergica, quando $CI = 1$ indica che l'interazione è additiva e quando $CI > 1$ indica antagonismo dei farmaci. Abbiamo ottenuto un indice di combinazione (CI) con valori compresi tra 0.12 e 0.47, che suggerisce una forte attività sinergica tra i due tipi di farmaci (Tabella XII). Nelle cellule Ba/F3-EPOR V617F la combinazione di RAD001 e AZD1480 ugualmente porta a un CI inferiore a 1.0, sebbene l'effetto della sinergia si meno marcato.

Tabella XII: Combinazione di inibitori di mTOR e JAK1/JAK2, con attività sinergica sulla proliferazione di cellule SET2 e Ba/F3-EPOR-JAK2V617F

Linee cellulari	IC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)		CI index
	Per singolo farmaco		Combinazione dei farmaci		
SET2	RAD001 200 ± 15	AZD1480 90 ± 5	RAD001 10	AZD1480 3.5	0.13
	RAD001 200 ± 15	INC424 160 ± 24	RAD001 13	INC424 18	0.20
	PP242 285 ± 11	AZD1480 90 ± 5	PP242 107	AZD1480 3.5	0.47
	PP242 285 ± 11	INC424 160 ± 24	PP242 5.7	INC424 16	0.12
EPO-dependent Ba/F3 JAK2V167F	RAD001	AZD1480	RAD001	AZD1480	CI index
+ EPO	1231 ± 100	707 ± 11	41	580	0.85
- EPO	651 ± 50	313 ± 23	22	220	0.73

Le prime due colonne in grigio indicano i valori di IC₅₀ calcolati per ogni farmaco, come riportati nella tabella X

RAD001: STUDIO IN VIVO

Per la valutazione dell'efficacia e della sicurezza del farmaco nei pazienti affetti da mielofibrosi è stato condotto uno studio clinico registrato come ANZCTR #12608000614392, multicentrico di fase I/II. La fase I è stata disegnata per determinare la massima dose tollerata (MTD) basandosi sulla dose limite di tossicità (DLT) del RAD001 in tre coorti di pazienti con dosaggio a crescere di 5.0, 7.5, e 10.0 mg per 3 mesi, arruolando 3 pazienti per ogni coorte. Dopo aver definito la MTD veniva iniziata la fase 2 per determinare l'efficacia del RAD001, secondo un disegno "Simon's two-stage" arruolando rispettivamente 16 e 14 pazienti. La durata del trattamento della fase 2 era di 4 mesi (Figura 13).

Il protocollo è stato valutato e approvato dell'ISS e dal comitato etico locale per la sperimentazione farmaci.

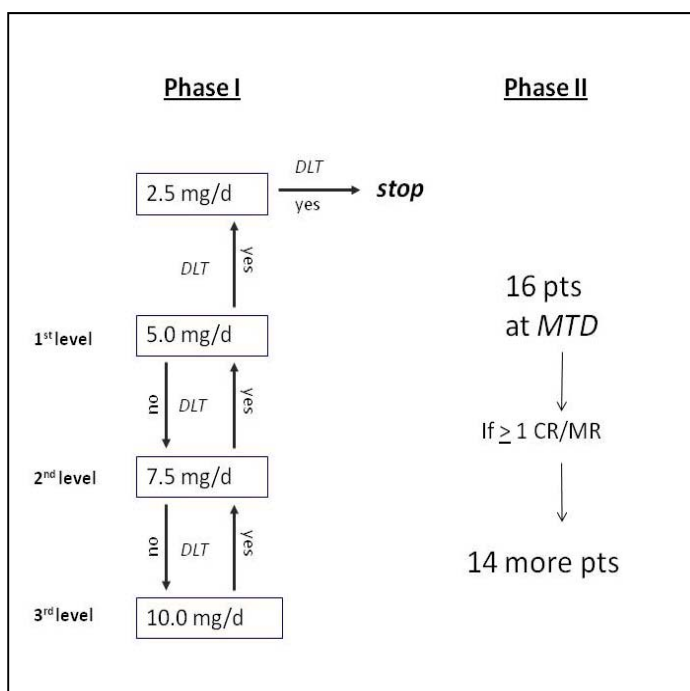


Figura 13. Flow-chart del protocollo. La fase 1 include 3 coorti di pazienti con dose a crescere (5.0, 7.5, 10.0 mg/day per 3 mesi) per determinare la massima dose tollerata (MTD); in caso di assenza di tossicità limitante la dose (DLT), il dosaggio di 10 mg/die viene scelto di default per la Fase 2. La DLT viene valutata alla fine di ogni mese di trattamento prima di procedere con la successiva somministrazione di farmaco. L'aumento di dose è permesso solo se nessun paziente incluso nella coorte sviluppa DLT; se ci fosse un caso di DLT, 3 ulteriori pazienti dovrebbero essere valutati allo stesso dosaggio. La fase 2 consta di 2 blocchi, il primo di 16 pazienti, nel caso dell'ottenimento di almeno 1 remissione completa o una risposta maggiore è possibile arruolare altri 14 pazienti. La durata della fase 2 è di 4 mesi

I pazienti per essere arruolati dovevano essere affetti da PMF o PPV/PET-MF, secondo i criteri WHO e IWG-MRT, non aver mai ricevuto trattamento o essere resistenti/refrattari alle precedenti linee di terapia. La necessità di iniziare una terapia veniva definita sulla base di un rischio intermedio-alto di malattia secondo lo score Lille o per i pazienti a basso rischio per la presenza di splenomegalia importante (≥ 10 cm oltre il margine costale sinistro). Durante lo studio sono stati valutati una serie di marcatori di malattia e di bersagli molecolari del RAD001 (conta delle cellule CD34+, la carica allelica di JAK2V617f o di MPLW515L/K, i livelli di WT1, il livello di espressione della ciclina D1 e glut1 e il dosaggio di citochine plasmatiche o proteine infiammatorie).

In tutto sono stati arruolati 39 pazienti (caratteristiche cliniche all'arruolamento nella tabella XIII), 22 pazienti erano affetti da PMF, 11 da PPV-MF e 6 da PET-MF. Il 67% era positivo per la mutazione JAK2V617F e due pazienti erano positivi per le mutazioni a carico del gene MPL. La

durata mediana di malattia era 2.3 anni (range 0.1 a 20) e il 77% dei casi aveva già ricevuto una precedente linea di trattamento, principalmente idrossiurea, dimostrandosi resistente. Il 23% dei casi era trasfusione dipendente e il 67% riferiva sintomi sistemici e prurito. Il 50% dei pazienti veniva considerata a rischio alto o intermedio-2, il 33% a rischio intermedio-1 e il 17% a basso rischio secondo IPSS.

Tabella XIII. Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nel protocollo

	Fase 1 (9 pazienti)	Fase 2 (30 pazienti)
Età, mediana (range)	58 (46-76)	62 (37-79)
Sesso (M/F)	5/4	20/10
PMF/PPV/PET	6/3/0	16/8/6
Durata di malattia, mesi mediana (range)	66 (7-126)	28 (1-237)
Lille score, No. (%)		
0	7	20
1	2	10
2	0	0
IWG-MRT, No. (%)		
Low	2	5
Int-1	5	10
Int-2	2	8
High	0	7
WBC x10⁹/L mediana (range)	12.2 (2.6-37.5)	12.3 (4.1-50.3)
Hb g/L, mediana (range)	126 (100-147)	114 (75-173)
Piastrine x10⁹/L, mediana (range)	250 (111-609)	300 (99-1149)
LDH (media±SD)	583.4±169.8	969.0±583.0
JAK2V617F mutati, No. (%)	7 (78)	20 (67)
JAK2V617F allele burden (media±SD)	55.4±37.8	64.2±20.8
CD34⁺ cells, % (media±SD)	0.24±0.17	0.96±1.55
CD34⁺ cells x10⁶/L (media±SD)	27.8±34.4	96.8±115.5
Splenomegalia, cm da LMC (media±SD)	14 (4-17)	14 (2-25)
Precedenti linee di terapia (%)	7 (77.7)	23 (76.7)
Dipendenza da trasfusioni No. (%)	0	7 (23.3)
Prurito, No. (%)	6 (67)	20 (66.7)
Sintomi sistemici No. (%)	5 (56)	20 (66.7)

Non è stata raggiunta una DLT nelle tre coorti di pazienti arruolati nella fase I, quindi per la fase II è stato utilizzato un dosaggio giornaliero di RAD001 di 10 mg. Cinque dei 30 pazienti arruolati nella fase II (17%) non hanno completato i quattro mesi di trattamento. Le motivazioni sono state il rifiuto di un paziente, l'esclusione dal protocollo per decisione medica in 2 casi, un caso di insufficienza renale reversibile di grado 3 considerata non correlabile al farmaco, un caso di polmonite, considerata correlabile al farmaco, che ha portato a insufficienza respiratoria in un quadro cronico di BPCO e successivamente a morte del paziente. I principali effetti collaterali (Tabella XIV) non ematologici sono stati stomatiti di grado 1-2 in

circa il 70% dei pazienti e l'aumento dei livelli di trigliceridi e colesterolo; la tossicità ematologica è stata modesta e rappresentata principalmente dal peggioramento dell'anemia nel 30% dei casi, neutropenia di grado 1-2 e piastrinopenia nel 7% e 3% dei pazienti, rispettivamente.

Tabella XIV. Principali effetti collaterali dei pazienti inclusi nella fase 2

Effetto collaterale	Tutti i gradi (%)	Grado ≥ 3 (%)
Diarrea	13	0
Fatigue	40	6
Mialgia	37	0
Stomatiti	70	3
Lesioni cutanee	27	0
Emorragia	17	0
Ipertrigliceridemia	57	0
Ipercolesterolemia	27	0
Aumento AST	7	3
Aumento ALT	10	3
Polmoniti	7	7
Insuff. renale	3	3
Altro	20	0

L'analisi dei risultati è stata basata su "Intention to treat" (ITT), 25 pazienti (83%) erano valutabili. Per quanto riguarda la fase I nella coorte da 5 mg/die ci sono state 2 risposte moderate e 1 maggiore; in quella da 7.5 mg/die 1 risposta moderata e 2 casi di malattia stabile; mentre in quella da 10 mg/die ci sono state 1 risposte minore e 2 malattia stabile (in accordo ai criteri EUMNET).

L'analisi dei risultati è riportata nella tabella XV. Secondo i criteri EUMNET, 60% dei pazienti possono essere considerati come sensibili al trattamento, in particolare ottenendo 8 casi di risposta maggiore (27%), 7 di moderata (23%) e 3 di minore (10%). Una risposta completa è stata registrata sull'anemia nel 25% dei casi, nel 15% sulla leucocitosi, nel 25% sulla trombocitosi, nel 43% sulla splenomegalia, nel 69% per i sintomi sistemici e nell'80% dei casi

sul prurito. Tutte le risposte sono state ottenute entro il primo mese di trattamento e mantenute per tutta la durata della terapia. (Figure 14). Non sono state riscontrate differenze tra pazienti JAK2 wild-type e V617F-mutati; i due casi MPL mutati hanno ottenuto una risposta maggiore e una non risposta.

Tabella XV. Stratificazione della risposta in base ai criteri EUMNET e IWG-MRT

EUMNET

	INTENTION TO TREAT N=30	PER-PROTOCOL N=25
COMPLETE RESPONSE	0 (0.0)	0 (0.0)
MAJOR RESPONSE	8 (26.7)	8 (32.0)
MODERATE RESPONSE	7 (23.3)	5 (20.0)
MINOR RESPONSE	3 (10.0)	2 (8.0)
NO RESPONSE	12 (40.0)	10 (40.0)
PROGRESSION	0 (0.0)	0 (0.0)

IWG-MRT

	INTENTION TO TREAT N=30	PER-PROTOCOL N=25
COMPLETE RESPONSE	0 (0.0)	0 (0.0)
MAJOR RESPONSE	1 (3.3)	1 (4.0)
MODERATE RESPONSE	6 (20.0)	5 (20.0)
MINOR RESPONSE	0 (0.0)	0 (0.0)
NO RESPONSE	23 (76.7)	19 (76.0)
PROGRESSION	0 (0.0)	0 (0.0)

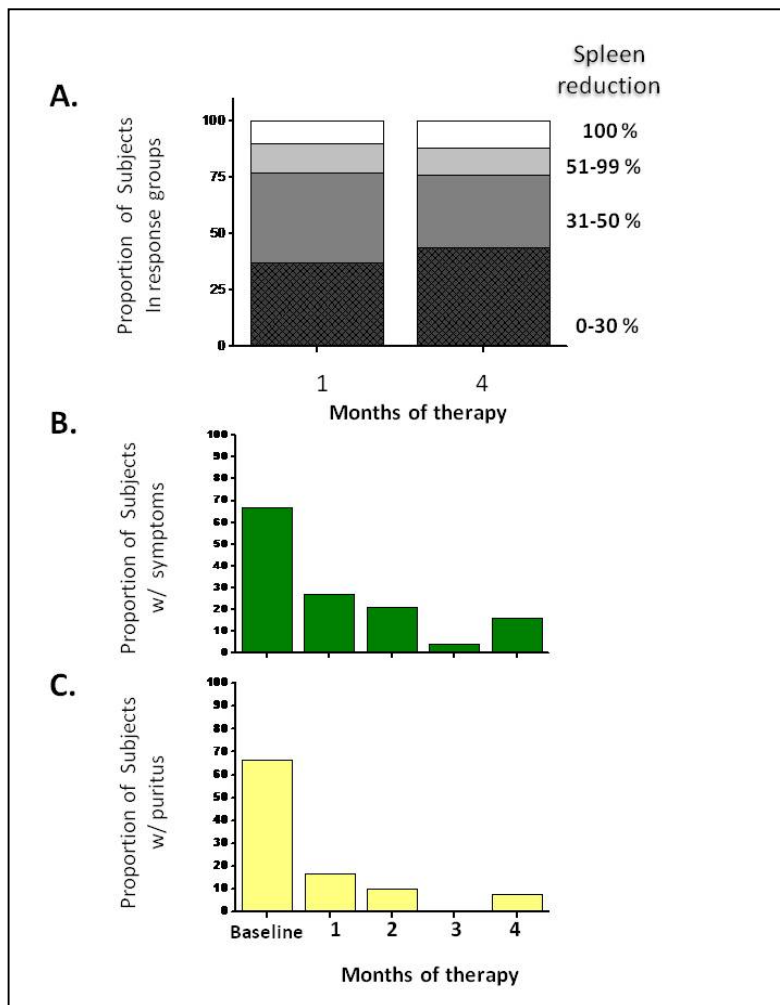


Figure 14. Risposta alla terapia con RAD001: splenomegalia, sintomi costituzionali e prurito. A) la proporzione dei pazienti che hanno presentato una riduzione della splenomegalia dopo 1-4 mesi di terapia, espressa in percentuale rispetto al baseline. La riduzione del volume splenico è già massima dopo un mese di terapia e mantenuta fino alla fine del trattamento. B) e C) rappresentano la proporzione di pazienti con sintomi costituzionali e prurito all'arruolamento e la loro risposta alla terapia ogni mese. Venivano considerati come risposte alla terapia solo i casi di scomparsa del sintomo.

Affiancato allo studio clinico è stato eseguito uno studio biologico ancillare. Sono stati misurati dopo un mese di trattamento i livelli di RNA ottenuto da cellule del sangue periferico dei geni CiclinaD1 (CCDN1) e Glut-1, noti per essere regolati da mTOR fosforilato. I pazienti con risposta clinica secondo i criteri EUMNET avevano una significativa riduzione dei livelli di CCDN1 rispetto ai non-responders ($55 \pm 25\%$ in responders vs $195 \pm 113\%$ in non-responders; $P=0.03$, Figura 15), dato poi confermato anche con l'utilizzo dei criteri IWG-MRT ($60 \pm 33\%$ in responders vs $195 \pm 289\%$ in non-responders). Al contrario, Glut-1 non cambiava significativamente rispetto ai livelli di baseline, così come non ci sono state modificazioni nel numero della conta delle cellule CD34+ circolanti e nella quota di burden allelico (valori

mensile dal mese 1 al 4: $62\pm 20\%$, $62\pm 17\%$, $59\pm 19\%$ e $62\pm 15\%$ vs $64\pm 21\%$ al baseline). I livelli plasmatici di 46 proteine plasmatiche e citochine infiammatorie sono stati misurati al baseline e dopo 1 mese di trattamento. Come già riportato in questi pazienti i livelli basali di citochine infiammatorie sono più elevati dei controlli, ma non sono stati visti cambiamenti significativi dopo la terapia con RAD001 con l'eccezione di alcune proteine, tra cui IL-10, la proteina-1 chemotattica monocitaria e la proteina-1 beta infiammatoria macrofagica, che si sono ridotte comunque meno di due volte.

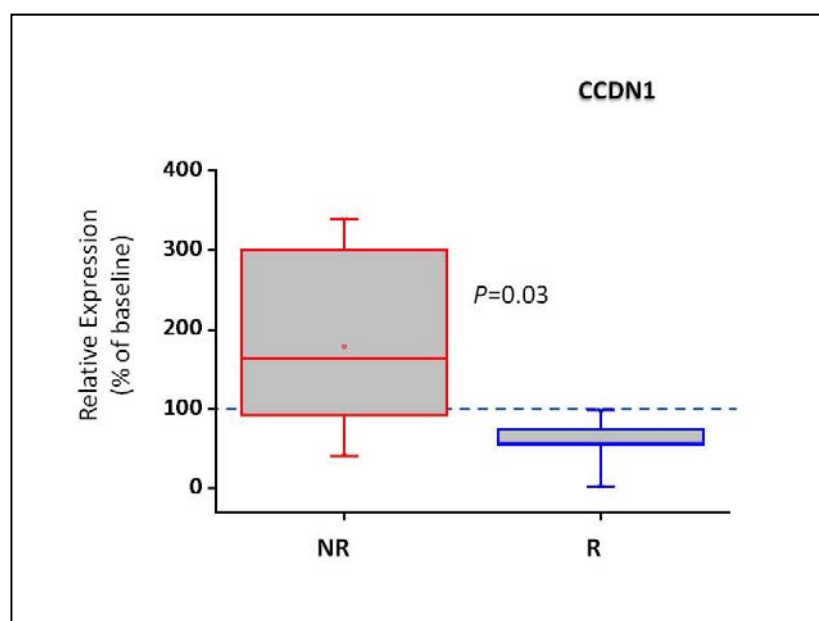


Figura 15. Livelli di CCDN1: cambiamento nel livello di mRNA di CCD1, misurato mediante PCR quantitativa, nei granulociti dei pazienti in terapia con RD001, in accordo alla risposta, definita secondo i criteri EUMNET.

Con questo studio abbiamo quindi documentato come RAD001 sia in grado di riprodurre molti degli effetti riportati con l'utilizzo di inibitori di JAK1 e JAK2: il miglioramento dei sintomi costitutivi, della splenomegalia e del prurito; solo alcuni pazienti hanno presentato una tossicità ematologica caratterizzata dal modesto peggioramento dell'anemia. Come per i JAK2 inibitori è stato visto solo un modesto cambiamento nella carica allelica di JAK2, anche se il breve periodo di tempo di esposizione al RAD001 (4 mesi) potrebbe aver mascherato il potenziale effetto. Infine la riduzione della milza, come per i JAK1 e JAK2 inibitori, avviene molto rapidamente, senza evidenza di lisi di cellule tumorali (nessun incremento di LDH o acido urico) o di migrazione dei progenitori emopoietici (nessun cambiamento della conta delle

cellule CD34⁺); inoltre alla sospensione del farmaco la milza è ritornata alle dimensioni precedenti al trattamento in circa 1-2 mesi. Al momento, il meccanismo non è ancora noto, potrebbero essere coinvolte o un tipo particolare di cellule spleniche neoplastiche o la struttura vascolare splenica, risultando questo un target comune ai JAK1 e JAK2 inibitori e agli inibitori di mTOR.

La maggior parte dei benefici clinici riportati dai pazienti trattati con JAK1 e JAK2 inibitori, INC18424, è stata attribuita al drammatico decremento delle citochine infiammatorie, caratteristicamente ad elevati livelli nei pazienti affetti da mielofibrosi. Al contrario questo tipo di meccanismo non è stato descritto in chi ha ricevuto trattamento con RAD001, nonostante il miglioramenti dei sintomi sistemici.

CAPITOLO 6

LA TERAPIA CON GLI INIBITORI DELLE ISTON DEACETILASI

Il controllo della funzione genica è funzione di molti parametri. Tra questa la capacità di un particolare fattore di trascrizione di legarsi ad un particolare gene è, in parte, funzione delle possibili modificazioni che possono avvenire nelle proteine degli istoni. Gli enzimi istone acetil trasferasi (**histone acetyl transferases**, HATs) sono in grado di alterare la struttura della cromatina aggiungendo alle proteine dell'istone corte catene di atomi di carbonio. Tale alterazione farà cambiare la struttura dell'interazione DNA/istone che perderà la classica forma, favorendo la formazione del legame con i fattori di trascrizione. Un diverso gruppo di enzimi, istone deacetilasi, (**histone deacetylases**, HDACs), è invece, responsabile della rimozione dei gruppi acetili dagli istoni, bloccando il processo di trascrizione. HDACs sono quindi enzimi coinvolti nel rimodellamento della cromatina ed hanno un ruolo chiave nella regolazione epigenetica dell'espressione genica. Inoltre anche l'attività di proteine non istoniche può essere regolata mediante ipoacetilazione da HDAC. Negli ultimi anni, l'inibizione delle HDAC è emersa come potenziale strategia terapeutica in grado di modificare le aberranti alterazioni epigenetiche associate alle neoplasie: numerose classi di inibitori delle HDAC sono risultati avere una potente e specifica attività antineoplastica.

Givinostat (ITF2357; Italfarmaco S.p.A., Cinisello Balsamo, Italy) rappresenta un nuovo composto sintetico inibitore HDAC di classe I e II con una potente attività anti-proliferativa e pro-apoptotica nei confronti di diversi tipi di malattie ematologiche. La maggior parte degli studi condotti in vitro sono stati eseguiti su linee cellulari di mieloma multiplo (RPMI8226, KMS11) e di leucemia acuta mieloide (KG1). Test clonogenici individuano un IC₅₀ di 125 nM e 80 nM rispettivamente per i due tipi di patologie. L'incubazione con Givinostat di queste due linee cellulari per 48 ore aumenta l'apoptosi in maniera dose dipendente, inoltre questo farmaco induce un arresto del ciclo cellulare in fase G₀/G₁. In aggiunta all'attività antitumorale in studi preclinici Givinostat ha dimostrato un'attività di inibizione della produzione e rilascio di numerose citochine infiammatorie tra cui TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN γ e VEGF da parte di cellule neoplastiche, endoteliali e mesenchimali^{133,134}. Givinostat è attualmente impiegato con due tipi diversi di indicazione:

- Le malattie infiammatorie croniche: inizialmente utilizzato per il trattamento della malattia di Chron e della psoriasi a placche con scarsi risultati ha trovato invece indicazione nell'artrite giovanile idiopatica

- Le neoplasie ematologiche: studi di fase II condotti in pazienti con mieloma multiplo¹³³ e leucemia acuta mieloide, in seguito utilizzato anche nella LLC e nel morbo di Hodgkin¹³⁵, attualmente risultati non disponibili. In tutti questi studi Givinostat è stato utilizzato ad una dose di 200 mg/die, con buona tolleranza, i principali eventi avversi descritti erano disturbi gastrointestinali e calo delle piastrine.

ITF2357: STUDI IN VITRO

Guerini et al⁹⁵ hanno valutato l'attività di ITF2357 su cellule JAK2V617F positive di pazienti affetti da PV e ET, e su cellule di linea HEL. L'attività clonogenica delle cellule JAK2V617F veniva inibita da basse concentrazioni di ITF2357 (IC₅₀ 0.001-0.01 microM), da 100 a 250 volte inferiori a quelle necessarie per inibire la crescita di cellule sane o comunque di altre neoplasie JAK2 wt. Inoltre in seguito ad incubazione con ITF2357 si otteneva una crescita sette volte maggiore delle colonie JAK2 negative rispetto alle mutate. Con metodica western blotting hanno stato dimostrato che in cellule HEL ITF2357 riduce la forma normale e fosforilata della proteina JAK2V617, così come pSTAT5 e pSTAT3, senza tuttavia coinvolgere la forma wt delle proteine JAK2 o STAT, nelle cellule di linee di controllo come le K562.

ITF2357: STUDI IN VIVO

Da queste osservazioni preliminari la proposta di un protocollo clinico per valutare la sicurezza e l'efficacia del Givinostat nel trattamento di pazienti affetti da MPN.

Presso l'Ematologa degli ospedali riuniti di Bergamo e il policlinico san Matteo di Pavia è stato condotto uno studio pilota di fase II A, multicentrico, in aperto, non randomizzato (Study No.: DSC/07/2357/28; EudraCT No.: 2007-004480-21).

Lo studio arruolava pazienti con diagnosi di MPN JAK2V617F-positivi in accordo con criteri WHO; per essere elegibili i pazienti dovevano necessitare di terapia citoriduttiva ma essere resistenti o intolleranti a HU in accordo con i criteri proposti dal LeukemiaNet European Collaboration per ET¹³⁶ e PV/MF¹³⁷, oppure potevano essere pazienti giovani che rifiutavano HU per il potenziale leucemogeno. Givinostat veniva assunto per via orale in compresse da 50 mg, al dosaggio di 50 mg x2/die, che poteva aumentare a 50 mg x3/die in caso di assenza di tossicità; il farmaco veniva somministrato per 24 settimane. In caso di effetti collaterali il farmaco veniva sospeso fino alla normalizzazione dei parametri e successivamente re-introdotto ad un dosaggio minore. La valutazione dell'efficacia veniva valutata sulla base di "intention to treat" dopo 12 e 24 settimane, per pazienti con PV/ET la risposta clinica veniva valutata in accordo con i recenti criteri pubblicati dal European LeukemiaNet¹³⁷, nei pazienti con mielofibrosi venivano utilizzati i criteri EUMNET¹³⁸ e IWG¹³⁹.

L'attività del farmaco veniva valutata con un disegno dello studio di tipo "one-stage Fleming" per determinare il tasso di risposte su un singolo braccio di trattamento

Tra Dicembre 2007 e giugno 2008, 29 pazienti (15 maschi/14 femmine) con PV ($n = 12$), ET ($n = 1$) o MF ($n = 16$), di cui 6 con PMF, 5 con PET-MF e 5 con PPV-MF erano arruolati nello studio, il centro di Firenze ne ha inviati 3, un caso di policitemia vera refrattaria a idrossiurea per presenza di ulcere mucose e due casi di PPV-MF diventati resistenti all'oncocarbide. Come da protocollo i pazienti arruolati erano in seconda o successiva linea di trattamento, tra le precedenti terapie con farmaci citotossici erano compresi oltre che HU, busulfano, pipobromano, bortezomib, anagrelide, danazolo, Thalidomide, IFN α , e pentofillina. Cinque pazienti (4 PV/ET e 1 MF) non erano stati precedentemente trattati ma erano di giovane età e quindi arruolabili. Due pazienti con MF erano trasfusioni dipendenti e 3 erano stati splenectomizzati, 14 pazienti con PV eseguivano regolarmente salassi, la splenomegalia era presente nel 76% dei casi e il prurito nel 52%. Tutti i pazienti erano JAK2V617F mutati, 17 casi di omozigosi.

Il farmaco è stato ben tollerato, non ci sono state tossicità di grado IV. Gli effetti collaterali più frequentemente riportati sono stati di tipo gastrointestinale (diarrea, nausea e epigastralgia), di tipo ematologico (anemia e piastrinopenia), e cardiologico con allungamento del tratto QTc e fatigue.

Dieci pazienti (34%) hanno dovuto ridurre il dosaggio per una mediana di 30 giorni (range, 5–49), mentre 15 pazienti hanno dovuto sospendere temporaneamente il farmaco, principalmente per tossicità ematologica, diarrea, alterazione degli enzimi epatici e allungamento transitorio del QTc.

In 11 casi il farmaco è stato sospeso definitivamente per progressione di malattia ($n = 6$, 21%), piastrinopenia di grado 2 ($n = 1$, 4%), ritiro del consenso informato ($n = 2$, 8%), allungamento del QTc ($n = 1$, 4%), comparsa di patologia psichiatrica, non correlata al farmaco ($n = 1$, 4%).

La valutazione dell'efficacia basata su intention to treat è stata valutata su 29 pazienti:

- Pazienti con PV e ET: 11/13 pazienti hanno terminato le 24 settimane di trattamento, con 1 caso di risposta ematologica completa e 6 pazienti con risposta parziale. Il 70% dei pazienti con PV ha sospeso i salassi, la mediana della conta piastrinica è gradualmente calata da 865 (range, 347–1458) $\times 10^9/l$ a 497 (range, 233–1602) $\times 10^9/l$ ($P = 0.0128$); ugualmente la mediana della conta dei leucociti scendeva da 16 (range, 5–45.2) $\times 10^9/l$ a 11.7 (range, 3.7–35.8) $\times 10^9/l$ ($P = 0.0076$). Otto pazienti presentavano splenomegalia palpabile all'arruolamento, 5 hanno ottenuto una remissione completa (milza non più palpabile) e 1 una remissione parziale.
- Pazienti con MF: 7/16 pazienti con MF (44%) hanno completato le 24 settimane di trattamento, 3 pazienti hanno lasciato lo studio prima della 12 settimana per eventi

avversi correlati al farmaco (piastrinopenia grado II) o progressione di malattia, un paziente ha ritirato il consenso alla 12 settimana, 3 pazienti non sono stati valutati alla settimana 24 per progressione di malattia.

Dopo 24 settimane di trattamento secondo i criteri EUMNET, 3 pazienti (19%) hanno ottenuto una risposta maggiore caratterizzata da una risposta completa sull'anemia e una risposta parziale sulla splenomegalia e controllo del prurito in un caso e in altri 2 casi da una risposta parziale sulla splenomegalia e sui sintomi sistemici senza peggioramento dell'anemia; erano tutti pazienti con mielofibrosi secondaria (2 post-PV MF e 1 post-ET MF). Valutati secondo i criteri IWG erano 2 miglioramenti clinici e 5 malattia stabile.

In tutti i pazienti arruolati nel protocollo è stata fatta un'analisi quantitativa della carica allelica successivamente al trattamento, l'analisi è stata eseguita mediante real-time PCR quantitativa su granulociti, inoltre è stata eseguita la genotipizzazione delle singole colonie. All'arruolamento nel protocollo, 16/29 pazienti (5 PV/ET e 11 MF) avevano una carica allelica maggiore del 50%. Tra i pazienti con PV/ET il trattamento con givinostat è stato associato ad un progressivo calo della quota di allele mutato: il valore medio all'arruolamento era 55% (range 23–100%), scendeva a 47% (range 19–91%) alla settimana 12 e a 41% (range 18–96%) alla settimana 24; il calo del burden allelico veniva osservato sia in chi presentava uno stato di omozigosi sia in eterozigosi (figura 16).

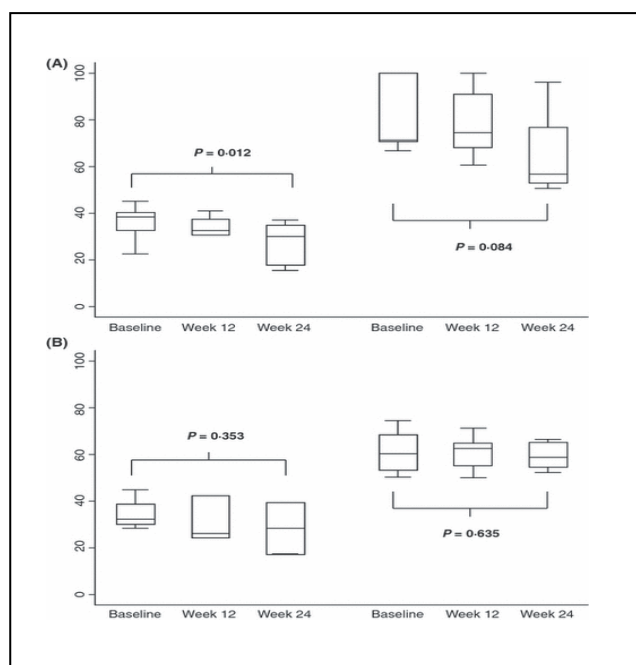


Figura 16: Monitoraggio molecolare di JAK2V617F nei granulociti durante trattamento con Givinostat. Pazienti con PV/ET (A) e MF (B). I pazienti sono stati raggruppati secondo lo stato di eterozigosi e omozigosi

Da segnalare il caso di un paziente che consensualmente ad una risposta clinica completa dopo 24 settimane mostrava un'importante risposta anche a livello molecolare con un calo dal 39% al 18%. Nei casi di MF la media di JAK2V617F non si è modificata in seguito al trattamento con Givinostat, 56% (range 12–74%) all'arruolamento, 55% (range 24–71%) alla settimana 12 e 56% (range 39–66%) alla settimana 24.

In un paziente con PV, che ha ottenuto una risposta clinica completa, è stata valutata parallelamente la quota di JAK2V617F su granulociti di sangue periferico e su single colonie ottenute in presenza di EPO; è stato documentato il calo della carica allelica sui granulociti insieme alla riduzione della quota di colonie mutate, tuttavia una volta sospeso il farmaco la proporzione delle colonie cambiava ritornando verso il quadro pre-terapia (figura 17).

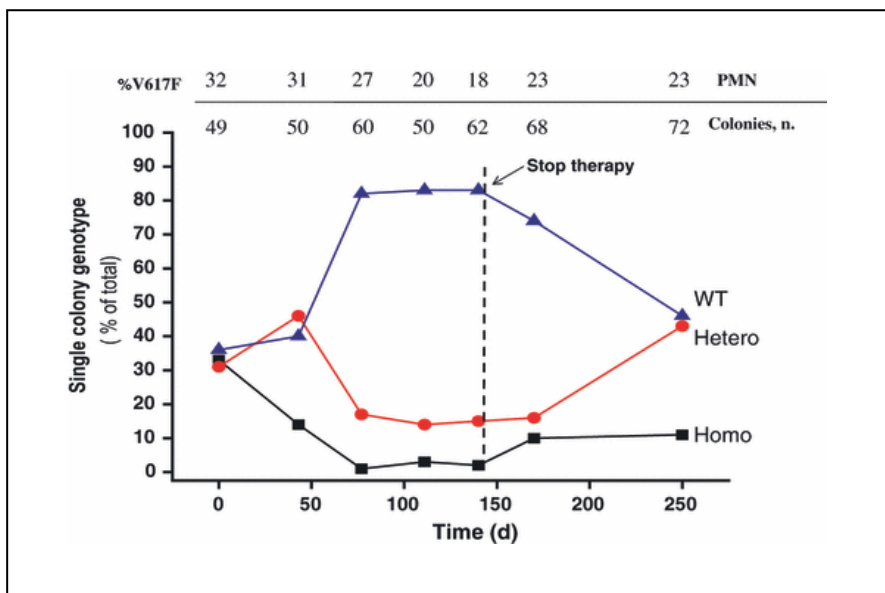


Figura 17: genotipizzazione delle single colonie in un singolo paziente.

Sulla base di risultati ottenuti sull'efficacia e la tollerabilità di GIVINOSTAT (ITF2357) in monoterapia nel trattamento di pazienti affetti da Policitemia Vera, Trombocitemia Essenziale e Mielofibrosi portatori della mutazione JAK2V617F nello studio pilota di fase IIA e sulla base di una serie di evidenze in vitro che dimostrano una forte azione sinergica tra givinostat e HU, Italfarmaco ha proposto un nuovo studio con lo scopo di valutare l'efficacia e la tollerabilità di ITF2357 in associazione con Idrossiurea in pazienti affetti da Policitemia Vera JAK2V617F positivi.

“Studio di fase II con l’inibitore dell’istone deacetilasi GIVINOSTAT (ITF2357) in associazione con Idrossiurea in pazienti affetti da Policitemia Vera JAK2V617F positivi, che non hanno risposto al trattamento in monoterapia con Idrossiurea”.

Numero protocollo: DSC/08/2357/38, Numero EudraCT: 2009-010982-22

Principal investigator Prof. A. Rambaldi (Ematologia di Bergamo)

L’obiettivo principale era valutare l’efficacia di GIVINOSTAT in associazione con Idrossiurea in pazienti affetti da Policitemia Vera JAK2V617F positivi, tra gli obiettivi secondari:

- la valutazione della sicurezza e della tollerabilità del trattamento con GIVINOSTAT in combinazione con Idrossiurea in pazienti affetti da Policitemia Vera JAK2V617F positivi che hanno avuto una risposta meno che parziale (ovvero che non hanno risposto) al trattamento con la massima dose tollerata di Idrossiurea in monoterapia.
- esplorare l’impatto in termini di efficacia e di tollerabilità di un aumento di 50 mg della dose di GIVINOSTAT nei pazienti che non hanno raggiunto almeno una risposta parziale dopo 12 settimane di trattamento combinato con Idrossiurea.
- valutare la risposta molecolare della mutazione V617F del gene JAK2 mediante RT-PCR quantitativa.
- valutare la riduzione della quota dei progenitori clonogenici JAK2V617F positivi rispetto a quelli negativi.

Gli endpoint principali sono la valutazione del numero di risposte (risposte parziali e complete) al trattamento dopo 12 settimane di terapia combinata mentre gli endpoint secondari la sicurezza del farmaco valutata come numero di pazienti che hanno avuto eventi avversi, tipo, incidenza e severità degli eventi avversi correlati al trattamento.

Lo studio è stato disegnato come studio di fase II, randomizzato, in aperto, multicentrico, numero di pazienti da arruolare e valutare: 44.

Il farmaco in questo studio veniva fornito dalla ditta sottoforma di capsule di gelatina contenenti 50 mg di principio attivo, la cui somministrazione avveniva per via orale.

Per poter essere arruolati nello studio i pazienti dovevano soddisfare alcuni criteri di inclusione, tra cui

- la diagnosi confermata di Policitemia Vera secondo i criteri WHO;
- la positività alla mutazione JAK2V617F;
- l’esposizione pregressa per almeno 3 mesi alla monoterapia con idrossiurea alla massima dose tollerata senza raggiungimento di alcuna risposta ematologica;

In considerazione della tossicità cardiologica un importante fattore di esclusione era la presenza di una patologia cardiaca valutata come:

- marcato prolungamento dell'intervallo QT/QTc (per esempio una dimostrazione ripetuta di QTc > 450 msec, calcolato secondo la formula di Bazett);
- uso di farmaci concomitanti che potrebbero prolungare l'intervallo del QT/QTc;
- patologie cardiovascolari clinicamente rilevanti, come l'ipertensione arteriosa non controllata, infarto del miocardio, angina instabile, scompenso cardiaco di grado 2 o superiore, secondo i criteri NYHA, storia di un qualsiasi tipo di aritmia cardiaca che ha richiesto un trattamento, presenza di fattori di rischio per torsione di punta .

Una volta screenati i pazienti prima di iniziare il trattamento sperimentale dovevano presentare un livello di ematocrito normale (uguale o minore di 45%), sottoponendosi, se necessario, a salassi. Una volta arruolati attraverso un processo di randomizzazione centralizzata gestito dallo Sponsor, il paziente veniva assegnato ad uno dei seguenti trattamenti:

- gruppo A: una capsula da 50 mg al giorno di GIVINOSTAT in combinazione con la massima dose tollerata di Idrossiurea in corso all'atto dell'ingresso nello studio;
- gruppo B: due capsule da 50 mg al giorno di GIVINOSTAT in combinazione con la massima dose tollerata di Idrossiurea in corso all'atto dell'ingresso nello studio.

I due gruppi bilanciati, sia per numero sia per Centro, forniranno un'informazione valutabile su entrambi i regimi di trattamento.

In entrambi i gruppi, la dose di entrambi i farmaci assegnati dovrà rimanere stabile per 12 settimane, al termine delle quali verrà valutato l'endpoint primario; faranno eccezione i pazienti che presentano tossicità, per i quali sarà possibile la riduzione del dosaggio dei farmaci assegnati.

A seconda della risposta clinica ottenuta ci potranno essere delle modificazioni della dose:

- nessuna risposta: aumento di 50 mg al giorno della dose iniziale di ITF2357;
- risposta parziale o completa: mantenimento della dose iniziale di ITF2357.

In qualsiasi momento nel corso dello studio, in caso di tossicità, il trattamento sperimentale sarà interrotto fino alla risoluzione della stessa e successivamente ripreso a dose ridotta. Il trattamento sarà definitivamente sospeso in caso di ricomparsa della tossicità anche a dose ridotta.

Complessivamente, il trattamento avrà una durata massima di 24 settimane cumulative.

Gli endpoint secondari verranno valutati dopo 24 settimane di trattamento o dopo 7 giorni dall'ultima dose di farmaco assunta se il paziente esce dallo studio prima di aver completato la 24^a settimana di trattamento. La sicurezza del farmaco verrà valutata a ciascuna visita per l'intera durata dello studio.

Verranno utilizzati i seguenti criteri di risposta:

- risposta completa: si devono verificare contemporaneamente tutte le seguenti condizioni: ematocrito < 45% senza necessità di fare salassi, conta piastrinica < $400 \times 10^9/L$, conta leucocitaria < $10 \times 10^9/L$, assenza di splenomegalia, nessun sintomo sistemico correlato alla patologia (disturbi alla micro-circolazione, prurito, cefalea);
- risposta parziale: ematocrito < 45% senza necessità di fare salassi, oppure normalizzazione di almeno 3 degli altri criteri sopra menzionati;
- nessuna risposta: nessuno dei casi sopra descritti.

L'attività di GIVINOSTAT sarà valutata in base ad un disegno noto come disegno di selezione della dose per gli studi di fase II di Simon. Per ciascuno dei 2 gruppi (gruppo A e gruppo B), un campione di 22 pazienti è stato stimato usando il metodo binomiale ed assumendo:

1. due trattamenti;
2. $p_0 = 0.20$ come il più piccolo tasso di risposta accettabile;
3. $p_1 = 0.40$ come il più alto tasso di risposta atteso;
4. una probabilità del 90% di selezionare correttamente il dosaggio migliore basandosi sul numero dei pazienti che hanno risposto al trattamento combinato GIVINOSTAT (ITF2357) - Idrossiurea.

In accordo con il disegno di Simon sopra citato, la dose che determinerà il più alto tasso di "responders" (ovvero pazienti che hanno risposto al trattamento combinato GIVINOSTAT (ITF2357) – Idrossiurea) sarà quella selezionata per gli studi successivi, indipendentemente da quanto la superiorità rispetto all'altra dose possa essere piccola.

La fase di arruolamento è rimasta aperta da Ottobre 2009 a Gennaio 2011, 44 pazienti totali arruolati, di questi il centro di Firenze ne ha arruolati 9, le cui caratteristiche generali all'arruolamento sono riportate nella tabella XVI. Lo studio è ancora in corso.

Tutti i pazienti arruolati dal Centro di Firenze eseguivano terapia con HU da almeno 6 mesi, con un dosaggio mediano di 1 gr/die per paziente. Nonostante la terapia citostatica, 6 pazienti eseguivano frequentemente salassi per il controllo dell'ematocrito e per tale motivo inseriti nel protocollo, 1 paziente presentava lesioni cutanee agli arti inferiori in lenta guarigione con un dosaggio di HU di 1 gr/die, 1 paziente riportava frequentemente il calo delle piastrine con un dosaggio di HU in grado di controllare la leucocitosi e la poliglobulia, 2 pazienti dovevano invece ricorrere ad importanti dosaggi di HU (>2.5 gr/die) per un adeguato controllo dell'emocromo.

Tabella XVI: caratteristiche dei 9 pazienti all'arruolamento

Caratteristiche dei pazienti	
Età, anni, mediana (range)	54 (50-74)
Sesso (M/F)	6/3
WBC x10 ⁹ /L mediana (range)	10.6 (8.4-16.5)
Hct, %, mediana (range)	48 (46.8-54.2)
Plt x10 ⁹ /L, mediana (range)	310 (285-550)
JAK2V617F allele burden (mean±SD)	57% (40-84)
Splenomegalia, No. (%)	5/9 (55%)
Precedenti terapia (%)	9/9 (100%)
Prurito, No. (%)	5/9 (55%)
Sintomi costitutivi, No. (%)	2/9 (23%)
Necessità salassi, No (%)	6/9 (66%)

Alla randomizzazione 5 pazienti sono stati inseriti nel braccio A, dosaggio 50 mg/die, e 4 pazienti nel braccio B, 100 mg/die. Alla settimana 12, al momento della valutazione della risposta, tutti i pazienti nel braccio A sono risultati NR e quindi sono tutti passati al dosaggio di 100 mg/die. Il farmaco è stato discretamente tollerato, non ci sono state tossicità di grado IV. Due pazienti hanno dovuto sospendere temporaneamente (un mese) il farmaco per riscontro di piastrinopenia (<100.000/ml) insorta dopo la sesta settimana di trattamento e poi recuperata. Gli effetti collaterali più frequentemente riportati sono stati di tipo gastrointestinale, principalmente epigastralgia ben controllata con l'uso di inibitori della pompa protonica e diarrea.

Attualmente non sono ancora disponibili i dati riguardo la risposta alla terapia e gli eventi avversi sulla casistica completa, in quanto alcuni pazienti sono ancora in fase di trattamento. Per quanto riguarda i pazienti del centro di Firenze, 9/9 (100%) ha completato le 24 settimane di trattamento, attualmente ancora 3 pazienti vengono trattati con Givinostat in uso compassionevole. Al termine del trattamento abbiamo ottenuto 4 casi di risposta parziale e 5 casi di nessuna risposta, quest'ultimi ritornati al trattamento con idrossiurea e salassi. Nei casi di risposta parziale i pazienti hanno sospeso i salassi e ottenuto un buon controllo su leucociti e piastrine.

Per tutti i pazienti arruolati nel protocollo, presso il laboratorio di biologia molecolare dell'Ematologia di Firenze diretto dal Prof Vannucchi, è stato conservato un campione di granulociti al momento della randomizzazione, della settimana 12 e della settimana 24; questo ci permetterà di eseguire una valutazione del trend della carica allelica di JAK2V617F, mediante PCR quantitativa, paziente-specifica in seguito al trattamento e al tipo di dosaggio intrapreso. Parallelamente alla conservazione del campione di granulociti, per ogni paziente sempre è stato raccolto un campione di sangue periferico in eparina, dal quale sono state

recuperate secondo gradiente le cellule mononucleate e successivamente piastrate e messe in coltura in metilcellulosa usando metodiche standard. Per ogni paziente sono state eseguite due tipi di colture, una per la valutazione delle EEC, quindi in assenza di EPO, e una con citochine per la valutazione delle BFU-E e delle CFU-GM. Per ogni piastra le colonie sono state contate, prelevate singolarmente e sempre singolarmente genotipizzate in ASO PCR, mediante metodica descritta da Baxter, questo ci consentirà la valutazione dello status di JAK2 (omozigosi/eterozigosi/wt) per ogni singola colonia e documentare se in seguito al trattamento ci fosse un calo dei progenitori emopoietici omozigoti o eterozigoti nei confronti dei WT . Per ogni paziente sarebbe ottimale riuscire ad avere genotipizzate almeno 50 colonie ad ogni punto di terapia, ciò consentirebbe un'adeguata analisi statistica. I dati di quest'analisi saranno disponibili solo alla chiusura dello studio.

CAPITOLO 7

LA TERAPIA CON APLIDINA

Plitidepsin (nome commerciale Aplidina®) è un dispeptide ciclico, originariamente isolato da un tunicato mediterraneo *Aplidium albicans* che ha una potente attività citotossica *in vitro* e attualmente è in fase di studio per il trattamento di diverse neoplasie solide e ematologiche. Sebbene il meccanismo d'azione dell'aplidina sia ancora da caratterizzare, diversi target molecolari sono già stati individuati. Plitidepsin causa un arresto del ciclo cellulare in G₀/G₁ e l'induzione dell'apoptosi in maniera dose-dipendente tramite l'attivazione della pathway di JNK, questa attivazione porta ad una ridotta produzione intracellulare di glutatione, un aumento dei radicali liberi dell'ossigeno e una alterazione dei potenziali di membrana mitocondriali, questo stress ossidativo porta all'apoptosi caspasi mediata. Inoltre in diversi modelli di tumore solido Plitidepsin induce l'attivazione dei membri della famiglia delle MAPK, incluso la serina/treonina chinasi, la p38 e ERK portando all'apoptosi così come attiva la proteina Rac1^{140,141}, un membro della famiglia delle guanine trifosfatasi coinvolte nella via della traduzione del segnale Wnt e nella attivazione di JNK.

Il blocco del ciclo cellulare a G₀/G₁ è principalmente dipendente dall'attività dell'inibitore p27; una correlazione inversa tra i livelli di espressione di p27 e la risposta all'aplidina è stata descritta in linee cellulari di sarcoma.

Infine, plitidepsin sembra avere proprietà anti-angiogeniche in quanto inibisce la secrezione di VEGF- e FGF-2 e del recettore di tipo1 VEGFR-1^{142,143} in linee cellulari di leucemia acuta. L'attività dell'aplidina comunque si traduce nell'inibizione spontanea e indotta dell'angiogenesi, bloccando la proliferazione, la migrazione e l'invasività e la formazione di strutture tridimensionali similcapillari.

L'attività citotossica dell'aplidina è ancora in fase di studio; è comunque stata dimostrata contro il melanoma, carcinoma a cellule chiare del rene¹⁴⁴, linfomi T periferici non-cutanei e mieloma multiplo¹⁴⁵. Lo studio randomizzato di fase III dove veniva confrontata l'associazione aplidina con desametasone, rispetto a desametasone in singola terapia per i pazienti con mieloma multiplo è ancora in corso. (NCT01149681).

La potente attività citotossica e anti-angiogenica di plitidepsin, associata a tossicità ematologica lieve e a buona tolleranza in pazienti pesantemente pretrattati con malattie ematologiche, ha portato l'idea di poterla utilizzare in pazienti con la mielofibrosi, malattia caratterizzata da massiva angiogenesi¹⁴⁶ e limitata riserva midollare per un difetto della mielopoiesi. Basandosi su questa premesse, recentemente è stata pubblicata l'efficacia di

plitidepsin su topi GATA-1^{low}, modelli murini di mielofibrosi^{147,148}, per i quali si ritiene che la difettosa emopoiesi midollare e lo sviluppo di emopoiesi extramidollare sia secondaria ad una insufficiente attività della p27(Kip1) e ripristinabile in seguito a trattamento con aplidina. Le cellule emopoietiche Gata1(low) in seguito al trattamento hanno ristabilito i normali livelli di Gata1 e p27, riducendo i livelli di TGF-beta/VEGF rilasciati nel microambiente dai megacariociti immaturi Gata1(low), migliorando la proliferazione dei progenitori emopoietici midollari in vitro e la maturazione dei megacariociti in vivo. Nei topi trattati con aplidina si è osservato una normalizzazione della densità dei vasi, della fibrosi e della cellularità midollare e l'assenza dello sviluppo di emopoiesi extramidollare a livello epatico. Sulla base di questi risultati la possibilità che Aplidina possa interferire con la storia naturale della mielofibrosi¹⁴⁹.

APLIDINA: STUDI IN VITRO

Quindi abbiamo analizzato gli effetti di Plitidpesin su cellule di MPN, utilizzando sia linee cellulari con la mutazione JAK2V617F sia cellule provenienti da pazienti affetti da MPN.

- Aplidina blocca la proliferazione delle linee cellulari JAK2V617F positive inducendo un arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi

Sono state utilizzate linee cellulari HEL e UK-E1 (entrambe in stato di omozigosi per JAK2 V617F), SET-2 (V617F eterozigoti) e K562 (BCR-ABL-positive) come controllo, insieme alle cellule murine Ba/F3 JAK2 wt e JAK2 V617F-mutate per valutare l'attività di inibizione di crescita di Plitidepsin sia in colture liquide a breve termine sia in saggi clonogenici.

I valori di IC₅₀ sono riportati nella tabella XVII.

Tabella XVII: determinazione di IC₅₀ in cellule umane e murine JAK2V617F mutate e nei controlli

	Plitidepsin IC50 (nM)	
	Agar	WST1
HEL	1.5 ± 0.05	1 ± 0.3
K562	2.7 ± 0.3	1.5 ± 0.1
UKE-1	0.5 ± 0.03**	2.4 ± 0.2
SET2	0.8 ± 0.02**	1 ± 0.3
Ba/F3-wt + IL3	0.3 ± 0.02	0.4 ± 0.03
Ba/F3 V617F +IL3	0.4 ± 0.02	0.5 ± 0.02
Ba/F3 V617F -IL3	0.3 ± 0.01	0.03 ± 0.01**

** p<0.01 utilizzando come riferimento le K562 per linee cellulari umane e Ba/F3 WT per cellule murine

Abbiamo osservato che la proliferazione delle cellule HEL, UKE-1 e SET2 era inibita a concentrazioni nanomolari molto basse di Plitidepsin, sebbene simili a quelle trovate per le cellule K562 BCR/ABL positive; tuttavia il potenziale clonogenico delle cellule UKE-1 e SET2 era invece inibito a concentrazioni statisticamente inferiori dell'ordine di 3 -5 volte rispetto al controllo. Mentre nelle colture delle cellule murine *JAK2V617F* Ba/F3 Plitidepsin era significativamente attiva nella prevenzione della proliferazione cellulare e della formazione delle colonie rispetto al wild-type.

Il trattamento con Aplidina causava un accumulo dose-dipendente di cellule SET2 in fase G0/G1 del ciclo cellulare, nel dettaglio dal 65.5±3.5% al 71.5±3.3% per 5nM (P<0.05) e 78.0±5.3% per 10 nM (P<0.01) (Figura 18), simili risultati sono stati ottenuti anche con le cellule HEL. La percentuale di cellule SET2 che presentavano apoptosi è stata valutata con annessina V in citofluorimetria e come mostrato nella figura 18 il trattamento con Plitidepsin porta in maniera dose-dipendente, un aumento statisticamente significativo delle cellule annessina V-positive dal 19.0±2.1% al 25.0±3.7.0% (P<0.05) per la dose di 5 nM al 49.0±2.0 per la dose di 10nM (P<0.01).

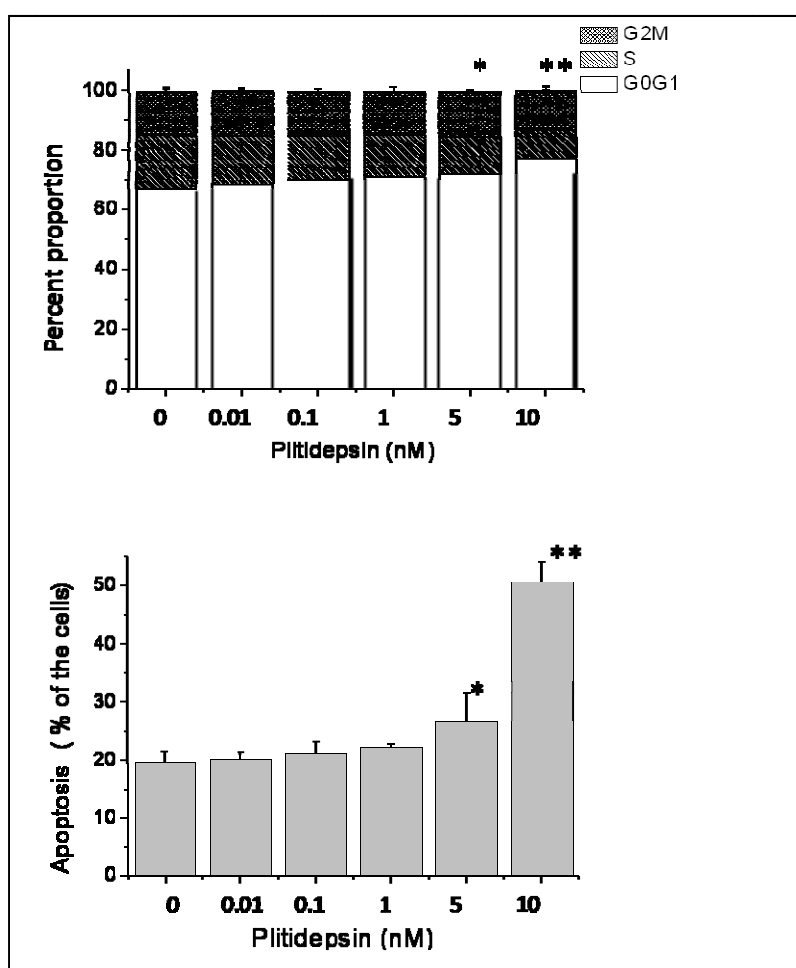


Figure 18: L'effetto dell'aplidina sull'apoptosi e ciclo cellulare nelle SET2. Risultati presentati come media±SD. *, P<0.05; **, P<0.01.

Simili risultati venivano osservati in caso di utilizzo delle UKE-1 (Figura 19) dove Plitidepsin a concentrazioni di 5nM e 10nM aumentava significativamente l'apoptosi e la fase G0/G1 del ciclo cellulare con un corrispondente calo della fase S ($p < 0.01$)

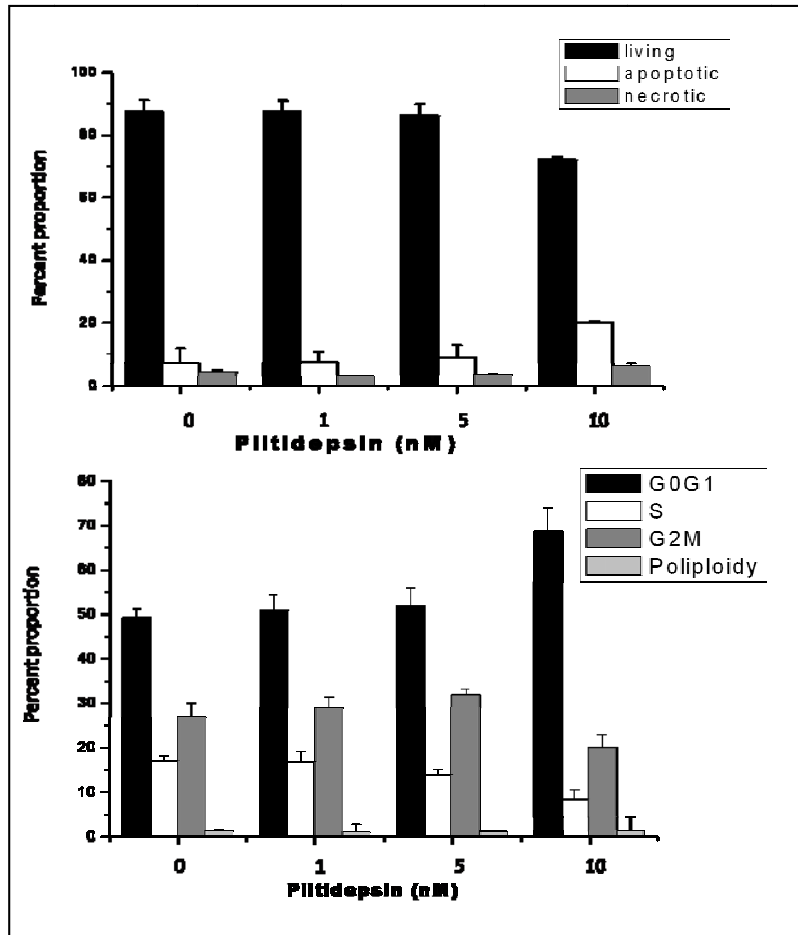


Figure 19: L'effetto dell'aplidina sull'apoptosi e ciclo cellulare nelle SET2

- Aplidina blocca l'attività clonogenica dei progenitori emopoietici di pazienti affetti da PV o PMF

L'effetto di apolidina sul potenziale clonogenico dei progenitori emopoietici di pazienti affetti da MPN è stato valutato utilizzando colture semisolide. Cellule CD34⁺ di pazienti con PV (n=5) JAK2V617F positivi, e con PMF JAK2V617F mutate (n=3) o JAK2 wild-type (n=2), oltre a controlli sani (n=5), sono state messe in coltura con citochine per la crescita di BFU-E, CFU-G/GM o CFU-Mk. Nei pazienti con PV sono state inoltre valutate le EEC, cioè colonie cresciute in assenza di EPO esogena. Il farmaco veniva aggiunto all'inizio della coltura a concentrazioni crescenti.

Aplidina inibisce la formazione di tutti i tipi di colonie dei pazienti con PMF a concentrazioni significativamente inferiori rispetto ai controlli sani ($P < 0.01$); i valori di IC_{50} sono riportati nella Tabella XIX; non si riscontrano invece differenze significative rispetto al controllo nel caso della risposta al trattamento delle cellule CD34+ provenienti da pazienti affetti da PV, molto più vicini ai controlli nella risposta che ai pazienti con PMF. Plitidepsin inibisce anche la crescita delle EEC nei cinque casi di PV, 3 dei quali con valori di carica allelica V617F maggiori del 50% a concentrazioni nanomolari.

Tabella XIX: Determinazione di IC_{50} in test clonogenici partendo da cellule CD34⁺ ottenuta da pazienti con PV o PMF, o soggetti sani.

	Plitidepsin IC_{50} (nM)		
	BFU-E	CFU-GM	CFU-Mk
Soggetti sani (n=5)	8.7 ± 2.3	8.2 ± 3.5	1.7 ± 0.9
PV (n=5)	5.2 ± 2.0	7.4 ± 4.0	0.9 ± 0.2
PMF (n=5)	1.1 ± 0.6**	1.6 ± 0.4**	0.4 ± 0.1**

Infine, abbiamo genitipizzato le single colonie di 5 pazienti mediante PCR-ASO (metodica Baxter) per valutare se in seguito alla aggiunta di farmaco ci fosse un'alterazione del rapporto delle colonie (BFU-E e CFU-GM) *JAK2* wt e *JAK2*V617F mutate. Abbiamo piastrato le cellule CD34+ in presenza di Aplidina a una concentrazione di 1 nM in 2 casi provenienti da pazienti con PMF e carica allelica pari a 11% e 58%, in 3 casi provenienti da pazienti con PV con carica allelica rispettivamente di 41%, 37% e 25%. In 4/5 pazienti abbiamo osservato una riduzione di circa il 10% delle colonie *JAK2* mutate sia BFU-E sia CFU-GM, specialmente in un caso abbiamo notato una riduzione dal 27% al 5%, mentre in un caso di PMF il quadro è rimasto invariato. (Figura 20)

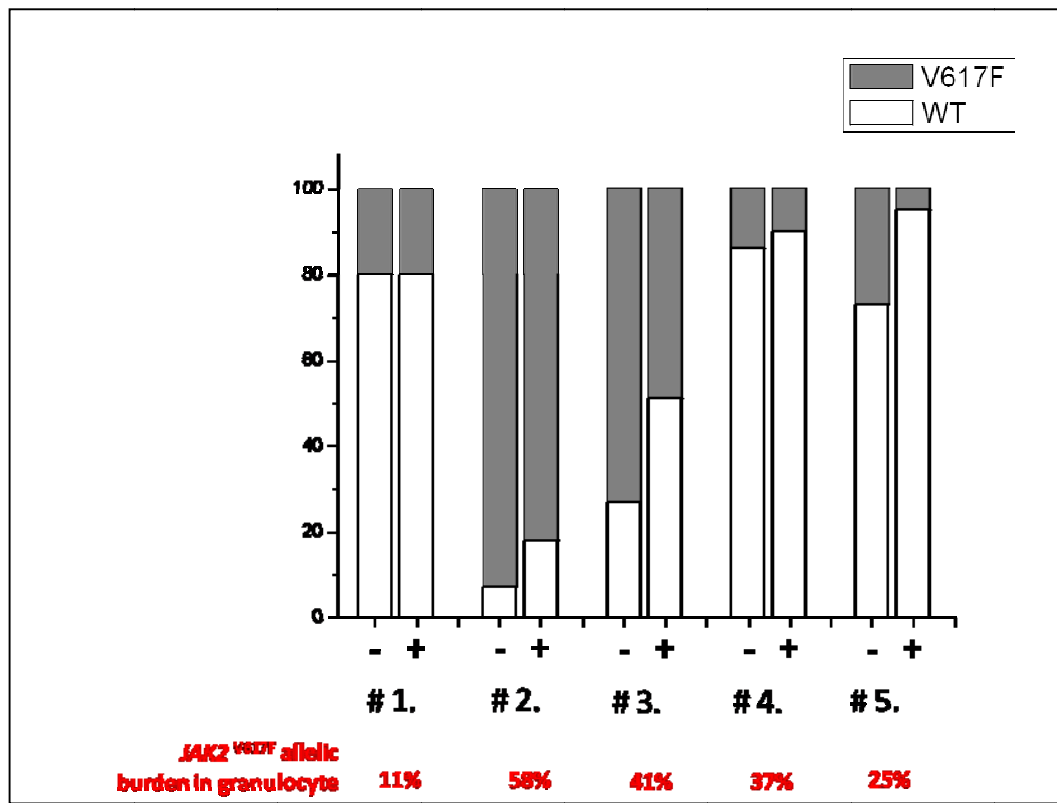


Figure 20: genotipizzazione delle singole colonie da cellule CD34+ di 5 pazienti, correlazione con il valore di carica allelica di JAK2V617F nei granulociti

Infine in considerazione della correlazione già studiata in letteratura tra le cellule neoplastiche, la risposta al trattamento con Aplidina e il livelli di p27(Kip1), abbiamo misurato il livelli di p27 in differenti linee cellulari dopo esposizione ad Aplidina. Abbiamo osservato che i livelli di p27 mRNA aumentano dopo 24 h di incubazione con Plitidepsin 10nM di circa 15 volte nelle UKE1 e di circa 30 volte nelle HEL, rispetto alle cellule K562. Questo incremento si osserva anche nella proteina il cui contenuto aumenta da 1.2 a 2 volte rispetto al baseline nelle cellule UKE-1 a concentrazioni diverse di 1.0 e 10 nM di Plitidepsin, questo potrebbe suggerire che la risposta delle cellule JAK2V617F mutate all'aplidina potrebbe essere modulata dai livelli di p27.

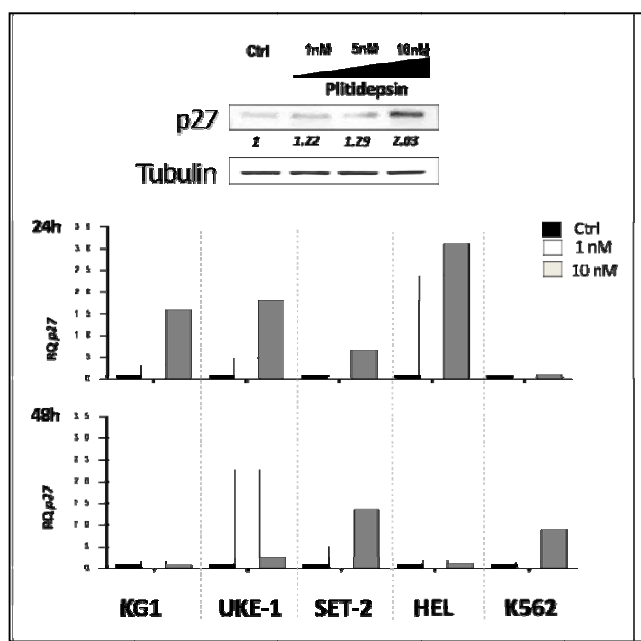


Figura 21: livelli di p27 in seguito al trattamento con aplidina

APLIDINA: STUDI IN VIVO

Sulla base dei risultati ottenuti è stato quindi proposto uno *Studio di fase II di Plitidepsina (Aplidin®) in pazienti con Mielofibrosi Primaria (PMF) e Mielofibrosi secondaria a Policitemia Vera/Trombocitemia Essenziale (Post-PV/ET)*, si tratta di uno studio di fase II, in aperto, suddiviso in due porzioni, in pazienti affetti da Mielofibrosi Primaria e Mielofibrosi secondaria a Policitemia Vera/Trombocitemia Essenziale che abbiano ricevuto almeno una precedente linea di terapia e richiedano ulteriore trattamento.

L'obiettivo primario della studio è di valutare il tasso di risposte complete o maggiori cliniche ed ematologiche dopo 4 mesi di trattamento con Plitidepsin in pazienti con Mielofibrosi Primaria e Mielofibrosi secondaria a Policitemia Vera/Trombocitemia Essenziale. Si aggiungono una serie di obiettivi secondari:

- Valutare la sicurezza e la tollerabilità di Plitidepsin in pazienti con Mielofibrosi Primaria e Mielofibrosi secondaria a Policitemia Vera/Trombocitemia Essenziale
- Valutare gli effetti del trattamento con Plitidepsin sui marcatori biologici e molecolari della malattia, oltre che sui geni bersaglio del farmaco, tra cui: fibrosi e cellularità midollare, angiogenesi midollare, stato mutazionale di JAK2 V617F o MPLW515L/K, variazioni nelle alterazioni del cariotipo, conta delle cellule CD34+ circolanti nel sangue periferico, espressione di WT1 nel sangue periferico, livelli di espressione di p27 nel sangue periferico.

Il numero di pazienti previsti per questo studio è di 16 per la porzione I, e di ulteriori 14 pazienti per la porzione II, se ci saranno risultati incoraggianti dall'uso di Plitidepsin. Potranno

essere arruolati tutti i pazienti con diagnosi di Mielofibrosi Primaria e Mielofibrosi secondaria a Policitemia Vera/Trombocitemia Essenziale che abbiano ricevuto almeno una linea di trattamento ma che richiedano terapia per persistenza della malattia. La diagnosi deve essere confermata per le forme primitive con i criteri WHO 2008 e per le forme secondarie con i IWG-MRT. I pazienti dovranno avere una forma di malattia a intermedio o alto rischio in accordo con IWG-MRT scoring system (Appendice 3). Sono inoltre eligibili pazienti con malattia a basso rischio ma con splenomegalia clinicamente significativa (≥ 10 cm oltre il margine costale sinistro a livello della linea emiclaveare).

Plitidepsin verrà somministrata al dosaggio di 5.0 mg/m^2 e.v. al giorno 1 e 15 di ogni ciclo della durata di 4 settimane, per 4 cicli.

E' prevista la possibilità di ridurre la dose del 20% sulla base di ogni tossicità osservata durante le precedenti infusioni, di tipo ematologica (neutropenia o piastrinopenia di grado 4) o di tipo non ematologiche (neutropenia febbrile, nausea e vomito di grado ≥ 3 refrattario alle terapie antiemetiche convenzionali, eventi avversi muscolari di grado ≥ 3 , incremento degli enzimi di funzionalità epatica e CPK)

In considerazione della cardiotossicità del farmaco verranno immediatamente esclusi dallo studio i pazienti che presenteranno rialzo della troponina I associato a danno cardiaco documentato con segni clinici, elettrocardiografici o ecografici, aritmia cardiaca di grado ≥ 2 , disfunzione ventricolare sinistra di grado ≥ 2 o riduzione della frazione di eiezione del ventricolo sinistro $\geq 20\%$ rispetto all'inizio del trattamento con plitidepsin.

L'efficacia verrà valutata in accordo con i criteri di risposta EUMNET, che verranno applicati anche per i pazienti con Mielofibrosi secondaria a PV/ET. L'efficacia sarà valutata al giorno 28 di ciascun ciclo, e l'analisi finale effettuata dopo 30 giorni dall'ultimo ciclo con plitidepsin.

Il centro di Firenze ha arruolato 2 pazienti, entrambi i casi PMF, 1) maschio di 65 anni intollerante alla terapia con HU, e 2) femmina di 77 anni resistente a diverse linee di trattamento tra cui HU e talidomide. Entrambi i pazienti hanno posizionato un catetere venoso centrale per permettere l'infusione del farmaco. Nessuno dei due paziente ha completato i 4 cicli di trattamento previsti, la paziente n2 è stata ritirata dallo studio dopo la 3° infusione per progressiva anemizzazione ed eccessiva tossicità cardiaca che ha portato ad uno scompenso cardiaco e successiva ospedalizzazione, il paziente n1 è stato invece ritirato dallo studio al 4° ciclo per eccessiva tossicità ematologica senza beneficio clinico. Il protocollo è stato chiuso dopo l'arruolamento di 10 pazienti totali per eccessiva tossicità del farmaco e scarsa efficacia.

CAPITOLO 8

CONCLUSIONI

Fino alla scoperta, avvenuta nel 2005, di una serie di mutazioni genetiche responsabili, almeno in parte della patogenesi delle MPN, la terapia farmacologica consisteva essenzialmente nel controllo dei vari sintomi. L'identificazione di bersagli molecolari ha consentito lo sviluppo di terapie mirate a colpire meccanismi cruciali alla base di queste malattie.

Una più dettagliata conoscenza dei segnali cellulari coinvolti nella non controllata proliferazione delle cellule neoplastiche ha permesso l'ideazione di una serie di nuovi farmaci o l'utilizzo di farmaci già presenti, ma non ancora testati, nelle neoplasie mieloproliferative croniche. Nello specifico l'identificazioni di mutazioni che coinvolgono tirosinchinasi come quelle a carico dei geni JAK2 e MPL ha permesso di avere a disposizione in pochi anni farmaci inibitori di JAK; lo studio delle alterazioni epigenetiche nelle MPN ha permesso di poter riutilizzare farmaci in grado di bloccare l'acetilazione degli istoni come gli inibitori delle iston-deacetilasi; lo studio del coinvolgimento di vie di trasmissione del segnale coinvolte nella proliferazione delle cellule neoplastiche come quella di mTOR ha permesso di valutare una classe di farmaci, i derivati della rapamicina, altrimenti utilizzati come immunosoppressori.

Lo sviluppo dei JAK2 inibitori ha introdotto una nuova era terapeutica con farmaci molti più selettivi, per bersagli molecolari noti nella patogenesi delle MPN.

Gli inibitori di JAK2 in vitro si sono dimostrati efficaci nel ridurre la proliferazione delle cellule *JAK2V617F* mutate e nel controllo della mieloproliferazione nei modelli murini transgenici per *JAK2V617F* e hanno portato un beneficio clinico importante in pazienti affetti da mielofibrosi o PV e ET resistenti all'idrossiurea, tuttavia non eradicano il clone neoplastico. Dai vari studi clinici in corso in cui sono stati utilizzati diversi JAK2 inibitori sono emerse alcune caratteristiche peculiari. Il primo beneficio clinico è la riduzione della splenomegalia, con significativo miglioramento della qualità di vita; tale effetto si verifica indipendentemente dallo stato mutazionale di JAK2 e accade rapidamente entro i due mesi dall'inizio del trattamento. La riduzione del volume splenico viene mantenuta per tutta la durata della terapia, anche a prescindere dal tipo di farmaco utilizzato (INCB 18424, TG101348). Il secondo obiettivo raggiunto dagli inibitori di JAK2 è il miglioramento della qualità di vita, osservato nei pazienti affetti da mielofibrosi, caratterizzato dal controllo dei sintomi sistemici, dall'aumento del peso, e dal miglioramento delle capacità funzionali. Ciò che viene descritto già durante i primi giorni di trattamento in questa pazienti è il calo importante di tutto il milieu di citochine pro-

infiammatorie tipiche della mielofibrosi; questo decremento correla con il quadro clinico del paziente, ma è stato osservato solamente in seguito all'utilizzo di JAK1-JAK2 inibitori come INCB424, più raro nei casi di farmaci selettivi per JAK2 come TG101348 o CEP701. Inoltre è stato osservato proprio come le citochine potrebbero essere coinvolte nella resistenza agli inibitori di JAK2; alcuni dati in vitro descrivono come in colture con elevata concentrazione di citochine sia ridotto l'arresto della crescita indotto da JAK2 inibitori su cellule JAK2 mutate.

Gli effetti di queste terapie sul burden allelico variano a seconda degli studi clinici; abbiamo comunque osservato che non ci sono miglioramenti sul grado di fibrosi midollare e che anche qualora si verifici una riduzione della carica allelica, in nessun paziente si è mai assistito alla remissione molecolare, come invece è stato descritto in caso di uso di interferone. Bisogna sottolineare tuttavia la problematica legata alla valutazione della carica allelica di JAK2, per la quale ancora non esistono metodiche standardizzate: spesso viene valutata su diverse tipologie di cellule (granulociti/cellule mononucleate), vengono utilizzati diversi tipi di controlli e diversi procedimenti diagnostici. Tuttavia considerando che precedentemente il trattamento per la mielofibrosi era solo di tipo palliativo, riuscire comunque a controllare una serie di sintomi e migliorare la qualità di vita è sicuramente da considerare un progresso terapeutico.

Restano comunque una serie di interrogativi sull'utilizzo degli inibitori di JAK2; per esempio non è ancora noto il meccanismo d'azione, oppure non è noto se il beneficio clinico sia legato all'inibizione di JAK2 nelle cellule neoplastiche, alla down regolazione dei livelli plasmatici di citochine o a entrambi; non è noto se lo status mutazionale di JAK2 interferisce e in che maniera con la risposta clinica; mancano completamente i risultati al lungo termine, per valutare se questo tipo di farmaci portano a un allungamento della sopravvivenza, sono in grado di interferire con la storia naturale della malattia o di bloccare la progressione della malattia, se l'inibizione di JAK3 possa portare ad effetti collaterali legati a una prolungata immunosoppressione.

Per quanto riguarda gli inibitori di mTOR, il trial clinico ha documentato come RAD001 sia in grado di riprodurre molti degli effetti riportati con l'utilizzo di inibitori di JAK1 e JAK2: il miglioramento dei sintomi costitutivi, della splenomegalia e del prurito; solo alcuni pazienti hanno presentato una tossicità ematologica caratterizzata dal modesto peggioramento dell'anemia. Come per i JAK2 inibitori è stato visto solo un modesto cambiamento nella carica allelica di JAK2, anche se il breve periodo di tempo di esposizione al RAD001 (4 mesi) potrebbe aver mascherato il potenziale effetto. Infine la riduzione della milza, come per i JAK1 e JAK2 inibitori, è avvenuta molto rapidamente, senza evidenza di lisi di cellule tumorali o di migrazione dei progenitori emopoietici; inoltre alla sospensione del farmaco la milza è ritornata alle dimensioni precedenti al trattamento in circa 1-2 mesi. Per la valutazione della risposta abbiamo utilizzato due sistemi indipendenti EUMNET e IWG-MRT, principalmente

perché IWG-MRT non considera la risoluzione dei sintomi sistemici come un endpoint nella valutazione della remissione completa. Sono due sistemi difficilmente confrontabili tra loro, in particolare se consideriamo che il miglioramento della qualità di vita e la scomparsa dei sintomi sistemici, in aggiunta alla riduzione della splenomegalia, costituiscono i principali benefici del trattamento con gli inibitori di mTOR e JAK1/JAK2

La maggior parte dei benefici clinici riportati dai pazienti trattati con JAK1 e JAK2 inibitori, INC18424, è stata attribuita al drammatico decremento delle citochine infiammatorie, caratteristicamente ad elevati livelli nei pazienti affetti da mielofibrosi. Al contrario questo tipo di meccanismo non è stato descritto in chi ha ricevuto trattamento con RAD001, nonostante il miglioramento dei sintomi sistemici.

In conclusione RAD001 ha portato un buon numero di risposte cliniche in pazienti con mielofibrosi, suggerendo l'opportunità di utilizzare ancora questo farmaco in questo campo magari in associazione con altre nuove molecole.

Per quanto riguarda gli inibitori delle iston-deacetilasi, il trattamento orale con Givinostat in pazienti con PV, ET e MF con la presenza della mutazione di JAK2V617F ha portato dei risultati soddisfacenti sul controllo della malattia nonostante il breve periodo di trattamento; il farmaco si è dimostrato principalmente attivo nel controllo del prurito, nella riduzione delle dimensioni della milza, nel controllo del fabbisogno dei salassi, con un profilo di tossicità di grado lieve principalmente a livello gastrointestinale. Inoltre, sebbene non sia mai stata ottenuta una risposta molecolare completa, le evidenze preliminari indicano che i livelli di JAK2V617F iniziano a calare già solo dopo un breve periodo di trattamento. Rimane quindi da dimostrare se l'utilizzo su pazienti meno impegnati da un punto di vista clinico e/o una maggiore esposizione al farmaco potrebbe essere associato a una migliore risposta clinica e molecolare. Inoltre Givinostat da solo potrebbe non essere sufficiente per ottenere un'ottima risposta in PV, ET e MF; per questo sono importanti i risultati attesi di quest'ultimo studio clinico ancora in corso. Potrebbe derivare che l'utilizzo ottimale di Givinostat è in combinazione con altre molecole, per esempio l'idrossiurea, e potrebbe agire in maniera sinergica e potenziare l'effetto proapoptotico nei confronti delle cellule con la mutazione JAK2V617F. Basandosi sulle esperienze riportate con l'utilizzo di un altro inibitore di HDAC, il panobinostat, che utilizzato insieme all'inibitore di JAK2 TG101209 determina un'importante attenuazione della via di JAK/STAT nelle cellule umane e murine JAK2V617F mutate e aumenta la citotossicità nei confronti delle cellule CD34+ di MPN rispetto all'uso individuale dei farmaci, sono già in corso una serie di esperimenti in vitro di combinazione tra Givinostat e JAK2 inibitori e farmaci immunomodulanti.

La prospettiva delle nuove modalità terapeutiche con l'utilizzo, quindi, di molecole "intelligenti" dovrebbe essere quella di eliminare alla base il vantaggio proliferativo delle

cellule clonali, consentendo il riequilibrio dell'emopoiesi normale, senza gli effetti collaterali dei farmaci citotossici tradizionali.

BIBLIOGRAFIA

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6:372-375.
2. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. 2008;22:3-13.
3. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22:14-22.
4. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30:229-236.
5. Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, et al. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:200-224.
6. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.
7. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.
8. Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:533-537.
9. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
10. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia*. 2007;21:1952-1959.
11. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:673-683.
12. Goerttler PS, Steimle C, Marz E, et al. The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood*. 2005;106:2862-2864.
13. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006;108:3548-3555.
14. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
15. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005;19:1847-1849.
16. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood*. 2009;114:1477-1483.

17. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;110:840-846.
18. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008;93:41-48.
19. Ziakas PD. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. *Haematologica*. 2008;93:1412-1414.
20. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3:e270.
21. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108:3472-3476.
22. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;112:844-847.
23. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol*. 2007;137:244-247.
24. Pietra D, Li S, Brisci A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111:1686-1689.
25. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007;21:1960-1963.
26. Saint-Martin C, Leroy G, Delhommeau F, et al. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;114:1628-1632.
27. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009;23:905-911.
28. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113:6403-6410.
29. Langemeijer SM, Aslanyan MG, Jansen JH. TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle*. 2009;8:4044-4048.
30. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009;41:838-842.
31. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*. 2009;23:1343-1345.
32. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114:144-147.

33. Oh ST, Simonds EF, Jones C, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*;116:988-992.
34. Jager R, Gisslinger H, Passamonti F, et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*;24:1290-1298.
35. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009;23:2183-2186.
36. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*;24:1302-1309.
37. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113:6182-6192.
38. Jones AV, Chase A, Silver RT, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41:446-449.
39. Score J, Walz C, Jovanovic JV, et al. Detection and molecular monitoring of FIP1L1-PDGFR α -positive disease by analysis of patient-specific genomic DNA fusion junctions. *Leukemia*. 2009;23:332-339.
40. Chase A, Schultheis B, Kreil S, et al. Imatinib sensitivity as a consequence of a CSF1R-Y571D mutation and CSF1/CSF1R signaling abnormalities in the cell line GDM1. *Leukemia*. 2009;23:358-364.
41. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*;42:722-726.
42. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007;110:1092-1097.
43. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114:937-951.
44. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*.
45. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative Neoplasms: Molecular Pathophysiology, Essential Clinical Understanding, and Treatment Strategies. *J Clin Oncol*.
46. Vannucchi AM, Barbui T. Thrombocytosis and thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:363-370.
47. De Stefano V, Za T, Rossi E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*. 2008;93:372-380.

48. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113:2895-2901.
49. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, et al. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia*. 2008;22:756-761.
50. Tefferi A. Leukocytosis as a risk factor for thrombosis in myeloproliferative neoplasms-biologically plausible but clinically uncertain. *Am J Hematol*;85:93-94.
51. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtmann SM, Berlin NI, Wasserman LR. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol*. 1986;23:132-143.
52. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2004;350:114-124.
53. Di Nisio M, Barbui T, Di Gennaro L, et al. The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br J Haematol*. 2007;136:249-259.
54. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005;23:2224-2232.
55. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*. 2005;105:2664-2670.
56. Liu E, Jelinek J, Pastore YD, Guan Y, Prchal JF, Prchal JT. Discrimination of polycythemia and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood*. 2003;101:3294-3301.
57. Messori C, Bensi L, Vecchi A, et al. Cytogenetic conversion in a case of polycythaemia vera treated with interferon-alpha. *Br J Haematol*. 1994;86:402-404.
58. Samuelsson J, Mutschler M, Birgegard G, Gram-Hansen P, Bjorkholm M, Pahl HL. Limited effects on JAK2 mutational status after pegylated interferon alpha-2b therapy in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2006;91:1281-1282.
59. Silver RT. Long-term effects of the treatment of polycythemia vera with recombinant interferon-alpha. *Cancer*. 2006;107:451-458.
60. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008;112:3065-3072.
61. Kroger N, Badbaran A, Holler E, et al. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood*. 2007;109:1316-1321.
62. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2005;128:275-290.

63. Kessler CM. Propensity for hemorrhage and thrombosis in chronic myeloproliferative disorders. *Semin Hematol.* 2004;41:10-14.
64. Budde U, Schaefer G, Mueller N, et al. Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood.* 1984;64:981-985.
65. Castaman G, Lattuada A, Ruggeri M, Tosetto A, Mannucci PM, Rodeghiero F. Platelet von Willebrand factor abnormalities in myeloproliferative syndromes. *Am J Hematol.* 1995;49:289-293.
66. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med.* 1995;332:1132-1136.
67. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med.* 2005;353:33-45.
68. Barbui T, Barosi G, Grossi A, et al. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica.* 2004;89:215-232.
69. Lengfelder E, Grieshammer M, Hehlmann R. Interferon-alpha in the treatment of essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma.* 1996;22 Suppl 1:135-142.
70. Jabbour E, Kantarjian H, Cortes J, et al. PEG-IFN-alpha-2b therapy in BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders: final result of a phase 2 study. *Cancer.* 2007;110:2012-2018.
71. Alvarado Y, Cortes J, Verstovsek S, et al. Pilot study of pegylated interferon-alpha 2b in patients with essential thrombocythemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;51:81-86.
72. Solberg LA, Jr., Tefferi A, Oles KJ, et al. The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol.* 1997;99:174-180.
73. Storen EC, Tefferi A. Long-term use of anagrelide in young patients with essential thrombocythemia. *Blood.* 2001;97:863-866.
74. Mazzucconi MG, Redi R, Bernasconi S, et al. A long-term study of young patients with essential thrombocythemia treated with anagrelide. *Haematologica.* 2004;89:1306-1313.
75. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status. *J Clin Oncol;*29:392-397.
76. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, et al. Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant;*16:358-367.
77. Kroger N, Holler E, Kobbe G, et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2009;114:5264-5270.
78. Cervantes F, Mesa R, Barosi G. New and old treatment modalities in primary myelofibrosis. *Cancer J.* 2007;13:377-383.

79. Huang J, Tefferi A. Erythropoiesis stimulating agents have limited therapeutic activity in transfusion-dependent patients with primary myelofibrosis regardless of serum erythropoietin level. *Eur J Haematol.* 2009;83:154-155.
80. Mishchenko E, Tefferi A. Treatment options for hydroxyurea-refractory disease complications in myeloproliferative neoplasms: JAK2 inhibitors, radiotherapy, splenectomy and transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Eur J Haematol*;85:192-199.
81. Mesa RA, Steensma DP, Pardanani A, et al. A phase 2 trial of combination low-dose thalidomide and prednisone for the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2003;101:2534-2541.
82. Tefferi A, Cortes J, Verstovsek S, et al. Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 2006;108:1158-1164.
83. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Manshour T, et al. Lenalidomide plus prednisone results in durable clinical, histopathologic, and molecular responses in patients with myelofibrosis. *J Clin Oncol.* 2009;27:4760-4766.
84. Tefferi A, Lasho TL, Mesa RA, Pardanani A, Ketterling RP, Hanson CA. Lenalidomide therapy in del(5)(q31)-associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. *Leukemia.* 2007;21:1827-1828.
85. Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, et al. Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. *J Clin Oncol.* 2009;27:4563-4569.
86. Pardanani A, Hood J, Lasho T, et al. TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia.* 2007;21:1658-1668.
87. Lasho TL, Tefferi A, Hood JD, Verstovsek S, Gilliland DG, Pardanani A. TG101348, a JAK2-selective antagonist, inhibits primary hematopoietic cells derived from myeloproliferative disorder patients with JAK2V617F, MPLW515K or JAK2 exon 12 mutations as well as mutation negative patients. *Leukemia.* 2008.
88. Wernig G, Kharas MG, Okabe R, et al. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer Cell.* 2008;13:311-320.
89. Fridman J, Nussenzveig R, Liu P, et al. Discovery and Preclinical Characterization of INCB018424, a Selective JAK2 Inhibitor for the Treatment of Myeloproliferative Disorders. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2007;110:3538-.
90. Verstovsek S, Pardanani AD, Shah NP, et al. A Phase I Study of XL019, a Selective JAK2 Inhibitor, in Patients with Primary Myelofibrosis and Post-Polycythemia Vera/Essential Thrombocythemia Myelofibrosis. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2007;110:553-.
91. Hexner EO, Serdikoff C, Jan M, et al. Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood.* 2007.

92. Mesa RA, Camoriano JK, Geyer SM, et al. A phase II trial of tipifarnib in myelofibrosis: primary, post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2007;21:1964-1970.
93. Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 2009;461:819-822.
94. Quintas-Cardama A, Tong W, Kantarjian H, et al. A phase II study of 5-azacitidine for patients with primary and post-essential thrombocythemia/polycythemia vera myelofibrosis. *Leukemia*. 2008;22:965-970.
95. Guerini V, Barbui V, Spinelli O, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2(V617F). *Leukemia*. 2008;22:740-747.
96. Rambaldi A, Dellacasa CM, Finazzi G, et al. A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*;150:446-455.
97. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006;355:2452-2466.
98. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;228:273-287.
99. Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19:385-393.
100. Kilpivaara O, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia*. 2008;22:1813-1817.
101. Cross NC, Daley GQ, Green AR, et al. BCR-ABL1-positive CML and BCR-ABL1-negative chronic myeloproliferative disorders: some common and contrasting features. *Leukemia*. 2008;22:1975-1989.
102. Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces antiapoptotic and proapoptotic signals in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003;102:630-637.
103. Meydan N, Grunberger T, Dadi H, et al. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature*. 1996;379:645-648.
104. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2004;32:179-187.
105. Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:6224-6229.
106. Savell J, Ma Y, Morrow KS, et al. AG490 inhibits G1-S traverse in BALB/c-3T3 cells following either mitogenic stimulation or exogenous expression of E2F-1. *Mol Cancer Ther*. 2004;3:205-213.
107. Kleinberger-Doron N, Shelah N, Capone R, Gazit A, Levitzki A. Inhibition of Cdk2 activation by selected tyrphostins causes cell cycle arrest at late G1 and S phase. *Exp Cell Res*. 1998;241:340-351.

108. Zaleskas VM, Krause DS, Lazarides K, et al. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS ONE*. 2006;1:e18.
109. Grandage VL, Everington T, Linch DC, Khwaja A. Go6976 is a potent inhibitor of the JAK 2 and FLT3 tyrosine kinases with significant activity in primary acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2006;135:303-316.
110. Starling N, Neoptolemos J, Cunningham D. Role of erlotinib in the management of pancreatic cancer. *Ther Clin Risk Manag*. 2006;2:435-445.
111. Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res*. 1997;57:4838-4848.
112. Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, et al. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood*. 2001;97:3361-3369.
113. Mesa RA, Tefferi A, Gray LA, Reeder T, Schroeder G, Kaufmann SH. In vitro antiproliferative activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in hematopoietic progenitors from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia*. 2003;17:849-855.
114. Geron I, Abrahamsson AE, Barroga CF, et al. Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors. *Cancer Cell*. 2008;13:321-330.
115. Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Isaacs MA, Spivak JL. Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Exp Hematol*. 2008;36:1480-1486.
116. Verstovsek S, Kantarjian H, Pardanani A, et al. INCB018424, an Oral, Selective JAK2 Inhibitor, Shows Significant Clinical Activity in a Phase I/II Study in Patients with Primary Myelofibrosis (PMF) and Post Polycythemia Vera/Essential Thrombocythemia Myelofibrosis (Post-PV/ET MF). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2007;110:558-.
117. Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:3669-3676.
118. Mendez R, Myers MG, Jr., White MF, Rhoads RE. Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*. 1996;16:2857-2864.
119. Dilling MB, Germain GS, Dudkin L, et al. 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. *J Biol Chem*. 2002;277:13907-13917.
120. Murata K, Wu J, Brautigan DL. B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:10624-10629.
121. Di Como CJ, Arndt KT. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev*. 1996;10:1904-1916.

122. Castedo M, Ferri KF, Kroemer G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ.* 2002;9:99-100.
123. Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, et al. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood.* 2007;109:3509-3512.
124. Peponi E, Drakos E, Reyes G, Leventaki V, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2006;169:2171-2180.
125. Teachey DT, Obzut DA, Axsom K, et al. Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood.* 2006;108:1965-1971.
126. Chen W, Drakos E, Grammatikakis I, et al. mTOR signaling is activated by FLT3 kinase and promotes survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer;*9:292.
127. Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller RG, Mills GB. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res.* 1995;55:1982-1988.
128. Chen YJ, Hsiao PW, Lee MT, Mason JI, Ke FC, Hwang JJ. Interplay of PI3K and cAMP/PKA signaling, and rapamycin-hypersensitivity in TGFbeta1 enhancement of FSH-stimulated steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells. *J Endocrinol.* 2007;192:405-419.
129. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, et al. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5165-5173.
130. Sillaber C, Mayerhofer M, Bohm A, et al. Evaluation of antileukaemic effects of rapamycin in patients with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Eur J Clin Invest.* 2008;38:43-52.
131. Haritunians T, Mori A, O'Kelly J, Luong QT, Giles FJ, Koeffler HP. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia.* 2007;21:333-339.
132. Costa LJ. Aspects of mTOR biology and the use of mTOR inhibitors in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Treat Rev.* 2007;33:78-84.
133. Golay J, Cuppini L, Leoni F, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity in vitro and in vivo and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. *Leukemia.* 2007;21:1892-1900.
134. Carta S, Tassi S, Semino C, et al. Histone deacetylase inhibitors prevent exocytosis of interleukin-1beta-containing secretory lysosomes: role of microtubules. *Blood.* 2006;108:1618-1626.
135. Carlo-Stella C, Lavazza C, Carbone A, Gianni AM. Anticancer cell therapy with TRAIL-armed CD34+ progenitor cells. *Adv Exp Med Biol.* 2008;610:100-111.
136. Barosi G, Besses C, Birgegard G, et al. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia.* 2007;21:277-280.

137. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, et al. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009;113:4829-4833.
138. Barosi G, Bordessoule D, Briere J, et al. Response criteria for myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of an initiative of the European Myelofibrosis Network (EUMNET). *Blood*. 2005;106:2849-2853.
139. Tefferi A, Barosi G, Mesa RA, et al. International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia, for the IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). *Blood*. 2006;108:1497-1503.
140. Gonzalez-Santiago L, Suarez Y, Zarich N, et al. Aplidin induces JNK-dependent apoptosis in human breast cancer cells via alteration of glutathione homeostasis, Rac1 GTPase activation, and MKP-1 phosphatase downregulation. *Cell Death Differ*. 2006;13:1968-1981.
141. Munoz-Alonso MJ, Gonzalez-Santiago L, Zarich N, et al. Plitidepsin has a dual effect inhibiting cell cycle and inducing apoptosis via Rac1/c-Jun NH2-terminal kinase activation in human melanoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324:1093-1101.
142. Brogгинi M, Marchini SV, Galliera E, et al. Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4. *Leukemia*. 2003;17:52-59.
143. Biscardi M, Caporale R, Balestri F, Gavazzi S, Jimeno J, Grossi A. VEGF inhibition and cytotoxic effect of aplidin in leukemia cell lines and cells from acute myeloid leukemia. *Ann Oncol*. 2005;16:1667-1674.
144. Schoffski P, Guillem V, Garcia M, et al. Phase II randomized study of Plitidepsin (Aplidin), alone or in association with L-carnitine, in patients with unresectable advanced renal cell carcinoma. *Mar Drugs*. 2009;7:57-70.
145. Mateos MV, Cibeira MT, Richardson PG, et al. Phase II clinical and pharmacokinetic study of plitidepsin 3-hour infusion every two weeks alone or with dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res*;16:3260-3269.
146. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2000;96:3374-3380.
147. Vannucchi AM, Bianchi L, Paoletti F, et al. A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis. *Blood*. 2005;105:3493-3501.
148. Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, et al. Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood*. 2002;100:1123-1132.

149. Verrucci M, Pancrazzi A, Aracil M, et al. CXCR4-independent rescue of the myeloproliferative defect of the Gata1^{low} myelofibrosis mouse model by Aplidin. *J Cell Physiol*;225:490-499.
150. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res.* 2007;31:737-740.