



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE
CURRICULUM ONCOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA

CICLO XXX

COORDINATORE PROF. DELLO SBARBA PERSIO

**Sviluppo e gestione di studi clinici
indipendenti di Fase I/II nelle
Neoplasie Mieloproliferative Croniche**

Settore Scientifico Disciplinare MED/15

Dottorando

Dott. Paoli Chiara

Tutore

Prof. Vannucchi Alessandro Maria

Coordinatore

Prof. Dello Sbarba Persio

Anni 2014/2017

Sommario

ABSTRACT	3
1 - INTRODUZIONE	5
1.1 - <i>GLI STUDI CLINICI</i>	5
1.1.1 - L'ETICA DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA	5
1.1.2 - IL PROCESSO DI SVILUPPO DI UN FARMACO.....	8
2 - CAMPO DI APPLICAZIONE	30
2.1 - <i>LE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE (MPN)</i>	30
2.1.1 - CLASSIFICAZIONE.....	35
2.1.2 - SINTOMI.....	38
2.1.3 - DIAGNOSI ED ESAMI.....	39
2.1.4 - SCORE PROGNOSTICI, FATTORI DI RISCHIO, TERAPIA	40
3 - SCOPO ED OBIETTIVI DEL PROGETTO	47
4 - METODOLOGIA PER L'ATTIVAZIONE E GESTIONE DI STUDI CLINICI INDIPENDENTI	50
4.1 - <i>REQUISITI DELLA CLINICAL TRIAL UNIT (CTU)</i>	51
4.2 - <i>PROCEDURE OPERATIVE STANDARD PER LA CONDUZIONE DI STUDI CLINICI DI FASE I-II</i>	51
5 – RISULTATI	53
5.1 - <i>PROGETTAZIONE DI SOP PER LE ATTIVITA' DELLA CTU</i>	53
5.1.1 - STRUTTURA DELLE SOP.....	55
5.2 - PROGETTAZIONE DELLO STUDIO CLINICO SVT-RUXO	57
5.2.1 - <i>FASE DI PROGETTAZIONE – IL PROTOCOLLO</i>	57
5.2.1.1 - PREMESSE E RAZIONALE DELLO STUDIO	57
5.2.1.2 - OBIETTIVI DELLO STUDIO (OBIETTIVO PRIMARIO ED OBIETTIVI SECONDARI).....	58
5.2.1.3 - DISEGNO DELLO STUDIO	58
5.2.1.4 - CRITERI DI ELEGGIBILITÀ DEI SOGGETTI (CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE).....	59
5.2.1.5 - PROCEDURE DA EFFETTUARE PRIMA DELL'INSERIMENTO DEL SOGGETTO NELLO STUDIO.....	63
5.2.1.6 - DESCRIZIONE DELLE MODALITÀ, DEI TEMPI E DELLE DOSI DI SOMMINISTRAZIONE DEI FARMACI IN STUDIO	67
5.2.1.7 - STRUMENTI E MODALITÀ DI VALUTAZIONE DEGLI OBIETTIVI PER LO STUDIO (AD ESEMPIO, CRITERI DELLA VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA OBIETTIVA, TEMPI ED ESAMI PREVISTI PER IL FOLLOW-UP, QUESTIONARI SULLA QUALITÀ DELLA VITA).....	67
5.2.1.8 - DIMENSIONAMENTO DEL CAMPIONE, PROCEDURE DI RACCOLTA E DI ANALISI DEI DATI.....	74
5.2.2 - <i>FASE DI ATTIVAZIONE E CONDUZIONE DELLO STUDIO</i>	75
5.2.2.1 - STUDY START-UP	75

5.2.2.2 – ATTIVITÀ SVOLTE PER L’APPROVAZIONE DA PARTE DELL’AUTORITÀ REGOLATORIA E SOTTOMISSIONE/APPROVAZIONE DELLO STUDIO DA PARTE DEI COMITATI ETICI COINVOLTI.....	80
5.2.2.3 - ATTIVITÀ SVOLTE PER L’ATTIVAZIONE DEI CENTRI SPERIMENTALI.....	82
5.2.3 - GESTIONE, ANALISI E PUBBLICAZIONE DEI DATI	86
5.2.3.1 -ATTIVITÀ SVOLTE PER IL MONITORAGGIO E LA GESTIONE DEI DATI CLINICI E DI LABORATORIO	86
5.2.3.2 - ANALISI STATISTICA E PUBBLICAZIONE DEI RISULTATI.....	87
5.3 – PROGETTAZIONE DELLO STUDIO CLINICO REVEMY.....	99
5.3.1 - FASE DI PROGETTAZIONE – IL PROTOCOLLO.....	99
5.3.1.1 - PREMESSE E RAZIONALE DELLO STUDIO.....	99
5.3.1.2 - OBIETTIVI DELLO STUDIO (OBIETTIVO PRIMARIO ED EVENTUALI OBIETTIVI SECONDARI).....	100
5.3.1.3 - CRITERI DI ELEGGIBILITÀ DEI SOGGETTI (CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE).....	101
5.3.1.4 - DESCRIZIONE DELLE MODALITÀ, DEI TEMPI E DELLE DOSI DI SOMMINISTRAZIONE DEI FARMACI IN STUDIO	103
5.3.1.5 - DISEGNO DELLO STUDIO E DIMENSIONAMENTO DEL CAMPIONE	103
5.3.1.6 - PROCEDURE DI RACCOLTA E DI ANALISI DEI DATI.....	105
5.3.2 - FASE DI ATTIVAZIONE – FATTIBILITA’	105
6 - CONCLUSIONI.....	107
7 - BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	111
7.1 - BIBLIOGRAFIA	111
7.2 - SITOGRAFIA	117

ABSTRACT

Le malattie mieloproliferative sono patologie neoplastiche rare, che possono colpire ogni fascia di età, ma con incidenza crescente stimata essere pari a 1.8 casi/100.000 persone-anno in Europa, e sono caratterizzate da una serie di mutazioni a carico di geni come *JAK2*, presente nella quasi totalità dei pazienti affetti da Policitemia Vera (PV; 95%) e in una proporzione significativa di pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale (ET; 55%) e Mielofibrosi Primaria (PMF; 65%), oppure *MPL*, presente nel 5-8% di ET e PMF, o calreticulina (*CALR*) presente nel 20-25% dei casi con ET e PMF.

Tali mutazioni causano l'attivazione disregolata della via di segnalazione JAK/STAT, che rappresenta quindi un bersaglio molecolare negli studi pre-clinici (target-based), su cui testare l'attività di nuove molecole per studi farmacologici. Tale screening si è molto arricchito grazie all'incremento delle conoscenze sui pathways molecolari che regolano la proliferazione cellulare oltre la via classica JAK/STAT. I farmaci Ruxolitinib (inibitore di JAK2) ed Everolimus (inibitore di mTOR) rientrano nella così detta "target therapy", ovvero molecole capaci di agire direttamente su un meccanismo chiave coinvolto nella patogenesi delle Malattie Mieloproliferative Croniche. L'esperienza su questi farmaci, derivante da studi pre-clinici, ha permesso di elaborare e progettare due studi clinici rispettivamente di fase II e fase Ib-II:

- "Safety and efficacy of ruxolitinib in splanchnic vein thrombosis associated with myeloproliferative neoplasms (SVT-RUXO)";
- "A phase Ib-II, open-label, multi-center, dose-finding study to assess the safety and efficacy of the oral combination of Ruxolitinib and EVERolimus in subjects with a primary MYelofibrosis, post- polycythemia vera-myelofibrosis , or post- essential thrombocythemia-myelofibrosis (REVEMY)".

Partendo dal presupposto che gli studi clinici nascono dall'esigenza di innovare la terapia e rispondere ai bisogni di salute dell'individuo, è indubbio che una organizzazione ben strutturata, come quella di una Clinical Trial Unit (CTU), possa permettere di svolgere le attività connesse alla gestione di uno studio clinico, a garanzia di elevati standard di qualità. Il processo della ricerca clinica è basato infatti su una organizzazione molto complessa di figure professionali, obiettivi e risorse. Per poter gestire i due studi oggetto del presente dottorato, nel rispetto delle normative vigenti in materia di Sperimentazione, è stato necessario svolgere attività di Clinical Research Process Management, sviluppando

procedure operative standard (SOP) interne al mio gruppo di ricerca. Il mio lavoro è quindi iniziato dalla organizzazione e strutturazione di una CTU per la quale ho preparato tutte le necessarie procedure scritte e relative checklist, in accordo alle linee guida della Buona Pratica Clinica, con l'obiettivo di facilitare l'operatività, agire secondo le indicazioni della normativa vigente, ma soprattutto agire con sicurezza per i pazienti ed efficacia. Questa iniziale attività si è concretizzata operativamente nella gestione e conduzione di uno studio clinico, SVT-RUXO, i cui risultati sono stati pubblicati di recente e attraverso il quale è stato possibile dimostrare la sicurezza ed efficacia di ruxolitinib in pazienti con trombosi splancnica associata a neoplasia mieloproliferativa.

1 - INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi anni la metodologia delle sperimentazioni cliniche si è profondamente trasformata diventando sempre più complessa. Si è passati da piccoli studi clinici condotti su casistiche limitate, a studi multicentrici con migliaia di pazienti arruolati. Affinché i risultati degli studi siano validi e corretti, occorre che vengano condotti secondo norme rigide e condivise, le Good Clinical Practice (GCP) introdotte nel 1987, che costituiscono un modello internazionale di etica e qualità scientifica che garantisce, soprattutto, la tutela dei diritti e la sicurezza dei soggetti partecipanti. Questa nuova metodologia ha avuto come esito l'intensificazione delle attività degli sperimentatori e un enorme impatto sul carico di lavoro. È sorta quindi l'esigenza di predisporre di figure professionali dedicate specificatamente alla gestione degli studi clinici. Il Coordinatore di Ricerca Clinica (CRC) è colui che si occupa di gestire e coordinare uno studio clinico, dalle prime fasi di approvazione e apertura del Centro, alla gestione dei dati, visite di monitoraggio, gestione del farmaco.

La corretta conduzione di un trial clinico, quindi, è il risultato dell'interazione tra differenti professionalità coinvolte: medici, infermieri, biostatistici, farmacisti e data manager.

Un'organizzazione ben strutturata permette quindi di poter svolgere l'attività di ricerca con elevato standard di qualità, obiettivo fondamentale soprattutto durante lo svolgimento di sperimentazioni cliniche "investigator initiated".

1.1 - GLI STUDI CLINICI

1.1.1 - L'ETICA DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA

Gli studi clinici nascono dall'esigenza di innovare la terapia e rispondere ai bisogni di salute dell'individuo. Dopo le aberranti sperimentazioni condotte nei campi di concentramento nazisti, la comunità internazionale, per la prima volta nella storia, decise di redigere un documento in cui porre limiti precisi alla sperimentazione sull'uomo. Era il 1947. I massimi esperti a livello mondiale scrissero quello che da allora viene chiamato il Codice di Norimberga. Con tale codice si proclama in modo solenne che "il consenso volontario del soggetto è assolutamente necessario". Tuttavia, la necessità di un consenso del paziente come requisito pieno, e non sostituibile con altre forme di legittimazione, venne compreso soltanto nei decenni successivi, attraverso un percorso che non è stato uniforme nei vari Paesi.

Oggi il principale documento che regola l'eticità delle sperimentazioni nell'uomo è la Dichiarazione di Helsinki, redatta nel 1964 dalla World Medical Association (Associazione mondiale dei medici). Il documento regola i diritti degli esseri umani coinvolti nella sperimentazione dei farmaci.

Se la Dichiarazione di Norimberga elenca principi di base a tutela degli individui coinvolti negli esperimenti, e costituisce quindi una sorta di "Costituzione" della materia, la Dichiarazione di Helsinki entra maggiormente nei dettagli tecnici, così come avviene per le leggi e le norme attuative. Il dibattito in merito non è comunque concluso e altri documenti, spesso di valore locale, hanno visto la luce per risolvere i casi più controversi o particolari.

Vediamo quindi quali furono le regole introdotte da queste due dichiarazioni:

Il Codice di Norimberga (1947)

Le raccomandazioni del Codice di Norimberga (1947) per l'etica della sperimentazione sull'uomo furono le seguenti:

1. Irrinunciabile il consenso informato
2. Beneficio per la società non altrimenti ottenibile
3. Preceduto dalla sperimentazione sull'animale
4. Evitata qualsiasi sofferenza non necessaria per i soggetti
5. Evitato il pericolo di morte o di disabilità per i soggetti
6. Disegnata affinché i benefici per l'umanità siano maggiori del rischio per il singolo
7. Opportunamente preparata al fine di proteggere il soggetto
8. Condotta solo da personale qualificato
9. Disegnata in modo tale da permettere al soggetto di ritirarsi in qualsiasi momento
10. Disegnata in modo tale da permettere al ricercatore di interromperla quando si accorgesse che essa genera sofferenza non necessaria al paziente

La Dichiarazione di Helsinki (1964)

Tale dichiarazione:

1. Introdusse l'esigenza di un Comitato etico indipendente per la valutazione e la conseguente approvazione dei protocolli sperimentali
2. sottolineò la facoltà del soggetto di ritirare il consenso alla sperimentazione in qualsiasi momento

3. introdusse la necessità di prendere ogni tipo di precauzione per rispettare la riservatezza del soggetto

Successivamente, nel 1982, la Food and Drug Administration (FDA) statunitense, elaborò una serie di norme per la conduzione degli studi clinici, che presero il nome di “Good clinical practice”, accettate in Italia con il Decreto Ministeriale del 15 Luglio 1997 (già consolidate nel 1991 nell’abito della ICH – International Conference of Harmonization).

Qui di seguito si riporta il link dove è possibile consultarle nella loro forma più aggiornata:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf

Le norme di Buona Pratica Clinica:

1. definiscono le procedure di tutela dei soggetti partecipanti alla sperimentazione (approvazione del protocollo, informazione del soggetto, consenso, assicurazione per i danni derivanti dalla partecipazione allo studio)
2. definiscono le responsabilità ed i compiti del promotore della sperimentazione (ovvero "una "persona, società, istituzione o organismo che si assume la responsabilità di avviare, gestire e finanziare la sperimentazione") e dei singoli sperimentatori partecipanti
3. istituiscono ispezioni regolatorie da parte di organi competenti nazionali ed internazionali per assicurare l’adeguatezza dei sistemi e l’accuratezza delle documentazioni inerenti lo studio.

1.1.2 - IL PROCESSO DI SVILUPPO DI UN FARMACO

Negli anni successivi, gli aspetti normativi sono aumentati sensibilmente, e condurre una ricerca clinica è diventato sempre più complesso; infatti, l'intero processo di sviluppo di un farmaco, dalla sintesi della molecola alla commercializzazione dura in media 12 anni e si compone di varie tappe intermedie che si possono così schematizzare (Fig.1):

FASE PRECLINICA

1. Acquisizione di nuove molecole: Identificazione dell'Hit – una molecola organica iniziale capostipite di una nuova classe di prodotti in un programma di ricerca.
2. Screening in vitro ed in vivo: Ottimizzazione del Lead – una molecola organica già parzialmente sviluppata (nel corso dell'hit-to lead process) che abbia la potenzialità di essere valutata in vivo.
3. Formulazione di un farmaco (via di somministrazione)
4. Tossicologia e farmacologia pre-clinica: *Studi preliminari di sicurezza ed efficacia* - Per determinare il profilo di sicurezza iniziale di un farmaco vengono condotti numerosi test tossicologici e farmacologici in silico, in vitro e ricorrendo al modello animale più appropriato.

FASE CLINICA

5. Sperimentazione clinica sull'uomo (attraverso 3 fasi di ricerca): *Studi di fase I* - In questa fase il farmaco viene assunto per la prima volta da esseri umani per verificare il meccanismo d'azione e per raccogliere i dati preliminari sull'efficacia, sullo schema di dosaggio e sugli eventuali effetti collaterali. Il composto viene somministrato a un piccolo gruppo di volontari sani o di pazienti (da 20 a 80). *Studi di fase II* - Negli studi di fase II, il farmaco viene somministrato a un gruppo più ampio di soggetti (da 100 a 600) con l'obiettivo di valutarne l'efficacia e il profilo di sicurezza, e determinare con più precisione la dose terapeutica e la frequenza di somministrazione. *Studi di fase III* - Negli studi di fase III il farmaco viene somministrato a un numero ancora maggiore di pazienti (da 1000 a 4000) in modo da confermare i dati sull'efficacia, avere una panoramica più dettagliata sugli effetti collaterali e confrontarlo con i trattamenti già in uso per la stessa patologia.
6. Approvazione da parte degli enti governativi EMA (Europeo) e FDA (Americano): *Registrazione* - Per registrare un nuovo farmaco occorre sottoporre alle Autorità Regolatorie i risultati di tutti gli studi preclinici e clinici (tipicamente, oltre 80 studi, con circa 5.000 pazienti), nonché le informazioni sulla qualità dei dati raccolti e la descrizione dei processi di produzione. Se

l'efficacia e la sicurezza del farmaco vengono considerate adeguate viene rilasciata l'autorizzazione all'immissione in commercio.

7. Commercializzazione (post-approvazione da parte dell'autorità regolatoria AIFA): *Studi di fase IV* - Quando il farmaco è in commercio occorre continuare a monitorarne gli effetti collaterali e segnalarli alle Autorità sanitarie. Inoltre, dopo la commercializzazione vengono spesso intrapresi nuovi studi, utili per identificare nuove indicazioni del farmaco, per migliorare la formulazione o per verificarne alcuni aspetti in condizioni reali d'uso.



Fig.1 – La sperimentazione clinica: processo di sviluppo di un farmaco

1.1.2.1 - FASE PRECLINICA

La sperimentazione preclinica, ha come scopo lo studio del comportamento di una molecola chimica in un organismo vivente complesso al fine di ottenere informazioni preliminari su efficacia, sicurezza, tossicità, farmacocinetica e farmacodinamica, via di somministrazione.

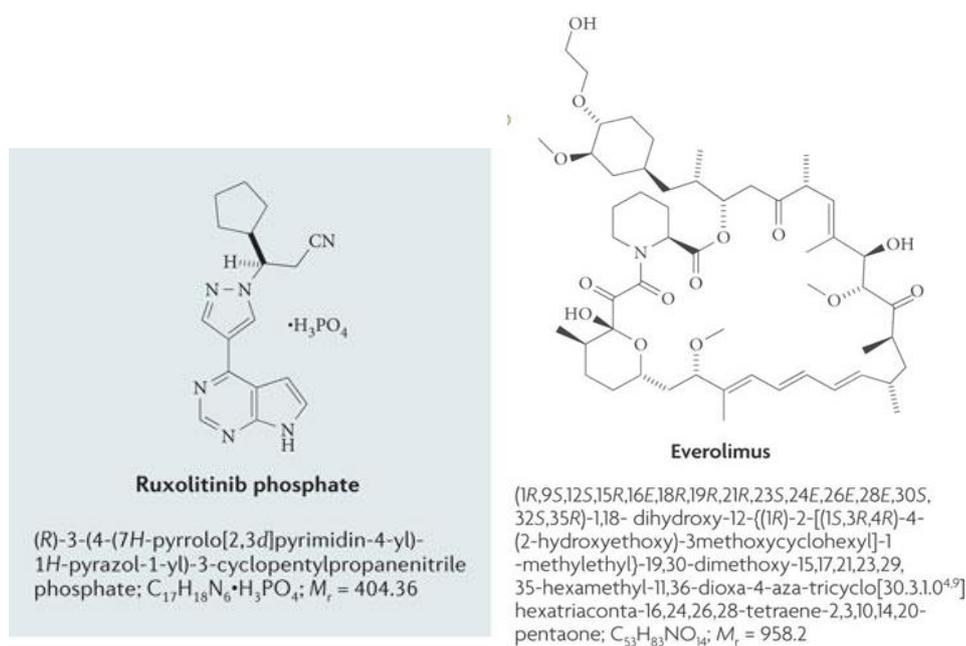
Nella fase preclinica sono inoltre oggetto di studio la produzione del composto, la sua formulazione e la relativa stabilità.

Questi studi devono essere condotti sotto il diretto controllo dell'azienda farmaceutica ed essere svolti in osservanza delle cosiddette buone procedure di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice).

La fase di sviluppo preclinico richiede da 2 a 3 anni e costituisce il 30% dell'investimento totale.

ACQUISIZIONE DI NUOVE MOLECOLE

L'acquisizione di nuove molecole può avvenire da fonti naturali o da processi di sintesi come nel caso delle due molecole utilizzate nel presente dottorato: Ruxolitinib ed Everolimus (Fig.2).



Nature Reviews | Drug Discovery

Nature Reviews | Drug Discovery

Fig.2 – Molecola di Ruxolitinib ed Everolimus

I potenziali nuovi farmaci possono essere o del tutto innovativi, con una struttura chimica completamente diversa dai farmaci esistenti, oppure essere analoghi ad altri farmaci già esistenti.

SCREENING IN VITRO ED IN VIVO

Lo scopo dello screening, nel caso specifico delle molecole con attività anti-tumorale, è quello di fornire una valutazione iniziale dell'attività citotossica o di inibizione della crescita tumorale di ciascun composto, magari derivato da una libreria di molecole naturali o sintetiche, nei confronti delle varie linee cellulari tumorali. I composti che rivelano interessanti profili di attività vengono selezionati per le tappe successive di sviluppo in vitro ed in vivo.

SCREENING IN VITRO

La misura dall'attività della sostanza a determinate concentrazioni per ciascuna delle linee cellulari bersaglio consente di ottenere un profilo ("fingerprint") dell'attività antitumorale del farmaco. Similitudini nel profilo di attività tra due molecole possono essere determinate da una simile struttura molecolare, ma possono rivelare eventualmente similitudine nel meccanismo d'azione o nei meccanismi di resistenza cellulare. Quindi, confrontando il profilo di attività di un farmaco nuovo con quello di farmaci noti si possono avere informazioni anche sul meccanismo d'azione del farmaco e sul bersaglio intracellulare.

Lo screening di attività di nuove molecole può essere diretto verso bersagli molecolari specifici (target-based), nel caso, ad esempio, di sostanze che interferiscano con l'azione di proteine coinvolte nella stimolazione della proliferazione cellulare responsabile della crescita tumorale (ad esempio, recettori di membrana per fattori di crescita, proteine intracellulari coinvolte nella trasduzione del segnale, etc.). Tale screening si è molto sviluppato grazie all'incremento delle conoscenze sui pathways molecolari che regolano la proliferazione cellulare.

Ruxolitinib ed Everolimus rientrano nella così detta "target therapy", ovvero molecole capaci di agire direttamente su un meccanismo chiave coinvolto nella patogenesi delle Malattie Mieloproliferative Croniche (Fig.3).

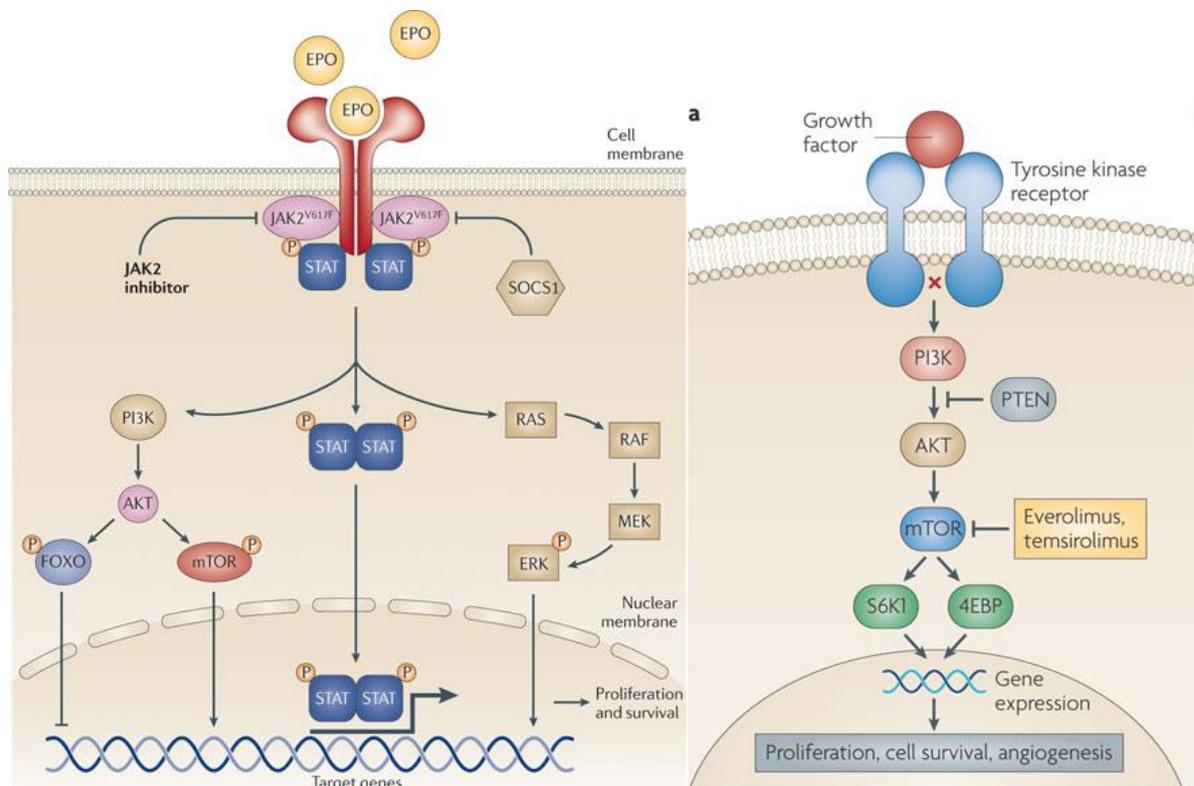


Fig.3 – Meccanismo d'azione di Ruxolitinib ed Everolimus

RUXOLITINIB ED IL SUO MECCANISMO D'AZIONE

Ruxolitinib è un inibitore selettivo delle Janus Associated Kinases (JAKs) JAK1 e JAK2. Queste mediano il segnale di un numero di citochine e fattori di crescita che sono importanti per l'ematopoiesi e la funzione immunitaria. La mielofibrosi è una neoplasia mieloproliferativa nota per essere associata alla deregolazione del segnale di JAK2. Si ritiene che la base della deregolazione includa alti livelli di citochine circolanti che attivano la via di JAK-STAT, le mutazioni che aumentano la funzionalità enzimatica come JAK2V617F, e la repressione dei

meccanismi di regolazione negativa. I soggetti con mielofibrosi presentano una deregolazione del segnale di JAK indipendentemente dallo stato della mutazione JAK2V617F. Ruxolitinib inibisce il segnale di JAK-STAT e la proliferazione cellulare di modelli cellulari citochino-dipendenti di neoplasie ematologiche, così come delle cellule Ba/F3 rese citochino-indipendenti dall'espressione della proteina mutata JAK2V617F. In particolare, Ruxolitinib inibisce la fosforilazione di STAT3 indotta da citochine nel sangue di volontari sani e di soggetti con mielofibrosi. Sia nei soggetti sani che nei pazienti con mielofibrosi, ruxolitinib ha determinato, 2 ore dopo la somministrazione, massima inibizione della fosforilazione di STAT3 che è ritornata quasi a livello basale entro 8 ore, indicando che non vi è accumulo né del farmaco immodificato né dei metaboliti attivi. Nei soggetti con mielofibrosi, l'innalzamento dei livelli basali dei marcatori infiammatori associati ai sintomi costitutivi lamentati dai pazienti, come TNF α , IL-6 e CRP, appare ridotto a seguito del trattamento con ruxolitinib. I pazienti con mielofibrosi non sono diventati resistenti, nel tempo, agli effetti farmacodinamici di ruxolitinib, ma può essere perduta in parte o totalmente l'efficacia clinica del farmaco con meccanismi che restano ancora da chiarire.

Due studi di fase 3, randomizzati (COMFORT-I e COMFORT-II) sono stati condotti in soggetti con mielofibrosi (mielofibrosi primaria, mielofibrosi post-policitemia vera o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale). In entrambi gli studi, i soggetti arruolati presentavano splenomegalia palpabile di almeno 5 cm al di sotto del margine costale e una categoria di rischio intermedio-2 (2 fattori prognostici) o rischio elevato (3 o più fattori prognostici) in base ai criteri condivisi del International Working Group (IWG). La dose iniziale di ruxolitinib è stata basata sulla conta piastrinica, essendo la dose-limite del farmaco (DLT) rappresentata appunto dalla riduzione della conta piastrinica .

COMFORT-I è uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo, condotto in 309 soggetti che erano resistenti o non erano candidabili alla terapia standard. I soggetti sono stati trattati con ruxolitinib o placebo secondo uno schema di somministrazione identico. L'endpoint primario di efficacia era la percentuale di soggetti che ottenevano una riduzione $\geq 35\%$ del volume della milza dal basale alla settimana 24 misurata mediante risonanza magnetica (Magnetic Resonance Imaging, MRI) o tomografia computerizzata (Computed Tomography, CT). Gli endpoint secondari di efficacia comprendevano la durata del mantenimento di una riduzione $\geq 35\%$ del volume della milza rispetto al basale, la percentuale

di pazienti che avevano una riduzione $\geq 50\%$ del punteggio totale dei sintomi dal basale alla settimana 24 misurato secondo il Myelofibrosis Symptom Assessment Form (MFSAF) v2.0 modificato, la modifica del punteggio totale dei sintomi dal basale alla settimana 24 misurato secondo il diario MFSAF v2.0 modificato, e la sopravvivenza globale.

COMFORT-II è uno studio randomizzato, in aperto, condotto in 219 soggetti. Questi sono stati randomizzati 2:1 a ruxolitinib verso la migliore terapia disponibile. La migliore terapia disponibile è stata scelta dallo sperimentatore in modo specifico per ciascun paziente. Nel braccio della migliore terapia disponibile, il 47% dei pazienti ha ricevuto idrossiurea e il 16% dei pazienti ha ricevuto glucocorticoidi. L'endpoint primario di efficacia era la percentuale di pazienti che raggiungevano una riduzione $\geq 35\%$ del volume della milza dal basale alla settimana 48 misurata mediante MRI o CT. Un endpoint secondario nel COMFORT-II era la percentuale di pazienti che ottenevano una riduzione $\geq 35\%$ del volume della milza misurata mediante MRI o CT dal basale alla settimana 24. Ulteriore endpoint secondario era anche la durata del mantenimento di una riduzione $\geq 35\%$ dal basale nei pazienti che hanno risposto.

Nel COMFORT-I e nel COMFORT-II, i dati demografici dei pazienti al basale e le caratteristiche della malattia erano comparabili tra i bracci di trattamento.

Tra gli 80 pazienti nel COMFORT-I e i 69 pazienti nel COMFORT-II che avevano mostrato durante lo studio una riduzione $\geq 35\%$, la probabilità che un paziente mantenesse una risposta al farmaco per almeno 24 settimane era, rispettivamente, dell'89% e dell'87%, mentre nel COMFORT-II la probabilità di mantenere una risposta per almeno 48 settimane era del 52%. Ruxolitinib ha migliorato i sintomi associati alla mielofibrosi e la qualità di vita nei pazienti con mielofibrosi. Nel COMFORT-I i sintomi della mielofibrosi sono stati raccolti utilizzando il diario MFSAF v2.0 modificato come un diario elettronico che i pazienti compilavano giornalmente. Una percentuale significativamente più ampia di soggetti nel gruppo con ruxolitinib ha ottenuto un miglioramento $\geq 50\%$ del punteggio totale dei sintomi dal basale alla settimana 24 in confronto al gruppo placebo (rispettivamente 45,9% e 5,3%, $p < 0.0001$ utilizzando il test del chi-quadrato). Un miglioramento nella qualità di vita complessiva è stato misurato con uno strumento validato, il questionario EORTC QLQ-C30 in entrambi gli studi COMFORT-I e COMFORT-II. Alla settimana 24 nel COMFORT-I, la variazione media del punteggio relativo allo stato di salute globale/qualità di vita è stata di +12,3 e -3,4 ($p < 0.0001$) rispettivamente per ruxolitinib e placebo. Nel COMFORT-I, 13 su 155 pazienti (8,4%) sono morti nel gruppo

ruxolitinib e 24 su 154 pazienti (15,6%) sono morti nel gruppo placebo. Nel COMFORT-II, 13 su 146 pazienti (8,9%) sono morti nel gruppo ruxolitinib e 5 su 73 pazienti (6,8%) sono morti nel gruppo della migliore terapia disponibile.

EVEROLIMUS ED IL SUO MECCANISMO D'AZIONE

I soggetti con malattia mieloproliferativa, mostrano anche un'attivazione anormale della via AKT/mTOR.

Everolimus è un inibitore selettivo di mTOR (*mammalian target of rapamycin, target della rapamicina nei mammiferi*). mTOR è una serin–treonin chinasi chiave la cui attività è nota per essere sovra-regolata in numerosi tumori nell'uomo. Everolimus si lega alla proteina intracellulare FKBP–12, formando un complesso che inibisce l'attività di mTOR complex–1 (mTORC1). L'inibizione della via del segnale di mTORC1 interferisce con la traduzione e la sintesi di proteine riducendo l'attività della protein chinasi S6 ribosomiale (S6K1) e la proteina eucariotica di legame del fattore 4E di allungamento della traduzione (4EBP–1) che regolano le proteine coinvolte nel ciclo cellulare, nell'angiogenesi e nella glicolisi. Si ritiene che S6K1 fosforili il dominio funzionale 1 di attivazione del recettore per gli estrogeni, che è responsabile dell'attivazione ligando–indipendente del recettore. Everolimus riduce i livelli del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), che potenzia i processi angiogenici tumorali.

Everolimus è un potente inibitore della crescita e della proliferazione delle cellule tumorali, delle cellule endoteliali, dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce associate ai vasi sanguigni e ha mostrato di ridurre la glicolisi nei tumori solidi *in vitro* e *in vivo*.

SCREENING IN VIVO

Soltanto una volta che sia stato appurato in laboratorio che una molecola di interesse possiede effetti biologici si può passare alla sperimentazione in vivo. Non necessariamente un farmaco attivo in vitro risulterà tale anche in vivo, perché ad esempio, alla base della perdita di attività possono esserci problemi di natura farmacocinetica o metabolica.

Lo screening in vivo, rappresenta un modello più complesso (animale), ma anche più vicino alla teorica somministrazione clinica. Consiste nel valutare l'attività antitumorale in modelli tumore-specifici, ad esempio, per quanto riguarda ruxolitinib, in topi knock-in per la mutazione JAK2V617F (presente in più del 60% dei soggetti affetti da Mielofibrosi).

Nel 1959 due accademici britannici, Rex Burch e William Russell, membri della Universities federation of animal welfare (UFAW), proposero un principio, o modello, che i ricercatori dovrebbero adottare per attuare una forma di sperimentazione animale più attenta al grado di sofferenza che tale pratica scientifica può indurre nei soggetti sperimentali (Russell, Burch, *The principles of humane experimental technique*, 1959). Il principio delle 3R fa riferimento a tre fondamentali concetti: rimpiazzare (*replacement*), ridurre (*reduction*) e rifinire (*refinement*). Quindi il ricercatore dovrebbe inizialmente cercare, con il maggiore sforzo possibile, di rimpiazzare, o sostituire, il proprio modello animale con un modello alternativo; il secondo passo è quello di cercare di ridurre il più possibile il numero di individui utilizzati in un certo protocollo sperimentale; infine, con l'ultima R si intende l'operazione di rifinire, o migliorare, le condizioni sperimentali alle quali sono sottoposti gli animali.

Rimpiazzare: Con questo concetto si vuole suggerire al ricercatore di indagare a fondo sulle possibilità di sostituire il modello animale con metodologie alternative. Nell'accezione originale del termine, quella proposta da Russell e Burch, si intendeva l'utilizzo di materiale non senziente, al posto del modello animale. I due autori descrissero una serie di metodi alternativi alla sperimentazione animale basati su piante, microrganismi, sistemi chimici e fisici non viventi. Attualmente, metodi alternativi al modello animale includono l'utilizzo di volontari umani, modelli tridimensionali e sistemi di realtà virtuale. Già Russell e Burch introdussero i concetti di rimpiazzo parziale (*relative replacement*) e rimpiazzo completo (*absolute replacement*). Nel primo caso, ci si riferisce agli esempi nei quali una specie animale viene sostituita da un'altra specie caratterizzata da un sistema nervoso relativamente meno complesso di quella originale, oppure, a quelli in cui in una particolare fase del protocollo sperimentale, l'animale è stato sostituito da un modello non senziente. Nel secondo caso, invece, il modello animale risulta completamente eliminato dal protocollo sperimentale.

Ridurre: Il secondo passo riguarda la riduzione del numero di soggetti utilizzati in un determinato protocollo sperimentale. Russell e Burch descrissero questo concetto come una riduzione del numero degli animali utilizzati, tale da ottenere comunque una quantità di dati numericamente significativi e di sufficiente precisione (Russell, Burch 1959). Mediante uno studio pilota, per es., è possibile determinare quantitativamente gli effetti di una certa manipolazione sperimentale, la facilità con la quale tali effetti possono essere identificati e il grado di variazione estranea all'esperimento stesso ma che può influenzare i risultati ottenuti.

Tali informazioni possono quindi essere utilizzate per calcolare con precisione il numero di soggetti sperimentali necessari all'ottenimento di risultati significativi per quel dato protocollo sperimentale. In questo tipo di approccio è di fondamentale importanza un uso corretto della statistica: un accurato disegno sperimentale, in termini di ampiezza del campione e potere del test statistico selezionato, è fondamentale per determinare il numero minimo necessario di soggetti da utilizzare.

Rifinire: cercare di ridurre il più possibile lo stress o la sofferenza dell'animale migliorando le procedure scientifiche di trasporto, stabulazione, tecniche usate nelle procedure del protocollo sperimentale, eutanasia.

FORMULAZIONE DI UN FARMACO (VIA DI SOMMINISTRAZIONE)

I fattori più importanti da considerare nella formulazione di un farmaco sono la solubilità, la stabilità, la dose e la via di somministrazione. La somministrazione orale offre maggiori vantaggi soprattutto in termini di comodità di assunzione per il soggetto, pur sollevando problemi di compliance, in quanto a differenza della somministrazione endovenosa, non è sempre possibile una verifica immediata della correttezza dei tempi e delle dosi di assunzione da parte del soggetto. Inoltre permette una somministrazione continuata di dosi relativamente basse, piuttosto che somministrazioni intermittenti di dosi elevate.

TOSSICOLOGIA E FARMACOLOGIA PRE-CLINICA

Gli studi di tossicologia e farmacologia preclinica permettono di valutare le dosi a cui il farmaco possa essere attivo senza eccessivi rischi di tossicità e possono essere utili per guidare gli incrementi di dose negli studi di fase I condotti sull'uomo.

CONCLUSIONE DELLA FASE PRECLINICA

L'intero percorso appena descritto genera la documentazione necessaria per richiedere agli organismi regolatori e di controllo l'autorizzazione per gli studi clinici sull'uomo, processo indicato come IND (Investigational New Drug Application). Le autorità competenti sono la Food and Drug Administration (FDA) per gli Stati Uniti, L'European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA) per l'Unione Europea e l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) per l'Italia.

1.1.2.2 - FASE CLINICA

Superata con successo la fase preclinica, è possibile quindi studiare gli effetti del nuovo prodotto medicinale sull'uomo; gli studi devono dimostrare la sicurezza e l'efficacia potenziale del composto osservate nella fase preclinica.

Esistono diverse modalità di classificazione delle sperimentazioni cliniche:

- Sulla base della loro *finalizzazione*, distinguendo tra ricerca *profit* e *no profit*. Le sperimentazioni *profit* hanno come obiettivo primario la commercializzazione (o comunque lo sviluppo di un nuovo farmaco) e sono quindi tipicamente sostenute dalle imprese farmaceutiche; le sperimentazioni *no profit* rispondono primariamente all'esigenza di determinare un miglioramento nelle strategie assistenziali e nei processi di cura dei pazienti e sono promosse da enti *no profit* come, appunto, le aziende sanitarie, i consorzi e gli istituti di ricerca. Secondo il decreto ministeriale del 2004 (DM 17 Dicembre 2004) gli studi clinici *no profit* sono finalizzati al miglioramento della pratica clinica come parte integrante dell'assistenza sanitaria. Tali sperimentazioni non sono finalizzate allo sviluppo industriale del farmaco né hanno fini di lucro. La legislazione italiana permette l'utilizzo del supporto economico messo a disposizione delle aziende farmaceutiche "a condizione che non sia pregiudicata in alcun modo l'indipendenza scientifica degli sperimentatori".
- In relazione alla *fase di sviluppo del nuovo farmaco* e, quindi, dalla Fase I, di prima somministrazione di un principio attivo sull'uomo, fino alla Fase IV, di studio di un farmaco già in commercio.
- Sulla base del *numero di centri coinvolti*, distinguendo tra studi monocentrici e studi multicentrici. In caso di studi multicentrici, il promotore dello studio individua un centro coordinatore e gli altri centri che partecipano alla sperimentazione sono considerati centri satelliti o secondari.

SPERIMENTAZIONE CLINICA SULL'UOMO (ATTRAVERSO 3 FASI DI RICERCA)

Il Decreto Legislativo 211/2003 definisce "sperimentazione clinica" qualsiasi studio sull'uomo finalizzato a scoprire o verificare gli effetti clinici, farmacologici e/o altri effetti farmacodinamici di uno o più medicinali sperimentali, e/o a individuare qualsiasi reazione avversa ad uno o più medicinali sperimentali, e/o a studiarne l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione, con l'obiettivo di accertarne la sicurezza e/o l'efficacia, nonché altri elementi di carattere scientifico e non. Questa definizione include le

sperimentazioni cliniche sia monocentriche che multicentriche, solo in Italia o anche in altri Stati membri dell'Unione Europea (articolo 2, comma 1, lettera a). Tali sperimentazioni vengono definite interventistiche.

Come detto in precedenza, lo svolgimento di una sperimentazione clinica è disciplinata in Europa dalla Direttiva 2001/20/EC e dalle linee guida internazionali *Good Clinical Practice* (GCP-ICH, recepite in Italia dal DM 15/7/97) che ne regolamentano i fondamenti e il processo autorizzativo. Le fasi comunemente riconosciute come fondanti sono tre:

1. l'approvazione da parte dell'Autorità Regolatoria;
2. la valutazione del protocollo di studio da parte dei Comitati Etici (CE);
3. l'attivazione dell'*agreement* (o convenzione economica) tra il proponente, gli sperimentatori e i centri di ricerca.

In Italia, in particolare, il percorso di autorizzazione per l'avvio di una sperimentazione prevede il coinvolgimento di diversi organismi con responsabilità e ruoli distinti:

- L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) che è l'autorità competente per le autorizzazioni degli studi di Fase I e gli studi con terapie geniche e cellulari che richiedono espressamente l'autorizzazione da parte del Ministero;
- I Comitati Etici (CE) per il rilascio di pareri etico scientifici propedeutici all'avvio dello studio nei centri;
- Le Direzioni Generali delle Aziende, o il loro legale rappresentante, che sono l'autorità competente per le autorizzazioni locali e per la negoziazione dei contratti tra i promotori della sperimentazione e i centri di sperimentazione;
- Il *network* europeo Eudravigilance per la segnalazione di "reazioni avverse serie" in corso di sperimentazione;
- L'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) che svolge un ruolo di raccordo e indirizzo e specifiche attività di autorizzazione e monitoraggio quali, ad esempio, quelle relative alle terapie avanzate.

In alcuni casi le sperimentazioni cliniche vedono il coinvolgimento anche di una *Contract Research Organization* (CRO), ovvero di una organizzazione di ricerca a contratto, accademica o commerciale, con cui il promotore dello studio può eventualmente stipulare una convenzione per supportare particolari attività connesse alla conduzione di una

sperimentazione clinica (quali, ad esempio, stesura del protocollo di ricerca, selezione dei centri e degli sperimentatori, elaborazione di report, analisi statistiche, preparazione della documentazione da sottoporre all'autorità regolatoria).

Tutte le sperimentazioni cliniche sono basate su un *protocollo* in cui sono descritte tutte le informazioni utili alla valutazione della sperimentazione e alla consultazione da parte degli sperimentatori durante la conduzione dello studio. Il protocollo individua inoltre i vari protagonisti della sperimentazione: lo sponsor, il primo ricercatore o principal investigator e i soggetti coinvolti, di cui è necessario acquisire il consenso libero, specifico ed informato (come descritto nelle linee guida per la buona pratica clinica – sezione 4.8 consenso informato dei soggetti coinvolti nello studio).

Prima che la sperimentazione possa avere inizio, il protocollo deve ottenere il *parere favorevole* di un Comitato etico indipendente. Ai sensi dell'articolo 2, comma 1, lettera m, dell'articolo 6 del D. Leg. 211/2003, il Comitato etico per le sperimentazioni cliniche dei medicinali è un organismo indipendente che ha la responsabilità di garantire la tutela dei diritti, della sicurezza e del benessere dei soggetti in sperimentazione e di fornire pubblica garanzia di tale tutela. Il D.M. 12 maggio 2006 ha stabilito i requisiti minimi per l'istituzione, l'organizzazione e il funzionamento dei Comitati etici.

Il Comitato etico è fra l'altro responsabile di: effettuare la revisione ed esprimere un parere sul protocollo di studio; valutare gli emendamenti sostanziali proposti e rilasciare il parere; verificare l'idoneità degli sperimentatori, delle strutture, dei metodi e del materiale da impiegare per ottenere e documentare il consenso informato dei partecipanti allo studio clinico; procedere a rivalutazioni periodiche degli studi approvati.

I componenti fondamentali di un buon protocollo di studio sono:

- Premesse e rationale dello studio
- Obiettivi dello studio (obiettivo primario ed eventuali obiettivi secondari)
- Criteri di eleggibilità dei soggetti (criteri di inclusione ed esclusione)
- Procedure da effettuare prima dell'inserimento del soggetto nello studio
- Descrizione delle modalità, dei tempi e delle dosi di somministrazione dei farmaci in studio

- Strumenti e modalità di valutazione degli obiettivi per lo studio (ad esempio, criteri della valutazione della risposta obiettiva, tempi ed esami previsti per il follow-up, questionari sulla qualità della vita)
- Disegno dello studio e dimensionamento del campione
- Procedure di raccolta e di analisi dei dati
- Bibliografia

REGISTRI DELLE SPERIMENTAZIONI CLINICHE

Negli ultimi anni la registrazione di sperimentazioni cliniche ha ottenuto sempre maggiore attenzione, ed a livello internazionale il numero di registri è cresciuto progressivamente. Tra i registri elettronici pubblici internazionali, certamente quello più noto è Clinicaltrials.gov, redatto a livello statunitense. Per quanto riguarda il panorama nazionale italiano, da alcuni anni è stato istituito l'Osservatorio sulla Sperimentazione Clinica dei Medicinali (OsSC), recentemente ampliato con la sezione Portale della Ricerca Clinica dei Farmaci. Oltre a questi sono disponibili altri registri, come ad esempio l'Eudract- European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials; database di tutte le sperimentazioni cliniche nella Comunità Europea dal 1 Maggio 2014 in avanti. Al momento infatti dell'approvazione di un protocollo clinico da parte del Comitato Etico locale, allo studio viene attribuito un EudraCT number, che lo identifica in maniera unica ed inequivocabile a livello Europeo.

IL PERCORSO DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA

L'intero processo di Sperimentazione clinica, dura in genere almeno 10 anni e si articola in varie fasi:

FASE I

Le tappe precliniche di sviluppo del farmaco, costituiscono le premesse per poter effettuare uno studio di fase I.

Per motivi etici, a causa della potenziale genotossicità di tali composti, negli studi di fase I condotti con molecole ad attività antitumorale, non è consentito avvalersi di volontari sani.

Gli studi di fase I rappresentano quindi la valutazione iniziale di un nuovo farmaco nell'uomo. Si tratta di studi che richiedono tipicamente un numero relativamente basso di soggetti (15-30). Tali studi hanno come obiettivi quelli di individuare la tossicità dose limitante (DLT), ovvero il tipo di tossicità la cui occorrenza a determinate dosi impedisce la somministrazione

di dosi più elevate del farmaco; di individuare la dose massima tollerata (MTD) per l'uomo, ovvero la più alta dose che è possibile somministrare causando tossicità inaccettabile in un numero sufficientemente limitato di soggetti; di definire la dose raccomandata per gli studi successivi, che generalmente è di poco inferiore alla MTD; di caratterizzare la farmacocinetica della molecola in esame.

Lo studio di tossicità è solitamente limitato alla tossicità acuta dei primi cicli di trattamento, mentre la tossicità a lungo termine non è quasi mai presa in considerazione.

Da un punto di vista metodologico, gli studi di fase I devono essere disegnati in modo da minimizzare il numero di soggetti trattati con dosi tanto basse da risultare inattive e minimizzare il rischio di tossicità irreversibili e potenzialmente letali con le dosi più elevate. Lo schema più diffuso per ottemperare a queste richieste è caratterizzato dal trattare 3 soggetti alla dose iniziale ritenuta presumibilmente non tossica, valutare se vi è stata tossicità inaccettabile e proseguire con successive coorti di 3 soggetti trattate a livelli crescenti di dose fino a che non si registrino dei casi di tossicità inaccettabile. Quando questo accade in 1 o 2 di 3 soggetti trattati ad un dato livello di dose, un'ulteriore coorte di 3 soggetti viene trattata con quella stessa dose; in genere si decide di proseguire l'incremento di dose se le tossicità registrate non interessano più di un terzo dei soggetti trattati; al contrario quando 3 o più dei soggetti riportano tossicità inaccettabile, si considera raggiunta la dose massima tollerata. Solitamente si considerano inaccettabili le tossicità di grado severo (ad esempio grado 3 e 4 secondo la scala WHO o i Common Toxicity Criteria del National Cancer Institute). Tuttavia, le tossicità che, per quanto severe, non inducono rischio di decesso (alopecia, nausea...) o che, sono solitamente transitorie e controllabili con la terapia di supporto (leucopenia, anemia...) non vengono considerate tossicità inaccettabili. Al contrario, l'occorrenza di una significativa tossicità d'organo (cardiaca, renale, epatica o polmonare) viene definita inaccettabile. In genere il livello di dose precedente a quello che ha rappresentato la MTD, viene considerato come dose massima accettabile per i successivi studi.

FASE II

Gli studi di fase II richiedono un numero di soggetti più ampio (generalmente tra 100-300, ma ovviamente variabile a seconda del tipo di disegno adottato). L'obiettivo principale è valutare l'attività del farmaco o della combinazione di farmaci in un gruppo di soggetti con una malattia specifica, al fine di fornire risposte preliminari su: risposta terapeutica ed impatto del farmaco

sull'evoluzione della malattia stessa. Questi studi non sono in grado di fornire informazioni attendibili sull'efficacia del trattamento stesso (vale a dire la sua capacità di indurre beneficio al soggetto). Inoltre il disegno di questi studi non consente di concludere se il trattamento sperimentato sia migliore della terapia standard.

Il parametro universalmente utilizzato per la valutazione dell'attività di un farmaco è la percentuale di risposte obiettive. I criteri utilizzati in ambito ematologico definiscono 3 possibili categorie di risposta: risposta completa, risposta parziale, nessuna risposta. Nella tabella di cui sotto (Fig.4), ad esempio, sono riportati i criteri di risposta in soggetti con mielofibrosi, una delle neoplasie mieloproliferative croniche.

1. Complete remission (CR)	<ul style="list-style-type: none"> i. Complete resolution of disease-related symptoms and signs including palpable hepatosplenomegaly. ii. Peripheral blood count remission defined as hemoglobin level at least 110 g/L, platelet count at least $100 \times 10^9/L$, and absolute neutrophil count at least $1.0 \times 10^9/L$. In addition, all 3 blood counts should be no higher than the upper normal limit. iii. Normal leukocyte differential including disappearance of nucleated red blood cells, blasts, and immature myeloid cells in the peripheral smear, in the absence of splenectomy.* iv. Bone marrow histologic remission defined as the presence of age-adjusted normocellularity, no more than 5% myeloblasts, and an osteomyelofibrosis grade no higher than 1.†
2. Partial remission (PR)	Requires all of the above criteria for CR except the requirement for bone marrow histologic remission. However, a repeat bone marrow biopsy is required in the assessment of PR and may or may not show favorable changes that do not however fulfill criteria for CR.
3. Clinical improvement (CI)	<p>Requires one of the following in the absence of both disease progression (as outlined below) and CR/PR assignment (CI response is validated only if it lasts for no fewer than 8 weeks)</p> <ul style="list-style-type: none"> i. A minimum 20 g/L increase in hemoglobin level or becoming transfusion independent (applicable only for patients with baseline hemoglobin level of less than 100 g/L).‡ ii. Either a minimum 50% reduction in palpable splenomegaly of a spleen that is at least 10 cm at baseline or a spleen that is palpable at more than 5 cm at baseline becomes not palpable.§ iii. A minimum 100% increase in platelet count and an absolute platelet count of at least $50 \times 10^9/L$ (applicable only for patients with baseline platelet count below $50 \times 10^9/L$). iv. A minimum 100% increase in ANC and an ANC of at least $0.5 \times 10^9/L$ (applicable only for patients with baseline absolute neutrophil count below $1 \times 10^9/L$).
4. Progressive disease (PD)	<p>Requires one of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> i. Progressive splenomegaly that is defined by the appearance of a previously absent splenomegaly that is palpable at greater than 5 cm below the left costal margin or a minimum 100% increase in palpable distance for baseline splenomegaly of 5-10 cm or a minimum 50% increase in palpable distance for baseline splenomegaly of greater than 10 cm. ii. Leukemic transformation confirmed by a bone marrow blast count of at least 20%. iii. An increase in peripheral blood blast percentage of at least 20% that lasts for at least 8 weeks.

5. Stable disease (SD)	None of the above.
6. Relapse	Loss of CR, PR, or CI. In other words, a patient with CR or PR is considered to have undergone relapse when he or she no longer fulfills the criteria for even CI. However, changes from either CR to PR or CR/PR to CI should be documented and reported.

Fig.4 – Criteri per la valutazione della risposta ad una determinata terapia

STUDI DI FASE II RANDOMIZZATI

Sono i cosiddetti studi “di selezione”, nei quali i soggetti vengono randomizzati tra più bracci sperimentali non per confrontare i trattamenti tra solo ma per selezionare quale tra due o più trattamenti sperimentali risulti il più idoneo per essere sperimentato in uno studio di fase III contro il trattamento standard. Gli studi di fase II randomizzati vanno interpretati con cautela, perché la randomizzazione prevista in tali disegni risponde esclusivamente agli obiettivi sopra accennati e non autorizza ad effettuare confronti tra i bracci, essendo il confronto caratteristica peculiare degli studi di fase III.

Generalmente i trials in fase II sono progettati come studio caso/controllo:

- A un gruppo di pazienti viene somministrato il farmaco (il gruppo può essere suddiviso in sottogruppi, ognuno dei quali riceve una dose differente di farmaco);
- A un gruppo di pazienti, viene somministrato il placebo o la migliore terapia disponibile

Al fine di una valutazione più oggettiva possibile dei parametri di attività e sicurezza viene condotto:

- Studio in singolo cieco, il paziente non conosce il tipo di trattamento ricevuto o somministrato
- Studio in doppio cieco, sia il medico che il paziente non conoscono il tipo di trattamento ricevuto o somministrato

Alcuni trials combinano Fase I e Fase II in modo tale da testare sia l’efficacia che la tossicità.

Il processo di studio e sviluppo del farmaco frequentemente si arresta in questa fase proprio con l’individuazione di un’attività terapeutica non adeguata e/o di effetti tossici.

FASE III

La caratteristica fondamentale degli studi di fase III, che mirano a valutare l'efficacia relativa di uno o più trattamenti, è la loro natura comparativa, basata sul meccanismo dell'assegnazione randomizzata dei soggetti partecipanti a uno dei gruppi di trattamento in studio (circa 1000-3000 soggetti). L'obiettivo principale è quindi quello di confermare, su larga scala, le informazioni ottenute negli studi di fase II su sicurezza, efficacia e dosaggio del farmaco e valutarne il rapporto rischio/beneficio attraverso il monitoraggio della manifestazione, frequenza e gravità degli effetti indesiderati.

E' possibile distinguere categorie differenti di studi di fase III in base al quesito che ne è alla base:

- Studi in cui si vuole determinare l'effetto di un nuovo trattamento sulla storia naturale di una malattia comparandolo con il placebo o con nessun trattamento: uno studio di questo tipo è ovviamente proponibile solo nelle situazioni in cui non esista alcuna terapia riconosciuta efficace per la patologia in studio.
- Studi di superiorità: in cui si vuole determinare se un nuovo trattamento è più efficace della miglior terapia standard conosciuta per quella malattia, eventualmente anche a rischio di una maggiore tossicità: in questo caso, il gruppo di controllo riceverà la migliore terapia standard.
- Studi di equivalenza o non inferiorità: in cui si vuole determinare se un nuovo trattamento è altrettanto efficace della migliore terapia standard per quella malattia ma presenta qualche vantaggio (ad esempio, migliore profilo di tossicità oppure costo inferiore).

Le differenze tra i trattamenti messi a confronto possono essere definite grazie all'utilizzo di parametri prestabiliti, noti come "end point" dello studio. Gli end-point più solidi sui quali basare la prova di reale superiorità tra i trattamenti confrontati sono gli "end-point di efficacia per il paziente" (ovvero la sopravvivenza globale o la qualità di vita). Uno studio di fase III, che mira proprio a confrontare i trattamenti in termine di efficacia, dovrebbe avere un end-point primario "solido" come appunto la sopravvivenza globale o la qualità di vita. La sopravvivenza globale (overall survival, OS), è definita come il tempo compreso tra la data della randomizzazione e la data di decesso per qualsiasi causa. Anche il tempo alla progressione, è spesso scelto come end-point dello studio. Una volta definito l'end-point dello studio, è necessario stimare il suo valore atteso nel braccio di controllo e la differenza ipotizzata nel braccio sperimentale. Da queste stime dipende la valutazione delle dimensioni del campione, necessarie per dimostrare una data differenza in modo statisticamente significativo. Qualora

l'end-point prescelto sia il tempo ad un evento (decesso, progressione), la potenza dello studio dipende soprattutto dal numero di eventi che si prevede verranno osservati nel corso del follow up, piuttosto che dal numero di soggetti inclusi inizialmente; in questo caso, quindi, deve essere arruolato nello studio un numero di soggetti sufficiente ad osservare, in un tempo predefinito, il numero di eventi necessari.

Gli studi di fase III prevedono per definizione l'esistenza di un gruppo di controllo; tale gruppo in base all'esistenza o all'assenza di una terapia standard, può essere non trattato, oppure trattato con placebo, oppure trattato con la migliore terapia standard disponibile. Il gruppo di controllo viene confrontato con il gruppo sperimentale, trattato con il farmaco (o la combinazione di farmaci) che si vogliono sperimentare. Il gruppo di controllo ed il gruppo sperimentale costituiscono i *bracci dello studio*; essi dovrebbero essere quanto più uguali possibili in termini di caratteristiche prognostiche della malattia in studio. Tuttavia, la conoscenza dei fattori prognostici che possono condizionare l'efficacia di un trattamento non può mai considerarsi completa; la randomizzazione, vale a dire l'assegnazione casuale dei soggetti ai bracci dello studio, è l'unico metodo che consenta di bilanciare la distribuzione dei fattori prognostici tra i bracci. Essa consente di eliminare possibili errori sistematici ("bias") nell'assegnazione dei trattamenti e di ottenere probabilisticamente una simile distribuzione tra i bracci dei fattori prognostici noti ed ignoti, che sarà tanto più paragonabile tra i due bracci quanto maggiore è il numero di soggetti arruolati nello studio.

Il *disegno* di uno studio di fase III può essere di diversi tipi. Il più semplice è quello a due bracci, che è anche il più sensibile, vale a dire quello che, a parità di numero di soggetti partecipanti, offre le maggiori probabilità di riscontrare delle differenze statisticamente significative tra i trattamenti studiati. In questo tipo di studi si preferisce, in genere, assegnare un egual numero di soggetti ai bracci dello studio (randomizzazione 1:1) in quanto questa è la procedura più efficiente per la potenza dei test statistici; tuttavia, delle assegnazioni sbilanciate (ad esempio 2:1) sono possibili con perdita di potenza dello studio relativamente piccola. Studi a più di due bracci, che prevedano confronti multipli, sono in genere considerati inefficienti in quanto richiedono numeri estremamente elevati di soggetti per poter confrontare tra di loro tutti i gruppi di trattamento.

APPROVAZIONE DA PARTE DEGLI ENTI GOVERNATIVI EMA ED FDA

Senza verifiche stringenti esiste il rischio teorico che vengano immesse in commercio medicine potenzialmente pericolose: è vero che l'iter è lungo ma è assolutamente necessario.

Gli enti regolatori che decidono il destino dei medicinali sono rispettivamente:

- la Food and Drug Administration (Fda) negli Usa
- l'European Medicines Agency (Ema) in Europa
- l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) in Italia

L'iter di approvazione si snoda fra flessibilità e rigore: la prima serve ad accelerare dove possibile le procedure, quando c'è necessità di dare risposta ai bisogni dei pazienti in tempi brevi, ma non può essere mai disgiunta dal rigore scientifico nel giudizio, indispensabile per tutelare la salute pubblica. Il percorso per l'approvazione di un farmaco è molto scrupoloso e codificato da regole precise. I tempi e i passaggi della procedura sono prestabiliti e non si possono saltare: prendere scorciatoie porterebbe portare alla commercializzazione di medicinali meno sicuri, con possibili effetti tossici, che dovrebbero essere poi ritirati dal commercio. Infatti, i casi di ritiro di farmaci già disponibili sono pochissimi rispetto alla mole di prodotti che arrivano nella pratica clinica dopo aver superato l'esame degli enti regolatori: su 100 farmaci in studio meno di 10 arrivano alla fine del percorso.

L'approvazione viene concessa dopo un'attenta valutazione del rapporto rischio/beneficio del farmaco candidato, eventualmente confrontato con ciò che è già disponibile sul mercato. Se però si tratta dell'unico principio attivo per una malattia rara, ad esempio, lo si rende disponibile anche se il rapporto rischio/beneficio non è ottimale. Se poi una patologia è "orfana", ovvero non ha alcuna terapia, le procedure sono in genere facilitate e abbreviate.

In Europa esistono due diversi percorsi per le domande di immissione in commercio dei farmaci, *la richiesta centralizzata* e *l'autorizzazione nazionale* o decentralizzata: la prima è sempre obbligatoria per i farmaci ottenuti attraverso processi biotecnologici (come anticorpi monoclonali o terapie cellulari), per prodotti da usare in patologie come il cancro, malattie neurodegenerative o autoimmuni, diabete, malattie virali o HIV, qualora si tratti di un medicinale contro malattie rare o anche se risulti particolarmente innovativo dal punto di vista scientifico, tecnologico o terapeutico. Negli altri casi si può scegliere la procedura decentralizzata, rivolgendosi all'ente regolatorio di un singolo Paese (in Italia, l'Agenzia

Italiana del Farmaco) o più Paesi, per poi eventualmente richiedere il riconoscimento dell'autorizzazione all'immissione in commercio anche in altri Paesi dell'Unione Europea.

I passi da compiere sono rigidamente fissati in modo che tutta la procedura scorra entro tempi certi: entro 6-7 mesi prima dell'effettiva presentazione del dossier occorre presentare la richiesta agli enti regolatori, specificando caratteristiche del prodotto e dati chimici, farmaceutici e biologici, fornendo relazioni sugli studi clinici effettuati e il foglietto illustrativo. Solo dopo un incontro preliminare si può presentare il dossier completo, da sottoporre alla valutazione scientifica vera e propria che, nel caso dell'EMA, deve concludersi in 210 giorni; i tempi però possono allungarsi, perché se vengono sollevate obiezioni e richieste supplementari di chiarimento, come accade di solito, il "cronometro" si ferma per dare modo all'azienda di raccogliere il materiale necessario. Inoltre, entro questo periodo vengono effettuate ispezioni ai siti di produzione per verificare che siano rispettati i criteri della buona pratica di fabbricazione, laboratorio e clinica: in pratica, ci si accerta che i farmaci siano realizzati in modo sicuro, i dati sperimentali raccolti siano veritieri e gli studi siano stati condotti rispettando l'etica e le norme vigenti.

Al termine dell'iter, l'ente rilascia il suo parere; se è positivo vengono prodotti un foglietto illustrativo, un documento che riassume le caratteristiche tecniche del farmaco ad uso dei medici, e un rapporto pubblico europeo di valutazione o EPAR, nel quale si trovano le ragioni che hanno convinto gli esperti ad autorizzare il medicinale e le sue condizioni d'uso. Peraltro, una volta approvato in Europa, il nuovo farmaco deve essere introdotto nei prontuari dei diversi Paesi: in Italia l'AIFA decide prezzo, prescrivibilità e rimborsi da parte del Servizio Sanitario, in un processo che a volte può richiedere qualche mese.

COMMERCIALIZZAZIONE

FASE IV – STUDI POST-MARKETING

La fase IV, viene definita come fase di farmacovigilanza, e si svolge successivamente alla commercializzazione del farmaco. Quest'ultima fase si avvale di sperimentazioni cliniche che valutano il profilo di *effectiveness* del farmaco utilizzato nella pratica clinica.

Gli obiettivi quindi sono:

- Confermare la validità del farmaco, la sicurezza e la tollerabilità
- Valutare gli effetti a lungo termine sulla qualità della vita

- Confrontare il rapporto rischio/beneficio rispetto ad altri farmaci già presenti sul mercato
- Determinare il rapporto costo/beneficio, studio farmaco economico

Questa fase include sia studi sperimentali che osservazionali su un ampio numero di pazienti per la conduzione di studi di farmacovigilanza al fine di segnalare reazioni avverse e impreviste.

Al momento della registrazione, per quanto sia stato stabilito un profilo di rischio beneficio accettabile negli studi che hanno condotto all'approvazione del farmaco stesso,, le informazioni disponibili hanno dei limiti; si rende quindi necessario migliorare la conoscenza del profilo di rischio e monitorare le reazioni avverse del farmaco (ADR, Adverse Drug Reaction). Vengono vigilate la segnalazioni di effetti collaterali, comunicate sia dal paziente che dal medico o dal farmacista.

La richiesta di vigilanza può anche venire inoltrata dalle agenzie regolatorie. Questi studi perdurano nel tempo e permettono alle aziende farmaceutiche di argomentare la revisione dell'autorizzazione all'immissione in commercio ogni 5 anni.

GLI STUDI OSSERVAZIONALI SUI FARMACI

Come illustrato dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) nelle Linee guida per gli studi osservazionali sui farmaci, "Gli studi osservazionali sui farmaci sono di particolare importanza per la valutazione del profilo di sicurezza nelle normali condizioni di uso e su grandi numeri di pazienti, per approfondimenti sull'efficacia nella pratica clinica, per la verifica dell'appropriatezza prescrittiva e per valutazioni di tipo farmaco-economico".

Per le loro caratteristiche, gli studi osservazionali non comportano rischi aggiuntivi per i pazienti ai quali sono offerte le migliori condizioni di assistenza clinica. Di conseguenza richiedono procedure differenziate rispetto a quanto previsto negli studi clinici sperimentali.

Gli studi riguardanti un farmaco, per essere considerati non sperimentali, devono soddisfare le seguenti condizioni:

- Il farmaco deve essere prescritto nelle indicazioni d'uso Autorizzate all'Immissione in Commercio in Italia
- La prescrizione del farmaco in esame deve essere parte della normale pratica clinica
- La decisione di prescrivere il farmaco al singolo paziente deve essere del tutto indipendente da quella di includere il paziente stesso nello studio

- Le procedure diagnostiche e valutative devono corrispondere alla pratica clinica corrente.

E' ritenuto indispensabile che i Comitati Etici debbano essere informati, tramite notifica, circa la volontà di svolgere questi studi.

2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

2.1 - LE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE (MPN)

Le Neoplasie Mieloproliferative (MPN) costituiscono una delle cinque categorie delle neoplasie mieloidi secondo la classificazione dell'organizzazione mondiale della sanità, la World Health Organization (WHO). Al loro interno vi è un sottogruppo costituito dalle MPN Philadelphia-negative, che include la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (TE), la Mielofibrosi Primaria (PMF) e la Mielofibrosi Primaria in fase prefibrotica. Tali disordini sono patologie neoplastiche, che colpiscono le cellule staminali emopoietiche, ossia le cellule midollari progenitrici dei globuli bianchi, dei globuli rossi e delle piastrine circolanti nel sangue periferico. Si caratterizzano per una emopoiesi clonale, in quanto gli elementi delle tre serie maturative midollari (granulocitaria, eritrocitaria e megacariocitaria) derivano tutti da una stessa cellula progenitrice emopoietica, che ha acquisito una o più mutazioni genetiche che le conferiscono un vantaggio proliferativo, con un eccesso di produzione di elementi cellulari appartenenti a una o più linee fra le tre sopracitate. In particolare, nella PV, la proliferazione eritroide è predominante e determina un aumento della massa dei globuli rossi nel sangue periferico; nel 50% dei pazienti può essere documentata anche la proliferazione piastrinopoietica e granulocitopoietica, causa di incremento rispettivamente delle piastrine e dei leucociti. La TE è, invece, caratterizzata da una proliferazione persistente e incontrollata della serie megacariocitaria, la linea midollare che produce le piastrine. Nella PMF si osserva l'incremento prevalente della serie mieloide e megacariocitaria; nella fase conclamata della malattia, tale proliferazione si associa a fibrosi midollare reattiva e a emopoiesi extramidollare, a carico principalmente di milza e fegato (Fig.5).

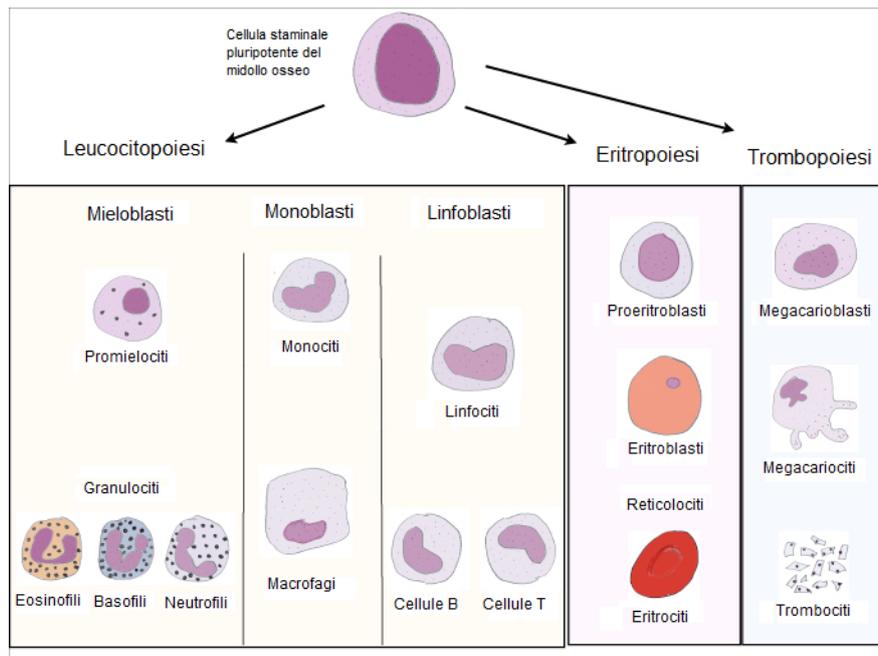


Fig.5 – Emopoiesi

Si tratta di patologie rare, che possono colpire ogni fascia di età, ma con incidenza crescente. L'incidenza in Europa è stimata pari a 1.8 casi/100.000 persone-anno. In dettaglio, l'incidenza della Policitemia Vera varia fra 0.7 e 2.6 casi/100.000 abitanti per anno, con età mediana alla diagnosi di 60 anni e predilezione per il sesso maschile; l'incidenza della Trombocitemia Essenziale varia fra 0.6 e 2.5 casi/100.000 abitanti per anno, colpisce generalmente pazienti di età superiore ai 50 anni, ma presenta un picco di incidenza nelle giovani donne, intorno ai 30 anni; l'incidenza della Mielofibrosi Primaria varia fra 0.25 e 1.5 casi/100.000 abitanti per anno, anch'essa con frequenza crescente con l'avanzare dell'età, senza apparenti differenze di sesso.

Il primo traguardo nel percorso di conoscenza delle basi genetiche delle neoplasie mieloproliferative è stato raggiunto nel 2005 con l'identificazione di una mutazione puntiforme (singola sostituzione nucleotidica G>T al nucleotide 1849, con conseguente sostituzione di un residuo di valina con uno di fenilalanina in posizione 617) nell'esone 14 del gene *JAK2*, codificante per una tirosinchinasi (*Janus Kinase 2*) coinvolta nella via di segnalazione intracellulare JAK-STAT. Tale mutazione, *JAK2V617F*, è presente nella quasi totalità dei pazienti affetti da Policitemia Vera (95%) e in una proporzione significativa di pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale (55%) e Mielofibrosi Primaria (65%). Nella restante quota di pazienti affetti da Policitemia Vera è possibile riscontrare mutazioni del gene *JAK2* diverse dalla V617F, ma con analogo significato funzionale in termini di attivazione

della proteina mutata; tali mutazioni si concentrano nell'esone 12 e dal punto di vista genetico si caratterizzano per essere inserzioni o delezioni. Dal punto di vista clinico i pazienti con mutazione a carico dell'esone 12 del gene *JAK2* presentano più spesso un'eritrocitosi isolata, ma non sembra che abbiano una prognosi dissimile dai pazienti portatori della classica mutazione V617F (Fig.6).

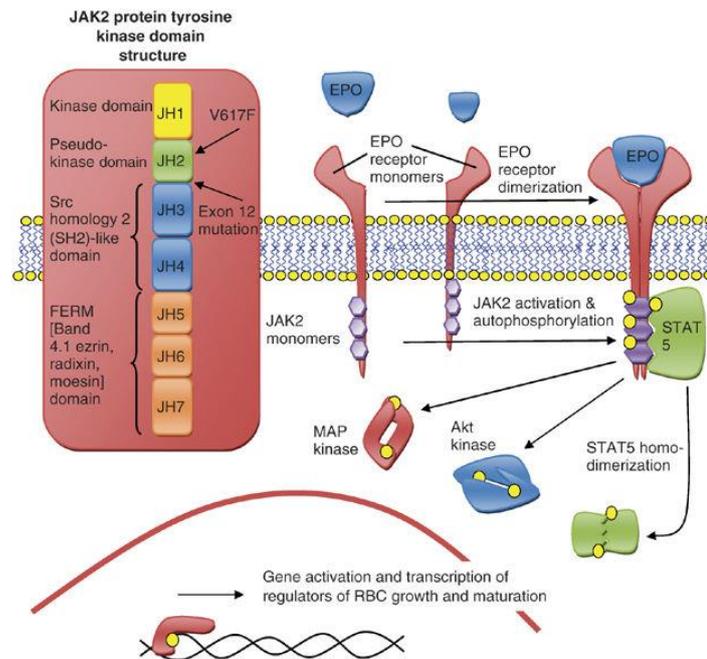


Fig.6 – Mutazione V617F del gene JAK2

Poco dopo la scoperta delle mutazioni a carico del gene *JAK2* sono state identificate ulteriori mutazioni somatiche a carico del gene *MPL*, che codifica per il recettore della trombopoietina, coinvolto nella medesima via di segnalazione intracellulare mediata da JAK-STAT. Dal punto di vista funzionale si tratta di mutazioni che conferiscono un guadagno funzionale alla proteina mutata, che si presenta, pertanto, costituzionalmente attivata.

Le mutazioni del gene *MPL* che si riscontrano nelle MPN si concentrano nell'esone 10, coinvolgendo in maniera precipua il codone W515 (*MPLW515L* e *MPLW515K*), e sono presenti in circa il 4-5% dei pazienti con Trombocitemia Essenziale e nel 7-10% dei pazienti con Mielofibrosi.

La mutazione MPLS505N, invece, si riscontra sia in casi sporadici di neoplasia mieloproliferativa, come mutazione somatica, sia in casi di Trombocitemia Ereditaria, come mutazione *germline* (Fig.7).

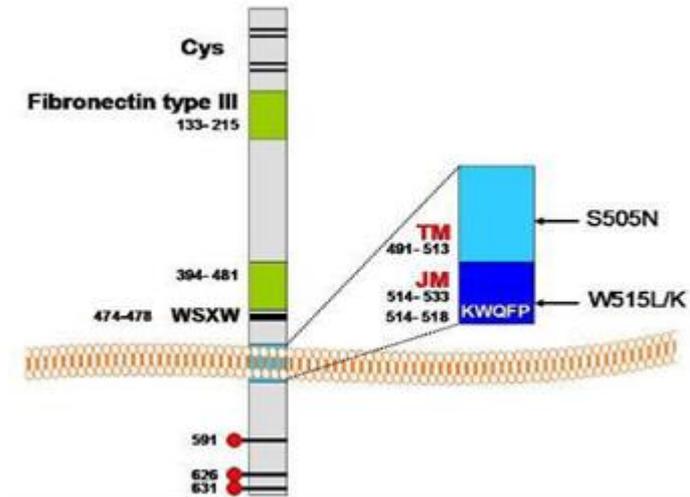


Fig.7 – Recettore della trombopoietina (MPL) e mutazioni presenti nelle MPN

Nonostante tali avanzamenti scientifici, tuttavia, una fetta non trascurabile di pazienti affetti da TE e MF rimaneva priva di un marcatore molecolare noto; tale lacuna è stata in buona parte colmata nel 2013, quando due gruppi di ricercatori hanno identificato, grazie a tecniche di *next generation sequencing*, la presenza di mutazioni a carico del gene *CALR* (codificante per la Calreticulina) nella suddetta popolazione di pazienti. La Calreticulina è una proteina altamente conservata dal punto di vista evolutivo, che assolve a più di una funzione nelle cellule eucariote: presenta un dominio di legame per il calcio (regione C-terminale), ricco di aminoacidi carichi negativamente, e grazie a esso partecipa alla regolazione della concentrazione del calcio intracellulare, agendo da proteina di legame e deposito all'interno del lume del reticolo endoplasmatico; si localizza anche nel nucleo, suggerendo così un suo possibile ruolo nella regolazione della trascrizione genica; agisce, infine, come regolatore della struttura tridimensionale delle proteine nascenti, cooperando con la Calnexina (ciclo Calreticulina/Calnexina). Tutte le mutazioni identificate nei pazienti con MPN si concentrano nell'esone 9 e si caratterizzano per essere inserzioni o delezioni, che comportano uno slittamento del codice di lettura di un singolo paio di basi. Nonostante se ne conoscano più di 50 sottotipi differenti, circa l'80% dei casi è costituito dalla mutazione di tipo 1 (delezione di 52 paia di basi) e dalla mutazione di tipo 2 (inserzione di 5 paia di basi). L'effetto complessivo

di tutte queste mutazioni è la generazione di una differente regione C-terminale, ricca in aminoacidi neutri e carichi positivamente; vi è, inoltre, la perdita di una porzione della proteina che agisce da segnale per la localizzazione a livello del reticolo endoplasmatico (sequenza *KDEL*).

Studi funzionali suggeriscono che, in maniera ancora non del tutto delineata, anche le mutazioni di *CALR* possono agire attraverso la via di segnalazione JAK-STAT. Le mutazioni di *CALR* si sono rivelate essere per la quasi totalità mutualmente esclusive con quelle a carico di *JAK2* e *MPL* – solo rarissimi casi sono stati fino ad ora riportati di pazienti che presentano una doppia mutazione a carico di *JAK2* e *CALR*.

Le mutazioni somatiche di *JAK2*, *MPL* e *CALR* si comportano come *driver founding mutations*, in quanto determinano l'acquisizione di un vantaggio selettivo in una cellula con capacità di autorinnovamento, portando così alla formazione di un clone mutato; questo non implica necessariamente che le tre suddette mutazioni costituiscano il primo evento genetico somatico, come testimoniato da alcuni recenti studi nei quali mutazioni a carico di altri geni (ad esempio il gene *TET2*) possono precedere l'acquisizione della mutazione di *JAK2*, con ripercussioni anche sul piano biologico e clinico.

Degno di nota, tuttavia, il fatto che, nonostante i risultati ottenuti negli ultimi anni, rimanga una fetta non trascurabile di pazienti per i quali non disponiamo di un marcatore molecolare noto (i cosiddetti pazienti “tripoli negativi”); è proprio su questa fascia di pazienti che si stanno concentrando gli sforzi volti a colmare tale lacuna.

Circa il 7% dei pazienti con neoplasia mieloproliferativa riferisce di avere un parente affetto da un'altra neoplasia mieloproliferativa. Anche nei pazienti con familiarità le mutazioni dei geni *JAK2*, *CALR* o *MPL* risultano mutazioni somatiche acquisite a livello del sistema emopoietico; non vi è quindi evidenza che vi sia una trasmissione ereditaria delle mutazioni dei geni *JAK2*, *CALR* o *MPL*. Si ipotizza che possa esistere una predisposizione ereditaria ad acquisire le suddette mutazioni. L'andamento clinico delle forme familiari è simile a quello delle forme sporadiche.

2.1.1 - CLASSIFICAZIONE

La diagnosi di MPN è posta in accordo con i criteri stilati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 2008), di seguito riportati.

Criteri WHO 2008 per la diagnosi di **Policitemia Vera**

Criteri maggiori:

- Hb >18,5 g/dl (uomo)*, >16.5 g/dl (donna)* o altra evidenza di aumentata massa eritrocitaria;
- Presenza della mutazione V617F del gene *JAK2* o di altre mutazioni analoghe, quali quelle a carico dell'esone 12 del gene *JAK2*.

* o >17 g/dl (uomo) e >15 g/dl (donna) con incremento di almeno 2 g dal basale

Criteri minori:

- Aumentata cellularità con iperplasia trilineare alla biopsia osteomidollare;
- Livelli serici di eritropoietina inferiori al limite inferiore di norma;
- Crescita spontanea di colonie eritroidi in vitro.

Per porre diagnosi di Policitemia Vera è necessario che siano soddisfatti i due criteri maggiori e almeno uno dei criteri minori, oppure il primo dei criteri maggiori e due criteri minori.

Criteri WHO 2008 per la diagnosi di **Trombocitemia Essenziale**

- Conta piastrinica superiore a 450.000/ μ l;
- Proliferazione prominente della linea megacariocitaria allo studio bioptico midollare, con megacariociti di grandi dimensioni e con morfologia matura;
- Assenza dei criteri diagnostici per Policitemia Vera, Mielofibrosi Primaria, Leucemia Mieloide Cronica, Sindrome Mielodisplastica o altra neoplasia mieloide;
- Presenza della mutazione V617F del gene *JAK2* o di altre anomalie clonali. Se assenti, è necessario escludere le piastrinosi secondarie (da carenza di ferro, stati infiammatori, infezioni croniche, neoplasie).

Per porre diagnosi di Trombocitemia Essenziale è necessario che siano soddisfatti tutti e quattro i criteri.

Criteri WHO 2008 per la diagnosi di **Mielofibrosi Primaria**

Criteri maggiori:

- Proliferazione megacariocitaria con atipie, accompagnata da fibrosi reticolinica e/o collagene; in assenza di fibrosi reticolinica le anomalie megacariocitarie devono essere

accompagnate da aumento della cellularità midollare, proliferazione della linea granulocitaria e spesso riduzione della linea eritrocitaria (mielofibrosi prefibrotica);

- Assenza dei criteri diagnostici per Policitemia Vera, Leucemia Mieloide Cronica, Sindrome Mielodisplastica o altra neoplasia mieloide;

- Presenza della mutazione V617F del gene *JAK2* o di altro marcatore clonale; se assenti, esclusione delle forme di fibrosi midollare reattiva.

Criteri minori:

- Screzio leucoeritroblastico;

- Aumento della lattico deidrogenasi sierica (LDH);

- Anemia;

- Splenomegalia palpabile.

Per la diagnosi è necessaria la presenza di tre criteri maggiori e di almeno due criteri minori.

Ricordiamo che si tratta di patologie correlate fra loro, con un certo grado di sovrapposizione clinica, emocromocitometrica e istopatologica, in particolare per quanto riguarda la Trombocitemia Essenziale con mutazione V617F del gene *JAK2* e la Policitemia Vera. Per tale motivo anche i criteri diagnostici sono soggetti a revisione e modifiche, di pari passo con il procedere delle conoscenze.

Recentemente è stato coniato il termine di Policitemia mascherata (***masked PV***), per identificare quei pazienti con istologia midollare suggestiva per Policitemia Vera ma con valori di emoglobina inferiori a quelli indicati dai criteri diagnostici WHO. È stata quindi proposta una revisione dei suddetti criteri, con riduzione dei valori di emoglobina (Hb > 16.5 g/dl per gli uomini e > 16 g/dl per le donne) o di ematocrito (Hct > 49% per gli uomini e > 48% per le donne) utilizzati come *cut off*. In tal modo si riuscirebbe a differenziare in maniera più efficace i pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale da quelli affetti da Policitemia Vera mascherata.

A partire dalla classificazione WHO del 2001 è stata introdotta la categoria nosologica della **Mielofibrosi Prefibrotica**, a cui corrisponde un peculiare quadro istopatologico, privo di significativa fibrosi, ma con anomalie citologiche a carico della linea megacariocitaria e alterazioni quantitative della cellularità midollare con iperplasia della linea granulopoietica. Tale entità è stata ed è tuttora oggetto di intenso dibattito scientifico; dal punto di vista clinico e in termini di gestione terapeutica i pazienti con Mielofibrosi Prefibrotica si avvicinano ai pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale, anche se i risultati di alcuni studi sembrano

indicare una differenza in termini prognostici e in termini di rischio evolutivo tra queste due categorie.

Le neoplasie mieloproliferative presentano, inoltre, un rischio di trasformazione leucemica e, nel caso di PV e ET, di evoluzione in mielofibrosi (Mielofibrosi post Trombocitemia Essenziale, *MF post-TE*, e Mielofibrosi post Policitemia Vera, *MF post-PV*, rispettivamente). I criteri stilati dall'International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT) per la diagnosi di MF post-TE e di MF post-PV sono di seguito riportati.

Criteri IWG-MRT per la diagnosi di Mielofibrosi Post Trombocitemia Essenziale

Criteri necessari:

- Precedente diagnosi di Trombocitemia Essenziale secondo i criteri WHO;
- Presenza di fibrosi midollare di grado 2-3 (secondo i criteri EUMNET, European Myelofibrosis Network).

Criteri addizionali (è necessario che ne siano soddisfatti almeno due):

- Anemia e una riduzione di almeno 2 g/dl del valore di emoglobina rispetto a quello riscontrato alla diagnosi di Trombocitemia Essenziale;
- Screzio leuco-eritroblastico allo striscio di sangue periferico;
- Incremento della splenomegalia (inteso come comparsa di splenomegalia palpabile, nei casi in cui non era presente all'esordio, oppure come incremento delle dimensioni della milza, con polo inferiore palpabile ad almeno 5 cm dall'arco costale);
- Aumento dell'LDH;
- Comparsa di almeno uno dei tre sintomi sistemici: perdita di più del 10% del peso corporeo in sei mesi, sudorazioni notturne, febbre (> 37.5°C).

Criteri IWG-MRT per la diagnosi di Mielofibrosi Post Policitemia Vera

Criteri necessari:

- Precedente diagnosi di Policitemia Vera secondo i criteri WHO;
- Presenza di fibrosi midollare di grado 2-3 (secondo i criteri EUMNET, European Myelofibrosis Network).

Criteri addizionali (è necessario che ne siano soddisfatti almeno due):

- Anemia oppure mancata necessità di procedere con salassi venosi e/o terapia citoriduttiva per il controllo dell'eritrocitosi;
- Screzio leuco-eritroblastico allo striscio di sangue periferico;

- Incremento della splenomegalia (inteso come comparsa di splenomegalia palpabile, nei casi in cui non era presente all'esordio, oppure come incremento delle dimensioni della milza, con polo inferiore palpabile ad almeno 5 cm dall'arco costale);
- Comparsa di almeno uno dei tre sintomi sistemici: perdita di più del 10% del peso corporeo in sei mesi, sudorazioni notturne, febbre (> 37.5°C).

È verosimile, inoltre, che i criteri sopra riportati possano subire nel prossimo futuro una revisione mirata all'integrazione delle recenti acquisizioni sulle basi molecolari di tali patologie nel percorso diagnostico.

2.1.2 - SINTOMI

Molti pazienti affetti da neoplasie mieloproliferative non presentano sintomi al momento della diagnosi; in questi casi la malattia viene identificata per caso, grazie a esami del sangue effettuati per altre ragioni.

In altri casi, l'esordio della malattia può coincidere con complicanze vascolari di tipo trombotico (quali infarto del miocardio, angina pectoris, ictus cerebri o attacchi ischemici transitori, trombosi venosa profonda, tromboflebite superficiale, trombosi dei seni venosi cerebrali e trombosi splancniche più rare, ma caratteristiche dei pazienti con neoplasie mieloproliferative) o, più raramente, emorragico (ad esempio emorragie del tratto gastroenterico).

I pazienti affetti da **policitemia vera** presentano spesso un colorito acceso del volto e delle mucose (eritrosi), disturbi funzionali del microcircolo, quali cefalea, vertigini, ronzii, disturbi visivi, fenomeni Raynaud-simili. L'eritromelalgia, un senso di bruciore alle mani e ai piedi accompagnato da arrossamento e calore, è un riscontro non infrequente. Questi disturbi funzionali del microcircolo possono regredire rapidamente e in modo pressoché completo con l'assunzione di piccole dosi di acido acetilsalicilico, per effetto della sua azione antiaggregante piastrinica. Un sintomo molto caratteristico è il prurito generalizzato, scatenato prevalentemente dal contatto con l'acqua (prurito acquagenico), presente alla diagnosi nel 40-50% dei pazienti e nel 30-40% durante il follow-up. Alla visita alcuni pazienti presentano splenomegalia o epatomegalia.

Anche in pazienti affetti da **trombocitemia essenziale** nel 35% dei casi sono presenti sintomi vasomotori, come cefalea, vertigini, ronzii, parestesie periferiche, disturbi della vista, livedo

reticularis e fenomeni Raynaud-simili, o eritromelalgia. Sono invece rari i sintomi sistemici e la presenza di epatosplenomegalia.

Per quanto riguarda i pazienti affetti da **mielofibrosi primaria**, nel 70% dei casi sono presenti sintomi sistemici quali sudorazioni notturne, perdita di peso (calo superiore al 10% del peso corporeo in 6 mesi), febbre. La splenomegalia è presente alla diagnosi nel 90% dei pazienti; spesso si associa anche epatomegalia. Le principali complicanze delle fasi più avanzate della malattia sono l'evoluzione in leucemia acuta, le infezioni, le emorragie, l'ipertensione portale e l'insufficienza epatica secondarie a trombosi splancnica o a metaplasia mieloide. L'emopoiesi extramidollare interessa prevalentemente la milza e il fegato, con conseguenti splenomegalia ed epatomegalia, ma può anche coinvolgere sedi insolite quali il polmone, la pleura, il pericardio, la regione paravertebrale e eventuali altre sedi, causando sintomi specifici a seconda dell'organo coinvolto.

2.1.3 - DIAGNOSI ED ESAMI

I principali esami utili per la diagnosi delle neoplasie mieloproliferative sono:

- *esame emocromocitometrico*
- *esami ematochimici*, quali dosaggio eritropoietina, LDH, depositi marziali e vitaminici, funzionalità epatica e renale, indici infiammatori
- *emogasanalisi arteriosa*, per valutazione dell'ossigenazione del sangue per escludere che l'aumento dei globuli rossi sia dovuto a problemi respiratori o apnee notturne in caso di eritrocitosi
- *emogasanalisi venosa*, per il calcolo della p50 (pressione parziale di saturazione dell'emoglobina), indicata in caso di eritrocitosi, per escludere la presenza di emoglobinopatie ad alta affinità per l'ossigeno
- *esame microscopico delle cellule del sangue periferico*, che permette di verificare la presenza di cellule anormali, quali i dacriociti, e di screezio leucoeritroblastico, peculiari della mielofibrosi
- *analisi molecolari su sangue periferico*, che permettono di identificare nei granulociti circolanti l'eventuale presenza di mutazioni nei geni JAK2, MPL e CALR
- misurazione della quantità di cellule staminali (CD34+) circolanti nel sangue periferico, in quanto possibile indice indiretto di fibrosi midollare
- *esame istologico midollare*

- *analisi citogenetica su sangue midollare*, utile dal punto di vista prognostico, soprattutto in pazienti affetti da mielofibrosi

- *ecografia dell'addome*, per valutare le dimensioni di milza e fegato.

- *ulteriori indagini strumentali a giudizio clinico* (esempio polisonnografia, prove di funzionalità respiratoria, radiografia del torace ecc) per escludere eventuali altre patologie in diagnosi differenziale con le neoplasie mieloproliferative

Dato che le neoplasie mieloproliferative possono causare complicanze vascolari, può essere utile anche effettuare:

- *misurazione dei livelli di colesterolo, trigliceridi e glicemia*;

- *screening trombofilico*, volto a cercare l'eventuale presenza di fattori genetici predisponenti agli eventi trombotici.

2.1.4 - SCORE PROGNOSTICI, FATTORI DI RISCHIO, TERAPIA

Le neoplasie mieloproliferative si caratterizzano sul piano clinico per il rischio vascolare, in termini di complicanze trombotiche e/o emorragiche, e per il rischio di evoluzione mielofibrotica o leucemica.

Un recente lavoro ha riportato sopravvivenze mediane pari a circa 20 anni per i pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale, 14 anni per i pazienti affetti da Policitemia Vera e 6 anni per i pazienti affetti da Mielofibrosi Primaria; considerando pazienti di età inferiore ai 60 anni, le sopravvivenze mediane risultano più favorevoli, essendo pari a 33 anni, 24 anni e 15 anni, rispettivamente.

Per quanto concerne i pazienti affetti da **TE**, la sopravvivenza riportata è risultata essere di poco inferiore a quella della popolazione sana di riferimento, senza significative differenze fra pazienti con mutazione di *JAK2*, *CALR*, *MPL* o tripli-negativi. I fattori di rischio per la sopravvivenza includono l'età avanzata, la presenza di leucocitosi e l'anamnesi vascolare personale. La trasformazione leucemica è stimata intorno al 5% a 20 anni. Nel 2012 è stato pubblicato uno score di prognosi per i pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale, mirato a stimarne il rischio trombotico (*IPSET thrombosis score*), che include le seguenti variabili: età superiore ai 60 anni; anamnesi vascolare personale positiva per eventi trombotici; presenza di fattori di rischio cardiovascolare, incluso tabagismo, ipertensione arteriosa e diabete mellito; presenza della mutazione *JAK2 V617F*. Sulla base della presenza o meno di tali variabili, è stato possibile suddividere i pazienti in un gruppo a basso rischio (0-1 punti, con

rischio di trombosi pari a 1.03%/pazienti/anno), un gruppo a rischio intermedio (2 punti, con rischio di trombosi pari a 2.35%/pazienti/anno) e un gruppo ad alto rischio (3 o più punti, con rischio di trombosi pari a 3.56%/pazienti/anno). Nonostante la significatività dei dati riportati, si sottolinea che le scelte terapeutiche relative ai pazienti affetti da MPN vengono ad oggi prese in accordo con le raccomandazioni presenti all'interno delle linee guida dell'*European Leukemia Network*, pubblicate nel 2011 sul *Journal of Clinical Oncology*; in tal caso, la suddivisione dei pazienti nei gruppi a basso o ad alto rischio vascolare avviene sulla base dell'età (inferiore o superiore a 60 anni) e dell'anamnesi vascolare. Dallo studio che ha permesso di stilare l'*IPSET* score è emerso come la presenza della mutazione V617F del gene *JAK2* raddoppi il rischio di trombosi, dato poi confermato da altri studi. Viceversa, è stato recentemente riportato da più Autori come la presenza della mutazione del gene *CALR* si associ a un rischio inferiore di eventi trombotici nei pazienti con TE, in maniera indipendente dall'*IPSET* score. È possibile che tali correlazioni fra lo stato mutazionale e l'*outcome* clinico possano avere ripercussioni nel prossimo futuro sulle strategie di gestione dei singoli pazienti, nell'ottica di un approccio via via più individualizzato, ma al momento attuale non giustificano modifiche della condotta terapeutica.

Per quanto concerne i pazienti con **PV**, gli stessi tre fattori sopracitati (età avanzata, presenza di leucocitosi e anamnesi vascolare personale) sembrano influenzare la sopravvivenza; l'evoluzione leucemica è stimata inferiore al 10% a dieci anni e i fattori di rischio in tal senso sembrano essere, oltre all'età e alla leucocitosi, anche le anomalie cromosomiche.

La **Mielofibrosi** si caratterizza, invece, per una maggiore complessità tanto sul piano biologico quanto su quello clinico-assistenziale, con sopravvivenze variabili dai 15 anni a meno di 5 anni. L'evoluzione leucemica è stata osservata nel 5-30% dei pazienti.

La stratificazione prognostica dei pazienti affetti da questa patologia è più articolata. Il primo tentativo sistematico di sviluppare uno *score* prognostico risale al 2009 con la formulazione dell'*International Prognostic Scoring System* (IPSS). Tale *score* è stato calcolato e validato per i casi valutati al momento della diagnosi e prevede cinque variabili indipendenti, predittive di ridotta sopravvivenza: età superiore ai 65 anni; presenza di anemia con emoglobina inferiore a 10 g/dl; leucocitosi con globuli bianchi superiori a 25.000/mmc; blasti circolanti nel sangue periferico in misura uguale o superiore all'1% e presenza di sintomi

sistemici. Grazie a questa stratificazione prognostica si possono identificare i pazienti a prognosi molto buona (che non presentavano nessuno di questi fattori, con sopravvivenza superiore agli 11 anni) e quelli con prognosi estremamente sfavorevole (che presentavano tre o più dei fattori di rischio, con una sopravvivenza di poco superiore a 2 anni). Questa classificazione è stata successivamente implementata in modo da poter essere applicata dinamicamente anche durante il *follow up*. Il DIPSS (*Dynamic International Prognostic System*) prevede le stesse variabili sopracitate, assegnando, tuttavia, alla presenza dell'anemia un punteggio doppio. Un'ulteriore revisione del DIPSS (DIPSS plus) ha portato all'aggiunta di tre fattori con significato prognostico sfavorevole: presenza di un cariotipo sfavorevole, fabbisogno trasfusionale di globuli rossi e presenza di piastrinopenia con conta inferiore a 100.000/mmc. Da studi recenti è emerso un significato prognostico anche dello stato mutazionale nei pazienti con PMF. In particolare, la presenza di mutazioni del gene *CALR*, cui corrisponde un quadro clinico caratterizzato da età meno avanzata, conta piastrinica superiore, punteggi del DIPSS plus più bassi, minore tendenza all'anemia e alla dipendenza trasfusionale, minore incidenza di leucocitosi e minore frequenza di mutazioni a carico dei geni che regolano lo *splicing*, è associata a un profilo prognostico più favorevole. Secondo alcuni Autori tali caratteristiche clinico-prognostiche favorevoli potrebbero non riguardare tutti i pazienti con mutazione di *CALR*, ma sarebbero limitate ai pazienti con mutazione di *CALR* tipo 1; gli studi che verranno condotti nei prossimi anni aiuteranno a dare risposte più precise in tal senso. Di significato sfavorevole sembrano, invece, essere sia il profilo molecolare triple-negative, ossia quello caratterizzato dall'assenza delle tre *founding mutations* a oggi identificate (a carico di *JAK2*, *MPL* e *CALR*), sia la presenza di mutazioni a carico di altri geni, quali *IDH*, *EZH2*, *SRSF2* o *ASXL1*. La presenza della mutazione di *ASXL1*, inoltre, sembra attenuare anche l'effetto favorevole della presenza della mutazione di *CALR*.

Al momento attuale non disponiamo di opzioni terapeutiche per i pazienti affetti da MPN in grado di indurre la guarigione della malattia, a eccezione del trapianto di cellule staminali emopoietiche, che risulta, però, gravato da una tossicità cumulativa tutt'altro che trascurabile e che, pertanto, è riservato a pazienti adeguatamente selezionati. Non disponendo, dunque, di un trattamento in grado di eradicare il clone emopoietico patologico, la terapia medica riservata a questi pazienti risulta mirata a ridurre il rischio di sviluppare un evento vascolare, trombotico o emorragico, a controllare i sintomi sistemici e/o i sintomi legati a particolari aspetti clinici quali l'anemia in corso di Mielofibrosi, i sintomi legati alla splenomegalia e, non

da ultimo, i disturbi microvascolari, che nei pazienti con ET o PV talvolta possono diventare particolarmente invalidanti. La terapia antiaggregante con aspirina si è dimostrata efficace nel controllo dei disturbi microvascolari in una frazione apprezzabile dei pazienti. È necessario sottolineare come, oltre al controllo del rischio vascolare legato alla presenza della patologia mieloproliferativa, sia fondamentale il controllo di tutti i rimanenti fattori di rischio cardiovascolare convenzionali, quali la sindrome metabolica, il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia e il fumo di sigaretta. Non è stata a oggi evidenziata una chiara associazione fra la conta piastrinica e lo sviluppo di eventi vascolari maggiori, mentre è noto come in presenza di spiccata piastrinosi (con conta piastrinica superiore a 1.500.000/mmc) vi sia un rischio clinicamente significativo di malattia di von Willebrand acquisita, con la relativa diatesi emorragica. È ormai accertato che i principali fattori predittivi di complicanze vascolari nei pazienti con Trombocitemia Essenziale e Policitemia Vera sono l'età superiore a 60 anni e la presenza di un precedente trombotico in anamnesi. Sulla base dei due suddetti fattori di rischio, i pazienti con TE o con PV possono essere suddivisi in pazienti a **basso rischio**, quando non presentano nessuna delle due caratteristiche, e pazienti ad **alto rischio**, in presenza di almeno una delle due variabili. Dagli studi fino a ora condotti emerge l'indicazione a trattare i pazienti affetti da **Policitemia Vera** a basso rischio con salassi venosi mirati a mantenere l'ematocrito al di sotto del target del 45% e con terapia antiaggregante con basse dosi di acido acetilsalicilico, a meno che non vi siano controindicazioni maggiori, inclusa la malattia di von Willebrand acquisita. La terapia citoriduttiva è indicata per tutti i pazienti con PV ad alto rischio. L'opzione di utilizzare una citoriduzione andrà, inoltre, presa in considerazione in caso di scarsa tolleranza ai salassi o di elevato fabbisogno di salassi per mantenere l'ematocrito entro il target ottimale, in caso di splenomegalia progressiva o sintomatica, di sintomi severi correlati alla malattia, di piastrinosi con conta superiore a 1.500.000/mmc o di progressiva leucocitosi. La terapia citoriduttiva di prima linea è l'Idrossiurea, mentre l'Interferone alfa rimane una valida alternativa nei pazienti con età inferiore ai 40 anni, data la non leucemogenicità e la notevole efficacia, con percentuali molto alte di remissioni ematologiche complete, con riduzione del burden allelico di JAK2V617F e con la possibilità di ottenere una remissione molecolare completa nel 5-10% dei casi. La terapia con Interferone, tuttavia, oltre ad essere off label per pazienti con PV in Italia, è gravata da un corollario di potenziali effetti collaterali, che la rendono molto meno maneggevole e meno tollerata dell'Idrossiurea. Le evidenze in nostro possesso supportano il trattamento dei pazienti affetti da **Trombocitemia**

Essenziale a basso rischio con terapia antiaggregante con basse dosi di acido acetilsalicilico, a meno che non vi siano controindicazioni maggiori, inclusa la malattia di von Willebrand acquisita. La terapia citoriduttiva è indicata nei pazienti con TE ad alto rischio e il farmaco di prima linea è l'Idrossiurea. La terapia citoriduttiva andrà, inoltre, considerata nei casi che presentano una spiccata piastrinosi, con conta superiore a 1.500.000/mmc. Ricordiamo che in tale circostanza sussiste un rischio vascolare di tipo emorragico. Come opzioni terapeutiche di seconda linea vi è l'anagrelide, farmaco non leucemogeno, ma che, tuttavia, risulta avere un profilo di tollerabilità meno favorevole rispetto all'Idrossiurea e che sembra associarsi a un aumentato rischio di evoluzione fibrotica e a un maggior numero di eventi vascolari (trombosi arteriose e sanguinamenti maggiori), oppure l'interferone, per cui valgono sostanzialmente le annotazioni fatte in precedenza per i pazienti con PV, in termini di efficacia ed effetti collaterali. Per quanto concerne la terapia dei pazienti con **Mielofibrosi**, è necessario ricordare che, con la sola eccezione del trapianto di cellule staminali allogeniche, non si dispone al momento attuale di terapie capaci di guarire la malattia. Per tale motivo, la scelta di intervenire farmacologicamente – con terapie convenzionali o sperimentali – deriva dalla valutazione congiunta della categoria di rischio del singolo paziente, dell'età e delle eventuali comorbidità, del quadro clinico e dei sintomi preponderanti, come ad esempio quelli correlati all'anemia o alla splenomegalia. Il paziente asintomatico, con malattia a basso rischio, senza voluminosa e/o sintomatica splenomegalia può essere tenuto in semplice osservazione (*watch and wait*); nel paziente con citopenie periferiche o marcata mieloproliferazione (splenomegalia, leucocitosi, piastrinosi) è invece indicato un trattamento.

L'anemia grave viene trattata con trasfusione di globuli rossi concentrati. I farmaci utilizzati per il trattamento delle citopenie periferiche sono gli steroidi, gli androgeni anabolizzanti (in particolare il danazolo), l'eritropoietina e i farmaci immunomodulanti (talidomide o derivati). Nei pazienti con spiccata mieloproliferazione (splenomegalia, leucocitosi, piastrinosi) la terapia di prima linea è rappresentata dall'Idrossiurea.

La splenectomia è indicata in caso di splenomegalia massiva sintomatica refrattaria alla terapia citoriduttiva, anemia trasfusione-dipendente, piastrinopenia severa o ipertensione portale sintomatica. Tale procedura è gravata da un rischio di mortalità perioperatoria del 5-10% e da una morbilità (per lo più trombosi venose addominali e infezioni) pari al 25% circa. Per ridurre la splenomegalia e i foci di ematopoiesi extramidollare è anche possibile intraprendere una

radioterapia a basse dosi, con un beneficio transitorio medio di circa 3-6 mesi. L'unica terapia potenzialmente in grado di guarire la mielofibrosi è il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche; tale procedura è tuttavia gravata da un elevato rischio di complicanze e di mortalità peritrapiantologica e pertanto viene riservata esclusivamente ai pazienti giovani con malattia aggressiva e rapidamente progressiva (rischio intermedio-2 o alto secondo gli *score* prognostici in uso).

Una possibile alternativa è rappresentata dai farmaci *JAK2* inibitori; tale gruppo comprende Ruxolitinib, la molecola più conosciuta e l'unica approvata per l'utilizzo clinico, e molecole attualmente in sperimentazione avanzata, quali Momeolotinib e Pacritinib. La scoperta della mutazione V617F del gene *JAK2* e le osservazioni successive sul ruolo fondamentale svolto dalla via di segnalazione intracellulare JAK-STAT nella patogenesi delle MPN Philadelphia negative, hanno dato origine a un filone di ricerca mirata al tentativo di inibire farmacologicamente tale via biochimica. Come accennato in precedenza, esistono al momento attuale evidenze a sostegno del fatto che anche le altre *driver mutations* (*MPL* e *CALR*) possano agire attivando la medesima via metabolica intracellulare e questo contribuirebbe a spiegare l'efficacia dimostrata da questi farmaci anche nei pazienti che non presentano la mutazione di *JAK2*.

Tutti i farmaci JAK-inibitori hanno mostrato risposte in termini di riduzione della splenomegalia e di controllo dei sintomi sistemici che, particolarmente nei casi di mielofibrosi, possono avere un impatto significativo sulla qualità di vita dei pazienti. Le singole molecole, tuttavia, si sono contraddistinte per maggiore o minore efficacia, probabilmente dettata dalla differente selettività e potenza in termini di inibizione dell'attività tirosin-chinasica di *JAK2*, e per alcune caratteristiche di tossicità. In seguito ai risultati positivi di due studi (COMFORT-1 e COMFORT-2) condotti su pazienti con Mielofibrosi (sia primaria sia secondaria a precedente TE o PV) a rischio intermedio-2 o alto, Ruxolitinib ha ricevuto l'approvazione FDA per l'utilizzo in questa categoria di pazienti. L'approvazione è stata, in seguito, ampliata anche all'Europa, inclusa l'Italia; è, pertanto, attualmente possibile impiegare tale farmaco al di fuori dei trial clinici per pazienti con mielofibrosi a rischio IPSS intermedio 2 o alto, con splenomegalia. Dagli studi sopracitati è emerso che Ruxolitinib è efficace nel ridurre la splenomegalia e nell'alleviare il corredo dei sintomi associati alla mielofibrosi (astenia, prurito, sensazione di ingombro addominale, sazietà precoce, sudorazioni notturne). L'effetto di Ruxolitinib si

espleta verosimilmente attraverso una riduzione delle citochine proinfiammatorie, che va di pari passo con il miglioramento dei sintomi sistemici; i dati sulla riduzione del burden allelico di *JAK2* e l'effetto sulla fibrosi midollare sono ancora preliminari. Dall'aggiornamento dei risultati dello studio COMFORT-1 e COMFORT-2 sembrerebbe emergere, inoltre, un piccolo, ma significativo, vantaggio in termini di miglioramento della sopravvivenza.

Per quanto concerne il profilo di tossicità, Ruxolitinib determina in maniera caratteristica, legata al suo meccanismo di inibizione della via JAK-STAT, una globale riduzione dell'emopoiesi, che si manifesta clinicamente con anemia e piastrinopenia, anche di grado severo e talora con necessità di supporto trasfusionale. Questi effetti collaterali ematologici generalmente sono transitori, raggiungono il *nadir* fra l'ottava e la dodicesima settimana di trattamento, per poi gradualmente migliorare fino a un recupero quasi completo. Ulteriori eventi avversi hanno riguardato la possibilità di infezioni opportunistiche e una reazione da *rebound* citochinico alla sospensione del farmaco, con rapida ripresa dei sintomi e della splenomegalia, talvolta con peggioramento delle citopenie e, in alcuni casi, con quadri di vera e propria instabilità emodinamica. Grazie ai risultati positivi dello studio RESPONSE, che ha indagato sicurezza ed efficacia di Ruxolitinib in pazienti affetti da Policitemia Vera resistenti o intolleranti all'Idrossiurea, nel mese di dicembre del 2014 questo farmaco ha ottenuto l'approvazione da parte dell'FDA anche per questa categoria di pazienti. È stata confermata la capacità di agire sulla splenomegalia e sui sintomi sistemici, ed è stato raggiunto un migliore controllo dell'ematocrito nei pazienti trattati con Ruxolitinib rispetto a quelli randomizzati nel braccio della terapia standard. È possibile che nel prossimo futuro, sulla scorta dei risultati appena riportati e di quelli degli studi attualmente in corso, anche in Italia venga estesa l'indicazione di Ruxolitinib ai pazienti con PV, resistenti o intolleranti alla citoriduzione con Idrossiurea.

3 - SCOPO ED OBIETTIVI DEL PROGETTO

Lo scopo di questo progetto, è stato quello di sviluppare un processo integrato per la gestione di trial clinici di fase I-II, comprendente la messa a punto di tutte le norme GCP mediante protocolli specifici e di applicare questo stesso processo per la gestione di due studi clinici indipendenti. Nello specifico mi sono occupata della progettazione, raccolta ed analisi dei dati del protocollo clinico non-profit di fase II dal titolo: "Safety and efficacy of ruxolitinib in splanchnic vein thrombosis associated with myeloproliferative neoplasms (SVT-RUXO)", volto a valutare la sicurezza e l'efficacia di Ruxolitinib in pazienti, affetti da MPN con associata trombosi splancnica; ed ho sviluppato un secondo protocollo clinico non-profit di fase I-II dal titolo: "A phase Ib-II, open-label, multi-center, dose-finding study to assess the safety and efficacy of the oral combination of Ruxolitinib and EVerolimus in subjects with a primary MYelofibrosis (PMF), post- polycythemia vera-myelofibrosis (PPV-MF), or post- essential thrombocythemia-myelofibrosis (PET-MF)" (REVE MY), che prevede l'associazione tra il farmaco INC424 (ruxolitinib) e RAD001, in pazienti affetti da mielofibrosi primaria o secondaria a policitemia vera e trombocitemia essenziale, pretrattati e resistenti/refrattari a ruxolitinib.

Il processo della ricerca clinica, dalla scrittura del protocollo alla submission regolatoria, fino alla valutazione, al monitoraggio e alla chiusura dello studio, è basato su una organizzazione molto complessa di figure professionali, obiettivi e risorse.

Tra i principali obiettivi degli studi clinici vi è la raccolta di dati qualitativamente validi, in ogni fase dello studio, a partire dalla progettazione. L'Investigator e tutti i membri del team dell'U.O. coinvolta svolgono ovviamente un ruolo chiave. Per poter condurre uno studio clinico la figura dello Study Coordinator in qualità di intermediario tra il centro di sperimentazione e i vari stakeholder esterni, è fondamentale. Per ogni studio clinico la valutazione statistica finale sui risultati ottenuti avviene mediante una precedente gestione dei dati raccolti durante il periodo di sperimentazione, su piattaforme elettroniche chiamate CRF di cui il Data Manager è responsabile.

La sperimentazione clinica prevede inoltre la partecipazione di molti operatori per la valutazione degli studi/emendamenti di Fase I (l'AIFA, l'Istituto Superiore di Sanità, i Comitati Etici per i pareri di merito nelle strutture sanitarie in cui si svolge lo studio clinico, il network

Eudravigilance per la segnalazione di reazioni avverse serie in corso di sperimentazione), ai quali competono responsabilità e ruoli distinti, ognuno di fondamentale importanza per garantire una gestione della ricerca corretta e conforme alle norme di riferimento. In quest'ambito l'Agenzia Italiana del Farmaco svolge un ruolo fondamentale come Autorità Competente (Legge n.189 dell'8 novembre 2012), nonché di raccordo e di indirizzo.

Nell'ambito dell'International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, le Standard Operating Procedures (SOP) sono state definite come "istruzioni scritte dettagliate mirate al raggiungimento di uniformità nello svolgimento di una funzione specifica". L'adozione delle SOP è avvenuta in parallelo all'evoluzione delle Norme di Buona Pratica Clinica. Inizialmente le SOP non sono state accolte con eccessivo entusiasmo, ma nel corso degli anni sono divenute il punto di riferimento per le Case farmaceutiche e di prodotti medicali che sponsorizzano studi clinici nei processi di programmazione, avvio, conduzione, conclusione e reporting degli studi stessi, oltre che naturalmente per gli stessi ricercatori clinici, siano essi coinvolti in studi profit che responsabili dello sviluppo e dell'effettuazione di studi non-profit.

L'adozione delle SOP, permette di semplificare l'organizzazione e la documentazione degli studi clinici, salvaguardando contemporaneamente gli standard elevati della Buona Pratica Clinica.

Per poter svolgere i due studi oggetto del mio dottorato, senza uno Sponsor esterno, ai compiti usuali attribuiti all'Investigator, si aggiungono le responsabilità proprie dello Sponsor, tra cui la notifica dello studio e la sottomissione all'approvazione del Comitato Etico locale, fornendo adeguata e aggiornata documentazione sul farmaco in studio. Per gestire i due studi nel rispetto delle normative vigenti in materia di Sperimentazione, mi sono occupata quindi di Clinical Research Process Management incentrando la mia ricerca alla gestione degli aspetti legati alle procedure di valutazione (feasibility) e autorizzazione da parte di AIFA e del Comitato etico locale, alla stipula del contratto con l'azienda farmaceutica per la fornitura gratuita del farmaco oggetto di sperimentazione, alla gestione dei farmaci sperimentali, agli aspetti di gestione amministrativa, alla cooperazione nella stesura del protocollo di ricerca, al disegno della CRF (scheda raccolta dati), al data management fino all'analisi statistica dei risultati. Ho sviluppato quindi procedure operative standard (SOP) per regolamentare le

attività appena descritte e uniformare la gestione presente e futura degli studi clinici attivati all'interno del mio gruppo di ricerca.

4 - METODOLOGIA PER L'ATTIVAZIONE E GESTIONE DI STUDI CLINICI INDIPENDENTI

Prima di progettare un nuovo studio, è necessario innanzitutto valutarne la fattibilità in termini di risorse (materiali, persone, finanze) analizzando alcuni aspetti fondamentali quali:

- la potenzialità numerica del centro
- l'esistenza di studi competitivi
- l'adeguatezza delle attrezzature
- la disponibilità delle risorse

La normativa che definisce i requisiti di idoneità dei centri clinici è strettamente correlata ai requisiti di qualità delle attività connesse con le sperimentazioni, ed è la seguente:

- Il *D.L.vo 24 giugno 2003, n. 211* attribuisce in maniera esplicita al Comitato Etico il compito di valutare non solo l'idoneità dello sperimentatore e dei suoi collaboratori ma anche l'adeguatezza della struttura sanitaria
- Il *Regolamento UE n. 536/2014* sulla sperimentazione clinica dei medicinali, in esecuzione dal maggio 2016, sancisce che le strutture suddette debbano essere idonee alla conduzione della sperimentazione clinica nel rispetto delle disposizioni del Regolamento stesso
- La *Determina n. 451 del 2016*

Lo studio di fattibilità è necessario per la definizione della lista dei centri partecipanti allo studio e quindi viene effettuato prima della sottomissione dei documenti al CE. L'obiettivo è quello di presentare il protocollo di studio, verificarne la fattibilità nel centro e di suscitare l'interesse dello sperimentatore nella sperimentazione proposta. La visita viene fatta in sede o telefonicamente (se lo studio non ha criticità o se si conosce bene).

Al fine di migliorare l'efficienza nell'attivazione di uno studio e la qualità nella conduzione dello stesso è stata individuata all'interno del nostro team, una Clinical Trial Unit.

La Clinical Trial Unit (CTU) rappresenta in generale l'unità operativa destinata al supporto della ricerca clinica ed indispensabile soprattutto in assenza di una CRO, come nel nostro caso. La CTU è gestita principalmente dal direttore medico (sperimentatore principale), dal

coordinatore degli studi clinici (data manager), da un medico ricercatore e da un infermiere di ricerca.

Per poter gestire i due studi clinici non-profit, ho progettato un regolamento per la costituzione della CTU (Clinical Trial Unit) definendo un organigramma ben strutturato, costituito da personale qualificato, in numero sufficiente per la attività da svolgere, adeguatamente formato ed istruito sulle procedure operative standard (SOP), che definiscono le responsabilità e descrivono le modalità con cui deve essere svolta una attività piuttosto che un'altra.

4.1 - REQUISITI DELLA CLINICAL TRIAL UNIT (CTU)

Una Clinical Trial Unit che rispetti i requisiti di qualità, come detto nel paragrafo precedente, necessita di un regolamento interno che specifichi: organico ed organizzazione, compiti, modalità operative, responsabilità. Il personale che ne fa parte deve avere competenza sui seguenti argomenti: GCP, legislazione europea e nazionale relativa agli studi clinici, farmacovigilanza, gestione degli studi clinici, principi di computer validation, data management e archiviazione, principi di bioetica, principi di gestione del farmaco sperimentale, discipline regolatorie, documentazione tecnico scientifica per la richiesta di autorizzazione delle fasi 1 dell'istituto superiore di sanità (ISS), documentazione europea per la richiesta al comitato etico, principi di qualità, sistemi di qualità, SOPs sulle sperimentazioni.

4.2 - PROCEDURE OPERATIVE STANDARD PER LA CONDUZIONE DI STUDI CLINICI DI FASE I-II

L'adozione delle SOP, permette di semplificare l'organizzazione e la documentazione degli studi clinici, salvaguardando contemporaneamente gli standard elevati della Buona Pratica Clinica.

Scopo delle SOP è definire quindi un quadro normativo generale per la conduzione di tutte le attività di Sperimentazione Clinica, dalla progettazione alla pianificazione, approvazione, conduzione, monitoraggio fino alla stesura del report finale, nonché gli aspetti economici connessi alla Sperimentazione stessa.

La CTU deve operare secondo SOP, predisposte per il sistema qualità, tra le quali devono essere presenti le seguenti ove applicabili: staff (qualificazione e formazione), personale coinvolto nello studio (definizione delle responsabilità e formazione), organizzazione e programmazione di uno studio, documentazione da inviare al CE e AC per l'approvazione del protocollo e/o emendamenti delle sperimentazioni no profit, investigator's file e archiviazione, stesura, revisione e validazione del protocollo, emendamenti al protocollo, stesura e revisione delle CRF prima della sperimentazione, investigator's brochure, requisiti minimi del laboratorio, contatti con altri reparti coinvolti nella sperimentazione, piano di monitoraggio, esecuzione del monitoraggio, verifica dei dati originali e modalità di correzione, ottenimento del consenso informato, gestione del farmaco sperimentale compresi moduli e modalità per la contabilità del farmaco, raccolta e segnalazione dei dati clinici di sicurezza (farmacovigilanza), stesura, revisione e approvazione del trial report, conflitti d'interesse nella CTU.

La sfida organizzativa consiste nel disporre di procedure snelle ed efficaci che minimizzano l'impatto sui processi. La mancanza di procedure facilita errori e omissioni, mentre procedure ridondanti o eccessivamente complesse impattano negativamente sulla efficienza.

Le SOP permettono quindi di:

- Conservare una documentazione scritta di tutti gli stadi del processo
- Uniformare le procedure anche se attivate da individui differenti
- Fornire nuovi strumenti ai membri del team coinvolto nello studio e di conseguenza migliorare la qualità del loro lavoro
- Migliorare il training del personale nuovo
- Ridurre il tempo e le energie da dedicare al lavoro di supervisione.

5 – RISULTATI

5.1 - PROGETTAZIONE DI SOP PER LE ATTIVITA' DELLA CTU

Sviluppare SOP interne ha portato alla realizzazione di un pacchetto base personalizzato per la gestione degli studi clinici presso la mia unità operativa. Lo scopo è stato quello di fornire una serie di checklist semplici da usare per garantire una qualità uniformemente elevata dell'impegno dei singoli nell'ambito della ricerca clinica, attraverso la creazione di Procedure, Protocolli, Documenti, Istruzioni di lavoro e Moduli:

Procedura: documento che fornisce informazioni su come sviluppare coerentemente attività e processi. Ogni procedura descrive un unico processo e può contenere istruzioni operative, linee guida, moduli, modelli.

Processo o Protocollo: Insieme di attività correlate o interagenti che trasformano elementi in entrata in elementi in uscita. Gli elementi in entrata, o input, possono essere materiali, istruzioni, specifiche del cliente, disposizioni normative, informazioni, mentre gli elementi in uscita, o output, sono rappresentati da un prodotto o servizio o informazioni. I processi sono descritti attraverso diagrammi di flusso.

Documento: Sono i prodotti di un processo.

Istruzione di lavoro: è un documento che descrive nel dettaglio la modalità di svolgimento di un'attività o parte del processo.

Modulo: documento dalla forma prefissata destinato ad essere ripetuto più volte o predefinito da completare in alcune parti con le scritte relative al caso singolo. Eventuali moduli e modelli sono acclusi al termine della procedura/istruzione operativa e numerati progressivamente seguendo un indice numerico. In questa sezione sono inclusi anche i moduli relativi alle registrazioni.

Le SOP che ho progettato comprendono 9 procedure, 4 protocolli, 1 documento, 7 istruzioni di lavoro, 26 moduli e sono state suddivise in cinque sezioni per renderne agevole la consultazione:

1. Regolamento e Definizioni
2. Politica e pianificazione della qualità
3. Organigramma e funzioni
4. Protocolli e procedure specifiche
5. Strumenti di registrazione

1. Regolamento e Definizioni

P/2281/01	Definizione di SOP (Standard Operating Procedures)
D/2281/01	Regolamento per la conduzione di una sperimentazione clinica

2. Politica e pianificazione della qualità

P/2281/10	Procedura per la gestione del Sistema Qualità
M/903/P50-D	Rapporto di Audit interno
M/1004/P 13b	Rapporto di non conformità

3. Organigramma e Funzioni

P/2281/05	Compiti del personale e job description
-----------	---

4. Protocolli e procedure specifiche

PT/2281/01	Attività organizzative di inizio studio - Il Comitato Etico
PT/2281/02	Attività organizzative di inizio studio - La Convenzione
PT/2281/03	Attività organizzative di inizio studio - Lo Sponsor
PT/2281/04	Attività organizzative di inizio studio - La Farmacia
P/2281/02	Procedura per la gestione del farmaco sperimentale
P/2281/03	Procedura per l'organizzazione delle cartelle dei pazienti
P/2281/04	Procedura per la gestione dei prelievi di laboratorio
P/2281/06	Procedura per l'invio degli esami ai pazienti
P/2281/07	Procedura per la gestione della chiusura di uno studio clinico
P/2281/08	Procedura per la gestione della safety e del rischio legato alle sperimentazioni cliniche
P/2281/09	Procedura per l'archiviazione della documentazione
IL/2281/01	Istruzione di lavoro per l'inserimento di un soggetto in uno studio clinico
IL/2281/02	Istruzione di lavoro per la prenotazione delle risonanze
IL/2281/03	Istruzione di lavoro per la prenotazione delle visite
IL/2281/04	Istruzione di lavoro per la raccolta e gestione dei dati clinici di sicurezza (SUSARs)
IL/2281/05	Istruzione di lavoro per la compilazione delle CRFs - Studio Profit
IL/2281/06	Il monitoraggio di uno studio clinico profit
IL/2281/07	Istruzione di lavoro per lo smaltimento dei KITS

5. Strumenti di registrazione

M/2281/D01-A	Scheda formazione per inserimento nuovo personale
M/2281/D01-B	Personale della Unità di Trial Clinici
M/2281/D01-C	Dichiarazione di uso e custodia chiavi locali
M/2281/04	Mansionario trial
M/2281/05	Scheda registrazione manutenzione ordinaria apparecchiatura biomedica
M/2281/06	Disposizione materiale da studio
M/2281/07	Tabella di assegnazione studi
M/2281/08	Verbale riunioni
M/2281/09	Verbale riunione con personale amministrativo

M/2281/10	Registro accettazione merce
M/2281/11	Registro firme arrivo farmaco da studio
M/2281/12	Contatti Monitor
M/2281/13	Scheda registrazione controllo scadenze farmaci
M/2281/14	Registro della temperatura di conservazione del farmaco
M/2281/15	Calendario annuale visite pazienti
M/2281/16	Scheda registrazione eventi avversi e terapie concomitanti
M/2281/17	Form di accompagnamento campioni
M/2281/18	Modulo di smaltimento Kits
Mod. 1	Ricevuta di consegna documentazione al Comitato Etico
Mod. 2	Modulo di avvenuto smaltimento farmaco sperimentale
Mod. 3	Istruzioni per la richiesta dei rimborsi
Mod. 4	Modulo per comunicazione SAE al Comitato Etico e di First Patient First Visit
Mod. 5	Comunicazione di stato avanzamento studio (report annuale)
Mod. 6	Attestazione di responsabilità per il trasporto del farmaco dalla Farmacia allo Sperimentatore

5.1.1 - STRUTTURA DELLE SOP

La struttura generale delle SOP sopra elencate è la seguente: Numero e titolo della procedura, Scopo, Procedure eventualmente cointeressate, Personale coinvolto e procedure relative Indicazione del responsabile dell'attivazione della procedura, Tempi e modalità di attivazione della procedura, Data della versione in uso ed eventuali modifiche, Identificazione dell'autore e della persona/e da cui è stata approvata la versione (Fig.8).

Le SOP devono essere intese quindi come strumenti duttili, che possono essere adattate alle esigenze della singola Unità Operativa o del singolo studio, una volta fatti salvi i principi della Buona Pratica Clinica. Inoltre, le SOP vanno riviste ed aggiornate ad intervalli regolari, indicativamente pochi mesi dopo la loro introduzione e, successivamente, circa una volta all'anno.

Ciascuna tipologia di documento contiene: il sommario del documento con specifica dei paragrafi e delle pagine; l'elenco dei componenti del gruppo di redazione; tabella di validazione del documento, una codifica univoca al fine di garantire adeguata gestione e rintracciabilità della documentazione (P/codice struttura/numero progressivo). Nel caso dei Moduli, questi sono associati ad un documento che ne regola l'uso. Al fine di facilitare la rintracciabilità del documento da cui origina il modulo, dopo il codice identificativo della struttura, è stata riportata la lettera ed il numero progressivo del documento di origine e, alla

fine del codice, un trattino di separazione ed una lettera in carattere maiuscolo, seguendo l'ordine alfabetico crescente.

**PROCEDURA PER LA
GESTIONE DEL FARMACO
SPERIMENTALE**

P/2281/02

Ed. 1

Rev. 0

SOMMARIO

1 INTRODUZIONE

2 SCOPO.....

3 RIFERIMENTI.....

4 DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.....

5 MODALITÀ OPERATIVE: DALL'ARRIVO ALLO SMALTIMENTO.....

 5.1 ACCETTAZIONE/REGISTRAZIONE DEL FARMACO C/O LA CTU.....

 5.1.1 ACCETTAZIONE.....

 5.1.2 CONTABILITÀ DEL FARMACO.....

 5.2 MODALITA' DI CONSERVAZIONE DEL FARMACO.....

 5.3 PROCEDURA PER LA GESTIONE DI FARMACI DELLO STESSO TIPO MA CON DOSAGGI DIVERSI.....*Errore. Il segnalibro non è definito.*

 5.4 MODALITA' DI MONITORAGGIO DELLA TEMPERATURA DEL FARMACO.....

 5.4.1 PROCEDURA PER IL SETTAGGIO E SCARICAMENTO DATI – STRUMENTI ESCORT DATA LOGGER

 5.5 MODALITA' DI SMALTIMENTO DEL FARMACO.....

6 STRUMENTI DI REGISTRAZIONE.....

7 LISTA DI DISTRIBUZIONE.....

	NOME	FUNZIONE	DATA	FIRMA
REDAZIONE	Dr.a Chiara Paoli	Biotecnologo	Xx/xx/xxxx	
VERIFICA	X	U.O. Accreditamento Qualità e Risk Management	Xx/xx/xxxx	
APPROVAZIONE	Prof. Alessandro M. Vannucchi	Responsabile dell'Unità	Xx/xx/xxxx	

Fig.8 – Esempio di SOP

5.2 - PROGETTAZIONE DELLO STUDIO CLINICO SVT-RUXO

5.2.1 - FASE DI PROGETTAZIONE – IL PROTOCOLLO

Per lo studio clinico in oggetto, siamo partiti dall'ideazione e stesura del protocollo, i cui contenuti fondamentali riguardano:

- premesse e rationale dello studio
- obiettivi dello studio
- disegno dello studio
- criteri di elegibilità dei soggetti
- paragrafo sull'ottenimento del consenso informato
- flow-chart delle procedure
- caratteristiche del farmaco sperimentale
- dimensionamento del campione e analisi statistica
- bibliografia

5.2.1.1 - PREMESSE E RAZIONALE DELLO STUDIO

Le malattie mieloproliferative croniche condividono manifestazioni e complicazioni cliniche; in particolare, le trombosi arteriosa e venosa rappresentano eventi clinici gravi e pericolosi per la vita, in particolare in pazienti affetti da PV e ET. La trombosi in siti insoliti, come le vene splancniche (SVT), è anche tipicamente associata a MPN. Le anomalie del flusso sanguigno a causa dell'occlusione dei vasi splancnici contribuiscono allo sviluppo della splenomegalia, oltre all'ematopoiesi extramidollare; la splenomegalia rappresenta una delle manifestazioni cliniche più evidenti nei pazienti con SVT associata a MPN. La trombosi della vena splancnica può causare l'ipertensione portale che, oltre a contribuire ulteriormente alla splenomegalia, aumenta il rischio di sanguinamento dalle varici esofagee.

I risultati della terapia a lungo termine in uno studio di fase II in pazienti con ET refrattari o intolleranti di idrossiaurea hanno dimostrato l'efficacia di ruxolitinib nel controllo della trombocitosi, riducendo la splenomegalia e migliorando i sintomi.

Abbiamo quindi voluto valutare se la terapia con ruxolitinib fosse sicura ed efficace e fosse in grado di ridurre la splenomegalia e migliorare la sintomatologia nei pazienti con SVT associata ad MPN. Abbiamo anche valutato se il trattamento portasse ad una diminuzione della pressione arteriosa nei vasi splancnici, con conseguente stabilizzazione / riduzione di

preesistenti varici esofagee e / o impedire la formazione di nuove. A questo scopo, abbiamo progettato uno studio di fase 2 multicentrico volto a valutare la sicurezza e l'efficacia di Ruxolitinib in pazienti con splenomegalia, affetti da MPN con associata trombosi splancnica (studio SVT-RUXO, codice del protocollo CINC424XIT01T, EudraCT: 2012-002253-30).

5.2.1.2 - OBIETTIVI DELLO STUDIO (OBIETTIVO PRIMARIO ED OBIETTIVI SECONDARI)

L'*obiettivo primario* dello studio è stato quello di valutare la porzione dei pazienti che hanno ottenuto una riduzione $\geq 50\%$ alla palpazione della milza (lunghezza calcolata dal margine costale) in qualsiasi momento e alla 24a settimana, o una riduzione del volume della milza (SV) $\geq 35\%$ valutata mediante risonanza magnetica (MRI) o tomografia computerizzata (CT) alla 24a settimana rispetto al basale.

Gli *obiettivi secondari*, tutti valutati alla settimana 24, comprendevano: sicurezza del trattamento; miglioramento della qualità della vita; modifiche nell'estensione della trombosi dei vasi splancnici; miglioramento della rigidità del parenchima epatico e splenico; cambiamenti nello stato delle varici esofagee; risposta clinica ed ematologica secondo i criteri "ELN per PV e ET" e "2006-IWG-MRT per MF".

Sono state incluse anche *altre valutazioni esplorative* tra cui: variazioni nel livello di JAK2V617F allele burden; analisi di ulteriori mutazioni somatiche; cambiamenti nei livelli di citochine infiammatorie plasmatiche; quantificazione dei progenitori endoteliali circolanti e delle cellule endoteliali mature (EPC e CEC rispettivamente); cambiamenti nel profilo di espressione di microRNA selezionati nei granulociti; cambiamenti della struttura parenchimale della milza attraverso l'analisi basata sull'imaging RM di diffusione (DWI).

5.2.1.3 - DISEGNO DELLO STUDIO

I 21 pazienti inclusi nello studio pazienti hanno ricevuto ruxolitinib per 24 settimane nel periodo core dello studio. I pazienti che avessero completato il periodo core dello studio, senza tossicità maggiore al trattamento e con evidenza di un miglioramento clinicamente significativo, sono stati autorizzati a continuare a ricevere il farmaco in studio in una fase di estensione del protocollo (Fig.9). Considerando l'uso concomitante di antagonisti di vitamina K e / o agenti anticoagulanti e il potenziale elevato rischio di emorragie dalle varici, il livello della trombocitopenia per l'interruzione del farmaco è stato fissato a $75 \times 10^9/L$ invece di $50 \times 10^9/L$, come nelle sperimentazioni precedenti.

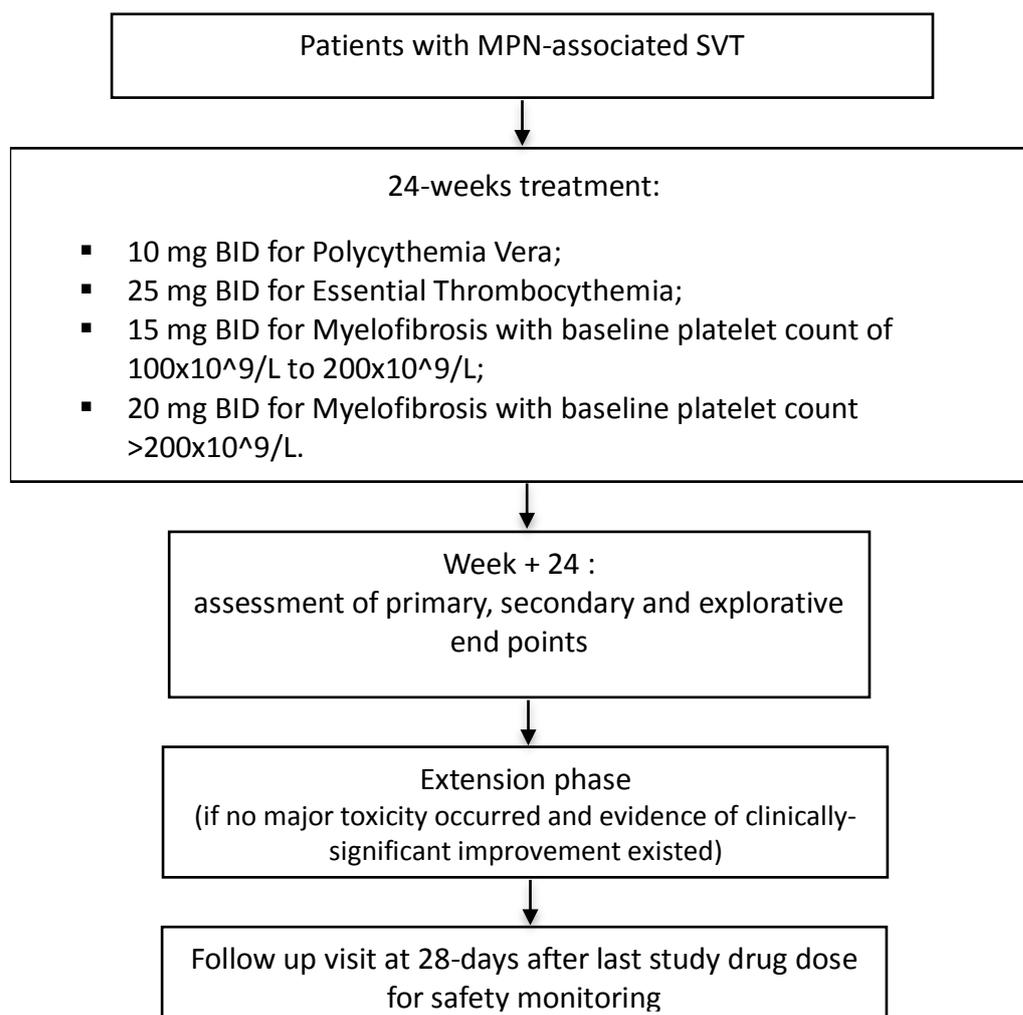


Fig. 9 – Disegno dello studio

5.2.1.4 - CRITERI DI ELEGGIBILITÀ DEI SOGGETTI (CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE)

CRITERI DI INCLUSIONE

Ogni paziente deve soddisfare tutti i seguenti criteri di inclusione per poter partecipare allo studio:

1. Una diagnosi di trombosi vena splancnica (SVT), inclusa la sindrome di Budd-Chiari, trombosi della vena addominale, trombosi venosa portale, trombosi delle vene spleniche.
2. I pazienti devono avere una diagnosi di policitemia vera, trombocitemia essenziale o mielofibrosi primaria secondo i criteri WHO 2008, o di mielofibrosi post-policitemia vera / mielofibrosi post-trombocitemia essenziale secondo i criteri IWG-MRT, sia JAK2V617F positivi che negativi, MPLW515L / K positivi o negativi.

3. Presenza di almeno 5 cm di milza alla palpazione, calcolata dal margine costale sinistro al punto di maggiore protrusione splenica.
4. I pazienti devono essere trattati per profilassi anti-trombotica/emorragica con anticoagulanti orali (per tenere l'INR tra 2-3) o basse dosi di aspirina (<150 mg/die).
5. I pazienti devono avere un conta piastrinica al basale > 100x10⁹/L.
6. Età ≥18 anni al momento della firma volontaria di un modulo di consenso informato approvato dal Comitato Etico.
7. Soggetti con Performance status (ECOG) di 0, 1 o 2.

Grado	ECOG
0	Completamente attivo e in grado di eseguire tutte le attività precedenti alla malattia senza limitazioni
1	Limitato nelle attività fisicamente ardue ma in grado di eseguire lavori leggeri o sedentari
2	Capace di provvedere completamente a sé stesso, ma incapace di eseguire attività lavorative di qualsiasi grado. In piedi per più del 50% delle ore di veglia.
3	Capace di provvedere a sé stesso solo limitatamente. Confinato a letto o in poltrona per più del 50% delle ore di veglia.
4	Completamente inabile. Non in grado di provvedere a sé stesso. Completamente confinato a letto o in poltrona.
5	Decesso

8. Consenso informato scritto da parte dei soggetti prima dell'esecuzione di qualsiasi procedura legata allo studio che non rientri nella normale assistenza medica, con la consapevolezza che il consenso potrà essere ritirato dal soggetto in qualsiasi momento senza pregiudizio per la futura assistenza medica.
9. Soggetti che accettano di partecipare agli studi correlativi associati al protocollo stesso.
10. Le donne fertili devono aver eseguito un test di gravidanza su siero che sia risultato negativo entro 14 giorni prima della somministrazione del farmaco in studio. I soggetti devono essere disposti a rispettare le precauzioni per evitare la gravidanza: il soggetto femmina deve essere in post-menopausa o sterilizzata chirurgicamente o disposta ad utilizzare almeno due dei seguenti metodi contraccettivi, efficaci al 99% nel prevenire il verificarsi della gravidanza (dispositivo intra-uterino, diaframma con spermicida, preservativo con spermicida, o astinenza) per la durata dello studio e per 28 giorni dopo la sospensione del trattamento in studio. Il soggetto maschio accetta di utilizzare un metodo accettabile per la contraccezione per la durata dello studio. Questi metodi

dovrebbero essere comunicati ai soggetti. La contraccezione ormonale non è accettabile a causa delle caratteristiche di questa coorte di paziente.

11. I pazienti devono avere effettuato un washout da qualsiasi altra terapia assunta per la MPN almeno 7 giorni prima di iniziare il farmaco di studio. In caso di interferone alfa o talidomide, è necessario un washout di 28 giorni.
12. Capacità di comunicare con lo staff di ricerca, fornire consenso informato scritto e rispettare le procedure di studio.
13. Il paziente si impegna ad accettare eventuali trasfusioni di sangue (ad esempio, globuli rossi o piastrine), se ritenuto necessario.

CRITERI DI ESCLUSIONE

I pazienti che soddisfano uno dei seguenti criteri di esclusione non devono essere inseriti nello studio:

1. ALT o AST > 2,5 x ULN
2. Bilirubina totale > 2xULN
3. Epatite acuta o cronica attiva di tipo A, B o C.
4. Presenza di ascite refrattaria.
5. Presenza di varici esofagee superiori al grado 2 e/o una storia di emorragie ricorrenti, vale a dire più di due episodi negli ultimi 12 mesi.
6. Presenza di TIPS (Shunt porto-sistemico transgiugulare).
7. Livello della creatinina non superiore a 1,5 volte il limite superiore.
8. Altri disturbi neoplastici entro 3 anni e in completa remissione, tranne il carcinoma a cellule squamose o basali della cute.
9. Il paziente ha ipersensibilità a Ruxolitinib o ad uno qualsiasi degli eccipienti.
10. Soggetti con una durata di vita inferiore a 6 mesi
11. Soggetti con:
 - Conteggio neutrofili assoluti (ANC) $\leq 1 \times 10^9/L$
 - Conteggio delle piastrine $< 100 \times 10^9/L$ senza il supporto di fattori di crescita, fattori trombopoietici o trasfusioni piastriniche.
12. Il paziente ha una percentuale di blasti nel sangue periferico superiore al 5% nei 14 giorni prima l'arruolamento.

13. Soggetti con qualsiasi storia di conta piastrinica $<50 \times 10^9/L$ o ANC $<0,5 \times 10^9/L$ tranne durante il trattamento per MPN o trattamento con terapia citotossica per qualsiasi altra ragione.
14. Soggetti con infezione batterica, fungina, parassitaria o virale clinicamente significativa che richiedono terapia, ad eccezione della profilassi antivirale: soggetti con infezioni batteriche acute che richiedono l'uso di antibiotici dovrebbero ritardare lo screening / l'arruolamento fino al completamento del ciclo di terapia antibiotica.
15. Soggetti HIV-positivi.
16. I pazienti sottoposti a trattamento con recettori-agonisti del fattore di crescita ematopoietico (cioè, eritropoietina [Epo], fattore stimolante le colonie granulocitarie (G-CSF, romiplostim, eltrombopag) in qualsiasi momento entro 2 settimane prima dello screening o 4 settimane prima della prima dose di farmaco.
17. I pazienti che ricevono qualsiasi medicinale presente nell'elenco dei medicinali proibiti.
18. Riduzione della funzionalità gastrointestinale (GI) o malattie GI che possono alterare in modo significativo l'assorbimento di ruxolitinib (ad esempio, malattie ulcerative, nausea incontrollata, vomito, diarrea, sindrome da malassorbimento).
19. I pazienti che ricevono un trattamento continuativo con un altro farmaco di sperimentazione o sono stati trattati con un farmaco di ricerca entro 30 giorni dal trattamento farmacologico.
20. Il paziente sia candidato al trapianto di cellule staminali.
21. Gravi patologie psichiatriche che potrebbero interferire con la partecipazione a questo studio clinico.
22. Soggetti con malattia cardiaca che possono mettere in pericolo la sicurezza dell'oggetto o la conformità al protocollo.
23. Soggetti con angina attualmente non controllata o instabile.
24. Soggetti con fibrillazione atriale o parossistica.
25. Soggetti che hanno avuto irradiazione splenica entro 12 mesi prima dello screening

5.2.1.5 - PROCEDURE DA EFFETTUARE PRIMA DELL'INSERIMENTO DEL SOGGETTO NELLO STUDIO

PRIMA DI TUTTO: OTTENERE IL CONSENSO INFORMATO SCRITTO DEL PAZIENTE

La richiesta e il conseguimento del consenso informato scritto del paziente rappresentano un momento molto delicato dello studio. Per questo motivo l'argomento viene trattato in modo estremamente dettagliato. Ricordiamo che il consenso del paziente deve essere ottenuto prima che venga messa in atto qualsiasi procedura dello studio. Il Coordinatore dello studio (in caso di studio multicentrico) o un medico possono fornire al paziente una spiegazione orale dello studio, ma solo il personale medico, cioè il PI o un altro Investigator, può ottenere il consenso informato scritto, e solo nel caso l'Investigator stesso ritenga che il paziente ne abbia compreso appieno tutte le implicazioni.

Vediamo nel dettaglio i singoli passaggi:

- Individuato un potenziale candidato, il Coordinatore dello studio o un Investigator lo contatta per descrivere lo studio. Verrà utilizzato un linguaggio non tecnico e si risponderà a qualsiasi domanda il paziente possa porre. Se fosse presente un parente/amico del paziente, è auspicabile che questi siano incoraggiati a prendere parte alla conversazione.
- Descrivendo lo studio occorre necessariamente evidenziare i punti seguenti:
 - Il carattere di ricerca e gli aspetti sperimentali.
 - Lo scopo dello studio.
 - Il tipo di farmaco in studio, specificando chiaramente se vi è un gruppo a placebo.
 - Il disegno dello studio.
 - Il numero delle persone coinvolte.
 - La durata dello studio.
 - Il medico che seguirà il paziente, il luogo, il numero e la durata delle visite.
 - Gli esami necessari (ad es., esami del sangue, urine, ECG, ecc.) (Fig. 10)
 - Le responsabilità del soggetto in caso decida di prendere parte allo studio.
 - I rischi eventuali e i possibili benefici cui si espone il/la paziente.
 - Occorre spiegare chiaramente se non sono attesi benefici.
 - La storia clinica del paziente e quali farmaci assume.
 - Le procedure o terapie alternative.

- La necessità del consenso informato scritto dato l'aspetto sperimentale dello studio; che l'aver concesso il consenso informato non implica l'automatica partecipazione allo studio.
 - La volontarietà della partecipazione allo studio; che l'eventuale mancata adesione non comporta penalizzazioni.
 - L'eventuale presenza nello studio di uno specifico criterio di esclusione che può venir valutato solo a consenso informato ottenuto.
 - La possibilità di ricevere un compenso e il diritto a un eventuale indennizzo e a una terapia, se necessari.
 - Il diritto di ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento senza pregiudizievoli conseguenze per le terapie future; che il medico avrà facoltà di interrompere la terapia se riterrà il farmaco in studio non adatto al paziente.
 - Il desiderio della CTU di tenersi in contatto con il paziente qualora si ritirasse.
 - La salvaguardia della privacy del paziente in quanto l'identificazione avverrà tramite iniziali o codice; solo il Centro di Sperimentazione, lo Sponsor ed eventualmente le Autorità Sanitarie avranno accesso ai dati del paziente.
 - Un numero di telefono di contatto disponibile 24 ore al giorno.
- Terminata la spiegazione, il soggetto esprime la propria opinione. Le possibili reazioni sono:
- Un deciso rifiuto. Il ricercatore ringrazia per il tempo dedicatogli.
 - Indecisione. Il ricercatore lascia al soggetto un foglio informativo dello studio, precisando che contiene le stesse informazioni appena comunicate, e lascia il proprio nominativo e recapito telefonico, esortando il soggetto a contattarlo/la qualora avesse ulteriori domande. Fissa poi un appuntamento con il soggetto, assicurandolo sull'esito della sua decisione sia positiva che negativa.
 - Una risposta affermativa. Il ricercatore consegna al soggetto un foglio informativo dello studio, precisando che contiene le stesse informazioni appena comunicate, e lascia al soggetto un congruo tempo per la lettura del foglio stesso. A seconda del tipo di studio, poi, il ricercatore fisserà un appuntamento con il soggetto in data successiva, in modo da lasciare la possibilità di riflettere ulteriormente sulla partecipazione allo studio, oppure, nel caso di uno studio in acuto, ottenuta una

conferma della disponibilità alla partecipazione, farà firmare il modulo di consenso informato.

- Il modulo di consenso informato può presentarsi in triplice copia: una per il paziente da conservare insieme al foglio informativo, una da inserire nella cartella del paziente e la terza da archiviare insieme agli altri documenti dello studio. Deve contenere le seguenti informazioni:
 - Titolo e numero/codice dello studio.
 - Una dichiarazione che il Dott. ... ha spiegato al soggetto lo studio, i potenziali rischi e benefici ed eventualmente l'esistenza di terapie alternative.
 - Che la firma viene apposta su base volontaria e che il soggetto è libero di ritirarsi in qualsiasi momento senza fornire spiegazioni.
 - Che la cartella clinica del soggetto sarà accessibile solo al personale autorizzato, che la sua privacy sarà salvaguardata e che nelle eventuali pubblicazioni dei dati dello studio il soggetto non sarà citato per nome.
 - La possibilità di un indennizzo e di accesso alle terapie necessarie nel caso in cui la partecipazione allo studio rechi danno al soggetto.
- Il modulo di consenso deve riportare la data e la firma dell'Investigator (medico) e del soggetto. Sotto le firme occorre scrivere il nome in stampatello. La presenza di un testimone è prevista solo nel caso in cui sia il soggetto sia il suo rappresentante legalmente riconosciuto non siano in grado di leggere e scrivere.

	Screening (from day-28 to -1)	Day 1 (±7 days)	Week 2 (±3 days)	Week 4 (±7 days)	Week 6 (±3 days)	Week 8 and every 4 weeks thereafter (±7 days)	Week 24/ EOS (±7 days)	Every 12 weeks after week 24	Follow up after EOS/ Week 28 (±7 days)
Visit type	visit	visit	lab visit	visit	lab visit	visit	visit	visit	Visit
History, diagnosis review	X							X	
History, Physical exam	X	X		X		X	X	X	X
Pulse, blood pressure, respiratory rate, temperature, body weight	X	X		X		X	X	X	X
Performance status	X	X		X		X	X	X	X
Measurement of spleen by palpation	X	X		X		X	X	X	X
Adverse events	X	X		X		X	X	X	X
Dispense study drug		X		X		X		X	
Evaluation of response evaluation of response per ELN or IWG criteria [†]		X		X		X	X	X	X
Procedures									
CBC, Platelet count, blood smear for differential	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Serum creatinine, electrolytes, PT, PTT, ALT, AST, Alk phosphatase, Bilirubin total and direct, LDH, uric acid, total protein and albumin, glucose, CPK, fibrinogen	X	X		X		X	X	X	X
Blood samples for ancillary biological studies	X			X		X [#]	X	X [†]	
Bone marrow biopsy	X*								
ECG	X						X		
MPN-SAF questionnaire	X	X		X		X	X		
Color and power Doppler analysis	X						X	X [†]	
Resistive indexes	X						X	X [†]	
Pulsatility index	X						X	X [†]	
Echocardiogram	X						X	X [†]	
Pressure-recording-analytical-method (PRAM)	X						X	X [†]	
Abdomen MRI (or TC)	X						X		
Oesophagogastroduodenosc	X**						X	X [†]	

	Screening (from day-28 to -1)	Week 4 (±7 days)	Week 24 (±7 days)	Week 72 and every 48 weeks thereafter (±7 days)
JAK2V617F or MPLW515 allelic burden	X		X	X
MicroRNA expression profile	X	X		
Cytokine profile	X	X		
Genotyping analysis	X			
Circulating EPC frequency	X		X	X
MRI-based analysis of diffusion weighted imaging	X		X	

Fig.10 - Flow-chart delle procedure

5.2.1.6 - DESCRIZIONE DELLE MODALITÀ, DEI TEMPI E DELLE DOSI DI SOMMINISTRAZIONE DEI FARMACI IN STUDIO

Nel protocollo abbiamo inserito le modalità con cui Ruxolitinib deve essere assunto e le sue caratteristiche, specificando che il farmaco deve essere assunto per via orale e che ogni confezione di farmaco contiene 60 compresse. Sul flacone stesso sono riportate le modalità di conservazione (15-30°C) ed è importante che il soggetto non utilizzi lo stesso flacone per più di 30 gg consecutivi dall'apertura.

Secondo il disegno dello studio, la dose iniziale è di 10 mg BID per i pazienti con diagnosi di PV, 25 mg BID per ET, 15 mg BID per MF se il numero di piastrine al basale è tra 100 e $200 \times 10^9/L$, e 20 mg BID se $> 200 \times 10^9/L$.

5.2.1.7 - STRUMENTI E MODALITÀ DI VALUTAZIONE DEGLI OBIETTIVI PER LO STUDIO (AD ESEMPIO, CRITERI DELLA VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA OBIETTIVA, TEMPI ED ESAMI PREVISTI PER IL FOLLOW-UP, QUESTIONARI SULLA QUALITÀ DELLA VITA)

Lo studio è stato approvato dalle Commissioni Istituzionali del Centro coordinatore (Firenze) e dei Centri satellite rispettivamente, ed è stato condotto in conformità alla Dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti hanno fornito consenso informato scritto per lo studio e l'analisi farmacodinamica.

Di seguito si riportano le procedure che sono state eseguite per il raggiungimento degli obiettivi dello studio:

IMAGING

La misurazione del volume della milza (SV) mediante risonanza magnetica (MRI) è stata eseguita con un metodo di segmentazione semiautomatica con il software OsiriX.

Sono stati utilizzati approcci non invasivi per valutare i cambiamenti nelle anomalie del flusso sanguigno:

1. Eco-color Doppler. È stato usato per stabilire il livello, il grado e l'estensione della trombosi nelle vene splancniche. Queste informazioni strumentali sono utili per interpretare i risultati delle misurazioni emodinamiche e per valutare la formazione di varici esofagee.
2. La valutazione degli indici resistivi delle arterie intraparenchimali della milza è stata ampiamente studiata nei pazienti con ipertensione portale a causa della cirrosi. Abbiamo

ipotizzato che l'indice resistivo fosse aumentato in correlazione con il grado di ipertensione portale nei pazienti con MPN-SVT, in modo da migliorare con il trattamento.

3. La valutazione dell'indice resistivo dei rami intraepatici dell'arteria epatica aumenta in presenza di ipertensione portale nei pazienti cirrotici; le stesse considerazioni si applicano come sopra.

RIGIDITA' DEL FEGATO E DELLA MILZA

La rigidità del parenchima epatico è ben accertata in presenza di malattie epatiche croniche, ad es. epatite C o B, ma non sono disponibili informazioni in MPN-SVT. La rigidità della milza è un parametro relativamente nuovo e misurabile, e i primi studi sull'ipertensione del sistema portale nel paziente cirrotico stanno comparando in letteratura medica. Questi studi indicano che la rigidità della milza è direttamente correlata con l'ipertensione portale e lo sviluppo di varici esofagee.

VARICI ESOFAGEE

Lo stato delle varici esofagee è stato valutato attraverso l'esofagogastroduodenoscopia al basale e alla settimana 24, e successivamente ogni 48 settimane.

ECOCARDIOGRAMMA

Scopo di questo test è stato quello di misurare i parametri associati alla circolazione iperdinamica utilizzando l'analisi Doppler e la valutazione dei volumi ventricolari attraverso una tecnica tridimensionale.

Sono stati valutati i seguenti parametri:

a) Ecocardiogrammi transtoracici unidimensionali:

- diametro end-diastolico ventricolare sinistro (LVEDD, cm) e diametro ventricolare sinistro ventricolare sinistro (LVESD, cm);
- spessore del setto e della parete posteriore
- diametro del ventricolo destro (RVD, cm);
- diametro atriale sinistra (LAD, cm);
- diametro della radice aortica (ARD, cm).

b) Ecocardiogrammi transtoracici bidimensionali:

- Valutazione dei volumi ventricolari e della frazione di eiezione (EF,%) con il metodo simpson biplane;
- Volume atriale sinistro

- tratto di deflusso del diametro del ventricolo sinistro
 - diametri aortici
 - diametro del tronco polmonare
- c) Studi di flussimetria cardiologica:
- Flusso nel tratto di deflusso del ventricolo sinistro (Doppler PW);
 - Flusso diastolico transmitralico (valutazione della funzionalità diastolica ventricolare sinistra, rapporto tra le altezze del picco di velocità del flusso diastolico precoce e tardivo (rapporto E / A), tempo di decelerazione (DT, ms), tempo di rilassamento isovolumico (IVRT, ms);
 - Valutazione di una possibile insufficienza valvolare:
 - pressione arteriosa polmonare sistolica (secondo il gradiente sistolico RV-RA di una possibile rigurgitazione polmonare);
 - Flusso nell'arteria polmonare.
- d) Ecocardiografia del doppler tissutale:
- rapporto E / E per la valutazione della funzione diastolica.
- e) Ecocardiogramma transtoracico:
- Valutazione dei volumi ventricolari e della frazione di eiezione (EF,%).

Il volume della milza (SV) è stato calcolato sottraendo il volume end-sistolico dal volume end-diastolico. L'output cardiaco o gittata (CO) è una misura che descrive il volume di sangue pompato dal cuore; si ottiene moltiplicando la SV per la frequenza cardiaca. L'indice cardiaco (CI) è ottenuto dividendo il CO per superficie della superficie corporea.

CALCOLO DELLA DIFFUSIONE DI RM (DWI)

La tecnica di diffusione RM-DWI è basata sui movimenti microscopici delle molecole di acqua causate dall'energia termica, noto anche come movimento Brownian. Pertanto, DWI descrive indirettamente la densità cellulare e la struttura architettonica di un tessuto.

Infatti, se all'interno di un tessuto la densità di cellule tumorali è elevata (stato fibroso o edematoso), le molecole d'acqua hanno difficoltà nei movimenti liberi, pertanto la "diffusione" è bassa (e in generale aumenta l'intensità del segnale alla RM). Al contrario, se la densità cellulare è bassa e il microambiente è omogeneo, le molecole d'acqua si muovono liberamente, la "diffusione" è più facile e in generale l'intensità del segnale diminuisce. La

tecnica DWI ha il potere di evidenziare alcune segnali intralesionali che non sono evidenti sulle scansioni CT / MR standard.

DWI può essere quantificato attraverso dei parametri. Tra questi, abbiamo adottato il più semplice, vale a dire il Coefficiente di diffusione apparente (ADC) che esprime, come quantità scalare, il moto medio molecolare in direzione generale. Così, l'ADC può solo parzialmente descrivere un evento più composito in un mezzo omogeneo ed isotropico (quale è la milza). Quindi ADC è una misura il cui valore descrive la quantità di barriere che le molecole d'acqua trovano nella loro libera diffusione. Quando la diffusività è facile (microambiente omogeneo, pochi ostacoli), l'ADC è elevato, mentre quando la diffusività è ostacolata l'ADC è basso.

VALUTAZIONI DI LABORATORIO SU GRANULOCITI E PLASMA

I campioni di plasma sono stati raccolti al momento dello screening e alla settimana 4 del trattamento dopo centrifugazione a 1.800 x g a 4 ° C per 15 minuti. I granulociti sono stati separati mediante centrifugazione differenziale su un gradiente Ficoll-Paque, a partire da 20 mL di sangue periferico; i globuli rossi contaminanti sono stati rimossi attraverso lisi ipotonica. Le pellet di cellule sono state usate per l'estrazione del DNA o sono state risospese in reagente di isolamento TriPure (Roche®) per l'estrazione di RNA. I campioni sono stati conservati a -20 ° C.

DETERMINAZIONE DI JAK2V617F ALLELE BURDEN E ANALISI STATISTICA.

Il burden allelico di JAK2V617F è stato valutato attraverso una analisi quantitativa in RT-PCR al basale, alla settimana 24 e alla settimana 72. Il DNA è stato purificato utilizzando il kit QIAmp DNA (QIAGEN GmbH®) e quantificato con tecnologia Nano Drop ND-1000. Il burden allelico mutato è stato misurato tramite reazione a catena della polimerasi (PCR), utilizzando 20 ng di DNA. L'amplificazione e la rilevazione PCR sono state eseguite su un sistema StepOne Plus PCR (Applied Biosystems®) utilizzando le seguenti condizioni di ciclo: 10 minuti a 95 ° C seguiti da 50 cicli di 15 secondi a 95 ° C e 60 secondi a 60 ° C. Questo metodo è costituito da due reazioni: uno eseguito utilizzando primers che fiancheggiano l'hot-spot e specifico per l'allele mutante (primer diretto 5'-GCGCGGTTTATAATTATGGAGTATGTT-3', primer inverso 5'-GCGGTGATCCTGAAACTGAATTTTC-3'), l'altra eseguita con primer specifici per allele WT (primer diretto 5'-GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGTG-3'; primer inverso 5'-GCGGTGATCCTGAAACTGAATTTTC-3'). In entrambe le reazioni è stata aggiunta la sonda Taqman 5'-TGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACAGGCT-6FAM-MGBNFQ. Tutti i campioni

sono stati analizzati in duplicato (JAK2wt e JAK2V617F) e la quantità di allele JAK2V617F è stata calcolata in confronto a diluizioni seriali del plasmide VF e WT (wt e mutate a 2,5%, 5%, 12,5%, 25%, 50%, 75 %, 100%). La media delle determinazioni Δ CT duplicate (CTJAK2V617F-CTJAK2WT) è stata utilizzata per calcolare la percentuale di alleli mutanti. In ciascun dosaggio sono stati inclusi controlli positivi e negativi.

QUANTIFICAZIONE DI MIRNA CON qRT-PCR.

I livelli di espressione del microRNA selezionato sono stati misurati con QRT-PCR in granulociti purificati alla settimana 4 e confrontati con il basale. L'RNA totale è stato preparato con un reagente di isolamento TriPure (Roche®) come descritto dal produttore. La purezza e la concentrazione di RNA sono state valutate mediante spettrofotometria utilizzando NanoDrop ND-1000. La qualità e la dimensione del RNA totale è stata valutata dalla piattaforma Agilent 2100 Bioanalyzer basata su microfluidici (Agilent Technologies®) con Agilent Rna 6000 Nano Kit; gli elettroferogrammi sono stati visualizzati utilizzando il software Agilent 2100 Expert. I campioni RNA impiegati per ulteriori analisi avevano un RIN maggiore di 8. Abbiamo eseguito un test di miRNA individuale mediante Taqman quantitativo in real-time PCR (QRT-PCR) per l'identificazione e la quantificazione dei miRNA anormalmente espressi nei granulociti (Applied Biosystems®). La quantificazione relativa di espressione di miRNA (RQ) è stata ottenuta usando il metodo della soglia di ciclo comparativo (CT) utilizzando U6 snRNA come il gene della casa. Per normalizzare i dati, $\Delta\Delta$ CT è stato calcolato per ogni campione raccolto alla settimana 4 del trattamento utilizzando la media dei suoi valori Δ CT sottratti dal valore medio di Δ CT misurato in tutta la popolazione di campioni raccolti allo screening, considerato come un calibratore; il valore RQ è stato espresso come $2^{-\Delta\Delta$ CT.

Di seguito l'elenco di miRNA selezionato. La tabella descrive la localizzazione cromosomica del miRNA, la direzione del cambiamento indotto da ruxolitinib come definito da Verstovsek S. et al, 2014 (diminuito [D] o aumentato [I]) e il ruolo previsto in ematopoiesi normali e anormali basati su informazioni in letteratura.

miRNAs selected	Location	Reported changes Under Ruxolitinib therapy [7]	Role in Normal and/or Abnormal Hematopoiesis
hsa-miR 183-5p	Chr. 7:129414745 - 129414854	D	<ul style="list-style-type: none"> - Induction of TNF-α-mediated NF-κB activation in U937 leukemia cell line; - Potential oncogenic miRNA; - Targets EGR1 and promotes tumor cell migration; - Inhibits TGF-β-induced apoptosis.
hsa-miR 198	Chr. 3: 120114515 - 120114576	D	-Potential oncogenic miRNA
hsa-miR 1225-5p	Chr. 16: 2140196 - 2140285	I	N/A
hsa-miR 31-5p	Chr. 9 - 21512114 - 21512184	I	<ul style="list-style-type: none"> -Downregulated in PMF granulocytes; -Loss of miR-31 leads to feed-forward EZH2; -Endogenous negative regulator of factorinhibiting hypoxia-inducible factor 1; - Impairs IL-2 production in T cells; - Negative regulator of fibrogenesis; - Downregulated in CML; - Involved in the aberrant activation of NF-κB signaling in tumors through Polycomb mediated silencing.
hsa-miR 127-5p	Chr. 14:101349316 – 101349412	I	<ul style="list-style-type: none"> -Tumor suppressor miRNA; -Expression increased by AZA
hsa-miR 146a-5p	Chr. 5: 159912359 – 159912457	I	<ul style="list-style-type: none"> -Expression is driven by NF-κB; -Inhibits IL-1β-induced release of proinflammatory; chemokines (IL-8, cc-chemokine); -Its overexpression causes reduction of IRAK1 and TRAFs, impairs NF-κB activity, and suppresses the expression of NF-κB target (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α); -Downregulates CXCR4 expression with impaired megakaryocytic proliferation and maturation; -Overexpressed in granulocytes of 5q-patients;

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI CITOCHINE PLASMATICHE

Le citochine ed i fattori di crescita riportati nella tabella supplementare 2 sono stati misurati con un test immunosorbente enzimatico (ELISA) alla base e la settimana 4 [8-12]. I livelli plasmatici di citochine pro-infiammatorie selezionate (IL-8, IL-12, sTNF-RII, proteina C-reattiva ad alta sensibilità [hs-CRP]) e fattori di crescita (GM-CSF, VEGF) nei pazienti a tempo di screening e dopo 4 settimane di trattamento sono state valutate mediante un sistema ELISA usando i kit commerciali Invitrogen®, secondo le istruzioni del produttore. I risultati sono stati espressi come concentrazione media (pg / mL) con ciascun campione esaminato in duplicato. A seguire l'elenco delle citochine selezionate e dati relativi alla letteratura.

Cytokines	Role in MPN	Authors
CRP	It is associated with shortened leukemia-free survival in patients with myelofibrosis.	<ul style="list-style-type: none"> Barbui et al., 2013[13]
GM-CSF	The subgroup of PV patients with vascular complications displayed significantly different concentrations of GM-CSF compared with patients without vascular complications.	<ul style="list-style-type: none"> Pourcelot E et al.,2014[9]
IL-8	<p>It is a potent chemokine that has the capacity to exert a profound effect on the tumor microenvironment, including the survival and proliferation of tumor cells through autocrine signaling, promotion of angiogenesis, and leukocyte chemotaxis and activation.</p> <p>It was significantly increased in patients with PV compared with healthy controls; levels significantly decreased with ruxolitinib therapy.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Verstovsek S. et al., 2014[7] Tefferi et al., 2011[10] Pourcelot E et al, 2014.[9] Waugh DJ et al., 2008[11]
IL-12	The subgroup of PV patients with vascular complications displayed significantly different concentrations of IL-12 compared with patients without vascular complications. It was associated with high hematocrit and LDH levels.	<ul style="list-style-type: none"> Verstovsek S. et al, 2014[7] Tefferi et al, 2011[10] Pourcelot E et al, 2014[9] Vaidya et al, 2014[12]
sTNF-RII	It was significantly increased in patients with PV compared with healthy controls; levels significantly decreased with ruxolitinib therapy.	<ul style="list-style-type: none"> Verstovsek S. et al, 2014[7]
VEGF	Ruxolitinib induced a rapid decrease of VEGF in MF and PV which coincided with improvement in constitutional symptoms and splenomegaly.	<ul style="list-style-type: none"> Verstovsek S. et al, 2014[7] Pourcelot E et al, 2014[9] Tefferi et al, 2011[10]

PROGENITORI ENDOTELIALI CIRCOLANTI (EPC): QUANTIFICAZIONE CON CITOMETRIA DI FLUSSO.

Il numero di cellule endoteliali circolanti dei progenitori endoteliali (EPC) e cellule endoteliali mature (CECs) è stato misurato mediante citometria a flusso alla 24a settimana;

Gli EPC sono stati identificati grazie all'espressione del CD34 e del vascular endothelial growth factor 2 (VEGFR-2) in associazione con CD133 e/o CD45/CD45dim, mentre CEC sono stati elencati come cellule Syto + CD45-CD31 + CD146 +.

Quattrocento microlitri di PB raccolti in tubi contenenti EDTA sono stati incubati per 30 minuti a 4 ° C con 200 µl di diluizione 1/1000 di FITC-Syto16 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 5 µl di APC AF750-anti- CD45, 5 µl di PECy7-anti-CD34 (Beckman Coulter, Pasadena, CA), 10 µl di PE-anti VEGFR-2 (R & D, Minneapolis, MN), 2,5 µl di diluizione 1/10 di biotinilato-CD31 PerCp- (1) µl di PE-anti-CD146 (Merk-Millipore, Darmstadt, Germania) e 5 µl di APC-anti-CD133 (ibidossi, San Diego, CA e Becton Dickinson Pharmingen, San Josè, CA) Miltenyi, Bergisch Gladbach). Per ciascuna procedura di colorazione (eBioscience) sono stati utilizzati appropriati controlli isotipici.

Dopo la lisi dei globuli rossi, i campioni sono stati centrifugati e i pellet risospesi in 300 µl di tampone di fosfato con 0,5% di siero di vitello fetale (FCS). Almeno 1×10^6 cellule sono state acquisite mediante flow cytometry (Navios, Beckman Coulter) e analizzate usando il software Kaluza (Beckman Coulter).

5.2.1.8 - DIMENSIONAMENTO DEL CAMPIONE, PROCEDURE DI RACCOLTA E DI ANALISI DEI DATI

L'analisi statistica include tutti i pazienti (21) che hanno ricevuto almeno una dose del farmaco. Il cut-off dei dati è stata la 24a settimana per l'endpoint primario e la settimana 72 del trattamento per la fase di estensione. I dati di sicurezza sono stati riportati come incidenza cumulativa degli eventi. Le differenze sono state valutate con Log-Rank e Wilcoxon Tests per variabili continue e test del Chi-square per variabili categoriali. La forza della correlazione lineare tra due variabili è stata valutata dalla correlazione di Pearson. I dati sono stati raccolti tramite un portale web (<https://hematology.hpg23.it/SVTRUXO/login.php>) e sono stati analizzati dal nostro centro, in qualità di centro coordinatore utilizzando SPSS 23.0 (SPSS, software IBM, USA). Il significato statistico è stato definito come $P < 0.05$.

5.2.2 - FASE DI ATTIVAZIONE E CONDUZIONE DELLO STUDIO

Dopo aver progettato il protocollo ed i relativi documenti, l'attivazione e la conduzione dello studio clinico ha richiesto diversi ed improrogabili passaggi.

5.2.2.1 - STUDY START-UP

Questa fase rappresenta l'insieme delle attività associate alla identificazione, qualificazione e attivazione dei centri sperimentali col fine ultimo di ottimizzare la pianificazione e la strategia di reclutamento dei pazienti per lo studio; nell'ambito di questo progetto di dottorato, 4 sono i centri satellite in cui abbiamo deciso di condurre l'attività di ricerca per raggiungere il target previsto di 21 pazienti.

Ciascun centro è stato scelto dopo averne valutato l'EFFICIENZA e QUALITA' in termini di:

a. Pianificabilità	<ul style="list-style-type: none">• Costanza, standardizzazione e certezza dei tempi di risposta• Percentuale di centri attivi negli studi ma non arruolanti• Capacità di arruolamento dei centri
b. Tempestività	<ul style="list-style-type: none">• Start up duration: tempi complessivi di attivazione dei Centri coinvolti• Tempi di reclutamento pazienti
c. Qualità del Dato	<ul style="list-style-type: none">• Costi del data cleaning• Queries• Dati non valutabili
d. Costi	<ul style="list-style-type: none">• Costo della gestione della sperimentazione• Costo per paziente
a. Risorse	<ul style="list-style-type: none">• Qualità della produzione scientifica• Esperienza dello staff• Meccanismi di coinvolgimento dello staff nello studio• Reputation e competenze dello sperimentatore principale• Proattività sperimentatore principale
b. Strutture	<ul style="list-style-type: none">• Qualità nelle cure

	<ul style="list-style-type: none"> • Qualità nella gestione dei documenti fonte • Location • Coordinamento tra sperimentatori e Comitato Etico
c. Meccanismi Operativi	<ul style="list-style-type: none"> • Aderenza al protocollo • Raccolta consenso informato • Registrazione Eventi Avversi
d. Gestione del Farmaco	<ul style="list-style-type: none"> • Procedure di gestione del farmaco: conservazione, dispensazione • Adeguatezza strutturale della farmacia

Fonte: Rapporto OASI 2012

Alle variabili di EFFICIENZA, si intersecano le variabili legate al parametro “QUALITA” nella conduzione della sperimentazione.

Esse si possono raggruppare in quattro macro aree principali:

- 1- risorse;
- 2- strutture;
- 3- meccanismi operativi (per assicurare aderenza al protocollo, alle procedure di studio e alla normativa vigente)
- 4- gestione del farmaco presso il centro.

Rispetto alla prima macro area, quella relativa alle risorse, rientrano nella valutazione la qualità della produzione scientifica dello sperimentatore principale e dello staff, la pregressa, e certificata, esperienza di tutto lo staff nella partecipazione a *studi clinici*, nonché i meccanismi di coinvolgimento dello staff nello studio, con l’evidenza del “training studio-specific” per ogni persona coinvolta. Il minimo staff richiesto per partecipare ad una sperimentazione clinica è costituito da:

- *Principal Investigator* (PI, Sperimentatore Principale). Come indicato nell’Investigator’s agreement, il PI è il responsabile finale della sperimentazione. Su di lui ricadono tutte le responsabilità, anche se poi il PI ha facoltà di delegarle al suo staff. Deve assicurare che la sperimentazione venga condotta in accordo con il contratto firmato, le GCP e le regolamentazioni vigenti. Deve inoltre garantire la protezione dei diritti, della sicurezza e del

benessere dei soggetti coinvolti nel trial. E' necessaria una laurea in Medicina se lo studio è interventistico con farmaci .

- Uno o più *Sub-Investigator* (SI, Sperimentatori Secondari). A seconda del carico di lavoro, il PI identificherà uno o più SI che prenderanno parte al trial. Essi saranno delegati dal PI riguardo determinate mansioni, come stabilito nel "Site Responsibility and Delegation Log". E' necessaria una laurea in Medicina se lo studio è interventistico con farmaci.
- *Study Coordinator* (SC, Coordinatore dello studio). Un tempo chiamato "data manager", lo SC si occupa solitamente di gestire tutti gli aspetti non prettamente medici dello studio. Per questo motivo non è necessario che lo SC abbia una laurea in Medicina. In genere chi svolge questo ruolo ha una laurea in discipline scientifiche.
- *Study Nurse* (SN, Infermiere di ricerca). Si occupa di tutte quelle mansioni non necessariamente mediche, quali per esempio la rilevazione della pressione e la frequenza cardiaca, o la rilevazione di altri parametri necessari per il trial (peso, altezza...).

Sono considerate poi molto rilevanti le procedure attivate dallo sperimentatore principale e le sue competenze: *oversight* sullo studio, conoscenza reale delle procedure legate allo studio, degli emendamenti, dello stato di progressione dello studio. Si valuta, infine, la proattività dello sperimentatore principale e i meccanismi posti in essere per coordinarsi con i vari attori coinvolti nella sperimentazione stessa.

In merito alla seconda macro area di interesse per valutare la qualità della struttura, tra le variabili fondamentali rientrano disponibilità, organizzazione e completezza dei documenti. Il Promotore presta particolare attenzione alla storia medica del paziente e a come questa viene registrata, oltre al fatto che vi sia evidenza documentata che tutti i criteri di inclusione/esclusione dei pazienti nello studio siano realmente verificati. Sempre rispetto alla documentazione, rientrano tra le variabili di valutazione della qualità i processi per la sua conservazione e, nello specifico, il luogo fisico di "deposito" delle cartelle cliniche e di tutta la documentazione correlata allo studio (archivio dello sperimentatore, *Investigator's Site File e Pharmacy Binder*). Si valuta quindi la *location* nei suoi aspetti strutturali come, ad esempio, la presenza di armadi chiusi a chiave per la conservazione della documentazione e la presenza di stanze e spazi adeguati per il monitoraggio. Infine, tra le variabili inerenti la struttura, rientra la comunicazione del *Principal Investigator* con il Comitato Etico. In particolare, viene verificato che il processo sia attuato in forma regolare e continuativa per gestire in maniera

efficiente eventuali deviazioni dal protocollo o anche per altre segnalazioni degne di nota. Viene inoltre verificato che il rapporto annuale sia inoltrato regolarmente al Comitato Etico.

La terza macro area inerente la dimensione della qualità, quella dei meccanismi operativi, considera innanzitutto “la aderenza a tutte le procedure/istruzioni specifiche dello studio”, inclusa la completezza e correttezza della compilazione delle schede raccolta dati (CRF); in sostanza che non si verifichino violazioni al protocollo e/o quanto previsto dalla normativa vigente. Inoltre, la qualità, come espressione della funzionalità dei meccanismi operativi, è legata alla revisione delle modalità di raccolta del consenso informato secondo quanto previsto dalle GDP – Good Distribution Practice. Questo controllo viene effettuato anche in caso di emendamenti al protocollo che determinano modifiche al consenso informato. In questi casi, oltre alle modalità di raccolta del consenso, si verifica la tempistica di somministrazione del consenso informato ai pazienti (e cioè che l’ICF sia stato firmato alla prima visita utile e che non siano determinati ritardi di nessun genere, soprattutto per emendamenti di safety). Rientra sempre nell’area di aderenza al protocollo la modalità di registrazione degli Eventi Avversi ed Eventi Avversi Seri (AE/SAE) in cartella clinica ed in CRF. In particolare per i SAE, si valuta che la notifica di un evento avverso sia avvenuta entro le 24 ore da quando il centro è venuto a conoscenza dell’evento. Per gli AE, invece, viene verificato che in cartella clinica sia sempre documentata la severità (secondo CTCAE - Common Terminology Criteria for Adverse Events) e la correlazione con il farmaco sperimentale.

Rispetto alla quarta macro area della qualità, la gestione del farmaco, quindi, la conservazione in adeguate condizioni e in luoghi con accesso limitato e controllato. Si controlla che il farmaco sia sempre dispensato correttamente ai pazienti inseriti nello studio Rientra nella macro area della gestione del farmaco anche l’adeguatezza strutturale della farmacia, dei processi e della documentazione relativa alla gestione e al flusso del farmaco sperimentale all’interno del Centro.

CENTRI PARTECIPANTI SELEZIONATI PER LO STUDIO SVT-RUXO

1. Dipartimento di Ematologia, Università di Firenze, Firenze (centro coordinatore)

PI: Alessandro M. Vannucchi.

2. Unità di laboratorio di Epidemiologia Clinica / Centro per lo studio della mielofibrosi.

Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia.

PI: Giovanni Barosi / Vittorio Rosti

3. Dipartimento di Oncologia Ematologica. IRCCS Fondazione Policlinico S. Matteo e Università di Pavia, Pavia.

PI: Mario Cazzola.

4. Divisione di ematologia. Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo.

PI: Alessandro Rambaldi.

5. Dipartimento di terapia cellulare e ematologia. Ospedale San Bortolo, Vicenza.

PI: Marco Ruggeri.

Basandosi sulla sinossi del protocollo e sul questionario di fattibilità, i centri coinvolti hanno revisionato criticamente gli aspetti etici e scientifici del protocollo e di altra documentazione per verificare l'esistenza della popolazione di studio (criteri di inclusione/esclusione) presso il proprio centro; la necessità di coinvolgere altri reparti all'interno della struttura (per es radiologia o medicina nucleare); se il carico di lavoro previsto dallo studio [casistica soggetti, numero visite, numero procedure, tempi dello studio, dati da raccogliere] fosse compatibile con le risorse umane disponibili e con il numero di sperimentazioni già in corso; la disponibilità di strumentazione non studio specifica (computer per inserimento dati, linea veloce, fax etc.); la revisione dei tempi autorizzativi. Non appena lo studio di fattibilità ha avuto esito positivo, si è proceduto con la sottomissione del protocollo al Comitato etico del centro coordinatore, per l'ottenimento del parere unico, e contestualmente ai Comitati etici dei centri satellite per l'ottenimento dei pareri favorevoli alla conduzione dello studio.

5.2.2.2 – ATTIVITÀ SVOLTE PER L'APPROVAZIONE DA PARTE DELL'AUTORITÀ REGOLATORIA E SOTTOMISSIONE/APPROVAZIONE DELLO STUDIO DA PARTE DEI COMITATI ETICI COINVOLTI

Per poter condurre uno studio clinico in Europa, è necessario ottenere un EudraCT Number prima della sottomissione della domanda autorizzativa ad AIFA. Il codice EudraCT è un codice unico ed inequivocabile che si riferisce ad un'unica sperimentazione, deve essere chiesto una sola volta, anche nel caso che la sperimentazione interessi più Stati Membri, sia che venga condotto in un singolo centro sia in più centri. Una volta acquisito, questo numero sarà utilizzato come unico riferimento per la conduzione dello studio clinico in qualsiasi stato dell'Unione Europea o dell'Area Economica Europea. Verrà pertanto indicato come codice di riferimento per qualsiasi richiesta e/o in qualsiasi corrispondenza.

Il codice univoco associato a questo studio è il: 2012-002253-30.

In qualità di centro coordinatore e promotore dello studio, dopo aver sottomesso il protocollo e i relativi documenti al Comitato Etico locale, ho caricato in Osservatorio AIFA la medesima documentazione per la valutazione da parte dei comitati etici dei centri satellite. Ha avuto inizio quindi il processo di valutazione e consultazione per le autorizzazioni del comitato etico ed amministrative necessarie affinché i centri potessero entrare a far parte della sperimentazione, ricevere il farmaco e arruolare pazienti.

Il farmaco è stato fornito gratuitamente da Novartis, che non ha avuto alcun ruolo nel disegno dello studio o nell'analisi dei dati. Per garantire la massima riproducibilità, tutte le misurazioni sono state centralizzate, ad eccezione di esofagogastroduodenoscopia eseguita localmente. Lo studio è stato sostenuto da AIRC, un'organizzazione italiana senza scopo di lucro per la ricerca sul cancro, nell'ambito del progetto AGIMM (www.progettoagimm.it).

La sperimentazione oggetto dei presente documento è multicentrica, quindi non poteva iniziare in alcun centro satellite prima dell'espressione del CE del centro coordinatore. Solo il CE del centro coordinatore può chiedere una modifica sostanziale al protocollo, che verrà quindi emendato. I centri collaboratori possono far pervenire al CE del coordinatore entro 30 giorni dal ricevimento della domanda, le proprie osservazioni e possono solo accettare o rifiutare il parere; non possono chiedere modifiche al protocollo, ma solo al foglio informativo e al consenso informato, e in taluni casi alla polizza assicurativa. A seguito del ricevimento del

parere unico, il CE collaboratore deve comunicare entro 30 giorni il proprio parere al promotore, agli altri CE e all'Autorità competente, che è l'AIFA per tutti gli studi (tranne quelli osservazionali), come stabilito nel Decreto Balduzzi (DL 189 del 08.11.2012), la quale ha 60 giorni per rilasciare l'autorizzazione amministrativa. Dopo il rilascio del parere unico del CE coordinatore, lo studio viene inserito nell'osservatorio nazionale sulla sperimentazione clinica dei medicinali dell'AIFA (ripristinato dal 1 ottobre 2014) e iniziano gli accordi per le convenzioni economiche e i contratti. In definitiva, i tempi di attivazione di uno studio in Italia sono di circa 3-4 mesi.

Nel caso di assenza del Parere Unico, il promotore deve ripresentare la domanda modificata allo stesso CE. Il soggetto promotore deve inviare al CE una lettera d'intenti in cui incarica lo sperimentatore dell'effettuazione della ricerca. Qui sono riportati il nominativo dello sperimentatore, il rationale dello studio, il compenso economico (ove applicabile), l'indicazione del centro coordinatore e l'elenco dei documenti richiesti dal CE per esprimere il parere che sono:

- CTA form
- protocollo di studio ed emendamenti
- sinossi del protocollo in italiano
- foglio informativo e consenso informato
- lettera al medico curante e il materiale del paziente previsto dallo studio (es. diario, questionari)
- informazioni sul prodotto sperimentale (Investigator Brochure o informazioni sul farmaco sperimentale)
- polizza assicurativa
- bozze di convenzione economica
- CV e dichiarazione di assenza di conflitto di interesse da parte dello sperimentatore principale
- parere del CE del centro coordinatore (entro 30 giorni ai CE dei centri collaboratori)

Al solo centro coordinatore, inoltre, vanno sottomessi:

- IMPD (Scheda di descrizione del farmaco sperimentale)
- copia dell'autorizzazione alla fabbricazione

- lista dei centri partecipanti
- elenco degli studi in corso con lo stesso farmaco
- esempi di etichette del farmaco in italiano

EMENDAMENTI INTRODOTTI ALLO STUDIO SVT-RUXO

Per questo studio, è stato necessario introdurre prima un emendamento al protocollo originale, causato dalla revoca prematura della CRO a cui erano state demandate le attività di monitoraggio dello studio; e nel 2017 è stato poi sottoposto a valutazione AIFA un secondo emendamento per poter permettere ai pazienti che avessero terminato le 72 settimane di trattamento (fase di estensione dello studio) di continuare a ricevere il farmaco. AIFA ha approvato l'estensione della durata dello studio in oggetto in quanto ruxolitinib non aveva ancora ricevuto l'AIC (autorizzazione all'immissione in commercio) per questa particolare indicazione clinica.

5.2.2.3 - ATTIVITÀ SVOLTE PER L'ATTIVAZIONE DEI CENTRI SPERIMENTALI

PRE-STUDY VISIT

A seguito della disponibilità del centro a partecipare alla nuova sperimentazione clinica e dopo la sottomissione del protocollo di studio al CE, ci siamo accordati con i centri sperimentali per una Pre-Study visit (PSV) con l'obiettivo di verificare se effettivamente il Principal Investigator (PI), il suo staff e le facilities del centro fossero adeguate alla conduzione dello studio clinico. Alla PSV hanno partecipato il PI e i co-investigators, lo Study Coordinator (SC) e le altre persone coinvolte nello studio. La PSV, inoltre, è l'occasione per iniziare a stabilire una relazione con il centro ed ottenere l'adesione dello sperimentatore e del suo staff allo studio. Nel corso della PSV è stato presentato il protocollo con le sue procedure e raccolte documentazioni relative a:

farmaco: l'iter che esso segue dall'arrivo in farmacia alla sua conservazione fino alla distribuzione al paziente, il monitoraggio della temperatura, lo smistamento e la conservazione al centro in modalità conformi alle GCP, il temperature log;

organizzazione del centro: presenza di ambulatori, spazi disponibili per le site visits, modalità di conservazione ed archiviazione dei documenti dello studio, identificazione dei source documents (es. cartelle elettroniche o cartacee);

adeguatezza dello staff: Curriculum vitae, training GCP, conduzione di altri studi

adeguatezza dei laboratori: qualifica del personale di laboratorio, certificazione di qualità e di manutenzione degli strumenti, certificati di calibrazione

potenzialità di reclutamento: attività di Pre-Screening.

In linea generale, la PSV può essere effettuata anche telefonicamente o in web-conference, soprattutto se il centro è già conosciuto dal Promotore. In tal caso la documentazione viene raccolta per via telematica o nel corso dell' apertura del centro sperimentale, ovvero nella Site Initiation Visit (SIV). Nel caso in cui la PSV viene fatta in loco e per i nuovi centri, allora viene programmato un tour nel centro, nella farmacia e negli altri reparti coinvolti, in cui vengono mostrati tutti gli spazi, la strumentazione e il personale coinvolto nello studio. Al termine della visita si compila un report che verrà conservato nell'Investigator's file.

SITE INITIATION VISIT

La Site Initiation Visit (SIV) è la visita di apertura/attivazione del centro sperimentale. La SIV viene concordata con il centro il più vicino al "ready to go" allo studio così da avere più tempo a disposizione per l'arruolamento e quando il farmaco è già disponibile in sede. A seguito della SIV, si può considerare che il centro abbia ricevuto il corretto e completo training per l'esecuzione dello studio, che abbia ricevuto tutto il materiale per condurlo, che siano state ottenute tutte le autorizzazioni e che siano stati raccolti e validati tutti i documenti necessari allo studio.

Gli obiettivi della SIV sono:

- training dello Staff del centro;
- raccolta dei documenti;
- impostazione del lavoro.

Le persone coinvolte, quindi, sono tutte quelle hanno un ruolo all'interno dello studio, dalla selezione dei pazienti, alla raccolta e processazione dei campioni, alla raccolta dei dati. La programmazione di una SIV prevede una richiesta ufficiale al centro in cui si invita alla partecipazione tutte le persone coinvolte nello studio di tutte le unità e a cui si spediscono l'investigator's folder(IF), le credenziali CRF, il farmaco, i kit di laboratorio e i kit di spedizione dei campioni biologici.

Secondo le regole GCP, prima dell'inizio dello studio è necessario che vi siano questi documenti:

- pre-study visit report (file solo del Promotore)
- Investigator's Brochure
- Protocollo firmato
- esempio di CRF
- foglio informativo e consenso informato
- lettera al medico curante
- assicurazione
- approvazione etica del centro (e delibera, se applicabile)
- approvazione etica del centro coordinatore
- accordi tra le parti (se applicabile)
- procedura/codici di apertura del cieco
- CV dei ricercatori
- modulo firme autorizzate
- FDA financial disclosure agreement
- certificato di qualità del laboratorio
- range di normalità esami strumentali
- documentazione di invio del prodotto e istruzioni per la sua manipolazione, esempio di etichetta, certificato di analisi (file solo dello sponsor)
- rapporto di monitoraggio di inizio studio

Nel corso della SIV il training riguarda principalmente il protocollo, il consenso informato, il farmaco, i materiali (kit di laboratorio, diari, manuali), le CRF, l'Investigator folder, la valutazione della safety e le responsabilità. Questi sono stati rivisti assieme agli esecutori che possono chiarire tutti i dubbi.

Nel dettaglio:

- protocollo: si rivedono i punti chiave del protocollo quali criteri di inclusione/esclusione, obiettivi primari/secondari, i trattamenti concomitanti permessi, la tempistica delle visite e le procedure previste da protocollo (flow chart); eventuali procedure particolari (randomizzazione, IVRS), tools utilizzati, rimborsabilità esami;

- consenso informato: data e firma vanno apposte personalmente dal paziente nella sua ultima versione, firma e data anche dello sperimentatore, indicazione in cartella della partecipazione allo studio del paziente previo rilascio del CI, archiviazione del CI nell'IF
- farmaco: modalità di assegnazione del trattamento, modalità di somministrazione prevista dal protocollo, restituzione del farmaco non utilizzato, modulistica di drug accountability (drug dispensing log e inventory log), procedure di smaltimento del farmaco;
- materiale di laboratorio: illustrazione e utilizzo dei kit, dei diari elettronici, modulo di richiesta, compilazione del requisition form, management dei campioni biologici, spedizione dei campioni, recapiti corriere;
- source documents: cartelle cliniche, ambulatoriali, referti esami centralizzati e locali;26
- Safety: moduli segnalazione eventi avversi (SAE, AE, ADR, SUSAR)
- CRF: training del personale dedicato alla compilazione, illustrazione pagine più importanti;
- Investigator folder: documenti da raccogliere, organizzazione dei CI, Screening/enrolment/Identification Log, Site responsibility Log, CV, SAE, manuali di laboratorio, Drug Accountability/dispensing Log.

In sede di SIV è stata verificata l'attivazione delle credenziali per la CRF del personale interessato all'inserimento dei dati raccolti durante lo svolgimento dello studio, e si raccoglie il modulo della site signature log con le firme e i ruoli di tutte le persone coinvolte nello studio. Al termine della SIV c'è un momento di discussione sulle criticità che il centro potrebbe incontrare, vengono proposte delle soluzioni e si fa una previsione dell'arruolamento. Da questo momento in poi, il centro può iniziare l'arruolamento dei pazienti.

5.2.3 - GESTIONE, ANALISI E PUBBLICAZIONE DEI DATI

5.2.3.1 -ATTIVITÀ SVOLTE PER IL MONITORAGGIO E LA GESTIONE DEI DATI CLINICI E DI LABORATORIO

La corretta gestione dei dati relativi ad uno studio clinico rappresenta un aspetto fondamentale dell'esecuzione dello studio stesso. La qualità delle procedure di raccolta e registrazione dei dati da parte dei singoli sperimentatori, di trasmissione dei dati al centro coordinatore e di inserimento dei dati nel database elettronico è un presupposto fondamentale per una corretta analisi e quindi per l'attendibilità dei risultati della sperimentazione. Prima dell'inizio della sperimentazione, sono state allestite, coerentemente con il protocollo di studio, le Schede Raccolta dati (CRF, Case Report Form), che sono state utilizzate per la trascrizione delle informazioni necessarie dei documenti clinici originali ("source documents": cartelle cliniche, referti di esami strumentali o di laboratorio). Compito degli sperimentatori è assicurare la correttezza della compilazione delle CRF e la coerenza delle informazioni trascritte con i dati contenuti nei documenti originali. Nel caso di studi multicentrici come l'SVT-RUXO, gli sperimentatori dei centri satellite devono garantire la compilazione delle CRF e l'invio dei dati al centro coordinatore in tempi brevi rispetto alle scadenze dettate dal protocollo. In particolare, tempestiva deve essere la segnalazione di eventuali eventi avversi gravi occorsi nei soggetti partecipanti alla sperimentazione, indipendentemente dalla probabilità di relazione causale tra l'assunzione del farmaco sperimentale e l'evento stesso.

Per questo studio mi sono quindi occupata di raccogliere i dati dei nostri pazienti (15 in tutto) e i dati relativi ai restanti 6 pazienti, inviati dai centri satellite per inserirli in un database elettronico unico (file excel), sul quale sono state effettuate le analisi dei risultati dello studio. Ogni processo di gestione dei dati comporta inevitabilmente degli errori, e delle procedure di controllo di qualità consentono di ridurre entro limiti accettabili il tasso di errori contenuti nel database.

Tali procedure mirano a:

- Verificare la correttezza della trascrizione dai documenti originali alle CRF (procedure di monitoraggio presso i centri, che possono riguardare tutti i dati di ciascun soggetto inserito nella sperimentazione o essere effettuati secondo una campionatura statisticamente controllata);

- Garantire la correttezza della trascrizione dei dati alle CRF al database elettronico (ad esempio mediante double data entry, cioè l’inserimento sistematico dei medesimi dati da parte di due operatori e successivo confronto delle incongruenze, oppure verifica di un campione di dati scelto a caso);
- Verificare la completezza e la coerenza delle informazioni raccolte (ad esempio, dati mancanti oppure dati poco plausibili oppure incongruenza delle date registrate rispetto ai tempi stabiliti dal protocollo). In questi casi, la risoluzione delle incongruenze viene ottenuta tramite la generazione di apposite *query*, ovvero richieste di chiarimenti, che ciascun centro interessato provvede a risolvere.

I dati clinici per essere dei dati di qualità, devono essere:

- **ATTRIBUIBILI:** i source data devono essere tracciabili e attribuibili, attraverso la firma (o le iniziali) e la data, a chi ha fatto le osservazioni e riportato le stesse
- **LEGGIBILI:** il dato deve essere leggibile e registrato in modo che rimanga tale nel tempo
- **CONTEMPORANEI:** i dati devono essere registrati al momento della loro osservazione e non a posteriori
- **ORIGINALI:** i dati sono quelli osservati e riportati per la prima volta e non sono dati trascritti
- **ACCURATI:** i dati riportati riflettono in modo completo e preciso quanto è stato osservato e la veridicità delle osservazioni, senza approssimazioni

5.2.3.2 - ANALISI STATISTICA E PUBBLICAZIONE DEI RISULTATI

In questo studio clinico sono stati inseriti 21 pazienti come da target previsto, con diagnosi rispettivamente di PMF in 8 pazienti (38,1%), PV in 5 (23,8%), ET in 4 (19,1%), PPV-MF in 3 (14,3%) e PET-MF in 1 (4,8%). Diciotto pazienti hanno avuto una trombosi spleno-porto-mesenterica e due avevano BCS (Sindrome di Budd-Chiari); un paziente aveva entrambi i siti coinvolti. Diciassette pazienti presentavano l’occlusione di almeno due vasi, mentre in 2 pazienti la trombosi ha coinvolto rispettivamente solo la vena porta e la vena splenica. Sedici pazienti (84%) avevano cavernoma portale e 17 (89%) avevano altri shunt venosi collaterali venoso-sistemici, tra cui splenorenali, esofagogastrici, perisplenici, cistifellea, peripancreatici e addominali. La diagnosi di SVT si è verificata 80 mesi (valore mediano, range 5-324) prima del trattamento con ruxolitinib. La mutazione JAK2V617F è stata riscontrata nel 90% dei pazienti, la carica allelica era del 43% (range, 16-74); un paziente presentava sia una mutazione MPLW515L che una mutazione CALR di tipo 1. La lunghezza mediana della milza

dal margine costale era di 10 cm (range, da 5 a 21 cm); 4 pazienti (19%) avevano anche un'epatomialgia palpabile. Quattordici pazienti avevano ricevuto idrossiurea come trattamento citoreducente interrotto, come da protocollo, almeno 7 giorni prima dell'inizio del trattamento con ruxolitinib. Il 90% dei pazienti era in trattamento con anticoagulanti, 1 per aspirina a basso dosaggio e 1 per antagonista di vitamina K e aspirina. Undici pazienti erano in terapia con beta-bloccanti al momento dello screening dello studio e sono rimasti allo stesso dosaggio fino alla valutazione della W72. Durante lo studio nessun paziente ha iniziato ex-novo un trattamento con beta-bloccanti. Il punteggio di rischio IPSS dei 12 pazienti con MF era basso in 4 (33,3%), intermedio-1 in 7 (58,3%) e intermedio-2 in 1 (8,3%).

Le caratteristiche cliniche e di laboratorio sono riportate nella tabella I.

	Patient no. (%)
Males	9 (42.9)
Age at enrolment Median (min-max)	49.8 (35.4-70.5)
Diagnosis	
Primary Myelofibrosis	8 (38.1)
PV	5 (23.8)
ET	4 (19.0)
Post PV-Myelofibrosis	3 (14.3)
Post ET-Myelofibrosis	1 (4.8)
Budd-Chiari syndrome	2 (9.5)
Spleno-porto-mesenteric thrombosis	18 (85.7)
Budd-Chiari and spleno-porto-mesenteric thrombosis	1 (4.8)
Patients with JAK2V617F mutation	19 (90.5)
VF allele burden <50%	12 (63.2)
VF allele burden >50%	7 (36.8)
Median (range, min-max) mutant alleles burden	43 (16.0-74.0)
Patients with MPLW515L mutation	1 (4.8)
Patients with CALR mutation	1 (4.8)
ECOG	
0, no. (%)	16 (76.2)
1, no. (%)	3 (14.3)
2, no. (%)	2 (9.5)
LDH, U/L, median (min-max)	248 (154-879)
Hemoglobin, gr/dL, median (min-max)	12.9 (9.4-16.7)
Platelet count, x10 ⁹ /L, median (min-max)	212 (100-389)
White blood cell count, x10 ⁹ /L, median (min-max)	7.3 (1.8-16.4)
Splenomegaly, cm below LCM, median (range)	10 (5-21)
Patients with palpable hepatomegaly	4 (19.1)
History of hemorrhagic events	1 (4.8)
Patients on vitamin K antagonist therapy	19 (90.4)
Patients in antiplatelet treatment	1 (4.8)
Patients on both vitamin K antagonist and antiplatelet treatment	1 (4.8)
Patients on beta-blockade treatment	11 (52.4)

Tabella I: Caratteristiche dei pazienti al Baseline.

Alla settimana 72 della fase di estensione dello studio (follow-up), 18 pazienti (85,7%) erano ancora in terapia. Due pazienti (9,5%) hanno discontinuato il trattamento alla 24a settimana, a causa rispettivamente di eventi avversi (astenia e trombocitopenia) e per mancanza di miglioramenti clinici e / o ematologici.

La dose totale media giornaliera di ruxolitinib alla 24a settimana era 25 mg per MF, 18 mg per PV e 22.5 mg per ET.

VALUTAZIONI DI SICUREZZA DEL FARMACO

Ruxolitinib è stato ben tollerato, non si sono verificati eventi avversi gravi (AE, registrati utilizzando National Cancer Institute Common Terminology Criteri per eventi avversi (NCI CTCAE) versione 4.03). Le tossicità ematologiche fino alla 24a settimana comprendevano principalmente:

- trombocitopenia, nel 52,4% dei pazienti (tutti i gradi) con grado 3 nel 14,3%
- anemia, nel 23,8% dei casi (tutti i gradi) con grado 3 nel 9,5%.
- Neutropenia, in due pazienti (9,5%), in entrambi i casi di grado 3.

Non è stata segnalata alcuna tossicità ematologica di grado 4 e nessuno paziente ha richiesto trasfusioni di globuli rossi o di piastrine; gli AE ematologici sono stati gestiti con sospensione temporanea del trattamento o riduzione della dose. Gli AE non ematologici fino alla 24a settimana, tutti di grado 1-2, consistevano di infezioni lievi, soprattutto nei tratti respiratori superiori, astenia, sintomi addominali ed incremento dei valori di AST / ALT; nessuno di questi AE ha richiesto la sospensione temporanea o definitiva del farmaco o la riduzione della dose. Una tabella dettagliata degli AE intercorsi è riportata nella tabella II. In particolare, non si è verificato alcun episodio di sanguinamento. C'è stata solo una riattivazione di herpes zoster.

Adverse event definition	Grade*	Number of events	Number of patients	Percentage of patients (%)
Platelet count decreased	all	21	11	52.4
	1,2	17	11	52.4
	3,4	4	3	14.3
Anemia	all	12	5	23.8
	1,2	10	5	23.8
	3,4	2	2	9.5
Neutropenia	all	4	2	9.5
	1,2	2	2	9.5
	3,4	2	2	9.5
Asthenia	all	4	4	19.0
	1,2	4	4	19.0
	3,4	0	0	0.0
Fever/Flu like symptoms	all	6	4	19.0
	1,2	6	4	19.0
	3,4	0	0	0.0
Upper airways infection	all	4	3	14.3
	1,2	4	3	14.3
	3,4	0	0	0.0
AST or ALT increase	all	11	6	28.6
	1,2	11	6	28.6
	3,4	0	0	0.0
Diarrhea	all	3	3	14.3
	1,2	3	3	14.3
	3,4	0	0	0.0
Abdominal pain	all	3	2	9,5
	1,2	3	2	9,5
	3,4	0	0	0,0

* According to CTC AE 4.03.

Tabella II: Gli eventi avversi si sono verificati in più del 10% dei pazienti fino alla 24a settimana, indipendentemente dalla causalità.

VALUTAZIONI DI EFFICACIA DEL FARMACO

Alla settimana 24 del trattamento, 13 pazienti (61,9%) hanno ottenuto una riduzione della lunghezza della milza $\geq 50\%$ alla palpazione e 6 pazienti (29%) hanno ottenuto una riduzione di volume della milza $\geq 35\%$ mediante imaging (Figura 11A e B). Tutti i pazienti alla 24a settimana di trattamento, alla risonanza magnetica hanno mostrato un certo grado di risposta, che va dal -6% al -54% rispetto alla baseline e 19/21 pazienti (90,5%) hanno anche dimostrato una riduzione della lunghezza della milza alla palpazione, da -13 % a -100% rispetto alla baseline. Le misurazioni seriali della lunghezza della milza alla palpazione a intervalli di 4

settimane, hanno dimostrato che una risposta sulla milza, vale a dire una riduzione della lunghezza della stessa $\geq 50\%$, è stata ottenuta progressivamente: 42,9% (9/21) alla settimana 4 e settimana 8, 47,6% (10/21) alla settimana 12, 57,1% (12/21) alla settimana 16 e 61,9% (13/21) alla settimana 20. La riduzione mediana è mostrata in Figura 11C.

La valutazione dello stato della circolazione sanguigna nella vena splancnica mediante analisi eco-doppler a 24 settimane ha rivelato che l'estensione della trombosi venosa era rimasta stabile rispetto alla baseline. L'indice resistivo dell'arteria splenica e epatica intraparenchimale e l'indice di pulsatilità dell'arteria mesenterica non si sono notevolmente modificati durante la terapia: i valori di screening e la settimana 24 sono stati 0.61 (range 0.52-0.79) rispetto a 0.63 (0.5-0.8) ($p = 0.7$) 0,66 (0,53-6,0) rispetto a 0,66 (0,5-0,8) ($p = 0,36$) e 2,2 (0,9-5,0) rispetto a 2,4 (0,8-7,0) ($p = 0,96$) rispettivamente.

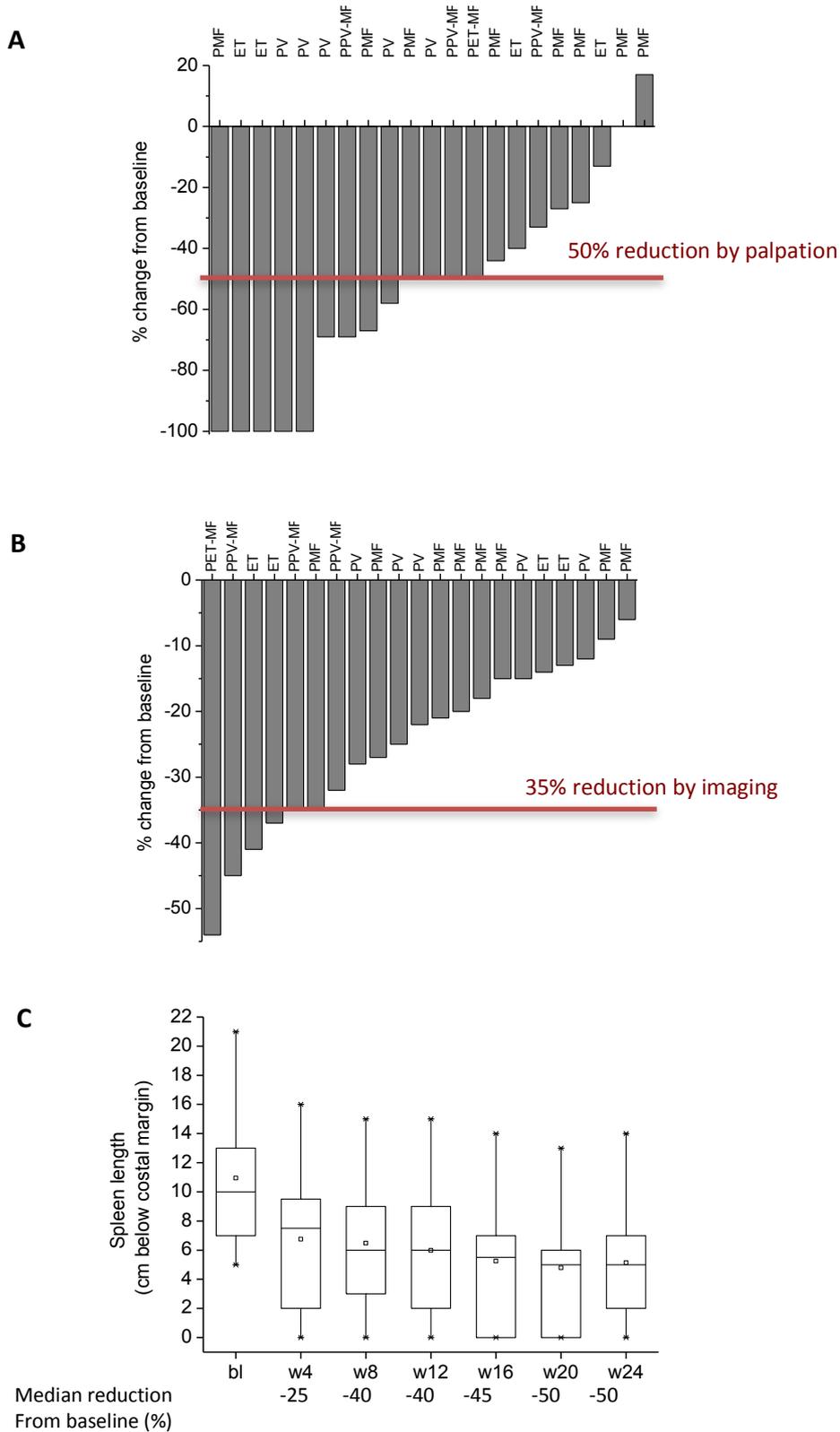


Fig.11 – Riduzione della milza durante il trattamento. (A) Riduzione della lunghezza della milza misurata con la palpazione e (B) riduzione del volume della milza misurata dall'immagine alla settimana 24. C: riduzione della lunghezza della milza misurata ogni quattro settimane dalla baseline alla 24a settimana; la riduzione mediana dalla linea di base ad ogni punto temporale è mostrata sul fondo.

La rigidità della milza valutata attraverso fibroscan è stata valutata solo in 4 pazienti a causa dei livelli al basale che erano superiori al limite massimo di rilevazione dello strumento. In tutti e quattro i casi valutati, la rigidità della milza, dopo trattamento con ruxolitinib, si è ridotta da una media di 55,85 Kpa (range 34,3-75,0) a 42,5 Kpa (range 26,3-72,0), con una riduzione mediana del 24%. Questa osservazione è risultata essere coerente se confrontata con pazienti con MF senza SVT sempre trattati con ruxolitinib. La rigidità epatica al basale era invece all'interno della gamma normale per tutti i pazienti e non si sono verificati cambiamenti a w24 (non mostrato in dettaglio).

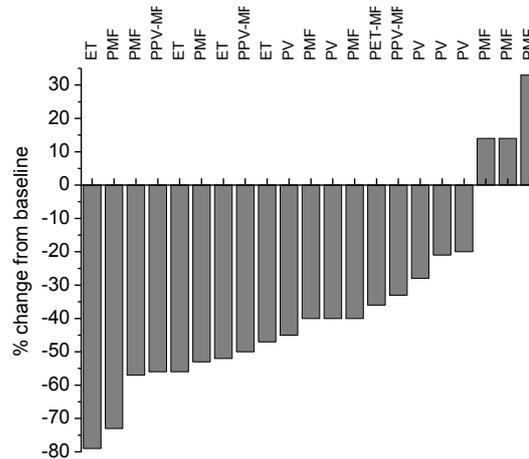
Al basale 5 pazienti non presentavano varici esofagei, 9 avevano varici di grado 1 (F1) e 7 avevano grado 2 (F2). Alla 24a settimana, nessuno dei 5 pazienti senza varici al basale aveva evidenze di formazioni de-novo. Otto di nove (88,9%) pazienti con F1 sono rimasti stabili e uno è peggiorato al grado 2 (11,1%), mentre nei 7 pazienti con varice F2, 4 rimanevano stabili (57,1%), 2 (28,6%) peggiorati al grado 3 e 1 paziente migliorata a F1 dopo una procedura di legatura delle varici eseguita dopo 14 settimane mentre si trovava in trattamento con ruxolitinib ma che era stata già pre-pianificata dal chirurgo prima dello screening del paziente. Nessun paziente è andato incontro ad emorragia gastrointestinale superiore e nessuno è stato sottoposto a legature tranne la procedura pre-programmata appena descritta.

La valutazione cardiaca alla settimana 24 ha mostrato una riduzione della frequenza cardiaca da un valore mediano di 76 bpm (range 55-110) al basale, a 63 bpm (range 45-90) ($P = 0.001$), portando ad una riduzione media dell'output cardiaco (CO) del 16,3% (gamma -41,8 a 38,5%; $P = 0,031$). L'aumento dell'indice di massa corporea (BMI) associato alla terapia con ruxolitinib (da un mediano di 21,8, da 18,3 a 34,9 a 22,2, da 20,6 a 39,3, $P = 0,025$) ha determinato una riduzione dell'indice cardiaco (CI) 17,9% dal basale (range -43,2 a 38,5; $P = 0,024$). Non sono state osservate variazioni di indici di funzione sistolica e diastolica.

La qualità della vita ed i sintomi associati ad MPN sono stati valutati utilizzando il questionario MPN-SAF-TSS al basale e ad ogni visita mensile fino alla 24a settimana. Al basale, la PV era la malattia più sintomatica con un punteggio mediano di 35, seguito da ET con 33 e MF con 21. Il sintomo più comunemente segnalato era la stanchezza (21/21 pazienti), seguito da prurito (18/21), sanguinamento (17/21), dolore addominale (16/21) e sudorazione notturna (15/21). Il punteggio medio per ciascun sintomo per tutti i pazienti è diminuito da 23 (range 3-54) al baseline a 12 (range 3-49) alla 24a settimana ($P < .001$). Per i pazienti con PV, la riduzione

mediana era da 35 (range 5-50) al basale a 21 (4-36, $P = .06$) alla 24a settimana; per i pazienti con ET era da 33 (19-45) a 13 (7-20, $P = .12$) e per MF da 21 (3-54) a 11 (3-49, $P = .02$) (Figura 12A e B). Riduzioni del punteggio TSS MPN-SAF si sono verificate dopo le prime 4 settimane di trattamento e sono rimaste sostanzialmente stabili dalla settimana 8 alla 24a settimana (Figura 12B).

A



B

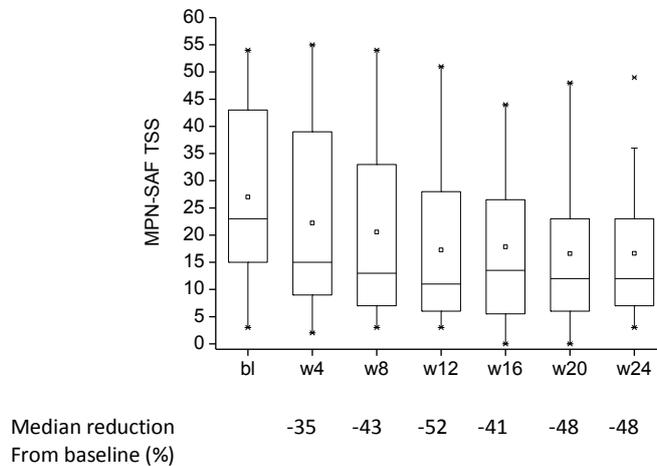


Fig.12 - Valutazione dei sintomi con il questionario MPL-SAF TSS. A. Percentuale di cambiamento dalla linea di base alla settimana 24. B. Il punteggio totale in ogni punto temporale con riduzione mediana rispetto alla linea di base è mostrato in basso.

La risposta clinica per i pazienti con MF è stata valutata secondo i criteri IWG-MRT del 2006. Quattro dei 12 pazienti (33%) hanno ottenuto un miglioramento clinico (CI) e 8 malattie stabili (SD) (67%); secondo i criteri 2013-IWG-MRT c'erano 3 CI (25%, per sintomi e / o risposta alla milza) e 9 SD (75%). La risposta per i pazienti PV e ET è stata valutata in base ai criteri ELN. Dei

9 pazienti ET / PV, 8 (89%) hanno avuto risposta parziale e 1 paziente ET ha avuto una risposta completa.

ENDPOINTS ESPLORATORI

Diciassette pazienti risultavano positivi per la mutazione *JAK2V617F*, con un burden allelico mediano alla base del 43%, range 16-74. Alla settimana 24, il valore era del 40%, range 14-67, con una riduzione dell'11% coerente con altri studi.

Delle 6 citochine i cui livelli plasmatici sono stati valutati dopo 4 settimane di trattamento (IL-8, IL-12, sTNF-RII, hs-CRP, GM-CSF e VEGF) due hanno mostrato riduzioni significative: VEGF da un mediano ($P = 0,02$) e sTNFrII da 12 ng / ml (range 2-76) a 8 ng / mL (range 3 -50) ($P = 0,04$).

Non sono state osservate variazioni statisticamente significative nei livelli plasmatici dei 13 miRNA valutati dopo 4 settimane di trattamento. Il numero assoluto di cellule progenitrici endoteliali circolanti rappresentate da diversi sottotitoli compresi Syto + CD34 + VEGFR-2 +, Syto + CD45-CD34 + CD133 + VEGFR-2 + e Syto + CD45dimCD34 + VEGFR-2 + era significativamente più basso ($P = .0005$, $P = .027$ e $P = .0009$, rispettivamente) alla 24a settimana di trattamento in confronto ai livelli di base. Al contrario, nessuna alterazione significativa è stata riscontrata nella frequenza delle cellule endoteliali circolanti identificate come cellule Syto + CD45-CD31 + CD146 + (Tabella III).

	Screening	Week 24	
	Number cells/ml	Number cells/ml	P value
<i>EPC subsets</i>			
Syto ⁺ CD34 ⁺ VEGFR-2 ⁺	285 (6-20000)	70 (12-6800)	.0005
Syto ⁺ CD34 ⁺ CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺	88 (0-1600)	50 (0-450)	.08
Syto ⁺ CD45-CD34 ⁺ VEGFR-2 ⁺	40 (0-4800)	20 (0-2200)	.07
Syto ⁺ CD45-CD34 ⁺ CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺	10 (0-4000)	2 (0-2200)	.027
Syto ⁺ CD45 ^{dim} CD34 ⁺ VEGFR-2 ⁺	200 (0-12100)	47 (0-2800)	.0009
Syto ⁺ CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺	70 (0-2000)	33 (0-500)	.06
<i>CECs</i>			
Syto ⁺ CD45-CD31 ⁺ CD146 ⁺ (CECs)	845 (1-3530)	370 (1-10000)	.3

Tabella III: Valutazione di cellule progenitrici endoteliali (EPC) e cellule endoteliali circolanti mature (CECs).

FOLLOW-UP ALLA 72a SETTIMANA

Diciotto pazienti erano ancora in trattamento. Oltre ai due pazienti che hanno interrotto alla settimana 24, il terzo ha continuato ruxolitinib in uso commerciale poiché approvato per MF int-2 (1/21, 4,8%). Alla settimana 72, la risposta della milza è stata valutata solo con la palpazione; dei 13 pazienti che avevano ottenuto una riduzione della lunghezza della milza \geq 50% alla 24a settimana, otto (61,5%) hanno mantenuto la risposta sulla milza. Un paziente (4,8%) ha ottenuto la risposta sulla milza dopo la 24a settimana (alla 48a settimana) e 7/21 (33,3%) non hanno mai raggiunto una risposta. La riduzione media alla settimana 72 era - 50,5% (range 0-100). Nessuno dei quattro pazienti senza varici esofagee al basale ancora in trattamento alla settimana 72 alla valutazione di esofagogastroduodenoscopia aveva evidenze di formazione di varici de-novo. Degli 8 pazienti con varici F1, 6 (75%) rimangono

stabili e 2 (25%) si sono aggravati al grado 2; uno di loro ha eseguito la procedura di legatura. Tutti e 5 i pazienti con F3 al basale sono rimasti stabili alla settimana 72. Complessivamente, l'85% dei pazienti ha mostrato la stabilità del grado di varici rispetto alla baseline.

Il profilo di sicurezza alla 72a settimana è stato paragonabile a quanto dimostrato alla 24a settimana, con un totale di 11 nuovi eventi avversi di grado 1-2, caratterizzati da ascite, crampi muscolari e aumento di peso (tabella supplementare 3), confermando il profilo di sicurezza di ruxolitinib in un follow-up più lungo. Un episodio di sanguinamento gastrointestinale si è verificato in un solo paziente. Dopo l'aggiustamento della dose, richiesto a causa della tossicità ematologica, la media giornaliera alla settimana 72 era 19,1 mg per MF, 16 mg per PV e 28,3 per ET.

La carica allelica di JAK2V617F è stata misurata in 13 pazienti: la mediana era del 41% (range 10-74) con una riduzione rispetto al baseline del 10,3% (range 0-38), simile a quanto riscontrato alla w24.

5.3 – PROGETTAZIONE DELLO STUDIO CLINICO REVEMY

5.3.1 - FASE DI PROGETTAZIONE – IL PROTOCOLLO

Come per il protocollo SVT-RUXO, anche per lo studio clinico REVEMY, durante la fase di progettazione, abbiamo utilizzato lo stesso schema di stesura.

5.3.1.1 - PREMESSE E RAZIONALE DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio clinico di fase Ib-II è quello di valutare la sicurezza della combinazione di INC424 e RAD001 in soggetti con mielofibrosi e di stabilire la dose massima tollerata e la dose raccomandata per la fase II secondo il modello 3+3 di escalation dose.

INC424 è un inibitore preferenziale di JAK1 e JAK2 con selettività rispetto ad altre chinasi. I dati di uno studio di fase I / II in MF (INCB 18424-251) hanno mostrato che il 57% dei pazienti trattati ha ottenuto almeno una riduzione del 50% della milza palpabile al di sotto del margine costale sinistro corrispondente ad una riduzione approssimativa del 35% della dimensione della milza volumetrica, e tollerano dosi fino a 25 mg di BID, con attività visibile a livelli multipli di dose: da 5mg BID a 25mg BID. I risultati mostrano anche la risposta del paziente indipendente dalla mutazione di JAK2, che è coerente con la disregolazione della via di segnalazione di JAK nei pazienti con MF. Entro un mese dall'inizio del trattamento, i livelli di citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita angiogenici sono stati ridotti e i pazienti hanno osservato un miglioramento dei sintomi. Questo miglioramento dei sintomi è stato persino visto all'estremità più bassa dello spettro di dosaggio (10mg BID) quando è stata osservata una riduzione clinicamente significativa della dimensione splenica. I risultati dello studio di fase I / II sono stati confermati da due studi randomizzati di fase III (COMFORT-I e COMFORT-II). L'inibitore di JAK2, ruxolitinib, è una terapia efficace per i pazienti con MF e provoca la riduzione della splenomegalia ed il miglioramento dei sintomi costituzionali associati alla malattia ed è stato quindi approvato negli USA e nell'UE per questi pazienti. RAD001 è un inibitore di mTOR. L'esperienza pre-clinica (“mTOR inhibitors alone and in combination with JAK2 inhibitors effectively inhibit cells of Myeloproliferative Neoplasms”- “Co-targeting the PI3K/mTOR and JAK2 signaling pathways produces synergistic activity against Myeloproliferative Neoplasms”) e clinica (“safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a fase I-II study in patient with myelofibrosis”) nell'utilizzo di questo farmaco, supportano la tesi che l'inibizione della via del PI3K / mTOR nella MF, derivante

dall'attivazione aberrante della via stessa, è stata osservata nei modelli affetti da MF e può contribuire alla patogenesi della malattia.

Infatti, l'attivazione di altre vie a valle, attraverso la PI3K e la chinasi extracellulare regolata dal segnale (ERK), è stata documentata in cellule mutate JAK2V617F che presentano attivazione indipendente dalla citochina di questa via di segnalazione. Pertanto non solo l'inibizione del percorso JAK-STAT può avere un effetto terapeutico benefico ma anche mirare al percorso PI3K / AKT / mTOR. L'esperienza clinica e preclinica precoce supporta l'effetto benefico dell'inibizione del percorso PI3K / mTOR in MF. Gli esperimenti in vitro hanno dimostrato che everolimus è in grado di compromettere la proliferazione delle linee cellulari mutate di JAK2V617F e delle cellule primarie di MF CD34 + e inibire il potenziale clonogenico delle cellule progenitrici ematopoietiche di pazienti MPN e vi è chiaro sinergismo in combinazione con INC424 [Bogani C.]. Uno studio clinico di I / II di everolimus nei pazienti con MF ha mostrato un tasso di risposta complessivo del 60%, con un tasso di risposta maggiore del 27%, tasso di risposta moderato del 23%, tasso di risposta minore del 10% e nessuna risposta nel 40% per criteri EMNET. È interessante notare che il 69% dei pazienti ha avuto una completa risoluzione dei sintomi con l'80% dei pazienti che hanno una completa risoluzione del prurito associato alla loro condizione di MF [Guglielmelli et al].

Basandosi su questa esperienza, i due meccanismi di azione RAD001 e RUXO, possono consentire un maggiore controllo della malattia utilizzando dosi inferiori di ciascuno di questi agenti per evitare tossicità. Non esiste alcuna interazione farmacocinetica prevista tra questi due farmaci e non si prevedono tossicità sinergiche.

5.3.1.2 - OBIETTIVI DELLO STUDIO (OBIETTIVO PRIMARIO ED EVENTUALI OBIETTIVI SECONDARI)

Obiettivo Primario:

- Stabilire la MTD e la dose raccomandata per la Fase II (RPIID) della combinazione di ruxolitinib (INC424) ed everolimus (RAD001) in pazienti con Mielofibrosi.
- Valutare la safety

Obiettivi secondari (solo nella fase di espansione o Fase 2) :

- valutare l'efficacia sulla splenomegalia
- valutare la risposta sui sintomi e sulla overall quality of life.
- cambiamenti nella carica allelica e altri marcatori di malattia

5.3.1.3 - CRITERI DI ELEGGIBILITÀ DEI SOGGETTI (CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE)

CRITERI DI INCLUSIONE

1. I pazienti devono avere diagnosi di PMF, PPV-MF o PET-MF indipendentemente dal loro stato di mutazione.

2. I pazienti con mielofibrosi che necessitano di terapia devono essere classificati almeno come rischio elevato (3 o più fattori prognostici) o livello intermedio-2 (2 o più fattori prognostici), o livello intermedio-1 (1 o più fattori prognostici, , come definito dai sintomi prognostici internazionali (IPSS) proposti dal gruppo di lavoro internazionale (IWG-MRT).

I fattori prognostici, definiti dall'IWG-MRT (Cervantes et al 2009) sono:

- Età > 65 anni

- presenza di sintomi costituzionali (perdita di peso > 10% nell'anno precedente la visita di screening, febbre inspiegabile o sudorazioni eccessive notturne persistenti per più di un mese)

- anemia marcata (Hgb <10g / dL). Un valore di emoglobina <10 g / dL deve essere dimostrato durante lo screening per pazienti non dipendenti dalla trasfusione. I pazienti che ricevono regolarmente trasfusioni di globuli rossi saranno considerati con emoglobina <10 g / dL ai fini della valutazione dei fattori di rischio

- leucocitosi (storia di WBC > 25 x10⁹ / L)

- blasti circolanti ≥ 1%

3. I pazienti devono avere una milza palpabile di almeno 5 cm dal margine costale fino al punto di maggiore sporgenza splenica allo Screening.

4. la conta PLT ≥ 100 x 10⁹ / L non raggiunta con l'aiuto di trasfusioni a Screening o Cycle 1 Day1.

5. Pazienti con ANC > 1,5 x 10⁹ / L allo Screening senza l'uso di G-CSF

6. Pazienti con ECOG di 0, 1 o 2 allo Screening

7. I pazienti devono aver interrotto la chemioterapia convenzionale (idrossiaurea, anagrelide, altri agenti mielosoppressivi o qualsiasi altra terapia sperimentale) nonché fattori di crescita o uso sistemico di corticosteroidi per almeno 7 giorni prima di iniziare il farmaco in studio. In caso di interferone alfa o talidomide, è necessario un intervallo di washout per 28 giorni. La terapia transfusionale di supporto è ad libitum, ma deve essere registrata.

8. I pazienti senza precedenti inibitori JAK e / o inibitori precedenti / PI3K / AKT sono idonei al trattamento combinato.

CRITERI DI ESCLUSIONE

1. Donne in gravidanza o allattamento, dove la gravidanza è definita come lo stato di una femmina dopo la concezione e fino alla conclusione della gestazione, confermata da un test di laboratorio hCG positivo. Donne di età infantile, definite come tutte le donne fisiologicamente in grado di rimanere incinte, a meno che non stiano utilizzando metodi di contraccezione altamente efficaci durante il trattamento e per 4 settimane dopo la dose finale di farmaci da studio.
2. Trattamento precedente con uno dei seguenti: inibitori mTOR / PI3K / AKT o inibitori JAK (inclusi INC424) che hanno determinato tossicità clinicamente significative a discrezione dell'investigatore.
3. Il paziente ha ipersensibilità agli analoghi rapamicinici (sirolimus, temsirolimus) o ad uno qualsiasi degli eccipienti.
4. Pazienti che hanno avuto irradiazione splenica entro 12 mesi prima dello screening.
5. I pazienti con blasti in periferico $\geq 20\%$ a screening
6. Una storia di diatesi sanguinante entro 6 mesi.
7. Il paziente ha una storia di disfunzione cardiaca.
8. I pazienti che ricevono i seguenti trattamenti / farmaci:
 - Medicinali che hanno un rischio noto per prolungare l'intervallo QT o indurre Torsades de Point, e il trattamento non può essere interrotto o commutato a un farmaco diverso prima di iniziare il trattamento dello studio. La terapia con un potente inibitore sistemico o un potente induttore sistemico di CYP3A4 a il tempo di screening e non può essere interrotto o commutato a farmaci alternativi prima di iniziare il trattamento dello studio.
 - qualsiasi uso regolare di farmaci che interferisca con la coagulazione o inibisce la funzione PLT. NOTA: sono consentite dosi basse di aspirina ≤ 100 mg / die e di eparina a basso peso molecolare
9. Pazienti attualmente candidati per il trapianto di cellule staminali al momento delle valutazioni di screening.
10. Paziente con infezione batterica, fungina, parassitaria o virale clinicamente significativa, compresa la storia della pneumonite.
11. Deterioramento significativo della funzionalità polmonare, definita come una delle seguenti: riduzione del 30% nei volumi polmonari previsti e / o riduzione del 30% in DLCO e / o $\leq 88\%$ saturazione di O₂ in resto sull'aria ambiente

12. Pazienti con diabete mellito incontrollato (DM)
13. Pazienti con insufficienza renale o epatica
14. Persistente neuropatia o storia della neuropatia di grado 3/4 di qualsiasi etiologia.
15. Perdita di funzionalità gastrointestinale o che presentano malattie gastrointestinali che possono alterare in modo significativo l'assorbimento di RAD001 (ad esempio, malattia ulcerosa, nausea incontrollata, vomito, diarrea, sindrome da malassorbimento) o pancreatite attiva.
16. Disturbi alla pelle, mucosa o oculare di grado > 2
17. Pazienti con ipertensione non controllata.
18. Paziente con malattia o malignità concorrente entro 3 anni dalla screening, ad eccezione di carcinoma basale o squamoso trattato adeguatamente, cancro della pelle non melanomatoso o cancro cervicale curativamente resecato.
19. Pazienti che non sono in grado di comprendere o non vogliono firmare un modulo di consenso informato
20. Pazienti con qualsiasi condizione concorrente che, a giudizio dello sperimentatore, metterebbe in pericolo la sicurezza del paziente o il rispetto del protocollo.

5.3.1.4 - DESCRIZIONE DELLE MODALITÀ, DEI TEMPI E DELLE DOSI DI SOMMINISTRAZIONE DEI FARMACI IN STUDIO

INC424 e RAD001 saranno somministrati per via orale in dosi crescenti come segue:

- Livello dose (1): INC424 5mg BID, RAD001 2,5mg QD
- Livello dose (2): INC424 10mg BID, RAD001 2,5mg QD
- Livello dose (3): INC424 10mg BID, RAD001 5,0mg QD
- Livello dose (4): INC424 15mg BID, RAD001 5,0mg QD
- Livello dose (5): INC424 15mg BID, RAD001 7,5mg QD
- Livello dose (6): INC424 15mg BID, RAD001 10 mg QD

5.3.1.5 - DISEGNO DELLO STUDIO E DIMENSIONAMENTO DEL CAMPIONE

Lo studio, uno studio di fase Ib-II in aperto, comprende due fasi di studio (Fig.13):

- Una "Fase di escalation" della dose (un singolo braccio con 6 livelli di dose in combinazione dei due farmaci):
 - Ogni coorte sarà composta da un minimo di 3 pazienti valutabili

- Ulteriori 3 pazienti saranno inseriti in caso di una DLT verificatosi durante il primo ciclo di trattamento (con almeno 6 pazienti) in modo da determinare un livello come livello di dose MTD / RPIID.
 - L'escalation del dosaggio continuerà solo in assenza di tossicità limitativa della dose (DLT). A tal fine, ogni coorte inizierà il suo primo ciclo solo quando la coorte che precede ha completato con successo il suo primo ciclo senza segni di DLT. Una DLT può verificarsi in qualsiasi momento durante la fase principale dello studio. DLT critiche (quelli che innescano una valutazione del tasso DLT di End-of-Cycle-1) sono solo quelle che si verificano entro il primo ciclo di trattamento. L'iperlipidemia, iperglicemia e alopecia di qualunque grado non saranno considerati come una DLT.
 - periodo di estensione del trattamento allo stesso livello di dose tollerata per ogni gruppo in pazienti con evidenza di un miglioramento clinicamente significativo.
- Una "fase di estensione": Quando è definita l'MTD / RPIID, verrà effettuata un'espansione della coorte per la valutazione dell'efficacia, al fine di determinare il tasso di efficacia sulla splenomegalia, i cambiamenti nei sintomi della mielofibrosi, il funzionamento e la qualità della vita complessiva per esplorare potenziali biomarcatori predittivi di risposta alla combinazione e cambiamenti nei marcatori molecolari e biologici della malattia alla combinazione.

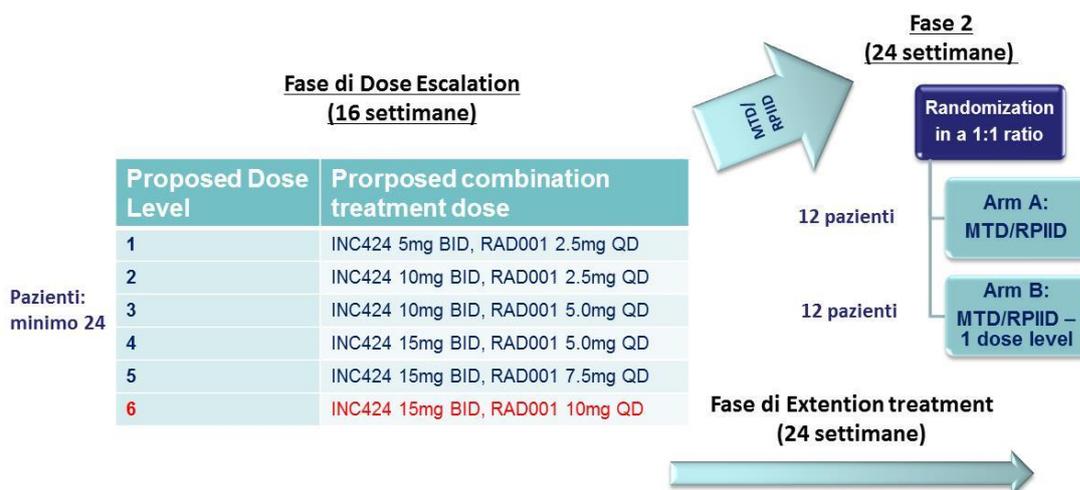


Fig.13 – Disegno dello studio

5.3.1.6 - PROCEDURE DI RACCOLTA E DI ANALISI DEI DATI

L'insieme completo di analisi (FAS) include tutti i pazienti che hanno ricevuto almeno una dose di INC424 o RAD001. I pazienti saranno classificati in base alla combinazione di trattamento prevista. Il FAS verrà utilizzato per tutti gli elenchi di dati grezzi. FAS, se non diversamente specificato, sarà l'insieme di analisi predefinito utilizzato per tutte le analisi. Per il periodo di Escalation Dose, 9 24 pazienti potrebbero essere inseriti, a seconda della DLT nei diversi livelli di dose escalation programmati, secondo la regola escalation tradizionale "3 + 3". Non sono previsti test statistici sull'ipotesi di efficacia per questa parte dello studio. Per il periodo di espansione il numero di pazienti al MTD e / o RPIID sarà ampliato di almeno 13 ma non più di 24 pazienti al fine di valutare ulteriormente la sicurezza e la tollerabilità. Quindi il numero di pazienti trattati con MTD e / o RPIID sarà almeno 24, che assicura che esista almeno una probabilità del 90% di rilevare qualsiasi AE con un tasso di incidenza del 10% tra i pazienti trattati a MTD e / o RPIID . Durante questa fase dello studio verrà ulteriormente definita l'attività biologica di questa combinazione.

5.3.2 - FASE DI ATTIVAZIONE – FATTIBILITA'

La sinossi dello studio è stata valutata dalla casa farmaceutica a cui è stata avanzata la richiesta di fornitura gratuita dei farmaci. Ad inizio luglio 2017 abbiamo ricevuto approvazione e abbiamo quindi preparato tutta la documentazione per la sottomissione alla valutazione del Comitato Etico Locale e ad AIFA, in modo da rispettare le seguenti tempistiche di attivazione dello studio:

Trial Start (First Patient First Visit)	1st October 2016
Recruitment End (Last Patient First Visit)	30 th September 2018
Trial End (Last Patient Last Visit)	1 st April 2019

Il 09 luglio 2016, con l'entrata in vigore della Determina n. 809/2015, l'AIFA ha definito i requisiti minimi necessari per il funzionamento delle strutture sanitarie che eseguono sperimentazioni cliniche dei medicinali di fase I. Secondo tale determina, il rappresentante legale della Unità/struttura che intende compiere sperimentazioni di Fase I, deve autocertificare all'OSSC il possesso dei requisiti richiesti dalla Determina AIFA 809/2015, almeno 90 giorni prima dell'avvio dell'attività del centro, periodo in cui possono verificarsi

visite ispettive da parte dell'Ufficio Attività Ispettive GCP dell'AIFA. L'Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi si è autocertificata per la conduzione degli studi profit e prevede di autocertificarsi anche per gli studi no-profit a breve. Per questo motivo, essendo questo uno studio no-profit, deve attendere l'autocertificazione aziendale prima di poter procedere con la richiesta di valutazione/approvazione da parte del Comitato Etico locale.

6 - CONCLUSIONI

Gli studi clinici nascono dall'esigenza di innovare la terapia e rispondere ai bisogni di salute dell'individuo. Partendo da questo presupposto, è indubbio che una organizzazione ben strutturata, come quella della Clinical Trial Unit, permette di svolgere le attività connesse alla gestione di uno studio clinico, definendo le responsabilità a garanzia di elevati standard di qualità. La costituzione di una CTU dedicata alle Sperimentazioni cliniche, la creazione di SOP e l'esperienza derivante da studi pre-clinici di laboratorio, ha permesso l'attivazione e la progettazione di due studi clinici. La determina AIFA sui requisiti che i centri devono possedere per poter svolgere gli studi di fase I, ha creato un rallentamento nella approvazione dello studio clinico investigator initiated "REVEMY", ma non ha posto ostacoli per lo svolgimento e conseguente pubblicazione dei risultati dello studio clinico "SVT-RUXO", in quanto lo studio era stato valutato ed approvato prima dell'entrata in vigore della determina.

Le informazioni raccolte per la stesura delle SOP, opportunamente integrate ed elaborate potranno in seguito costituire un quadro normativo generale per la conduzione di tutte le attività di Sperimentazione Clinica presso il nostro centro: dalla progettazione alla pianificazione, approvazione, conduzione (regolamentata dalle norme di GCP good clinical practice), fino alla stesura del rapporto finale.

La stesura di SOP interne, ha permesso di semplificare l'organizzazione dando la possibilità al mio gruppo di attivare un numero elevato di studi per offrire maggiori alternative terapeutiche ai pazienti. Abbiamo acquisito la convinzione che se uno studio viene condotto secondo procedure scritte e relative checklist, non solo si opera secondo le linee guida della Buona Pratica Clinica, ma si producono risultati di qualità elevata. Le SOP rappresenteranno quindi un pacchetto base personalizzato che può però anche essere esteso ed applicato altrove.

Un esempio è proprio lo studio SVT RUXO, i cui risultati sono stati pubblicati di recente. Molto spesso le MPNs si associano a trombosi venosa splenica. In questi pazienti, oltre al processo mieloproliferativo, l'ipertensione portale contribuisce alla patogenesi della splenomegalia e infine induce l'ipersplenismo che contribuisce alla citopenia. Nella maggior parte dei pazienti, i valori del sangue sono spesso all'interno o al di sotto del range di normalità, ma la trombosi

stessa pone i pazienti ad un "rischio elevato", per cui è indicata la citoriduzione oltre ad antagonisti della vitamina K e / o agenti antiaggreganti.

Tali caratteristiche rendono i pazienti MPN più fragili se presentano una SVT associata alla malattia mieloproliferativa rispetto a quelli senza SVT, in particolare a causa di un elevato rischio di sanguinamento grave da siti come le varici esofagee. Ruxolitinib ha dimostrato superiorità al placebo (COMFORT-I) e alla migliore terapia disponibile (COMFORT-II) nei pazienti con forme primarie e secondarie di mielofibrosi per quanto riguarda la riduzione del volume della milza ed il miglioramento sintomatico; anche nei pazienti con policitemia vera refrattari o resistenti alla idrossiaurea, il ruxolitinib è risultato superiore alla migliore terapia disponibile in un endpoint combinato di controllo dell'ematocrito e riduzione del volume della milza. Le informazioni relative all'associazione di SVT ad MPN sono scarse. Un singolo case-report descriveva il miglioramento delle varici esofagee secondarie all'ipertensione portale in un paziente con MF che aveva ricevuto ruxolitinib. Al contrario, nessuno dei tre pazienti con MPN e ipertensione portale causa di SVT, trattati con ruxolitinib in un altro studio, hanno mostrato un significativo cambiamento nel grado delle varici esofagee.

La domanda principale che volevamo affrontare con questo studio riguardava l'efficacia e la sicurezza di ruxolitinib, in particolare per quanto riguarda la tossicità ematologica e gli episodi di sanguinamento, in queste situazioni di pazienti con MPN che erano scarsamente rappresentati negli studi controllati precedentemente condotti. I risultati indicano che la riduzione di SV $\geq 35\%$ ad imaging alla 24a settimana di trattamento è stata ottenuta nel 29% dei pazienti, una percentuale di risposta simile al COMFORT-II (32%) alla settimana 24 e COMFORT-II alla 48a settimana (28%). Una comparabile percentuale di riduzione del volume della milza è stata raggiunta dal 35% (38,2%) in 32 settimane in pazienti con PV inseriti nello studio RESPONSE.

Similmente a quanto già riportato negli studi sopra descritti, abbiamo anche osservato che la percentuale di pazienti con riduzione della lunghezza della milza è aumentata progressivamente lungo la durata del trattamento, suggerendo che alcune risposte potrebbero verificarsi dopo 24 settimane. Anche il miglioramento sintomatico osservato nei pazienti con SVT è stato coerente con le esperienze precedenti. Le tossicità ematologiche ed extra-ematologiche erano simili a quelle osservate negli studi controllati, in particolare non abbiamo registrato episodi di sanguinamento, anche se il trattamento con ruxolitinib è stato interrotto ad una soglia di conta piastrinica superiore ($75 \times 10^9 / L$) rispetto a quella utilizzata

negli studi precedenti ($100 \times 10^9/L$). Secondo i criteri di inclusione / esclusione, solo i pazienti con piastrine superiore a $100 \times 10^9/L$ e nessuna storia recente di sanguinamento sono stati ammessi a entrare nel protocollo; quindi una certa selezione dei pazienti potrebbe essere avvenuta in quanto circa il 25% dei pazienti con SVT e MPN sono trombocitopenici.

I risultati di questo studio non sono a favore di un effetto ruxolitinib nel produrre miglioramenti significativi nello stato delle varici esofagee durante il trattamento, ma potrebbe suggerire che il trattamento ha indotto una sostanziale stabilizzazione del grado di varici alla 72a settimana, come osservato nell'85% dei pazienti; inoltre si è verificato solo un episodio di sanguinamento. A questo proposito, un recente studio sulla trombosi della vena portale in pazienti senza cirrosi cronica ha riportato un'incidenza di varici di nuova sviluppo del 2% a 1 anno e del 22% a 3 anni e della probabilità di peggioramento delle varici esofagee esistenti del 13% e del 40% a 1 e 3 anni, rispettivamente. Lo stesso studio ha riportato una probabilità di sanguinamento nei pazienti con varici esofagee di grandi dimensioni del 9% e del 20% a 1 e 3 anni. È chiaro che è necessario un follow-up più lungo e un maggior numero di pazienti prima di valutare l'impatto di ruxolitinib sulle varici. Altri parametri che riflettono lo stato funzionale dell'ipertensione portale, come gli indici resistivi delle arterie intraparenchimali della milza e del fegato, sono rimasti invariati durante il trattamento; tuttavia, mentre queste misure sono state ampiamente studiate in pazienti con ipertensione portale a causa di cirrosi, la mancanza di dati nei pazienti con un ipertensione portale pre-epatica come quelli con SVT-MPN rende incerta l'interpretazione dei risultati. Abbiamo osservato inoltre che i pazienti con SVT e MPN inseriti in questo studio hanno presentato valori normali di rigidità epatica, diversa dall'ipertensione portale associata alla cirrosi.

Al contrario, la rigidità della milza è risultata notevolmente aumentata in tutti i pazienti SVT-MPN; tuttavia, in tutti i 4 pazienti in cui tale misurazione è risultata fattibile, è stata documentata una marcata riduzione della rigidità della milza, suggerendo che la riduzione del volume della milza indotta da ruxolitinib potrebbe essere in parte associata a cambiamenti nel parenchima della milza. Questa ipotesi è supportata ulteriormente dai cambiamenti osservati nella imaging di diffusione RM (DWI) della milza. A questo proposito, abbiamo rilevato che ADC, un parametro che stimola il movimento medio molecolare dell'acqua in un tessuto, è risultato essere significativamente ridotto da ruxolitinib a 24 settimane, suggerendo un restringimento del tessuto interstiziale piuttosto che una riduzione di componenti cellulari del parenchima splenico. Il coinvolgimento del comparto vascolare nella risposta meccanica del

volume della milza indotta da ruxolitinib è ulteriormente supportato dalla riduzione osservata delle EPC circolanti e dei livelli plasmatici di VEGF.

Abbiamo anche descritto il verificarsi di una significativa riduzione della frequenza cardiaca durante la terapia di ruxolitinib associata ai cambiamenti nella gittata cardiaca. Si ipotizza che l'abbassamento della frequenza cardiaca possa essere correlato alla riduzione del volume della milza e ad alcune citochine pro-infiammatorie, come ad esempio sTNF α . Inoltre, la riduzione dell'out-cardiaco, combinata con una superficie di superficie aumentata a causa di un aumento di peso, ha determinato una significativa diminuzione dell'indice cardiaco. Nel complesso, tali cambiamenti nella circolazione sistemica potrebbero essere potenzialmente di beneficio in almeno alcuni pazienti SVT-MPN con anormale funzione cardiovascolare a causa dell'evento trombotico sottostante.

In conclusione, i risultati di questo studio di fase II hanno dimostrato che ruxolitinib è sicuro in pazienti con SVT associata ad MPN ed è efficace nel ridurre la dimensione della milza ed i sintomi correlati alla malattia.

7 - BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

7.1 - BIBLIOGRAFIA

1. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA: a cancer journal for clinicians* 2009;59:171-191.
2. Sekhar M, McVinnie K, Burroughs AK. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *British journal of haematology* 2013;162:730-747.
3. De Stefano V, Qi X, Betti S, et al. Splanchnic vein thrombosis and myeloproliferative neoplasms: molecular-driven diagnosis and long-term treatment. *Thrombosis and haemostasis* 2015;115.
4. Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, et al. Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* 2012;120:4921-4928.
5. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, et al. Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* 2006;44:1528-1534.
6. De Stefano V, Martinelli I. Splanchnic vein thrombosis: clinical presentation, risk factors and treatment. *Internal and emergency medicine* 2010;5:487-494.
7. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FW, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* 2008;111:4922-4929.
8. Donadini MP, Dentali F, Ageno W. Splanchnic vein thrombosis: new risk factors and management. *Thrombosis research* 2012;129 Suppl 1:S93-96.
9. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med* 2015;372:426-435.
10. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366:787-798.
11. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2012;366:799-807.
12. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, et al. Long-Term Results from a Phase II Open-Label Study of Ruxolitinib in Patients with Essential Thrombocythemia Refractory to or Intolerant of Hydroxyurea. *Blood* 2014;124:1847-1847.

13. 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.
14. Cervantes F PF, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008;22:905-914.
15. Barosi G BG, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Kiladjian JJ, Lengfelder E, McMullin MF, Passamonti F, Reilly JT, Vannucchi AM, Barbui T. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet (ELN) consensus conference. *Blood* 2009;113:4829-4833.
16. Tefferi A BG, Mesa RA, Cervantes F, Deeg HJ, Reilly JT, Verstovsek S, Dupriez B, Silver RT, Odenike O, Cortes J, Wadleigh M, Solberg LA Jr, Camoriano JK, Gisslinger H, Noel P, Thiele J, Vardiman JW, Hoffman R, Cross NC, Gilliland DG, Kantarjian H; IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). 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.
17. Tefferi A, Cervantes F, Mesa R, et al. Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. *Blood* 2013;122:1395-1398.
18. Colecchia A, Montrone L, Scaiola E, et al. Measurement of spleen stiffness to evaluate portal hypertension and the presence of esophageal varices in patients with HCV-related cirrhosis. *Gastroenterology* 2012;143:646-654.
19. Pinzani M, Vizzutti F, Arena U, et al. Technology Insight: noninvasive assessment of liver fibrosis by biochemical scores and elastography. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology* 2008;5:95-106.
20. Iurlo A, Cattaneo D, Giunta M, et al. Transient elastography spleen stiffness measurements in primary myelofibrosis patients: a pilot study in a single centre. *British journal of haematology* 2015;170:890-892.
21. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood* 2011;118:401-408.

22. Deininger M, Radich J, Burn TC, et al. The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. *Blood* 2015;126:1551-1554.
23. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, et al. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 Inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer* 2014;120:513-520.
24. Vannucchi AM, Passamonti F, Al-Ali HK, et al. Reductions in JAK2 V617F Allele Burden with Ruxolitinib Treatment in Comfort-II, a Phase 3 Study Comparing the Safety and Efficacy of Ruxolitinib with Best Available Therapy (BAT). *Blood* 2012;120:802-802.
25. Pieri L, Pancrazzi A, Pacilli A, et al. JAK2V617F complete molecular remission in polycythemia vera/essential thrombocythemia patients treated with ruxolitinib. *Blood* 2015;125:3352-3353.
26. Colagrande S, Carbone SF, Carusi LM, et al. Magnetic resonance diffusion-weighted imaging: extraneurological applications. *La Radiologia medica* 2006;111:392-419.
27. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia* 2016;30:1701-1707.
28. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:761-770.
29. Koschmieder S, Koppelle A, Seifert H. Ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366:2031-2032; author reply 2032-2034.
30. Yan M, Geyer H, Mesa R, et al. Clinical features of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms complicated by portal hypertension. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 2015;15:e1-5.
31. Noronha Ferreira C, Seijo S, Plessier A, et al. Natural history and management of esophagogastric varices in chronic noncirrhotic, nontumoral portal vein thrombosis. *Hepatology* 2016;63:1640-1650.
32. Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, et al. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* 2007;45:1290-1297.

33. Swerdlow SH, Campo, E, Harris, NL, Jaffe, ES, Pileri, SA, Stein, H, Thiele, J, Vardiman, JW., editor. WHO classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
34. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working group for myelofibrosis research and treatment. *Leukemia* 2008;22:437-438.
35. Baik SK. Haemodynamic evaluation by Doppler ultrasonography in patients with portal hypertension: a review. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2010;30:1403-1413.
36. Takuma Y, Nouse K, Morimoto Y, et al. Prediction of oesophageal variceal bleeding by measuring spleen stiffness in patients with liver cirrhosis. *Gut* 2016;65:354-355.
37. Takuma Y, Nouse K, Morimoto Y, et al. Portal Hypertension in Patients with Liver Cirrhosis: Diagnostic Accuracy of Spleen Stiffness. *Radiology* 2015:150690.
38. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006;108:1865-1867.
39. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, et al. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 Inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer* 2014;120:513-520.
40. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:761-770.
41. Pourcelot E, Trocme C, Mondet J, et al. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: Clinical implications. *Experimental hematology* 2014;42:360-368.
42. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:1356-1363.

43. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:6735-6741.
44. Vaidya R, Gangat N, Jimma T, et al. Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *American journal of hematology* 2012;87:1003-1005.
45. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, et al. Elevated C-reactive protein is associated with shortened leukemia-free survival in patients with myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27:2084-2086.
46. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circulation research* 2012;110:624-637.
47. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:5688-5695.
48. Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PloS one* 2010;5:e13790.
49. Bertolini F, Mancuso P, Benayoun L, et al. Evaluation of circulating endothelial precursor cells in cancer patients. *Methods in molecular biology* 2012;904:165-172.
50. Bogani C., Bartalucci N, et al. "mTOR inhibitors alone and in combination with JAK2 inhibitors effectively inhibit cells of Myeloproliferative Neoplasms" - *PLoS One*. 2013;8(1):e54826. doi: 10.1371/journal.pone.0054826. Epub 2013 Jan 31.
51. Bartalucci N., Tozzi L., et al. "Co-targeting the PI3K/mTOR and JAK2 signaling pathways produces synergistic activity against Myeloproliferative Neoplasms" - *J Cell Mol Med*. 2013 Nov;17(11):1385-96. doi: 10.1111/jcmm.12162. Epub 2013 Nov 17.
52. Guglielmelli P., Barosi G. et al. "safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a fase I-II study in patient with myelofibrosis" - *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2069-76. doi: 10.1182/blood-2011-01-330563. Epub 2011 Jul 1.
53. Li G, Wang Z, Miskimen KL, Xie XY, Tse W (2009) Genetic and pharmacologic targeting of STAT5/Gab2/PI3K/mTOR signaling in a mouse myeloproliferative disease model. *Blood* 114: 3902A.
54. Tefferi A (2012) JAK inhibitors for myeloproliferative neoplasms: clarifying facts from myths. *Blood* 119: 2721–2730.

55. Pardanani A, Gotlib J, Jamieson C, Cortes J, Talpaz M, et al. (2008) A phase I study of TG101348, an orally bioavailable JAK-selective inhibitor, in patients with myelofibrosis. *Blood* 112: 97.
56. Guglielmelli P, Barosi G, Rambaldi A, Marchioli R, Masciulli A, et al. (2011) Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood* 118: 2069–2076.
57. Vannucchi AM, Pancrazzi A, Guglielmelli P, Di Lollo S, Bogani C, et al. (2005) Abnormalities of GATA-1 in megakaryocytes from patients with idiopathic myelofibrosis. *Am J Pathol* 167: 849–858.
58. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779–1790.
59. Shide K, Shimoda HK, Kumano T, Karube K, Kameda T, et al. (2008) Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2V617F. *Leukemia* 22: 87–95.
60. Bumm TG, Elsea C, Corbin AS, Loriaux M, Sherbenou D, et al. (2006) Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res* 66: 11156–11165.
61. Tefferi A, Vainchenker W (2011) Myeloproliferative Neoplasms: Molecular Pathophysiology, Essential Clinical Understanding, and Treatment Strategies. *J Clin Oncol* 29: 573–582.
62. Liu PC, Caulder E, Li J, Waeltz P, Margulis A, et al. (2009) Combined inhibition of Janus kinase 1/2 for the treatment of JAK2V617F-driven neoplasms: selective effects on mutant cells and improvements in measures of disease severity. *Clin Cancer Res* 15: 6891–6900.
63. Quintas-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshour T, Li J, et al. (2010) Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 115: 3109–3117.
64. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, et al. (2010) Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med* 363: 1117–1127.
65. Pardanani A, Gotlib JR, Jamieson C, Cortes JE, Talpaz M, et al. (2011) Safety and Efficacy of TG101348, a Selective JAK2 Inhibitor, in Myelofibrosis. *J Clin Oncol* 29: 789–796.
66. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, Barosi G, Rosen PJ, et al. (2010) Durable Responses with the JAK1/JAK2 Inhibitor, INCB018424, In Patients with Polycythemia Vera

- (PV) and Essential Thrombocythemia (ET) Refractory or Intolerant to Hydroxyurea (HU).
ASH Annual Meeting Abstracts 116: 313-.
67. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, et al. (2012) A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine* 366: 799–807.
 68. Pardanani A, Guglielmelli P, Lasho TL, Pancrazzi A, Finke CM, et al. (2011) Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients. *Leukemia* 25: 1834–1839.
 69. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A (2009) Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *AC- A Cancer Journal for Clinicians* 59: 171–191.
 70. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA (2011) New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 118: 1723–1735.
 71. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG (2007) Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 7: 673–683.

7.2 - SITOGRAFIA

1. <http://www.aifa.gov.it/content/come-nasce-un-farmaco>
2. <http://www.aifa.gov.it/content/sperimentazione-e-ricerca>
3. <http://www.aifa.gov.it/content/ispezioni>
4. <https://flore.unifi.it/retrieve/handle/2158/599006/18057/tesi%20Paola%20Guglielmelli.pdf>
5. <http://www.ematologia-pavia.it/it/Patologie/Neoplasie-Mieloproliferative/>
6. http://www.aifa.gov.it/sites/default/files/GU158_1072015_Determina_Requisiti_centri_Fase1.pdf
7. <http://www.aifa.gov.it/content/sperimentazioni-cliniche-di-fase-i-determina-aifa-inerente-l%E2%80%99autocertificazione-dei-requisiti>
8. <https://www.nbt.nhs.uk/research-innovation/running-your-study/site-initiation-visit-siv>
9. http://www.agenziafarmaco.gov.it/sites/default/files/tipo_filedf1a.pdf