

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA



Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica
Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea specialistica in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA

***LA MIELOFIBROSI NELL'ERA DEGLI INIBITORI
DI JAK2: EFFICACIA ED ASPETTI MOLECOLARI
DELLA TERAPIA CON RUXOLITINIB.***

Relatori

Chiar.mo Professor Mario Petrini

Professoressa Sara Galimberti

Candidato

Sara Barsotti

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

CAPITOLO 1: Introduzione	pag 7
1.1 - Le neoplasie mieloproliferative croniche.....	pag 7
• Biologia moleolare nelle neoplasie mieloproliferative croniche.....	pag 9
• Principali parametri clinico-patologici delle neoplasie mieloproliferative croniche.....	pag 12
1.2 – La mielofibrosi.....	pag 16
• Epidemiologia.....	pag 17
• Patogenesi.....	pag 17
• Le basi molecolari della mielofibrosi.....	pag 19
• Le forme familiari.....	pag 25
• Quadro clinico.....	pag 25
• Caratteristiche di laboratorio.....	pag 27
• Anomalie cromosomiche associate alla mielofibrosi.....	pag 30
• Scoperte in letteratura sulla mielofibrosi.....	pag 30
• Sospetto di malattia.....	pag 33
• Diagnosi.....	pag 34
• Mielofibrosi secondaria.....	pag 36
• La fibrosi midollare.....	pag 38
• Stadi clinici della mielofibrosi.....	pag 40
• Diagnosi differenziale.....	pag 41
• Prognosi ed indici prognostici.....	pag 43
• Evoluzioni e complicanze.....	pag 45
• Terapia.....	pag 47
CAPITOLO 2: obiettivi della tesi	pag 58
CAPITOLO 3: gli studi COMFORT ed i miRNA	pag 59
3.1 – Gli studi COMFORT.....	pag 59

• Lo studio COMFORT-I.....	pag 59
• Lo studio COMFORT-II.....	pag 61
• Risultati studi COMFORT-I e –II.....	pag 63
○ Efficacia.....	pag 64
○ Sicurezza.....	pag 66
3.2 – I miRNA.....	pag 68
CAPITOLO 4: materiali e metodi.....	pag 72
4.1 – Il protocollo JUMP.....	pag 72
4.2 – I pazienti.....	pag 79
4.3 – I campioni biologici.....	pag 80
4.4 – Citogenetica standard.....	pag 81
4.5 – Estrazione dell’RNA.....	pag 81
4.6 – Analisi di espressione dei microRNA.....	pag 81
4.7 – Analisi statistica.....	pag 82
CAPITOLO 5: risultati.....	pag 83
5.1 – Risultati obiettivo 1.....	pag 83
5.2 – Risultati obiettivo 2.....	pag 103
CAPITOLO 6: discussione.....	pag 107
6.1 – Discussione obiettivo 1.....	pag 107
6.2 - Discussione obiettivo 2.....	pag 115
CAPITOLO 7: conclusioni.....	pag 118
BIBLIOGRAFIA.....	pag 124

Riassunto analitico

La mielofibrosi è una neoplasia mieloproliferativa cronica caratterizzata da variabile fibrosi midollare, presenza nel sangue periferico di elementi immaturi della linea granulocitaria ed eritroblastica, evidente anisopoichilocitosi ed emopoiesi extra-midollare, con associata epatosplenomegalia. Esistono forme di mielofibrosi primitiva (MFI) e mielofibrosi secondaria ad altre neoplasie mieloproliferative croniche, quali la policitemia vera (MF-post-PV) e la trombocitemia essenziale (MF post-TE). Recentemente è stato identificato giocare un ruolo importante nella patogenesi della MF il gene JAK2, la cui mutazione in posizione V617F ne provoca una costante iperattivazione. A seguito di tale scoperta, è stato messo a punto Ruxolitinib, farmaco capace di inibire JAK1 e 2, attualmente in indicazione negli U.S.A. ed in Europa per il trattamento della mielofibrosi. I nostri obiettivi sono stati: 1) confronto dei dati sulla sicurezza e tossicità del farmaco ruxolitinib (INC424) somministrato all'interno dello studio in aperto, multicentrico, di accesso allargato CINC424A2401 a pazienti con mielofibrosi primaria e secondaria seguiti presso la UO Ematologia di Pisa, con i risultati degli studi COMFORT I e COMFORT II (i trials che hanno portato all'approvazione di ruxolitinib); 2) studio dei profili di espressione dei miRNA negli stessi pazienti di cui sopra con l'intento di investigarne la funzione in relazione ai geni targets. Dai dati raccolti è emerso che i risultati ottenuti dai 14 pazienti in trattamento con Ruxolitinib, seguiti presso UO Ematologia di Pisa, sono per la maggior parte sovrapponibili a quelli degli studi COMFORT. In particolar modo possiamo affermare che la diminuzione della splenomegalia, così come dei sintomi sistemici, è stata, in media, del 32,3% vs il 35% dei risultati degli studi COMFORT. Per quanto riguarda lo studio dei profili di espressione dei miRNA, effettuato su 4 dei 14 pazienti in trattamento con Ruxolitinib, è emerso che 9 miRNA risultano significativamente deregolati nella mielofibrosi, attribuendo ad essi un possibile ruolo di biomarkers all'interno della terapia farmacologica con anti-JAK2.

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 - Le neoplasie mieloproliferative croniche

Con il termine “neoplasie mieloproliferative croniche” viene identificato un gruppo di patologie che originano dalla trasformazione neoplastica della cellula staminale pluripotente. Queste patologie sono caratterizzate dalla proliferazione clonale ed incontrollata di uno o più progenitori emopoietici nel midollo osseo ed, in molti casi, anche in sedi extra-midollari, in particolar modo nella milza e nel fegato.

Nel 1951 William Dameshek fu il primo ad identificare questo gruppo di malattie definendole inizialmente “disordini mieloproliferativi”, poiché aveva intuito la correlazione con l’alterazione della maturazione della cellula staminale emopoietica lungo la linea mieloide, ma non era ancora arrivato a dimostrare la natura clonale del fenotipo neoplastico. Dameshek con suoi studi riuscì a dimostrare che esistevano elementi caratteristici comuni in tutte queste malattie:

1. proliferazione di una o più linee midollari;
2. maturazione sostanzialmente efficace;
3. epato-splenomegalia molto frequente;
4. frequente evoluzione in fibrosi midollare;
5. possibile evoluzione in leucemia acuta.

Nel corso degli anni è stata poi scoperta la clonalità alla base della patogenesi, che ha portato all’utilizzo del termine “neoplasie” per indicare queste patologie. Negli anni, la classificazione patogenetica è stata arricchita con le caratteristiche cliniche ed istologiche che conosciamo oggi, permettendo così la corretta redistribuzione delle patologie inizialmente incluse in questo gruppo.

Studi recenti effettuati su queste malattie hanno dimostrato l’importanza di alterazioni di geni codificanti tirosin-kinasi e geni appartenenti alla famiglia delle “Janus Protein TK” (*JAK*) nella patogenesi e progressione di queste malattie.

Classificazione delle malattie mieloproliferative croniche

Secondo la classificazione, formulata dal WHO (*World Health Organization*) nel 2001 e poi rivista nel 2008, sulla base di caratteristiche genetiche, morfologiche e cliniche, si distinguono 8 tipi principali di malattie mieloproliferative croniche.

Malattie mieloproliferative croniche - WHO (2008)
1. Leucemia mieloide cronica <i>BCR/ABL</i> + (LMC)
2. Policitemia vera (PV)
3. Trombocitemia essenziale (TE)
4. Mielofibrosi primaria (MFI)
5. Leucemia eosinofila cronica non altrimenti specificata
6. Leucemia cronica a neutrofili
7. Malattia mieloproliferativa cronica non classificabile
8. Mastocitosi

Tabella 1 – La classificazione delle malattie mieloproliferative croniche, WHO 2008.

Inoltre, queste neoplasie possono essere ulteriormente distinte, in base all'esistenza o meno della presenza della traslocazione t(9;22), nota come cromosoma Philadelphia, in:

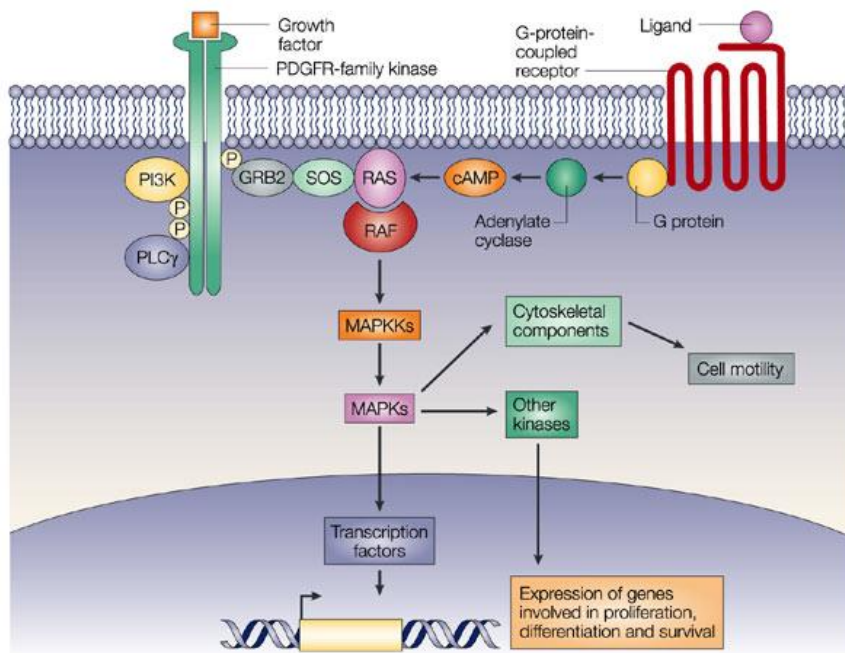
- Neoplasie cromosoma Philadelphia + (Leucemia mieloide cronica - LMC)
- Neoplasie cromosoma Philadelphia – (Trombocitemia essenziale - TE, Policitemia vera - PV, Mielofibrosi - MF)

Soltanto la Leucemia Mieloide Cronica è associata ad un'alterazione del cariotipo, definita Cromosoma Philadelphia. Il cromosoma Philadelphia non è altro che il cromosoma 22 modificato per l'inserzione di un frammento terminale proveniente dal cromosoma 9. In questo modo, a seguito di una traslocazione, il gene *Abelson (ABL)* passa dal cromosoma 9 alla regione di raggruppamento dei punti di rottura (*BCR-breakpoint cluster region*) del cromosoma 22, con la formazione di un gene chimera *BCR/ABL*. Nella proteina di fusione risultante, parte del prodotto del protooncogene *ABL* (c-*ABL*) è fuso alla porzione amino-terminale del gene *BCR*, dando origine ad una chinasi iperattiva stimolante la proliferazione leucemica dei mieloblasti. Tale difetto si riscontra nel 90-95% delle leucemie mieloidi croniche, che sono per questo motivo denominate anche neoplasie cromosoma Philadelphia positive.

Biologia molecolare delle neoplasie mieloproliferative croniche

La normale emopoiesi in queste malattie è assicurata dalla regolare differenziazione dei precursori prodotti a partire dalla cellula staminale. Alle fasi iniziali di proliferazione, che assicurano l'amplificazione numerica, fanno seguito tappe di differenziamento che permettono la produzione di cellule funzionanti e mature. Queste fasi sono rese possibili grazie all'esistenza di fattori di crescita solubili, come l'eritropoietina, la trombopoietina ed il *G-CSF*, che esercitano la loro azione mediante il legame con specifici recettori di membrana. La trasmissione dei segnali di proliferazione e differenziazione è resa possibile da due principali famiglie di recettori che danno luogo all'attivazione di *Tirosin-Kinasi (TK)*, cioè enzimi che agiscono fosforilando residui di tirosina.

La prima famiglia è rappresentata dalle proteine-recettori delle tirosin-kinasi (*RPTK* – “*receptor protein tyrosine kinases*”), che sono recettori transmembrana contenenti un *domain* catalitico intra-citoplasmatico. Il legame ligando-recettore porta alla dimerizzazione del recettore, al ri-orientamento del *domain* catalitico ed all'attivazione del sito di legame per le molecole coinvolte nella trasduzione del segnale. Esempi di questa famiglia sono: il *PDGF-r* (recettore per il *PDGF*, *platelet-derived growth factor*), il *VEGF-r* (recettore per il *VEGF*, *vascular endothelial growth factor*), l'*FGF-r* (recettore dell'*FGF*, *fibroblast growth factor*).



Nature Reviews | Cancer

Figura 1 – Esempio di “receptor protein tyrosine kinases”: PDGF-r

La seconda famiglia è costituita dai recettori dei fattori di crescita emopoietici, membri della super famiglia dei recettori delle citochine, che non hanno un *domain* catalitico intra-citoplasmatico, ma funzionano legando ed attivando una tirosin-kinasi citoplasmatica specifica, chiamata *Janus Protein Tyrosin Kinase* (*JAK*). Questi recettori, quando non sono stimolati, formano un dimero che lega una proteina *JAK* inattiva; invece, dopo il legame ligando-recettore, il recettore stesso subisce una modifica strutturale della porzione intra-citoplasmatica, che induce la trans-fosforilazione di *JAK*. La molecola di *JAK* attivata, a sua volta, lega una proteina chiamata *STAT* (*signal transducers and activators of transcription*) provocandone l’attivazione mediante una reazione di fosforilazione. Le proteine *STAT* attivate formano un dimero che raggiunge il nucleo e regola direttamente la trascrizione di geni target. Sono esempi di questa classe di TK i recettori dell’eritropoietina e dell’*IL3*.

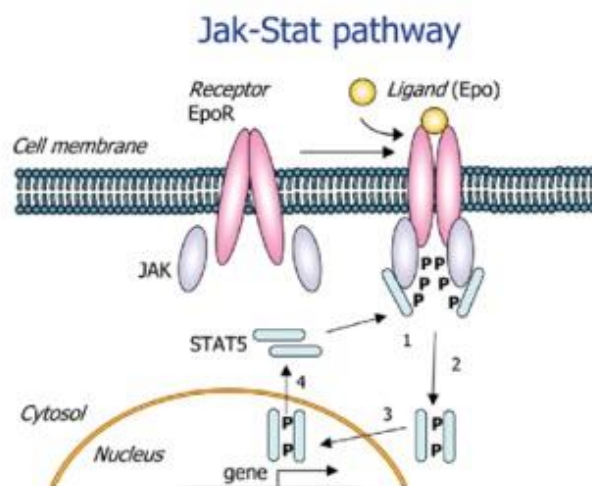


Figura 2 – Jak-STAT pathway.

Mutazioni a carico delle *RPTK* (“receptor protein tyrosine kinases”) sono state riscontrate nella leucemia mieloide cronica atipica (inserita nel gruppo delle malattie mieloproliferative/mielodisplastiche) e nelle patologie caratterizzate da ipereosinofilia. Tali mutazioni rendono le tirosin-kinasi insensibili ai meccanismi di regolazione e danno luogo a molecole con attività tirosin-kinasica costituzionalmente attive.

Le malattie mieloproliferative croniche come la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (TE) e la mielofibrosi primaria (MFI) sono, invece, caratterizzate da mutazioni riguardanti le tirosin-kinasi della famiglia *JAK*. Nel 2005 è stata scoperta la mutazione *JAK2 V617F* (9p24), nella quale una valina è sostituita da una fenilalanina in posizione 617. Tale mutazione porta alla produzione di una tirosin kinasi insensibile ai meccanismi di regolazione, dotata di un’attività particolarmente prolungata, con conseguente stimolazione proliferativa dei cloni cellulari coinvolti. Una delle funzioni più importanti di *JAK2* è quella di regolare l’eritropoiesi normale, sia in termini quantitativi che qualitativi.

Mutazioni *JAK2 V617F* si ritrovano nel 90% delle policitemie vere ed in circa il 50% delle trombocitemie essenziali e delle mielofibrosi primarie. Non è, ad oggi, ancora chiaro come uno stesso tipo di mutazione possa causare patologie di tipo diverso e quale ruolo possa avere la presenza o l’assenza di una mutazione nell’ambito di ciascuna di queste patologie mieloproliferative.

In alcuni casi, inoltre, è possibile osservare mutazioni a carico del gene codificante per il recettore della trombopoietina, detto *MPL*; per esempio la mutazione *MPLW515L* è stata ritrovata nel 10% delle mielofibrosi risultate negative per la mutazione *JAK2V617F*.

Principali parametri clinico-patologici delle malattie mieloproliferative croniche

Queste malattie hanno aspetti clinico-morfologici simili fra loro, con sovrapposizione di molti parametri sia all'esordio che durante l'evoluzione delle malattia.

Di solito vengono presi in considerazione parametri, quali:

- esame emocromo-citometrico;
- caratteristiche morfologiche del sangue periferico;
- aspetti morfologici delle sezioni biottiche midollari e mieloaspirato;
- reperti morfologici di milza e fegato;
- reperti di citogenetica;
- aspetti molecolari.

Esame emocromo-citometrico – Alla diagnosi possono essere riscontrate caratteristiche diverse che possono indirizzare verso una delle malattie mieloproliferative:

- *Eritrocitosi ed incremento dei livelli di ematocrito (Htc)* sono caratteristici della policitemia vera, ma possono essere riscontrati anche nella mielofibrosi primaria alla diagnosi o quando la malattia si presenta nella fase cellulata. Lieve incremento dell'ematocrito può essere riscontrato anche nella trombocitemia essenziale.
- *Anemia* di grado variabile, in genere di tipo normocitico, si osserva solitamente nella MF in fase più avanzata, nelle fasi molto avanzate di PV (fase spenta), in alcuni casi di leucemia mieloide cronica (LMC) diagnosticata in tempi non precoci e nella leucemia cronica a neutrofili.

- *Leucocitosi*: è un reperto frequente, ma con caratteristiche diverse e talora molto suggestive per ciascun tipo specifico.
- La *Neutrofilia* si osserva nella LMC, nella leucemia cronica a neutrofilia ed in minor misura nella PV e nelle TE. E' presente anche nella MF, ma solo in fase cellulare.
- *Elementi mieloidi immaturi*, spesso associati alla neutrofilia, sono presenti nelle varie fasi di maturazione. Nella LMC è caratteristica la presenza di mielociti e metamielociti, mentre nella MF sono presenti in varia percentuale anche mieloblasti. Nelle altre forme gli elementi mieloidi immaturi sono in genere occasionali.
- L'*eosinofilia*, lieve o moderata, può caratterizzare la LMC e la PV.
- La *basofilia* è, invece, un reperto più tipico della LMC.
- La *piastrinopenia* caratterizza in primo luogo la TE e la fase iniziale della MF, ma incrementi variabili delle piastrine possono essere rilevanti anche in una discreta frazione di casi di PV ed LMC.
- I *reperti morfologici degli eritrociti* sono un importante elemento diagnostico, perché variabile anisopoichilocitosi con presenza di dacriociti caratterizza la MF e le fasi avanzate di PV, definibili come fase spenta.
- Possono essere individuati *eritroblasti circolanti*, soprattutto nella MF, mentre sono meno significativi nella LMC.

Sezioni biottiche midollari e mieloaspirato

Le sezioni biottiche midollari ed il mieloaspirato rappresentano un elemento essenziale per la diagnosi. I principali aspetti morfologici sono:

- ✓ tipo di linea iperplastica ed entità dell'iperplasia;
- ✓ morfologia degli elementi iperplastici;

✓ grado di fibrosi.

Sono parametri soggettivi, ma servono per guidare l'istologo nella diagnosi morfologica. Sono state proposte linee guida internazionali utili nella definizione dei parametri morfologici, al fine di migliorare l'attendibilità dell'osservazione istologica nella diagnosi differenziale della varie forme.

Gli aspetti morfologici del *mieloaspirato* sono utili soprattutto nella valutazione della maturazione della linea mieloide, nel conteggio dei blasti, dei promielociti, degli eosinofili e dei basofili.

La *splenomegalia* è caratteristica di queste patologie, sia all'esordio che nelle fasi terminali. Le forme più marcate si riscontrano nelle mielofibrosi, sia all'esordio che durante l'evoluzione della malattia, ma splenomegalie di grado lievi-moderato possono essere osservati anche nelle altre malattie mieloproliferative croniche.

L'*epatomegalia* è meno frequente e solitamente è tipica delle forme più avanzate.

Le indagini citogenetiche, sia mediante cariotipo convenzionale che mediante *FISH* con sonde per anomalie specifiche, sono essenziali nell'iter diagnostico. Nella LMC la t(9;22) è caratteristica della malattia. Nelle altre forme non sono presenti anomalie patognomoniche, ma alcune mostrano una discreta frequenza, come la delezione 20q.

Le tecniche di biologia molecolare mediante *PCR* sono altrettanto necessarie. L'esistenza del gene di fusione *BCR/ABL* è caratteristico della LMC.

Grazie a studi recenti oggi si conoscono numerose molecole coinvolte nella patogenesi di queste malattie, ma non ci sono ancora linee guida che dimostrino l'utilità di queste molecole nella diagnosi o come target nel trattamento delle malattie mieloproliferative croniche.

Le molecole identificate sono:

- *JAK2* (9p24, janus kinase 2) > 95%;
- *TET2* (4q24, ten-eleven translocation 2) < 20%;
- *ASXL1* (20q11.21, additional sex combs-like protein 1) < 10%;

- *MPL* (1p34, Myeloproliferative Leukemia Virus Oncogene) < 10%;
- *DNMT3A* (2p23, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A) < 10%;
- *IDH1 e 2* (*IDH1*- 2q33.3; *IDH2*-15q26.1, isocitrate dehydrogenase 1 and 2) < 5%
- *EZH2* (7q36.1, enhancer of zeste homolog 2) < 5%;
- *CBL* (11q23, *Cbl* proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase) < 3%
- *IKZF1* (7p12.2, IKAROS family zinc finger 1) < 1%

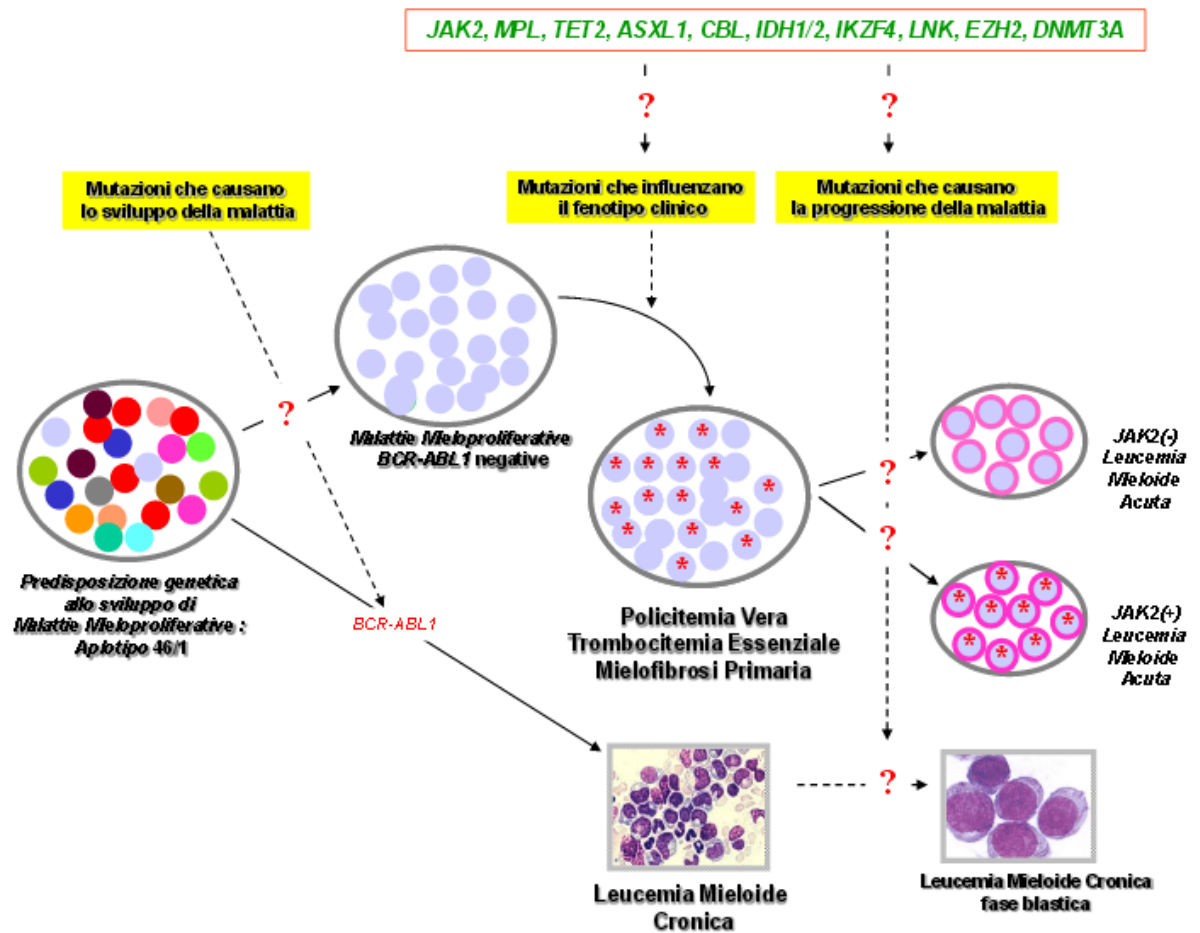


Figura 3 – Malattie mieloproliferative croniche.

1.2 La Mielofibrosi

La mielofibrosi è una malattia mieloproliferativa cronica caratterizzata da variabile fibrosi midollare, presenza nel sangue periferico di elementi immaturi della linea granulocitaria ed eritroblastica, evidente anisopoichilocitosi ed emopoiesi extra-midollare, con associata epatosplenomegalia.

Questa patologia, nella sua forma primitiva, è anche nota con altri nomi, come ad esempio: mielofibrosi idiopatica, metaplasia mieloide agnogenica o mielofibrosi con metaplasia mieloide. Le varie terminologie, utilizzate nel corso degli anni, avevano tutte lo scopo di evidenziare l'aspetto morfologico midollare predominante nella fase conclamata della malattia, ovvero la fibrosi midollare, che aumenta progressivamente e si associa allo sviluppo di emopoiesi extra-midollare, prevalentemente splenica e/o epatica (metaplasia mieloide).

La mielofibrosi può essere classificata in:

- mielofibrosi primaria o idiopatica (MFI), che insorge come disturbo primitivo nel midollo osseo;
- mielofibrosi secondaria, che può essere, a sua volta, distinta in:
 - ✓ Mielofibrosi post-policitemia vera (MF post-PV)
 - ✓ Mielofibrosi post-trombocitemia essenziale (MF post-TE)

Le forme di mielofibrosi secondaria costituiscono il 30-40% dei casi di mielofibrosi. Esse rappresentano l'evoluzione di due malattie mieloproliferative croniche, quali la Policitemia Vera (PV) e la Trombocitemia Essenziale (TE), in una forma di mielofibrosi. Dal momento che molti pazienti alla diagnosi mostrano segni e sintomi che rappresentano una miscellanea di queste patologie, le classificazioni moderne tengono conto dell'appartenenza della mielofibrosi al più vasto gruppo delle malattie mieloproliferative croniche.

Epidemiologia

L'incidenza della malattia è di 0.25-1.5/100000/anno.

Sono molto rari i casi di mielofibrosi familiare riportati in letteratura.

In Italia, si calcolano circa 650 nuovi casi l'anno, con sopravvivenza media di 5-6 anni dalla diagnosi. La malattia si presenta, prevalentemente, nella sesta-settima decade di vita con uguale frequenza nei due sessi. L'insorgenza della malattia secondaria può, tuttavia, essere più precoce. Sono riportati casi, seppur non numerosi, di insorgenza giovanile, cioè al di sotto dei 30 anni.

Patogenesi

La mielofibrosi primitiva deriva dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale. Esistono studi effettuati sulla *glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PD)*, che dimostrano che le cellule interessate dalla malattia presentano un solo tipo di *G6PD* (A o B), a differenza di quelle sane. I fibroblasti, che invece non derivano dal clone neoplastico, possiedono il caratteristico mosaicismo della *G6PD A* e *G6PD B*.

Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che i megacariociti e le piastrine liberano fattori di crescita che inducono un'abnorme proliferazione con notevole incremento delle fibre reticolari. Il ruolo dei megacariociti nella patogenesi della mielofibrosi primaria è supportato da alcune evidenze:

- iperplasia megacariocitaria con notevole displasia degli elementi cellulari;
- incremento dei progenitori megacariocitari e dei megacariociti circolanti;
- la sindrome ereditaria della "*piastrina grigia*", ovvero un disordine degli alfa-granuli, che spesso è associato alla mielofibrosi.

Il contenuto degli alfa-granuli dei megacariociti e delle piastrine (costituito da: *PDGF*, *platelet derived growth factor*; *TGF-beta*, *transforming growth factor beta*; *EGF*, *epidermal growth factor*) è in grado di stimolare la proliferazione dei fibroblasti midollari, che risultano, infatti, iperstimolati nei pazienti con MFI, con conseguente iperplasia fibroblastica. Anche il *b-FGF* (*basic fibroblastic growth factor*) è elevato nei

megacariociti circolanti e nelle piastrine dei soggetti affetti da MFI e può contribuire ulteriormente all'iperplasia fibroblastica.

Nei pazienti con MFI risultano aumentati anche altri fattori, come il *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), l'osteocalcina, l'osteoprotegerina (*OPG*). Quest'ultimo è un importante inibitore dell'osteoclastogenesi, infatti animali trasfettati con *OPG* sviluppano osteopetrosi. E' stato inoltre dimostrato che la calmodulina rilasciata dalle piastrine ha una spiccata attività mitogena sui fibroblasti. I soggetti affetti da MFI risultano avere elevati livelli urinari di calmodulina.

I pazienti con mielofibrosi primaria hanno anche alti livelli di *TPO* circolante; è noto che la *TPO* induce la liberazione di *VEGF*, che, a sua volta, stimola la proliferazione delle cellule endoteliali e quindi induce l'angiogenesi, che è documentata in molti campioni di biopsia osteomidollare (*BOM*). I progenitori megacariocitari nei pazienti affetti da MFI proliferano e si differenziano anche in assenza di *TPO* e, soprattutto, in alcuni casi non si riscontra l'attivazione del suo recettore *c-MPL*; queste evidenze inducono ad ipotizzare che esistano altri meccanismi molecolari implicati nella patogenesi della MFI. Già da alcuni anni è stato dimostrato che *GATA-1*, membro della famiglia *zinc-finger* di fattori trascrizionali, ha un ruolo importante nel controllo sia dell'eritropoiesi che della megacariocitopoiesi. Sperimentalmente è stato dimostrato che bloccando *GATA-1* nell'animale, si osserva un'iperproliferazione di megacariociti nel midollo con bassi livelli di *c-mpl* ed una condizione patologica caratterizzata da anemia, fibrosi midollare, eritropoiesi extramidollare, elevati livelli di *VEGF*, *PDGF* e *TGF-beta1*. E' ipotizzabile, quindi, che la ridotta espressione di *c-MPL*, secondaria a bassi valori o a mutazioni di *GATA-1*, giustifichi i livelli elevati di *TPO*.

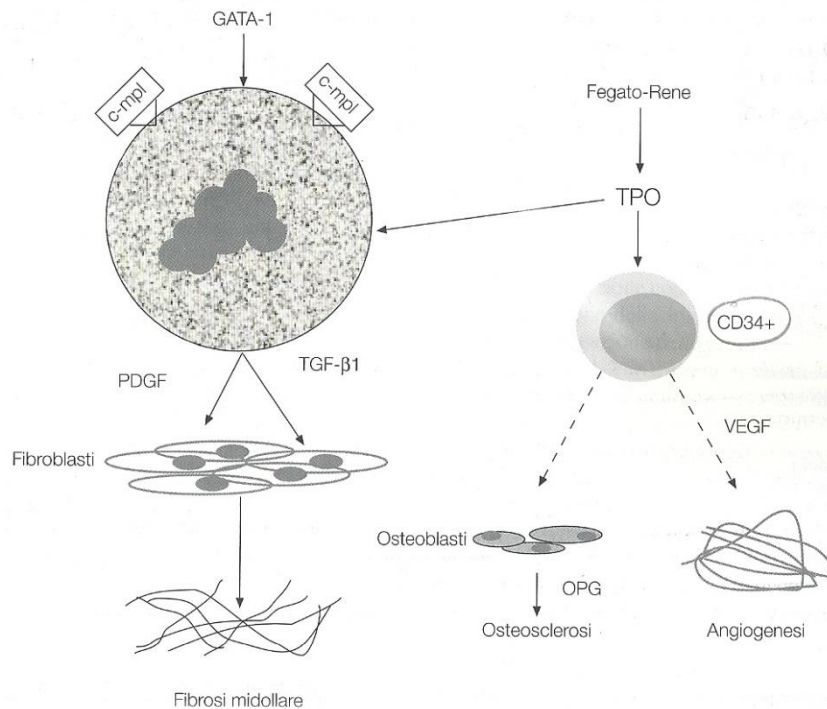


Figura 4 - Ruolo della TPO nel processo di patogenesi.

Le Basi Molecolari della mielofibrosi.

La mielofibrosi è caratterizzata da un'abnorme proliferazione della linea megacariocitaria e mieloide, con fibrosi midollare reattiva ed emopoiesi extra-midollare.

Sebbene non sia nota la mutazione genetica iniziale capace di scatenare la proliferazione clonale, e quindi l'insorgenza della malattia, il 50-60% dei pazienti presenta la mutazione *V617F* [*Val617Phe*] del gene *Janus Kinase 2* (*JAK2*).

Gene *JAK2* (9p24) – Scoperto nel 2005, è noto con il nome "*Janus chinasi 2*" e codifica una proteina che stimola la crescita e la divisione cellulare. La proteina *JAK2* è coinvolta nel meccanismo di trasduzione del segnale dal recettore di membrana al nucleo attraverso l'attivazione della via di trasduzione del segnale *JAK/STAT*. Tale proteina è particolarmente importante per il controllo della proliferazione delle cellule ematiche a partire dalle cellule staminali midollari. La mutazione più comune (*Val617Phe* o *V617F*) vede la sostituzione dell'amminoacido valina con la fenilalanina, in posizione 617. Tale mutazione

coinvolge il dominio auto-inibitorio della proteina *JAK2* e quindi determina l'aumento dell'attività della proteina stessa, con conseguente eccessiva trasduzione del segnale e mieloproliferazione.

Questa particolare mutazione non è specifica né patognomonica della mielofibrosi, infatti si ritrova:

- in circa il 50% dei pazienti affetti da trombocitemia essenziale (TE), nei quali porta alla produzione di una proteina *JAK2* costitutivamente attivata. Questa mutazione, in tale patologia, ha come conseguenza un'espansione clonale della linea megacariocitica con aumento della produzione delle piastrine (ben visibile all'emocromo) e rischio di formazione di coaguli e trombi.
- nel 96% dei pazienti affetti da policitemia vera (PV); malattia clonale nella quale, in seguito alla mutazione, tutte e tre le serie maturative midollari (che derivano tutte da una stessa cellula progenitrice emopoietica) acquisiscono un vantaggio proliferativo che le porta ad una proliferazione persistente ed incontrollata.
- in circa il 50% dei soggetti con mielofibrosi primaria (MFI). Anche in questo caso, la proteina *JAK2* è costitutivamente attiva e porta alla proliferazione incontrollata delle cellule della linea mieloide e megacariocitica. Nella mielofibrosi l'iperproduzione di megacariociti anomali stimola il rilascio di collagene, che, in questo caso, non fornisce il supporto strutturale per le cellule del midollo, bensì provoca la formazione di tessuto cicatriziale che porterà alla fibrosi midollare. Ed è proprio a causa della fibrosi che il midollo osseo non riesce più a portare avanti il normale processo di ematopoiesi con conseguente ematopoiesi extra-midollare, prevalentemente nella milza e nel fegato.

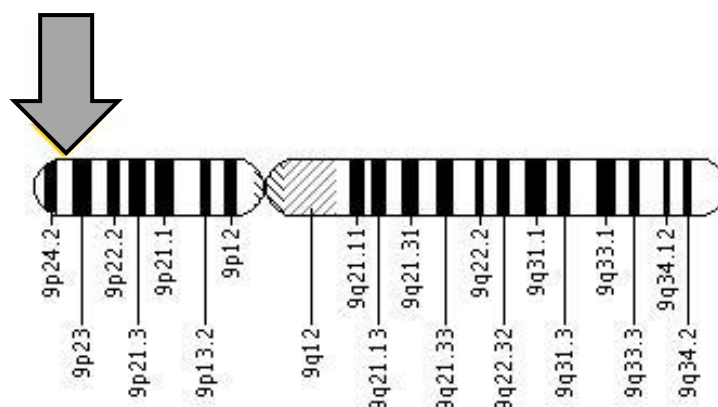


Figura 5 - Mutazione *JAK2* (9p24.2), V617F.

Gli studi di citogenetica sulle colonie dei progenitori emopoietici hanno dimostrato che l'anomalia citogenetica, quando presente, è evidenziabile a livello degli eritroblasti, delle cellule mieloidi, dei macrofagi, dei basofili e dei megacariociti.

Nel rimanente 50% dei pazienti affetti da mielofibrosi privi della mutazione *JAK2* (V617F), attraverso diversi studi, si è cercato di individuare eventuali altre mutazioni. Ciò ha portato ad identificare, nel 5-10% dei pazienti, la mutazione del gene *MPL* (*Myeloproliferative Leukemia Protein*), che codifica per il recettore della trombopoietina.

Gene *MPL* – Oncogene, la cui variante murina, *v-MPL*, fu identificata nel 1990 (*virus della leucemia murina mieloproliferativa*); nel 1992 fu clonato l'omologo umano, *c-MPL*, e si vide che codificava per una proteina recettoriale. Nel 1994 fu identificato il ligando di tale recettore: la trombopoietina, che è il principale regolatore della megacariocitopoiesi. La proteina codificata dal gene *c-MPL*, il *CD110*, è un recettore costituito da 635 aminoacidi, con un dominio trans-membrana, due domini intracellulari e due extracellulari. Topi Know-out per tale gene mostravano gravi forme di trombocitopenia, a sottolineare l'importante ruolo di *CD110* e trombopoietina nel processo di megacariocitopoiesi.

Il legame della trombopoietina con il *CD110* induce dimerizzazione del recettore stesso, con conseguente attrazione ed attivazione di una tirosin-

chinasi citosolica (*JAK*), che si associa al recettore e fosforila il dimero recettoriale.

La via JAK/STAT

La via metabolica *JAK/STAT* trasmette segnali chimici dall'esterno della cellula al nucleo attraverso recettori di membrana, inducendo in questo modo la trascrizione di geni specifici. Il sistema *JAK/STAT* è costituito da tre componenti principali:

- 1) il recettore;
- 2) la proteina *JAK2*;
- 3) il segnale trasduttore e attivatore di trascrizione: *STAT*.

E' una via di segnalazione espressa nelle cellule emopoietiche.

Il recettore di membrana, a seguito del legame con il proprio ligando (Interleuchine, fattori di crescita, interferone o altri messaggeri chimici), va incontro a dimerizzazione. A questa fa seguito la trans-fosforilazione delle subunità di *JAK2* su residui specifici (*tirosina 1007* e *tirosina 1008*). Dopo questa fosforilazione, senza la quale *JAK2* ha attività basale pressoché nulla, la chinasi aumenta l'affinità verso i suoi substrati di almeno 4-5-volte.

Janus chinasi (JAK) è una proteina appartenente alla grande famiglia delle tirosin-chinasi. Trasduce segnali mediati da citochine attraverso la via metabolica *JAK-STAT*. Questa famiglia di chinasi è stata inizialmente chiamata "*just another kinase*", (dato che le *JAKs* sono solo alcune di un grande numero di chinasi scoperte grazie alla PCR). Successivamente hanno ricevuto la denominazione "*Janus chinasi*", in riferimento al dio romano Giano, dio delle porte che aveva due facce, in relazione al loro meccanismo d'azione ed alla loro funzione.

La famiglia è costituita da 4 membri (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3* E *TYK2*) con una distribuzione tissutale pressoché uniforme, eccetto per la *JAK3*, la cui espressione è ristretta a livello emopoietico.

Quella descritta sopra è la via chiamata "canonica" per l'attivazione delle *JAKs*. Esiste anche un'altra via, chiamata "non-canonica", regolata da stimoli diversi da quelli citochinici, ovvero:

- recettori di membrana con domini a 7 eliche (7TM) - [l'angiotensina II (AT II), la bradichinina, le endorfine e la colecistochinina]
- tirosin-chinasi non recettoriali indotte dallo stress ossidativo. Le tirosin-chinasi che possono attivare le *JAKs* dopo stress ossidativo sono *c-Src*, *c-Fyn* e *c-Lyn*;
- ipertonicità cellulare e/o tissutale.

Il compito finale delle *JAKs* è quello di fosforilare dei fattori trascrizionali chiamati *STATs* (*Signal Transducers of Activated Transcription*), che dal citosol migrano nel nucleo cellulare. Le *STATs* sono proteine che, attraverso il dominio *SH2*, si legano a fosfotirosine sul complesso recettore-*JAK* e vengono esse stesse fosforilate. Le fosfotirosine, quindi, agiscono come siti di legame mediando la dimerizzazione di *STAT*. Una volta nel nucleo, le *STATs* interagiscono con sequenze specifiche di DNA (prevalentemente a livello del promotore), dando il via all'espressione di batterie di geni-bersaglio specifici, i cui prodotti daranno origine alle risposte biologiche in base al contesto cellulare o tissutale. Tali meccanismi sono alla base di funzioni come la crescita, il differenziamento e la morte della cellula. Tutto questo percorso cellulare può essere regolato su più livelli.

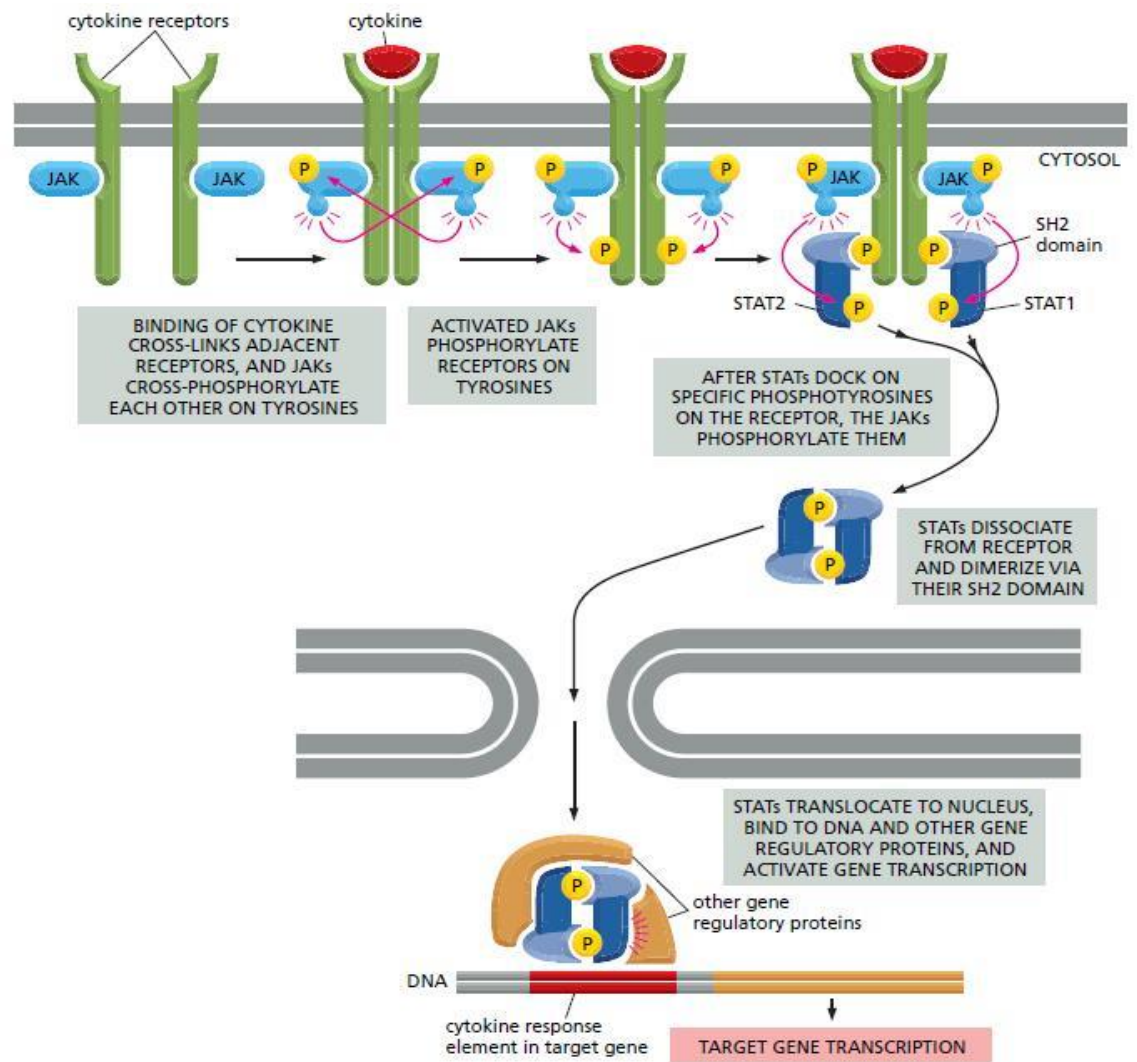


Figura 6 - La Via JAK/STAT

Studi recenti hanno evidenziato nel 17% dei pazienti affetti da mielofibrosi primaria (MFI) la presenza di un'ulteriore nuova mutazione a carico del gene *TET2*, la cui proteina è ancora sconosciuta; di conseguenza non è ancora chiaro quale possa essere il ruolo di questa mutazione nella genesi della malattia.

I due geni ad oggi studiati e conosciuti, *JAK2* e *MPL*, codificano proteine coinvolte nella promozione della crescita e proliferazione delle cellule emopoietiche tramite l'attivazione della via *JAK/STAT*. Tuttavia, le mutazioni di *JAK2* e *MPL* non sono considerate né specifiche né patognomoniche per la mielofibrosi, in quanto non

mutualmente esclusive e probabilmente rappresentano eventi secondari ad un evento mutazionale primitivo non ancora identificato.

Forme familiari

La prevalenza delle forme familiari di mielofibrosi (nelle quali membri di uno stesso nucleo familiare sono affetti da una malattia mieloproliferativa cronica Philadelphia - negativa) è circa del 7%. La trasmissione sembrerebbe essere di tipo autosomico dominante a penetranza ridotta. Tuttavia, è stato dimostrato che non esiste una trasmissione diretta delle mutazioni dei geni *JAK2* o *MPL* tra le varie generazioni, ma piuttosto che venga ereditata una predisposizione a sviluppare la malattia mieloproliferativa cronica e che le suddette mutazioni oggi note costituiscano solo un evento secondario.

L'andamento clinico delle forme familiari è simile a quello delle forme sporadiche. Da alcuni anni sono in corso studi per definire con certezza le modalità di trasmissione genetica di queste malattie e per identificare precocemente i soggetti con tali forme familiari per poter intervenire precocemente.

Quadro clinico

La diagnosi di mielofibrosi, soprattutto nei casi di mielofibrosi primaria, può essere casuale in occasione di esami clinici obiettivi e/o di indagini di laboratorio; nei casi di mielofibrosi secondaria a PV o a TE, solitamente si presenta come l'evoluzione in senso fibrotico di una delle due malattie.

All'esame obiettivo il reperto più frequente è il riscontro della splenomegalia, che può essere da lieve a severa (con quadri in cui la milza, per le dimensioni aumentate, arriva fino in fossa iliaca sinistra), attribuibile all'emopoiesi extra-midollare. Questi pazienti, di solito, lamentano tensione addominale, dolore a livello dell'ipocondrio sinistro, disturbi della digestione e sensazione di sazietà precoce. Possono verificarsi, inoltre, infarti splenici e manifestazioni emorragiche, quali petecchie ed ecchimosi.

Una percentuale minore di pazienti presenta anche epatomegalia, che può essere messa in relazione all'emopoiesi extra-midollare, ma anche all'ipertensione secondaria alla splenomegalia. Raramente sono stati riportati casi con metaplasia mieloide e focolai di emopoiesi extra-midollare in organi quali polmone, pericardio, regione paravertebrale, sistema nervoso centrale, apparato gastro-intestinale e genito-urinario. In questi rari casi si avranno sintomi atipici, difficili da riconoscere.

Tuttavia, è importante ricordare che esistono altre patologie neoplastiche e condizioni non maligne che si accompagnano a fibrosi midollare.

Patologie associate a fibrosi midollare	
Non neoplastiche	Neoplastiche
Tubercolosi	Malattie mieloproliferative croniche
Osteodistrofia renale	Mielofibrosi acuta
Deficit Vitamina D	Leucemia mieloide acuta
Ipo/Iper-paratiroidismo	Leucemia linfoblastica acuta
Sindrome della piastrina grigia	Leucemia a cellule capellute
LES, sclerodermia	Linfoma di Hodgkin
Mielofibrosi autoimmune	Mielodisplasia con mielofibrosi
Esposizione a radiazioni	Mieloma multiplo
Osteopetrosi	Linfoma non Hodgkin
Esposizione a sostanze tossiche	Carcinoma mammella, polmone, prostata e stomaco.

Tabella 2 – Patologie associate a fibrosi midollare.

Reperti soggettivi più frequentemente riferiti dal paziente sono l'affaticabilità, l'astenia, il cardiopalmo ed un evidente pallore.

Il 70% dei pazienti alla diagnosi presentano sintomi sistemici, quali:

- sudorazioni notturne,
- perdita di peso (corrispondente ad un calo ponderale superiore al 10% del peso corporeo in circa 6 mesi)
- febbre e malessere generale,

- splenomegalia (che risulta presente, al momento della diagnosi, nel 90% dei casi),
- epatomegalia (solo nel 50% dei pazienti.)

Il restante 30% dei pazienti risulta, invece, asintomatico.

Caratteristiche di laboratorio

All'esame emocromo-citometrico possono essere riscontrati: anemia, trombocitopenia/trombocitosi e leucopenia/leucocitosi.

L'anemia può essere di tipo normocromico-normocitico o, più raramente, ipocromico-microcitico ed è riscontrabile nei 2/3 dei pazienti affetti da mielofibrosi. In questi pazienti, in notevole percentuale, si documenta un'eritropoiesi inefficace con ridotta sopravvivenza media delle emazie. In alcuni pazienti, durante il decorso della malattia, si possono riscontrare episodi di anemia emolitica dovuti all'ipersplenismo e/o alla presenza di anticorpi anti-eritrociti.

La trombocitopenia è evidente in circa 1/3 dei casi, mentre nel 10-20% dei pazienti si riscontra una trombocitosi, con livelli di piastrine superiori a 600×10^9 /litro.

Nella fase pre-fibrotica iniziale, l'unico dato clinico può esser rappresentato dalla piastrinosi, con possibili problemi di diagnosi differenziale con una trombocitemia essenziale (TE).

Può essere presente un'alterazione dell'emostasi secondaria a difetti di aggregazione piastrinica (al collagene e/o all'adrenalina) che a volte si rileva associata a trombocitopenia, ipofibrinogenemia e bassi livelli di fattore V e VIII.

Possono riscontrarsi sia leucocitosi che leucopenia. Quest'ultima si osserva nel 15% dei pazienti con mielofibrosi.

La fosfatasi alcalina leucocitaria è quasi sempre elevata.

Vengono riportate, nel corso della mielofibrosi, anomalie del sistema immune come la possibile presenza di anticorpi anti-nucleo, aumento del fattore reumatoide, fattore

lupus anticoagulante (LAC), anticorpi anti-eritrociti, ipocomplementemia, immunocomplessi circolanti e gammopatie monoclonali.

I pazienti con mielofibrosi presentano spesso un incremento del numero dei progenitori circolanti CD34 positivi. Il CD34 è un antigene di superficie presente nell'1% delle cellule midollari e nello 0.1% delle cellule nucleate circolanti e rappresenta un marcatore di immaturità dei progenitori emopoietici mieloidi. I pazienti con mielofibrosi hanno valori di cellule CD34+, nel sangue periferico, superiori rispetto alla popolazione sana e rispetto anche ai pazienti affetti da altre neoplasie mieloproliferative Philadelphia-negative. In base al range di normalità, si considerano elevati valori di cellule CD34+ superiori a 12/microlitro.

Dall'esame degli strisci di sangue periferico si evidenzia la presenza di elementi immaturi della serie granulocitaria (in particolare mielociti e metamielociti) ed eritroblastica; quasi sempre è presente una marcata anisocitosi e/o poichilocitosi con i tipici dacriociti, i cui livelli tendono a diminuire/ridursi a seguito della splenectomia.

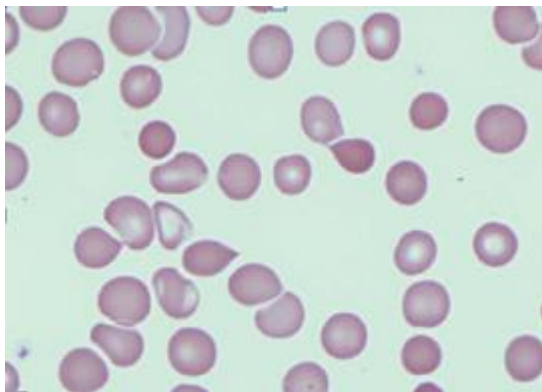


Figura 7 – Dacriociti su sangue periferico.

La biopsia osteo-midollare (esame fondamentale per la diagnosi di questa malattia) può evidenziare ipercellularità, normocellularità o ipocellularità, a seconda della fase di malattia in atto. Spesso sono evidenti una dismegacariocitopoiesi (micromegacariociti, megacariociti giganti con nucleo abnorme, solitamente disposti in “cluster”) ed una disgranulopoiesi (granulociti con nucleo ipersegmentato o con anomalia di Pelger-Huet).

Reperto costante e sempre presente è l'incremento delle fibre reticolari nel midollo, che solitamente tendono ad aumentare con il progredire della malattia. Spesso si osserva una marcata deposizione di collagene di tipo I e III ed altre matrici extracellulari come la fibronectina ed i proteoglicani, con la formazione di nuovo tessuto osseo (osteosclerosi) e nuovi vasi (angiogenesi). I sinusoidi midollari appaiono dilatati e con una emopoiesi intravascolare.

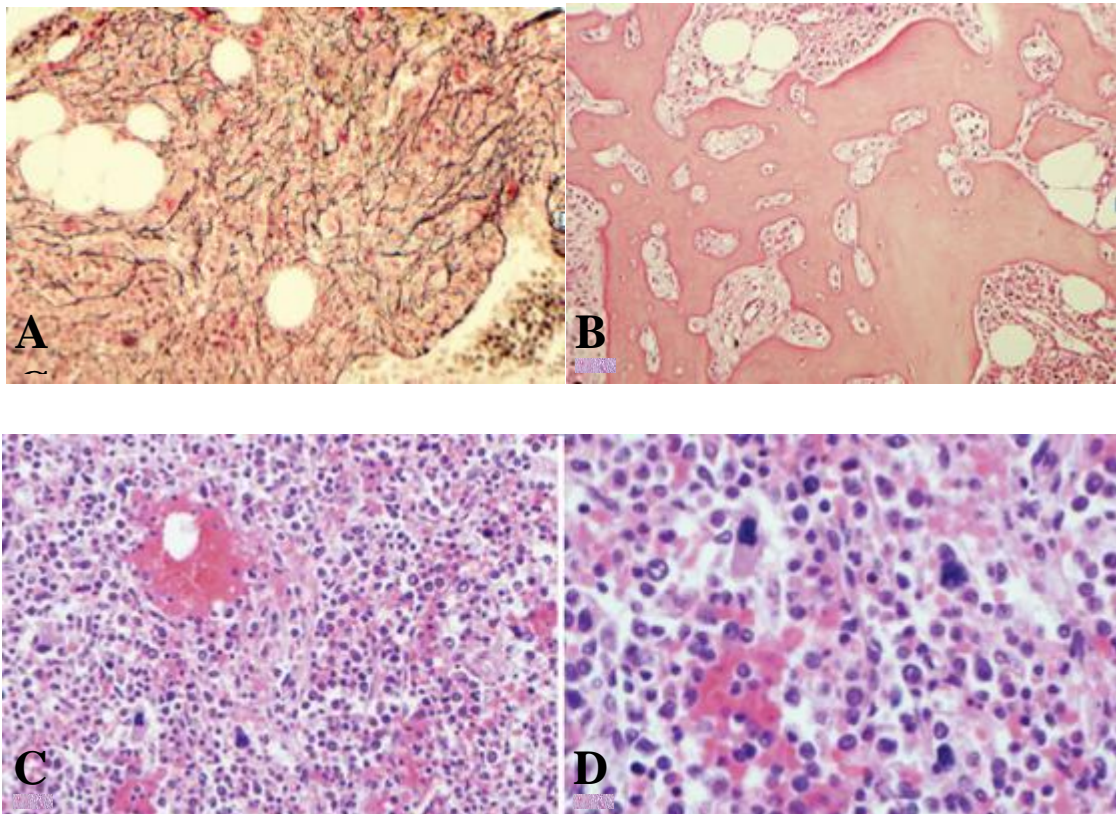


Figura 8- A) Esempio di fibrosi di grado-1 su biopsia osteo-midollare; B) esempio di osteosclerosi prominente (colorazione ematossilina-eosina) su biopsia osteo-midollare; C) e D) Esempio di prominente emopoiesi extra-midollare nella milza, con colorazione ematossilina-eosina.

Secondo la vecchia classificazione, la malattia veniva differenziata in due fasi: pre-fibrotica e fibrotica. Nella mielofibrosi in fase pre-fibrotica (detta anche *early-myelofibrosis*), la fibrosi risultava assente (non è visibile), ma la diagnosi di malattia era suggerita dalla presenza di un midollo ipercellulato, con aumentato numero di megacariociti atipici, associato ad iperplasia granulocitaria ed ipoplasia eritroide.

Oggi viene proposta una classificazione della malattia in quattro stadi, in rapporto sia al grado di cellularità che alla fibrosi.

Classificazione MF in rapporto al grado di cellularità/fibrosi	
STADIO I	ipercellularità trilineare con aumento dei megacariociti ed incremento focale delle fibre reticolari;
STADIO II	midollo ipocellulare, scomparsa della componente adiposa, ispessimento del reticolo;
STADIO III	midollo ipocellulare, ispessimento del reticolo, comparsa del collagene, neogenesi ossea;
STADIO IV	marcata ipocellularità, fibrosi diffusa ed incremento della neogenesi ossea.

Tabella 3 – Classificazione MF in rapporto al grado di cellularità/fibrosi

Anomalie cromosomiche associate alla mielofibrosi

Anomalie cromosomiche alla diagnosi sono state osservate in una percentuale variabile dal 30 al 70% dei pazienti, in media in circa 1/3 dei pazienti. Le alterazioni possono coinvolgere i cromosomi: 1, 5, 13, 17, 18, 20, 21 e l'Y. I pattern citogenetici più frequentemente riportati sono: del(13q), del(20q), +8, +9, del(11q) ed anomalie del cromosoma 1. E' stata, inoltre, descritta un'associazione fra il difetto del cromosoma 11 e l'ipoplasia eritroide. La trasformazione leucemica è quasi sempre preceduta dalla comparsa di anomalie cariotipiche aggiuntive, tutt'ora in studio. Nonostante queste scoperte, ad oggi, non esiste un marker cromosomico specifico della mielofibrosi.

Le anomalie del cariotipo, oltre a costituire un marcatore di clonalità, rivestono un ruolo importante nella prognosi della malattia, come è stato recentemente confermato da numerosi studi clinici in tale ambito. In base ai risultati di tali studi il cariotipo viene classificato come “favorevole” o “sfavorevole” ed associato ad una diversa evoluzione della malattia.

Scoperte in letteratura sulla mielofibrosi

Il ruolo della mutazione JAK2 nella mielofibrosi

Il 50% circa dei pazienti con mielofibrosi primaria presenta una mutazione acquisita di JAK2V617F, ma tale mutazione non è considerata patognomonica. La mutazione più

nota risiede nel dominio auto-inibitorio del gene *JAK2* e porta all'aumento dell'attività chinasi della proteina *JAK2* mutata. Tale mutazione sembra poter influenzare il fenotipo ed il decorso clinico della malattia.

I pazienti con la proteina mutante hanno la tendenza ad avere una leucocitosi più elevata, una storia di trombosi o di prurito e richiedono meno frequentemente trasfusioni durante il decorso della malattia. Risultati contrastanti sono stati ottenuti dagli studi che hanno valutato l'effetto della mutazione sulla sopravvivenza e l'evoluzione a leucemia acuta. Tuttavia, il numero relativamente piccolo dei campioni studiati ha impedito la valutazione dei rapporti precisi fra genotipo e fenotipo.

E' stato effettuato uno studio sull'associazione genotipo-fenotipo analizzando la mutazione *JAK2V617F* sul DNA isolato dai granulociti del sangue periferico di più di 300 pazienti con mielofibrosi primaria. I pazienti erano reclutati in diversi centri nazionali fra il 1980 ed il 2007. I pazienti erano esclusi dallo studio se avevano una mielofibrosi post-policitemia vera o post-trombocitemia essenziale oppure una diagnosi di mielofibrosi in fase "pre fibrotica".

Gli autori hanno esaminato le seguenti variabili che possono essere influenzate dalla mutazione *JAK2V617F*: terapia citostatica (idrossiurea, busulfano, interferone), prurito, livello d'emoglobina, livello di leucociti, percentuali di cellule mieloidi immature, eritroblasti, blasti nel sangue periferico, conta piastrinica, dimensione della milza, livello di LDH, numero di cellule CD 34+ nel sangue periferico.

Gli end point primari clinicamente rilevanti ai fini dello studio erano: la morte da ogni causa, la morte da trasformazione leucemica, gli episodi di trombosi maggiore (infarto miocardico non fatale, ictus cerebrale, trombosi venosa profonda, embolia polmonare), sviluppo di grave anemia (emoglobina < 100 grammi/litro), importante splenomegalia (oltre 10 cm dal margine costale sinistro), piastrinopenia (piastrine <150.000/uL) e leucopenia (leucociti inferiori a 4.000/uL), necessità di splenectomia e trasformazione leucemica. La diagnosi di trasformazione leucemica richiedeva nel sangue periferico la presenza di blasti superiore al 20% della conta leucocitaria e/o blasti nel midollo superiore al 30%.

Il 63,5% (193 pazienti) avevano la mutazione *JAK2V617F*, di questi il 35,8% (109 pazienti) erano eterozigoti ed il 27,6% (84 pazienti) avevano una mutazione omozigote.

I livelli d'emoglobina erano più elevati nei pazienti mutati (eterozigoti od omozigoti) rispetto a quelli non mutati, mentre la conta piastrinica era più elevata negli eterozigoti rispetto a soggetti omozigoti o normali. I pazienti omozigoti avevano anche un indice splenico ed una leucocitosi significativamente più elevata rispetto a quelli eterozigoti o normali. La frequenza dei pazienti con prurito aumentava significativamente nei soggetti eterozigoti rispetto a quelli con genotipo omozigote. I pazienti con una mutazione omozigote avevano anche una durata maggiore della malattia e richiedevano più frequentemente terapia citostatica rispetto ai soggetti eterozigoti o normali.

Durante il periodo analizzato il tasso di prevalenza della mutazione non variava significativamente dal momento della diagnosi sino ad un periodo d'otto o più anni di durata della malattia. Al contrario, la prevalenza della mutazione omozigote aumentava dal 19,6% al 50%, mentre quella della mutazione eterozigote si riduceva dal 51% al 12, dopo otto anni o più di durata della malattia. Questi dati suggeriscono il notevole tasso di trasformazione dalla mutazione eterozigote a quella omozigote.

Per quanto riguarda le caratteristiche del decorso clinico, la mutazione di *JAK2V617F* non influenzava, comunque, in modo significativo il rischio di sviluppare una grave anemia, piastrinopenia e leucopenia. E' stato evidenziato che pazienti positivi per la mutazione *JAK2V617F* (sia eterozigote sia omozigote al momento della diagnosi) avevano: aumento del rischio di decesso per ogni causa, sviluppo di splenomegalia, rischio di splenectomia, progressione a leucemia, morte per trasformazione leucemica.

Il 63% dei pazienti con mielofibrosi idiopatica, analizzati fra il 1980 ed il 2007, era portatore della mutazione *JAK2V617F*. Nessuno dei pazienti analizzato con metodi sensibili, e negativo al momento della diagnosi iniziale, mostrò l'acquisizione della mutazione in seguito. Questo risultato è in accordo con quelli riportati nella policitemia vera e nella trombocitemia essenziale, ma contrasta con uno studio precedente nella mielofibrosi idiopatica, in cui un ingente gruppo di pazienti mostrò una progressione da un genotipo normale ad eterozigote. Tuttavia questo può essere stato causato dall'uso di metodiche di laboratorio poco sensibili, che possono produrre risultati falsamente negativi, come fu documentato da quattro su 36 pazienti di questo studio.

Con tutto questo, è stato dimostrato che la mutazione *JAK2V617F* svolge un ruolo indipendente e significativo sul genotipo della malattia, che è correlato principalmente

con l'espansione del clone emopoietico portatore dell'allele mutante. Qualsiasi livello dell'allele mutante favorisce più elevate concentrazioni d'emoglobina ed il prurito. Bassi livelli, come quelli che si osservano nello stato eterozigote, favoriscono una conta piastrinica più elevata, mentre livelli ancora più elevati del gene mutante, come si osserva nello stato omozigote, favoriscono un profilo iperproliferativo che è sostenuto da una conta leucocitaria più elevata, da una milza particolarmente ingrossata, e da un maggior bisogno di terapia citoriduttiva.

Probabilmente, il dato più interessante che emerge da questo studio è che la presenza della mutazione omozigote al momento della diagnosi influenza in modo decisivo la comparsa di una importante splenomegalia, la richiesta di splenectomia (tipologia di trattamento molto utilizzato nel passato) e l'aumento del rischio di trasformazione leucemica (5,2 volte più elevato rispetto ai pazienti non mutati).

Fra i pazienti sottoposti a splenectomia, 17 su 20 (85%) avevano una mutazione omozigote; fra quelli con trasformazione leucemica 12 su 15 (80%) avevano una mutazione omozigote al momento della comparsa della leucemia. Queste osservazioni convalidano l'ipotesi che il passaggio da stato eterozigote ad omozigote (cioè l'accumulo di un maggior carico d'alleli mutati) rappresenta una fase critica nella progressione della malattia, com'è già stato riportato per l'evoluzione verso la mielofibrosi secondaria nei pazienti con policitemia vera o trombocitemia essenziale. Poiché questo tasso di conversione genetica fu osservato in circa il 10% dei pazienti per anno, si può ipotizzare che esso rappresenti un fattore principale per l'evoluzione della malattia.

In conclusione, la mutazione *JAK2V617F* potrebbe rappresentare un marcatore biologico utile per la stratificazione del rischio della mielofibrosi idiopatica.

Sospetto di malattia

La mielofibrosi viene sospettata quando sono presenti i seguenti aspetti clinici, di laboratorio e/o istologici:

- evidente fibrosi midollare,

- splenomegalia,
- quadro morfologico del sangue periferico caratteristico, con leuco-eritroblastosi, anisopoichilocitosi e presenza di dacriociti,
- anemia di grado variabile,
- altre anomalie dell'emocromo (leucocitosi/leucopenia, piastrinosi/piastrinopenia),
- assenza del cromosoma Philadelphia e del gene di fusione *BCR-ABL*.

Bisogna, però, sempre considerare che questi aspetti clinici/laboratoristici sono evidenti solo nella fase conclamata di malattia e che il 30% dei pazienti risulta asintomatico alla diagnosi.

Diagnosi

I criteri per la diagnosi della mielofibrosi sono definiti in accordo alla classificazione WHO 2008 e comprendono valutazioni cliniche, morfologiche, genetiche e molecolari.

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

Criteri Maggiori
1 - Biopsia osteomidollare con iperplasia di megacariociti atipici e fibrosi reticolinica o collagena; in assenza di fibrosi significativa (mielofibrosi pre-fibrotica) l'iperplasia megacariocitica deve essere accompagnata da ipercellularità granulocitaria ed eritrocitica;
2 - Assenza di criteri WHO diagnostici di leucemia mieloide cronica, policitemia vera, trombocitemia essenziale, sindromi mielodisplastiche ed altre neoplasie mieloidi;
3 - Presenza della mutazione <i>JAK2 (V617F)</i> o altro marcatore clonale come la mutazione <i>MPL (W515K/L)</i> ; se assenti, esclusione delle forme di fibrosi.

Criteri Minori
1 - Leuco-eritroblastosi;
2 - Aumento della lattico deidrogenasi (LDH);
3 - Anemia;
4 - Splenomegalia palpabile;

Tabella 4 – Criteri maggiori e minori per la diagnosi di mielofibrosi (WHO 2008).

In realtà esistono anche altre due criteri che, però, non sono inclusi nella classificazione del *WHO 2008* e sono: incremento delle cellule CD 34+ (> 15/ml), senza alcun incremento delle CD 34+ all'interno del midollo; anomalie citogenetiche: del(13q), 9p, del(20q), del(12p), +8, +9.

La classificazione WHO del 2001 identificava una fase precoce di mielofibrosi primaria, detta mielofibrosi in fase prefibrotica, ed una fase fibrotica.

La fase pre-fibrotica era caratterizzata:

- *a livello midollare*, dalla presenza di ipercellularità, iperplasia granulocitaria, iperplasia megacariocitaria con atipie (cluster di megacariociti, anomale lobulazioni del nucleo) e fibrosi minima/assente.
- *A livello del sangue periferico*, assente o lieve leuco-eritroblastosi, minima/assente poichilocitosi e pochi dacriociti.
- *A livello emocromo-citometrico*, lieve anemia, lieve leucocitosi e lieve o marcata trombocitosi.
- *A livello clinico*, il paziente in questa specifica fase, non è splenomegalico, ha valori normali o solo lievemente aumentati di LDH e può avere un valore di progenitori CD34+ circolanti basso o lievemente aumentato.

Tale condizione clinica è tutt'ora riconosciuta dalla classificazione WHO del 2008, purché il paziente presenti dal punto di vista clinico almeno due criteri minori.

Lo fase fibrotica, riconosciuto dalla classificazione WHO del 2001, prevedeva:

- *A livello midollare*, fibrosi reticolare e/o collagene, ipocellularità, sinusoidi dilatati, emopoiesi intraluminare, notevole proliferazione megacariocitaria ed atipie (cluster di megacariociti, anomale lobulazioni del nucleo) ed osteosclerosi.
- *A livello del sangue periferico*, leuco-eritroblastosi e notevole poichilocitosi con dacriocitosi.
- *A livello emocromo-citometrico*, moderata/marcata anemia, leucocitosi/leucopenia, conta piastrinica solitamente diminuita.
- *A livello clinico*, il paziente in questa fase presenta moderata/severa epatosplenomegalia.

Ad oggi la classificazione WHO 2001 non è più in uso, in quanto è stata soppiantata dalla successiva classificazione elaborata dal WHO nel 2008, riportata di seguito.

Mielofibrosi secondaria

Mielofibrosi post-policitemia vera (MF post PV) e Mielofibrosi post-trombocitemia essenziale (MF post TE).

La mielofibrosi secondaria insorge tipicamente in soggetti affetti precedentemente da policitemia vera (PV) o trombocitemia essenziale (TE). Può colpire, proprio per questo motivo, soggetti più giovani, in quanto l'intervallo tra le due malattie risulta in media di circa 10-15 anni. Si manifesta con la comparsa di una sintomatologia sistemica e progressiva citopenia trilineare (riduzione di leucociti, emoglobina e piastrine), associata ad un aumento della splenomegalia.

I criteri per porre diagnosi di Mielofibrosi post-Policitemia vera sono stati recentemente definiti dal gruppo internazionale IWGMRT (*International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment*).

Per la diagnosi sono necessari i due criteri principali e almeno due dei criteri addizionali sotto riportati.

Criteri IWG-MRT per la diagnosi di MF post-PV

Criteri Principali

- 1 - Precedente diagnosi di Policitemia Vera (secondo i criteri WHO)**
- 2 - Fibrosi midollare di grado II o III (secondo i criteri europei EUMNET, *European Myelofibrosis Network*)**

Criteri Addizionali

- 1 - Anemia oppure non necessità di salasso o di chemioterapia;**
 - 2 - Screzio leuco-eritroblastico allo striscio di sangue periferico;**
 - 3 - Splenomegalia (alla visita incremento delle dimensioni della milza di 5 cm dall'arcata costale; oppure comparsa di splenomegalia precedentemente assente)**
 - 4 - Comparsa di almeno un sintomo sistemico (calo ponderale, febbre, sudorazione notturna)**
-

Tabella 5 – Criteri IWG-MRT per la dignosi di MF post-PV.

Secondo alcuni studi, sono da ritenere fattori prognosticamente negativi, al momento della diagnosi, valori di emoglobina inferiore a 10 g/dL; oppure, durante il follow-up, l'evidenza di: emoglobina < 10 g/dL, piastrine < 100.000/ μ l, leucociti > 30.000/ μ l.

I criteri per porre diagnosi di Mielofibrosi post-trombocitemia essenziale sono stati, anch'essi, recentemente definiti dal gruppo internazionale IWGMRT (*International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment*).

Per la diagnosi sono necessari, anche in questo caso, due criteri principali e almeno due dei criteri addizionali sotto riportati.

Criteria IWG-MRT per la diagnosi di MF post-TE

Criteria Principali

- 1 - Precedente diagnosi di Trombocitemia Essenziale (secondo i criteri WHO)**
- 2 - Fibrosi midollare di grado II o III (secondo i criteri europei EUMNET, European Myelofibrosis Network)**

Criteria Aggiuntivi

- 1 - Anemia oppure riduzione dell'Hb di almeno 2 g/dL rispetto al valore riscontrato alla diagnosi;**
 - 2 – Criteri di Trombocitemia essenziale;**
 - 3 - Splenomegalia (alla visita incremento delle dimensioni della milza di 5 cm dall'arcata costale; oppure comparsa di splenomegalia precedentemente assente)**
 - 4 - Comparsa di almeno un sintomo sistemico (calo ponderale, febbre, sudorazione notturna)**
 - 5 – Screzio leuco-eritroblastico allo striscio di sangue periferico;**
 - 6 – incremento della lattico deidrogenasi (LDH).**
-

Tabella 6 - Criteri IWG-MRT per la diagnosi di MF post-TE

La fibrosi midollare

Esistono gradazioni della fibrosi midollare.

GRADAZIONE DELLA FIBROSI MIDOLLARE

<i>MF 0</i>	Stadio pre-fibrotico (CIMF 0). Normale reticolo di fibrina.
<i>MF 1</i>	Fibrosi precoce (CIMF 1). Perdita del normale reticolo con interstizioni tra le fibre.
<i>MF 2</i>	Stadio fibrotico (CIMF 2). Aumento del reticolo con frequenti intersezioni focali ed accumuli di collagene.
<i>MF 3</i>	Fibrosi avanzata (CIMF 3). Notevole aumento del reticolo con diffusi accumuli di collagene ed osteosclerosi.
<i>MF > 3</i>	Stadio terminale ipocellulare con osteomielosclerosi estesa.

Tabella 7 – Tabella della gradazione della fibrosi midollare.

Correlazione tra gradazione della fibrosi e dati clinico-laboratoristici

Nelle fasi precoci della Mielofibrosi, alcuni aspetti clinici e patologici sono simili a quelli di altre malattie mieloproliferative croniche, con particolare riferimento alla trombocitemia essenziale ed alla policitemia vera. Per questo

motivo può essere utile attuare la combinazione dei criteri istologici preposti della WHO e dei criteri diagnostici, clinici, molecolari e patologici europei ECMP, come illustrato.

Criteri clinici e molecolari

- 1 - Può essere associata/preceduta da TE o da PV;
 - 2 - Non presente prima di altre malattie mieloproliferative croniche, quali PV, TE, LMC, sindromi mielodisplastiche;
 - 3 - Assenza del cromosoma Philadelphia;
 - 4 - Presenza della mutazione JAK2 (V617F) o MPL (W515L).
-

Staging Clinico

A - Stadio clinico PRECOCE

- PLT > 450 x 10⁹/litro;
- No anemia, no leuco-eritroblastosi;
- Splenomegalia assente o riscontrabile solo con ecografia;
- CIMF 0 o CIMF 1.

B - Stadio clinico INTERMEDIO

- evidente leuco-eritroblastosi;
- anemia di grado 1 (Hb 10-12 g/dL);
- splenomegalia palpabile;
- CIMF 1 o CIMF 2.

C - Stadio clinico AVANZATO

- marcata leuco-eritroblastosi;
 - anemia di grado 2 (Hb < 10 g/dL oppure > 10 g/dL ma con segni avversi)
 - splenomegalia pronunciata;
 - leucocitosi o leucopenia;
 - PLT ridotte
 - CIMF 2 o CIMF 3.
-

Criteri istologici (WHO)

- P1*** Cellularità aumentata, proliferazione megacariocitica e granuloblastica e ridotta emopoiesi;
- P2*** Clusters di megacariociti immaturi di taglia medio-grande con nuclei ipolobati e con difetti di maturazione.
-

Tabella 8: 8a – criteri clinici e molecolari della MF;
8b staging clinico; 8c criteri istologici (WHO) della MF

Stadi clinici della mielofibrosi

E' possibile identificare tre stadi clinici della malattia:

1. *Stadio clinico precoce*, con segni di ipercellularità midollare;
2. *stadio clinico intermedio*, con segni clinici e laboratoristici caratteristici;
3. *stadio clinico avanzato*, con segni clinici e laboratoristici definiti come “avversi”, conseguenti alla marcata fibrosi ed alla metaplasia mieloide.

Nello *stadio clinico precoce* della malattia, quando la fibrosi non è ancora evidente, l'esordio è insidioso ed è caratterizzato, nella maggior parte dei casi, da lieve anemia. Solo in alcuni soggetti è presente un transitorio aumento dei livelli di emoglobina e di ematocrito e, quindi, è possibile confonderla con una iniziale forma di policitemia vera. E' spesso presente trombocitosi e, talora, anche lieve neutrofilia. L'osservazione morfologica del sangue periferico non permette di vedere sempre le caratteristiche anomalie morfologiche della malattia. Gli studi di citofluorimetria permettono di evidenziare un incremento delle cellule CD34+ circolanti, che risultano in genere > 1%. (E' stato osservato che, nelle patologie con fibrosi midollare secondaria, la percentuale di cellule CD34+ è costantemente < 0.2%.) Pertanto, questo reperto può essere utile nella diagnosi differenziale. In questo stadio la splenomegalia non è presente ed è relativamente facile prelevare il sangue midollare al mieloaspirato.

Nello *stadio clinico intermedio* di malattia, i pazienti mostrano:

- anemia moderata (Hb 10-12 g/dl),
- splenomegalia palpabile all'esame obiettivo,
- livelli di piastrine variabili (trombocitopenia/trombocitosi),
- quadro morfologico del sangue periferico caratterizzato dalla presenza di elementi immaturi mieloidi ed eritroidi (leuco-eritroblastosi),
- anisopoichilocitosi degli eritrociti,

- presenza di dacriociti e di piastrine di taglia aumentata.
- Possono essere presenti anche sintomi generali, ma di solito sono di lieve entità.

E' difficile, in questo stadio di malattia, ottenere sangue midollare all'esame del mieloaspirato. Gli esami di laboratorio, solitamente, mostrano livelli elevati di LDH.

Nello *stadio clinico avanzato* i pazienti mostrano:

- ✓ progressiva anemizzazione, che tende a peggiorare in rapporto all'incremento della fibrosi midollare,
- ✓ trombocitopenia e neutropenia,
- ✓ incremento ulteriore della splenomegalia, con diametro longitudinale della milza > 20 cm e conseguenti sintomi di ingombro addominale. (Esistono casi in cui la milza arriva ad avere diametro di 30 cm, con conseguente localizzazione in fossa iliaca sinistra e sintomi di ingombro e tensione addominale importanti.)
- ✓ sintomi generali sistemici, causati dallo stato ipermetabolico,
- ✓ talora gotta, per eccesso di acido urico nel plasma,
- ✓ sintomatologia emorragica, nei casi di severa piastrinopenia.

La diagnosi Differenziale

La diagnosi può non essere agevole, soprattutto nella fase ipercellulare della malattia. La fibrosi rilevabile con l'istologia del midollo, l'anisopoichilocitosi, la presenza di elementi immaturi eritroidi e granulocitari nel sangue periferico non sono marker patognomonici assoluti della mielofibrosi, poiché si possono riscontrare anche in altre patologie mieloproliferative come la LMC, la PV e la TE.

Per la diagnosi differenziale con la leucemia mieloide cronica (LMC) può essere di ausilio lo studio citogenetico e molecolare (Ph+, *BCR/ABL*); la valutazione morfologica del midollo nella LMC mostra un'iperplasia prevalentemente granulocitaria, con micro-

megacariociti non riuniti in cluster e, soprattutto, un minor numero di fibre reticolari, almeno nelle prime fasi della malattia. Di minor aiuto è la fosfatasi alcalina leucocitaria che, per quanto bassa o assente nella LMC ed elevata nella mielofibrosi, può avere un comportamento eterogeneo in rapporto alle fasi della malattia.

Nella policitemia vera (PV), l'eritropoiesi extra-midollare non è marcata come nella mielofibrosi e, a livello midollare, il numero delle fibre reticoliniche (soprattutto nelle fasi iniziali della malattia) è più scarso rispetto a quello rilevabile nella mielofibrosi.

A volte può essere più problematica la diagnosi differenziale con la trombocitemia essenziale (TE), in quanto il reperto midollare può essere identico; tuttavia, il rilievo di elementi immaturi della serie eritroide nel sangue periferico, l'anisopoichilocitosi e la marcata splenomegalia possono essere di ausilio nella diagnosi di mielofibrosi primitiva.

La mielofibrosi deve essere differenziata da altre condizioni e patologie caratterizzate dalla presenza di fibrosi midollare. In questi casi, la fibrosi non è correlata ad eziologia clonale, ma è sostanzialmente di tipo reattivo.

<i>CAUSE REATTIVE</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Patologie autoimmuni (LES, sclerosi sistemica) • Meccanismi tossici (benzene, radiazioni ionizzanti)
<i>OSTEOPATIE</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Deficit vitamina D ▪ Osteoporosi ▪ Ipotiroidismo ▪ Osteodistrofia renale
<i>INFEZIONI</i>
<ul style="list-style-type: none"> ○ TBC, sarcoidosi, AIDS.
<i>PATOLOGIE NEOPLASTICHE</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Linfomi (Hairy Cell Leukemia, Linfoma di Hodgkin) ✓ Malattie mieloproliferative croniche ✓ Sindromi mielodisplastiche ✓ Carcinomi metastatizzanti ✓ Leucemie acute (leucemia megacarioblastica)

Tabella 9 – Diagnosi differenziale della mielofibrosi.

Prognosi

Il decorso clinico è molto variabile; si osservano pazienti asintomatici per lungo tempo (anni) e pazienti, invece, con decorso clinico ingravescente che può portare rapidamente all'exitus. La variabilità dei risultati sulla sopravvivenza riportata in letteratura dipende, soprattutto, dall'eterogeneità delle casistiche valutate, in particolare per il numero limitato di pazienti, per i diversi trattamenti (aggressivi o conservativi) e, soprattutto, per le difficoltà nello stabilire criteri diagnostici assoluti (soprattutto in passato). La sopravvivenza, quindi, si considera compresa in un range estremamente ampio di 5-15 anni dalla diagnosi.

L'International Prognostic Scoring System – IPSS

Lo score prognostico attualmente in uso è l'*International Prognostic Scoring System* (IPSS), elaborato nel 2008 da un gruppo di studio internazionale, permettono di stimare la sopravvivenza al momento della diagnosi di malattia. L'IPSS si basa su cinque diversi parametri di rischio:

INTERNATIONALE PROGNOSTIC SCORING SYSTEM – IPSS

Fattori prognostici sfavorevoli

- 1 - Età > di 65 anni;
 - 2 - Hb < 10 g/dL
 - 3 - WBC > 25000/microL
 - 4 - sintomi costituzionali (febbre, sudorazioni profuse, calo ponderale)
 - 5 - Blasti nel sangue periferico > o uguale a 1%
-

Tabella 10 - L'International Prognostic Scoring System – IPSS

Ad ogni fattore viene attribuito un punto e così, a seconda del numero di fattori presenti, è possibile suddividere i pazienti in quattro diversi gruppi di rischio:

GRUPPI DI RISCHIO E SOPRAVVIVENZA

- **basso rischio** (0 fattori prognostici negativi) con sopravvivenza mediana di 135 mesi,
- **rischio intermedio-1** (1 fattore) con sopravvivenza mediana di 95 mesi,
- **rischio intermedio-2** (2 fattori) con sopravvivenza mediana di 48 mesi,
- **alto rischio** (almeno 3 fattori) con sopravvivenza mediana di 27 mesi.

Tabella 11 – Gruppi di rischio e sopravvivenza nei pazienti con MF.

L'assenza di una sintomatologia soggettiva, livelli di emoglobina > 10 g/dl, piastrine > 100.000/microlitro ed una modesta splenomegalia, sono generalmente associati ad una sopravvivenza più lunga.

Dynamic International Prognostic Scoring System

Gli stessi parametri di prognosi utilizzati dall'IPSS sono stati successivamente integrati in uno **score prognostico tempo-dipendente**, applicabile in ogni momento della storia naturale della malattia, chiamato **DIPSS** (*Dynamic International Prognostic Scoring System*).

Ad ogni parametro viene assegnato un solo punto, ad eccezione dell'anemia, che sembra incidere maggiormente sulla prognosi ed alla quale, perciò, si assegnano 2 punti. Questo score permette di identificare i pazienti che presentano un decorso della malattia più aggressivo, così da poter orientare correttamente le scelte terapeutiche.

<i>DIPSS</i>	
0 punti	<i>BASSO</i>
1-2 punti	<i>INTERMEDIO-1</i>
3-4 punti	<i>INTERMEDIO-2</i>
5-6 punti	<i>ALTO</i>

Tabella 12 – DIPSS (Dynamic International Prognostic Scoring System).

Dynamic International Prognostic Scoring System- plus

Ancora più recentemente il DIPSS è stato modificato con l'aggiunta di tre ulteriori fattori di rischio, che comprendono lo **stato di trasfusione-dipendenza**, la **piastrinopenia** (PLT < 100.000/ μ l) e un **cariotipo sfavorevole**.

Sulla base del numero di fattori presenti, è possibile suddividere i pazienti in quattro gruppi di rischio:

<i>GRUPPI DI RISCHIO secondo il DIPSS-plus</i>	
<i>basso rischio</i>	(nessun fattore di rischio) con sopravvivenza mediana di 15.4 anni,
<i>rischio intermedio-1</i>	(1fattore) con sopravvivenza mediana 6.5 anni,
<i>rischio intermedio-2</i>	(2-3 fattori) con sopravvivenza mediana 2.9 anni,
<i>alto rischio</i>	(almeno 4 fattori) con sopravvivenza mediana 1.3 anni.

Tabella 13 – Gruppi di rischio secondo il DIPSS plus.

Evoluzione e complicanze

Sono considerati segni prognostici avversi, al momento della diagnosi:

- età avanzata (> 70 anni),
- Hb < 10 g/dl,
- Blasti nel sangue periferico > 2%,
- Eritroblasti circolanti > 2%,
- Leucociti > 20 x 10⁹/L,
- Piastrine < 300 x 10⁹/L,
- Marcata splenomegalia,
- Presenza di sintomi costituzionali,
- Anomalie citogenetiche.

Le principali complicazioni delle fasi più avanzate della malattia, sono:

- evoluzioni in leucemia acuta;
- infezioni;
- emorragie;
- ipertensione portale, con formazione di varici esofagee, trombosi della vena Porta e/o trombosi splenica;
- insufficienza epatica secondarie a trombosi splacnica o a metaplasia mieloide;
- fenomeni trombotici in genere.

I pazienti affetti da mielofibrosi presentano un rischio trombotico più elevato rispetto a quello della popolazione generale, con un'incidenza pari a 2 eventi ogni 100 pazienti/anno. Tali eventi riguardano più frequentemente pazienti con età superiore a 60 anni, portatori della mutazione *V617F* di *JAK2*.

L'evoluzione leucemica è un evento riportato nel 5-30% dei pazienti affetti da mielofibrosi. Deve essere sospettata quando si assiste ad un sensibile aumento o riduzione dei leucociti o ad una drastica riduzione di piastrine ed emoglobina con febbre e manifestazioni emorragiche. Queste leucemie sono caratterizzate, nella maggior parte dei casi, da tipiche alterazioni del cariotipo, quali delezioni parziali o totali dei cromosomi 5 e/o 7 e del cromosoma 17.

Le cause di decesso sono soprattutto:

- scompenso cardiaco causato dall'anemia cronica;
- complicanze infettivo e/o emorragiche, causate dalla grave neutropenia e severa piastrinopenia della fase terminale di malattia;
- evoluzione in leucemia acuta mieloblastica, che interessa il 10-20% dei pazienti.

Terapia

L'atteggiamento terapeutico è diverso a seconda del quadro clinico di ciascun paziente.

- Nel paziente *asintomatico*, senza voluminosa splenomegalia, è possibile, in alcuni casi, adottare un approccio di sola osservazione e controllo, senza alcun tipo di terapia (*watch and wait*); oppure si possono effettuare cicli di terapie di diverso tipo alternati a periodi liberi da terapia (variabili da mesi ad anni) con controlli periodici.
- Nel paziente *sintomatico*, che presenta un quadro clinico caratterizzato da citopenie periferiche o, al contrario, da marcata mieloproliferazione (splenomegalia, leucocitosi, piastrinosi), è invece indicato un trattamento, che nella maggior parte dei casi è sintomatico.

Solitamente viene iniziato un trattamento quando comincia a manifestarsi anemia che, all'inizio, viene trattata con terapia trasfusionale. In genere poi l'anemia tende ad aumentare con la progressione della malattia e l'incremento della splenomegalia, ed, in questi casi, la terapia trasfusionale può non essere più sufficiente per cui verranno introdotte nuovi trattamenti.

Non essendo attualmente presente un farmaco specifico per la mielofibrosi, il trattamento, ad oggi, è di tipo sintomatico e viene impostato in base al quadro clinico del paziente.

Anemia:

I farmaci utilizzabili per il trattamento delle citopenie periferiche sono: corticosteroidi, androgeni anabolizzanti, eritropoietina, trasfusioni di sangue e farmaci immunomodulatori.

La *terapia corticosteroidica* (solitamente prednisone 0.5-1 mg/kg al giorno) risulta efficace in circa il 30% dei pazienti. L'ipertensione arteriosa, il diabete mellito e l'obesità, costituiscono, però, una controindicazione all'assunzione di tale terapia.

Tra gli *androgeni anabolizzanti*, il più utilizzato è il Danazolo, che alla dose di 600 mg/die consente di ottenere, nell'arco di pochi mesi, una risposta nel 30-40% dei

pazienti affetti da mielofibrosi. Questi farmaci sono però gravati da tossicità prevalentemente epatica e sono sconsigliati in pazienti con patologia prostatica.

L'*eritropoietina* consente di ottenere una risposta sull'anemia in una percentuale di pazienti variabile dal 16 al 60% (dato variabile a seconda degli studi). La probabilità di ottenere un miglioramento dell'anemia, con aumento dei livelli di emoglobina, è maggiore se il livello basale di eritropoietina è inferiore a 125 mU/ml e se non vi è stato ancora fabbisogno trasfusionale.

Le *trasfusioni di sangue* sono utili nei pazienti con gravi forme di anemia o in pazienti con forme di anemia acuta e consentono di ripristinare i livelli di emoglobina, alleviando i sintomi tipici, quali la fatigue e la debolezza. Ben presto, però, questi pazienti diventano trasfusione-dipendenti.

I *farmaci immunomodulatori* agiscono grazie alla loro attività anti-angiogenetica, anti-infiammatoria, anti-proliferativa, immunoregolaria e pro-eritropoietica. Uno fra questi è la Talidomide a basse dosi (50 mg/die) che, in associazione al prednisone, consente un controllo dell'anemia nel 62% dei casi, della piastrinopenia nel 75% dei casi e della splenomegalia nel 19% dei casi. Risultati meno soddisfacenti sono stati riscontrati, invece, con la Talidomide a basse dosi in monoterapia, con risposte del 22% per l'anemia e la piastrinopenia e del 19% per la splenomegalia. Il maggior effetto collaterale legato all'utilizzo della Talidomide è costituito dall'insorgenza di una neuropatia periferica.

La **Talidomide** è un farmaco che fu venduto negli anni cinquanta e sessanta come sedativo, anti-nausea e ipnotico, rivolto in particolar modo alle donne in gravidanza. Poi fu riscontrato essere teratogeno e ritirato dal commercio. L'effetto di inibizione dell'angiogenesi e la selettiva inibizione della sintesi del *TNF α* da parte del farmaco hanno riacceso l'interesse clinico per l'uso della talidomide in molte patologie. La molecola è risultata inibire la protein-chinasi alfa (*IKK α*) della proteina *I κ B*, un inibitore endogeno del fattore di trascrizione *NF- κ B*. Questo fattore è attivamente coinvolto nella proliferazione delle cellule tumorali e nella sintesi di molte citochine, come l'interleuchina-1, l'interleuchina-6 ed il fattore di necrosi tumorale (*TNF- α*). L'*IL-6* ed il *TNF α*

sono responsabili della sintomatologia febbrile, dolorosa e osteolitica nei pazienti colpiti da numerose malattie, soprattutto neoplastiche come la mielofibrosi ed il mieloma multiplo. La talidomide, interferendo col fattore *NF- κ B*, semplicemente sopprime la loro produzione.

Un'alternativa può essere la Lenalidomide, derivato della Talidomide, alla dose di 10 mg/die, per 3-4 mesi, in associazione o meno alla terapia corticosteroidea, che consente un buon controllo dell'anemia (22% dei casi) e della piastrinopenia (50% dei casi).

Lenalidomide è un farmaco derivato dalla talidomide, impiegato soprattutto nel trattamento del mieloma multiplo e delle sindromi mielodisplastiche. Si tratta di un agente immunomodulante, che interferisce sull'attività del sistema immunitario.

In vitro, la lenalidomide ha tre attività principali: favorisce l'apoptosi delle cellule tumorali (effetto citotossico diretto), inibisce il microambiente che sostiene lo sviluppo e la sopravvivenza delle cellule tumorali attraverso un effetto anti-angiogenico e anti-osteoclastogenico (effetto citotossico indiretto), e modifica l'attività del sistema immunitario stimolando alcune cellule ad attaccare (effetto immunomodulante). Questo ampio spettro di attività viene sfruttato per trattare diversi tipi di neoplasie ematologiche e neoplasie solide.

In ultimo, la **Pomalidomide**, che è stata recentemente utilizzata in uno studio randomizzato in doppio cieco (condotto presso la Mayo Clinic, USA) su 58 pazienti con mielofibrosi ed anemia. Di questi, 16 pazienti sono risultati negativi per la mutazione JAK2V617F e 42 positivi per la stessa mutazione. L'efficacia del farmaco sull'anemia si è rivelata pari allo 0% per il gruppo dei 16 pazienti negativi alla mutazione ed intorno al 24% per quelli JAK2 positivi. In particolar modo, fra i pazienti JAK2+, si è riscontrata una maggiore risposta per quelli che non presentavano splenomegalia (milza < 10 cm) rispetto a coloro che, all'esame obiettivo, avevano evidente splenomegalia (dimensioni della milza > 10 cm). La Pomalidomide veniva somministrata alla dose di 0,5 o 2 mg/die con o senza associazione di steroide ed, in generale, è stato concluso che risultava efficace per controllare l'anemia nel 20-40% dei casi, a seconda del braccio di trattamento, con scarsa tossicità ematologia (solitamente mielosoppressione) e senza

complicanze neurologiche (neuropatie e trombosi). Si è notato che l'aumento dei basofili sembra essere un fattore predittivo di risposta alla terapia. Inoltre, questo farmaco si è dimostrato efficace sulla piastrinopenia in pazienti con conta piastrinica < 100.000/microlitro nel 58% dei casi, purtroppo però non ha dimostrato nessuna efficacia sul trattamento della splenomegalia. E' stato tuttavia dimostrato che l'aumento della dose del farmaco, fino a 2 mg/die, non migliora l'efficacia sull'anemia.

A seguito di questo studio sono stati ipotizzati algoritmi per il trattamento dell'anemia nel paziente con mielofibrosi, elaborati in base ai dati raccolti dai diversi studi.

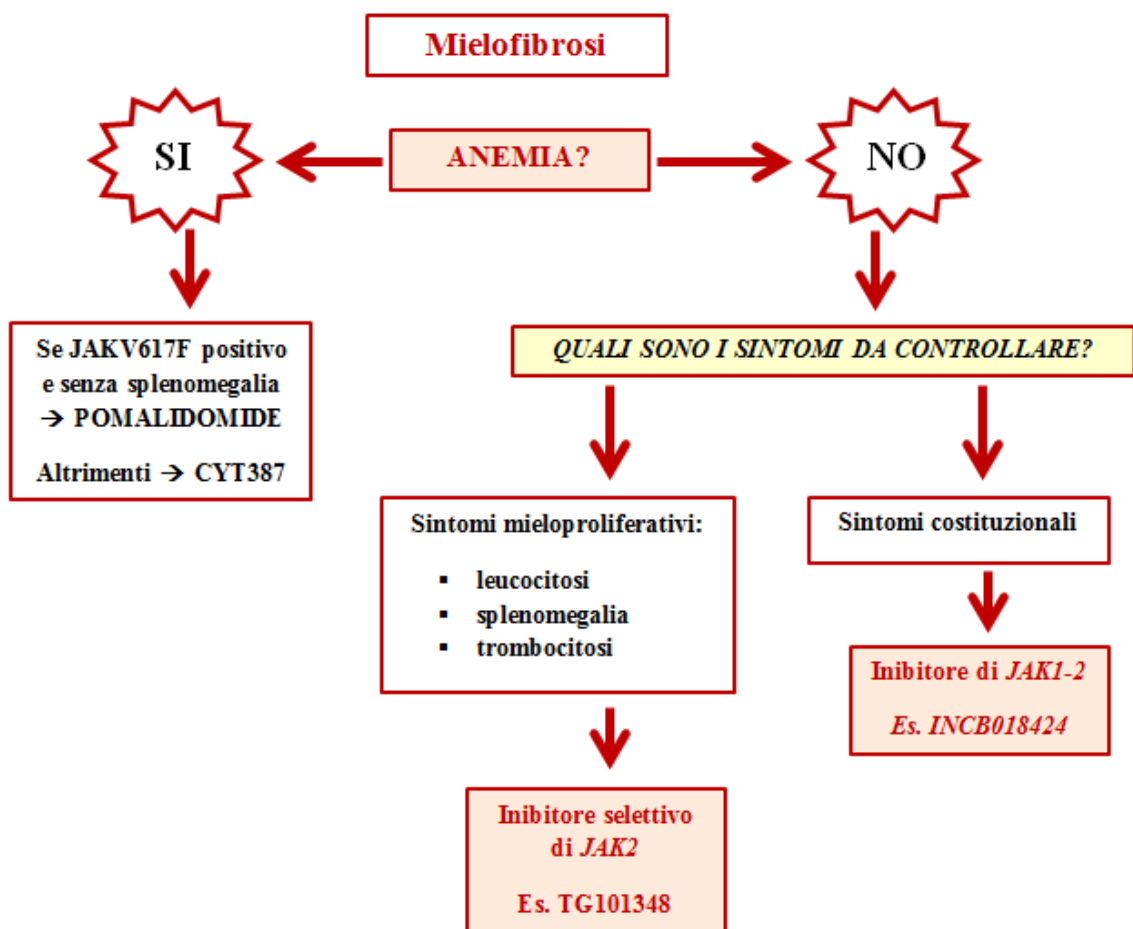


Figura 9 – Algoritmo trattamento mielofibrosi associata ad anemia.

Splenomegalia, leucocitosi e piastrinosi:

Nei pazienti con spiccata mielo-proliferazione (splenomegalia, leucocitosi, piastrinosi), la terapia di prima linea è rappresentata dall'Idrossiurea (Oncocarbide) con dose iniziale di 500 mg due volte al giorno.

L'**Idrossiurea** è un farmaco a somministrazione orale che sembra inibire la sintesi del DNA e quindi prevenire la divisione cellulare, ma non interferisce con i processi di produzione dell'RNA e delle proteine. Sebbene il meccanismo di azione esatto di tale farmaco resta ancora abbastanza sconosciuto, alcuni studi suggeriscono che la sintesi del DNA venga bloccata per interferenza con l'attività di un enzima dal ruolo fondamentale nel processo di proliferazione.

Gli effetti collaterali più comuni dell'idrossiurea sono:

- Mielosoppressione,
- Nausea e vomito,
- Diarrea,
- Stipsi,
- Variazioni/alterazioni dell'epidermide.

Altri farmaci utilizzabili sono: gli agenti alchilanti (Busulfano, Melphalan) e la Cladribina, gravati però da un maggior rischio di mielo-soppressione.

Gli **Agenti alchilanti** sono composti planari in grado di inserire gruppi alchilici all'interno di macromolecole di composti organici, come ad esempio proteine e DNA. Gli alchilanti sono in grado di agire a livello della catena del DNA provocando appaiamenti errati e rotture all'interno dei filamenti, che possono generare errori durante la fase di replicazione cellulare ed hanno, quindi, un effetto genotossico che può in alcuni casi renderli dei carcinogeni.

L'azione citotossica degli agenti alchilanti si presenta con intensità molto maggiore nelle cellule in riproduzione, ed ha un effetto lineare dose\risposta. Poiché il loro effetto aumenta linearmente di intensità all'aumentare della

concentrazione assunta da un organismo, gli agenti alchilanti vengono utilizzati con controllo meticoloso.

Gli alchilanti utilizzati nel trattamento della mielofibrosi sono soprattutto le mostarde azotate, della quali fa parte il Melphalan ed i sulfoni, di cui fa parte il busulfano.

La **Cladribina** (2CdA o cloro-deossiadenosina) è un farmaco chemioterapico solitamente utilizzato nella terapia della tricoleucemia.

In quanto analogo delle purine agisce sia come chemioterapico, sia come immunosoppressore. Chimicamente esso mima il nucleotide adenosina ed inibisce l'enzima adenosina deaminasi, che interviene per processare il DNA.

Viene facilmente distrutto dalle cellule ad esclusione di quelle ematiche, garantendo quindi pochi effetti collaterali ed una grande precisione nel bersaglio terapeutico.

Altre tipologie di trattamento della mielofibrosi

La **splenectomia**, oggi meno utilizzata che in passato, può essere considerata una tipologia di trattamento della splenomegalia. E' indicata, però, solo in caso di:

- splenomegalia massiva sintomatica (con dolore intenso e persistente), refrattaria alla terapia citoriduttiva,
- paziente con anemia trasfusione-dipendente;
- piastrinopenia molto severa;
- ipertensione portale sintomatica.

E' utile ricordare che l'approccio chirurgico è efficace solo nel 50% dei casi e spesso può comportare numerose complicanze trombotiche e/o emorragiche che possono anche essere fatali per il paziente.

Tale procedura, infatti, è gravata da un rischio di mortalità peri-operatoria del 5-10% e da una morbilità (costituita per lo più da trombosi venosa a livello addominale ed infezioni) pari al 25% circa.

La **radioterapia a basse dosi** trova spazio nel trattamento delle mielofibrosi in cui si evidenziano sedi di ematopoiesi extramidollare non epato-splenica, oppure nei casi di splenomegalia refrattaria alle terapie standard, e sembra dare un beneficio transitorio di circa 3-6 mesi.

Trapianto allogenico di cellule staminali

L'unica terapia potenzialmente in grado di guarire la mielofibrosi, ad oggi, è il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche; tale procedura è tuttavia gravata da un elevato rischio di complicanze e di mortalità peri-trapiantologica (che varia dal 18-40%, a seconda dei regimi di condizionamento utilizzati) 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).

Esistono studi incentrati sull'efficacia del trapianto allogenico a lungo termine sulla sopravvivenza a lungo libera da malattia (DSF). In questo studio, pubblicato su "Biology of blood and marrow transplantation", furono analizzati i dati di 289 affetti da mielofibrosi e sottoposti a trapianto allogenico tra il 1989 ed il 2002, dalla banca dati del Centro per Bone Marrow Transplant Internazionale di Ricerca (CIBMTR). L'età media dei pazienti sottoposti a trapianto era di 47 anni (range: 18-73 anni). I donatori erano fratelli HLA identici in 162 casi, individui non imparentati in 101 casi e familiari HLA non identici in 26 casi. 65 pazienti su 289 avevano subito una splenectomia pre trapianto e tutti sono stati trattati con gli stessi regimi di condizionamento e di graft-versus-host disease (GVHD) profilassi. La mortalità correlata al trattamento nei primi 100 giorni post trapianto è stata del 18% per i trapianti tra fratelli HLA identici, del 35% per i trapianti non collegati, e del 19% per i trapianti da donatori relativi alternativi. La sopravvivenza globale calcolata a 5 anni (OS) era rispettivamente del 37%, 30% e 40%. In conclusione, si può considerare che il trapianto allogenico nei pazienti con mielofibrosi crea una sopravvivenza a lungo termine in circa il 33% dei casi, un terzo dei pazienti.

Terapie sperimentali:

Attualmente sono in fase di studio diversi farmaci a bersaglio molecolare, appartenenti alla categoria dei farmaci *JAK1/JAK2*-inibitori. Alcuni di questi studi hanno superato la fase preclinica e sono in corso sperimentazioni cliniche su pazienti con mielofibrosi in fase avanzata.

Tali farmaci interferiscono in maniera più o meno selettiva con l'attività della proteina *JAK2*. Si sono dimostrati efficaci, in particolar modo, nel controllo della splenomegalia e nella riduzione dei sintomi sistemici, indipendentemente dalla presenza della mutazione del gene *JAK2 (V617F)*.

Da poco, in Europa, è stato approvato Ruxolitinib, farmaco che inibisce l'attività tirosin-chinasica di *JAK2* e *JAK1*, il primo (*JAK2*) coinvolto nell'emopoiesi, il secondo (*JAK1*) nello sviluppo del sistema infiammatorio. Questo farmaco va a bloccare la via di trasduzione del segnale *JAK/STAT*, indipendentemente dalla mutazione che ne sostiene l'attivazione. Spegnendo questa via cellulare, contiene l'iperpoliferazione cellulare tipica della malattia.

L'attività di Ruxolitinib si esplica in due punti: riduzione della splenomegalia, che risulta essere un fattore limitante la qualità della vita, e riduzione dei sintomi sistemici, come febbre, sudorazione, prurito, dolori ossei e fatigue. E' stato visto che una buona parte dei pazienti, con la somministrazione del farmaco, riacquista peso e migliora la propria qualità della vita.

Lo studio di fase III COMFORT (effettuato negli USA) che confrontava Ruxolitinib con placebo ha mostrato un aumento della sopravvivenza nel gruppo trattato con ruxolitinib. In letteratura ci sono stati altri due studi che hanno affrontato il problema. Nello studio dei ricercatori della Mayo Clinic, la sopravvivenza di 51 pazienti trattati con ruxolitinib, è stata confrontata con quella di una coorte storica non matchata di 410 pazienti trattati, nello stesso centro, con trattamento convenzionale. In questo caso, però, non sono state riscontrate differenze in termini di sopravvivenza.

Un altro trial condotto in Italia, in collaborazione con l'MD Anderson Cancer Center di Huston ha confrontato la sopravvivenza di 107 pazienti trattati in trattamento con ruxolitinib con quella di 310 pazienti americani ed italiani trattati con terapie

convenzionali, ma che avevano le stesse caratteristiche dei pazienti trattati con ruxolitinib.

Ruxolitinib è somministrato per via orale in compresse da 5 mg solitamente in due dosaggi: 10 mg BID e 15 mg BID, variando la dose in base al numero delle piastrine.

- 15 mg BID per piastrine tra 100.000 e 200.000/microL
- 20 mg BID per piastrine superiori a 200.000/microL

Altri farmaci, appartenenti sempre alla famiglia degli inibitori delle tirosin-chinasi sono stati introdotti nell'uso clinico, all'interno di protocolli, come ad esempio INCB01424.

L'utilizzo di questo inibitore di *JAK1/2* in 39 pazienti con trombocitemia essenziale e 34 pazienti con nella policitemia vera risultati intolleranti/refrattari all'idrossiurea, ha portato i seguenti risultati.

Nella trombocitemia essenziale, con la somministrazione di INCB01424, si ottiene una risposta completa (CR) nel 26% dei pazienti contro risposte > 80% con busulfano (con assenza di evoluzione leucemica in pazienti con età inferiore a 60 anni dopo 72 mesi; Svidel L, et al. *Leukemia*. 2007; 21: 2071-2072) e contro il 76% di risposta completa con PEG-Interferone (associata a casi di remissione molecolare; Quintà Cardama A, et al. *J. Clin Oncol*. 2009; 27: 5418-5424)

Nella policitemia vera, con la somministrazione di INCB484, si ottiene una risposta completa (CR) nel 50% dei casi contro risposte di: 80% con PEG-Interferone (associata a casi di remissione molecolare; Quintà Cardama A, et al. *J. Clin Oncol*. 2009; 27: 5418-5424), 80% con Pipobromano (Najman A., et al. *Blood*; 182;59: 890-894), più dell'80% con busulfano (Messinezy M, et al. *Br. J. Haematol*. 1985; 61: 667-666; D'Emilio A, et al. *Br Haematol*, 1987; 65: 121-122.)

Farmaci sperimentali in studio sono molti, principalmente:

Farmaci inibitori di JAK, ATP mimetici, nei trial clinici delle mielofibrosi

	Anti-JAK2 IC50 (selettività per JAK1/JAK3)	Target non appartendenti alle chinasi JAK
INCB018424 (Studio fase 1/2) N=153	5.7 nM (x1.0/x98)	Nessuna delle 28 protein chinasi valutate
TG101348 (Studio fase 1/2) N=59	3 nM (x35/x332)	FLT3 RET
CYT387 (Studio fase 1/2) N=60	18 nM (x0.6/x8.6)	JNK1 CDK2
CEP-701 (Studio fase 1/2)	1 nM (x7/x3)	FLT3 TrkA
SB1518 (Studio fase 1/2)	22 nM (x58/x24)	FLT3
AZD1480 (Studio fase 1/2)	0.26 nM (x5/x15)	TrkA Aurora A FGFR1
LY2784544 (Studio fase 1/2)	Dati insufficienti	Dati Insufficienti

Figura 10 – Farmaci sperimentali attualmente in studio per il trattamento della mielofibrosi.

In conclusione, ad oggi, l'algoritmo per il trattamento della mielofibrosi può essere così riassunto:

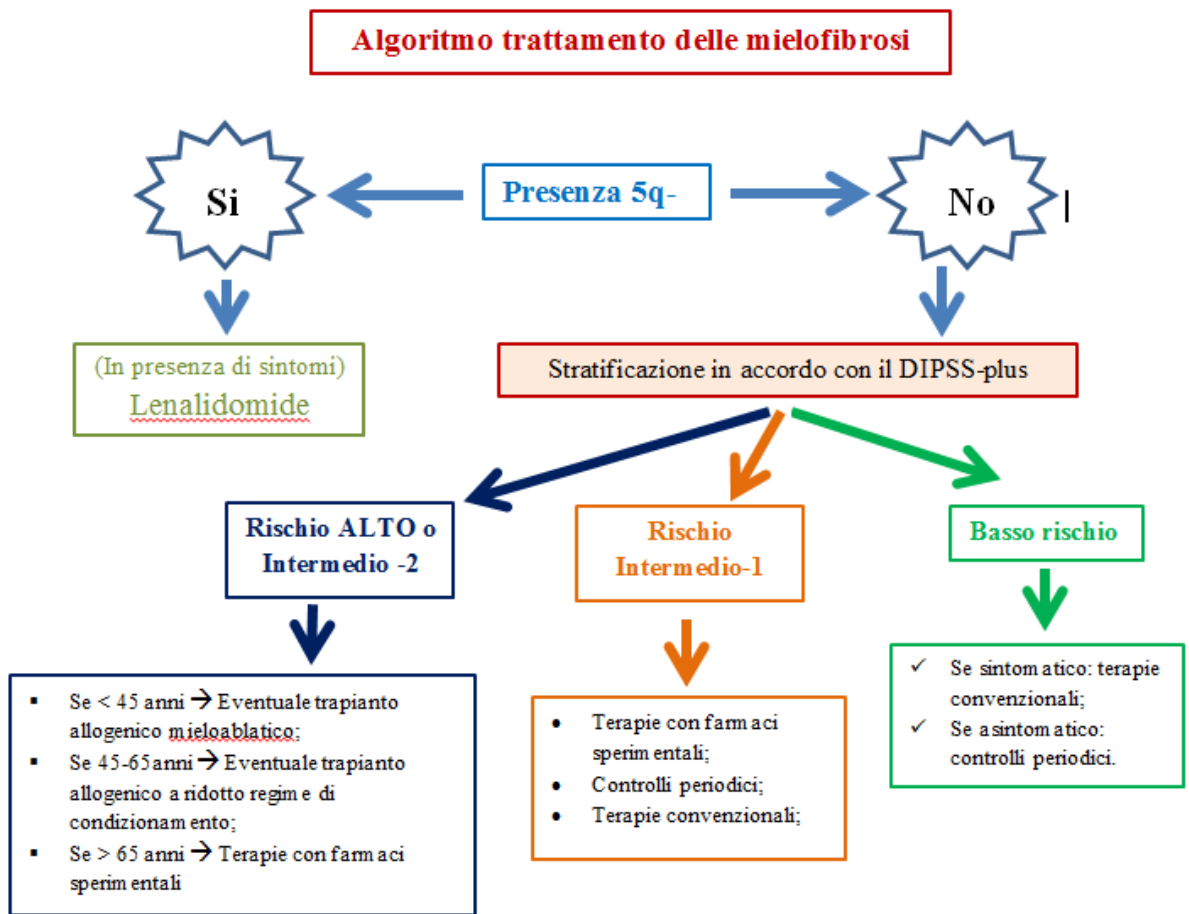


Figura 11 – Algoritmo per il trattamento della mielofibrosi.

CAPITOLO 2

Obiettivi della tesi

1. Confronto dei dati sulla efficacia, sicurezza e tossicità del farmaco ruxolitinib (INC424) somministrato all'interno dello studio in aperto, multicentrico, di accesso allargato CINC424A2401 a pazienti con mielofibrosi primaria e secondaria (post-policitemia vera e post-trombocitemia essenziale) seguiti presso la UO Ematologia di Pisa, con i risultati degli studi COMFORT I e COMFORT II (i trials che hanno portato all'approvazione di ruxolitinib in Europa e negli USA).
2. Studio dei profili di espressione dei miRNA negli stessi pazienti di cui sopra con l'intento di investigarne la funzione in relazione ai geni targets.

CAPITOLO 3

3.1 Gli Studi COMFORT

(COntrolled MyeloFibrosis study with Oral JAK2 Inhibitor Treatment)

Gli studi *COMFORT* (*COMFORT-I* e *COMFORT-II*) sono studi di fase III tesi a valutare l'efficacia e la sicurezza del farmaco Ruxolitinib, inibitore selettivo di *JAK1/2*, per il trattamento della mielofibrosi, primitiva (MFI) o secondaria (MF post-PV e MF post-TE). Ruxolitinib è stato approvato nel 2011 dalla *US Food and Drug Administration (FDA)* per il trattamento della mielofibrosi a rischio Intermedio-alto. [Jakafi (ruxolitinib) Wilmington, 2011; Novartis drug Jakavi first medication to receive European Commission approval to treat patients with myelofibrosis, 2013].

Più recentemente, anche la *Health Canada* e la *European Commission* ne hanno consentito l'utilizzo per il trattamento della mielofibrosi accompagnata da splenomegalia e sintomi sistemici legati alla malattia. [Jakavi (ruxolitinib) product monograph; 2012.]

Lo studio *COMFORT-I* era un studio in doppio cieco controllato con il placebo; *COMFORT-II*, invece, era uno studio aperto che metteva a confronto l'efficacia e la sicurezza di Ruxolitinib versus la miglior terapia attualmente in commercio per il trattamento della mielofibrosi (*BAT, best available therapy*). In entrambi gli studi, è stato riscontrato che i pazienti che ricevevano Ruxolitinib mostravano riduzioni rapide e durevoli delle dimensioni della milza, miglioramenti dei sintomi costituzionali associati alla malattia ed, in generale, miglioramenti notevoli della qualità di vita. Al contrario, i pazienti all'interno degli stessi studi ma nei gruppi di controllo (con placebo o con *BAT*), avevano generalmente aumenti della splenomegalia e peggioramento dei sintomi costituzionali legati alla malattia.

Lo studio COMFORT-I

Lo studio *COMFORT-I* è stato condotto prevalentemente negli U.S.A. ed ha avuto lo scopo di confrontare l'efficacia e la sicurezza del nuovo farmaco *JAK1/JAK2* inibitore, Ruxolitinib, somministrato alle dosi di 15-20 mg BID, con placebo, in una coorte di 299

pazienti [Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al., 2012].

L'endpoint primario dello studio era la valutazione della riduzione delle dimensioni spleniche > del 35%, dal basale alla Settimana 24, misurato con tecniche di imaging o con l'esame obiettivo ogni 12 settimane, fino alla Settimana 72. Tra gli endpoints secondari si collocavano il mantenimento nel tempo di tale riduzione della splenomegalia e la percentuale di soggetti che raggiungono > 50% di riduzione dei sintomi costituzionali dal baseline alla settimana 24 di trattamento. Venivano ammessi allo studio *COMFORT-I* tutti i pazienti affetti da MFI, MF post-PV e MF post-TE, indipendentemente dalla presenza della mutazione *JAK2 V617F*, che soddisfacevano i seguenti criteri:

Criteri di inclusione per lo studio COMFORT-I

<i>Criteri di inclusione nello studio COMFORT-I</i>
1. Maschio o femmina con età > 18 anni;
2. Diagnosi di MFI, MF post-Pv o MF post-TE secondo i criteri WHO (<i>World Health Organization</i>) 2008;
3. Almeno 2 fattori di rischio prognostici, come definito dall'IWG (<i>International Working Group</i>); *
4. ECOG (<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>) performance status;
5. Milza palpabile > di 5 cm l di sotto dell'arcata costale;
6. Nessun precedente trattamento con un inibitore di JAK1/2.

* L'International Working Group (IWG) ha definito fattori di rischio:

Età > di 65 anni;

presenza di sintomi costituzionali (perdita di peso, febbre, suorazione notturna)

Anemia marcata (Hb < 10 g/dL)

Leucocitosi (Storia di WBC > di 25 x 10⁹/L)

Blasti circolanti > 1%

Tabella 14 – criteri di inclusione nello studio COMFORT-I

Criteria di esclusione per lo studio COMFORT-I

<i>Criteria di esclusione dello studio COMFORT-I</i>
1. Aspettativa di vita < a 6 mesi;
2. Inadeguata riserva midollare;
3. Insufficienza epatica e/o renale;
4. Infezioni batteriche, micotiche, parassitarie o virali significative che richiedono un trattamento;
5. Tumore maligno attivo nei precedenti 5 anni, escludendo specifici tumori della cute.
6. Condizioni cardiache gravi;
7. Irradiazioni della milza nei precedenti 12 mesi.

Tabella 15 – criteri di esclusione dello studio COMFORT-I

La scelta della dose di Ruxolitinib (15 o 20 mg BID) era basata sulla conta piastrinica al basale, rispettivamente 100-200 x 10⁹/L o > 200 x 10⁹/L.

I sintomi costituzionali e la *Health-related QoL* (HRQoL) venivano valutati mediante *European Organisation for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire-Core 30 Items (EORTC QLQ-C30)*, cioè una serie di questionari fatti compilare ai pazienti al basale ed alle settimane 4, 8, 12, 16 e 24.

Lo studio COMFORT II

Lo studio *COMFORT-II*, condotto sia negli U.S.A. che in Europa su 219 pazienti, era uno studio randomizzato di fase III, in doppio cieco, con inibitore *JAK1/JAK2 (INCB018424)* orale, verso la miglior terapia attualmente disponibile in commercio (*best available therapy, BAT*), in pazienti con mielofibrosi primaria (MF), mielofibrosi post-policitemia vera o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. La “*Best available therapy, BAT*” includeva i migliori agenti disponibili in commercio per il trattamento della MF (in monoterapia o in combinazione) oppure la sola osservazione.

Anche in questo studio l'endpoint primario era la diminuzione del volume della milza > del 35%, dal basale alla Settimana 48, misurato con tecniche di imaging quali MRI o

TC ogni 12 settimane fino alla Settimana 72. Tra gli endpoints secondari, la sopravvivenza libera da leucemia, la sopravvivenza globale, quella libera da progressione e la durata del mantenimento di una riduzione > 35% rispetto al basale del volume della milza;

Criteri di inclusione per lo studio COMFORT –II

Venivano ammessi allo studio *COMFORT-II* tutti i pazienti affetti da MFI, MF post-PV e MF post-TE, indipendentemente dalla presenza della mutazione *JAK2 V617F*, che soddisfacevano i seguenti criteri:

<i>Criteri di inclusione dello studio COMFORT-II</i>
1. Maschio o femmina con età > di 18 anni;
2. Diagnosi di MFI, MF post-PV o MF post-TE secondo i criteri WHO (World Health Organization) 2008;
3. Almeno 2 fattori di rischio prognostici, come definito dall'IWG (International Working Group); *
4. Conta dei blasti nel sangue periferico < 10%;
5. ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance Status di 0-3;
6. Milza palpabile > di 5 cm al di sotto dell'arcata costale;
7. Deve essere in un "regime terapeutico stabile" almeno 2 settimane dallo screening ed almeno 4 settimane dal baseline;
8. Nessun precedente trattamento con inibitore JAK1/2.

* L'International Working Group (IWG) ha definito fattori di rischio:

Età > di 65 anni;

presenza di sintomi costituzionali (perdita di peso, febbre, suorazione notturna)

Anemia marcata (Hb < 10 g/dL)

Leucocitosi (Storia di WBC > di 25 x 10⁹/L)

Blasti circolanti > 1%

Tabella 16 – Criteri di inclusione dello studio COMFORT-II.

Criteria di esclusione per lo studio COMFORT-II

<i>Criteria di esclusione dello studio COMFORT-II</i>
1. Aspettativa di vita > di 6 mesi;
2. Inadeguata riserva midollare;
3. Storia di episodi di conta piastrinica < 50000/mL o ANC < 500/microL, tranne che durante l'assunzione di precedenti terapie per malattie mieloproliferative croniche o in trattamento con sostanze citotossiche;
4. Insufficienza epatica e/o renale;
5. Infezioni batteriche, micotiche, parassitarie o virali significative che richiedono un trattamento;
6. Tumore maligno attivo nei precedenti 5 anni, escludendo tumori specifici della cute;
7. Condizioni cardiache gravi;
8. Irradiazioni della milza negli precedenti 12 mesi.

Tabella 17 – Criteri di esclusione dello studio COMFORT-II.

Risultati degli studi COMFORT-I e COMFORT-II

Le analisi degli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II* sono state effettuate quando tutti i pazienti arruolati nei due protocolli sono giunti alla settimana 24 (data cut-off, 2 Novembre 2010) [Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio J, et al., 2012] di arruolamento per lo studio *COMFORT-I* ed alla settimana 48 (data cut-off 4 Gennaio 2011) [Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al., 2012] per lo studio *COMFORT-II*.

Nell'analisi dei dati relativi al follow-up a tre anni dello studio *COMFORT-II*, i pazienti trattati con Ruxolitinib avevano ottenuto un vantaggio per quanto riguarda la sopravvivenza globale rispetto ai pazienti che avevano ricevuto la terapia tradizionale.

In particolare, 51,4% dei pazienti trattati con Ruxolitinib avevano conseguito una riduzione $\geq 35\%$ delle dimensioni della milza rispetto ai valori basali. I pazienti avevano continuato a mantenere la risposta splenica, con una riduzione mediana delle dimensioni della milza. Complessivamente 191 pazienti sono stati esposti a Ruxolitinib entro la data di cut-off, 146 pazienti sono stati inizialmente randomizzati al trattamento con

Ruxolitinib e 45 pazienti sono passati a Ruxolitinib dopo essere stati inizialmente assegnati al braccio con la terapia tradizionale.

È stata osservata, inoltre, una riduzione del rischio di morte del 52% nel braccio con Ruxolitinib rispetto alla terapia tradizionale (HR=0,48; IC al 95%, 0,28-0,85; p=0,009) e la probabilità stimata di sopravvivenza globale era significativamente maggiore con Ruxolitinib rispetto alla terapia tradizionale (rispettivamente 81% rispetto al 61%) a 144 settimane.

Efficacia

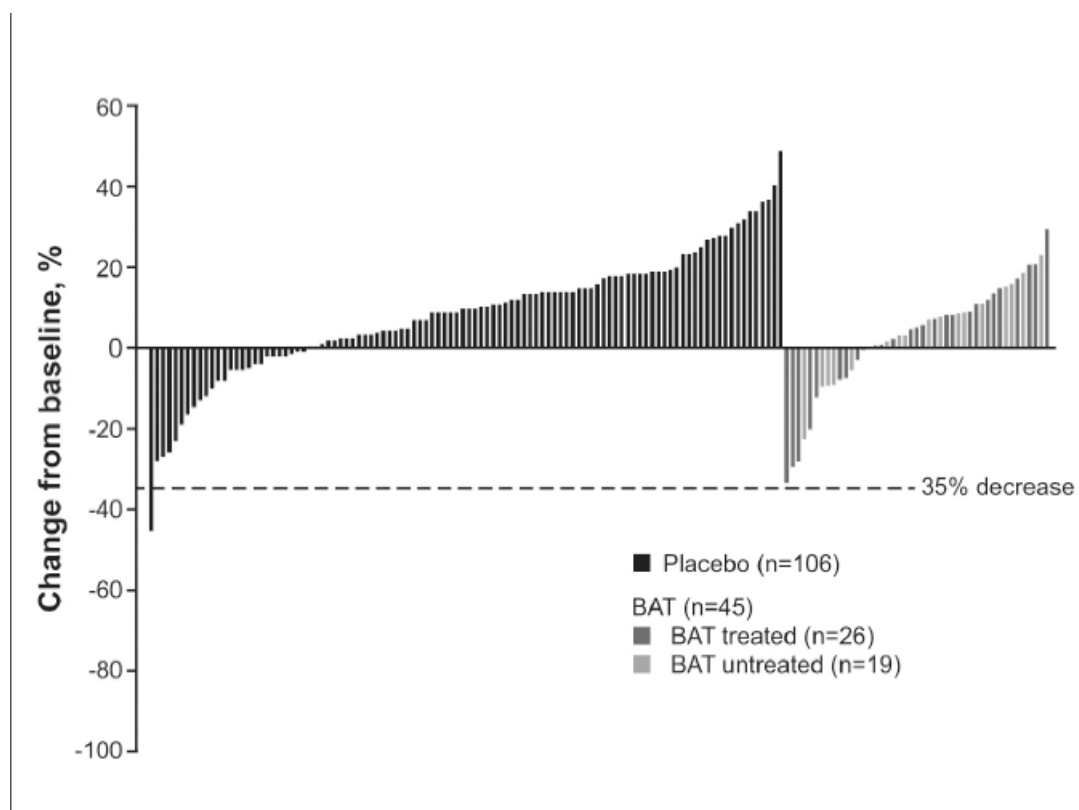


Figura 12 - Variazione in percentuale del volume della milza a partire dal valore basale, valutato mediante RMI o TC a distanza di 24 settimane.

Durante il periodo delle 24 settimane, la maggior parte dei pazienti trattati con placebo (75%) o *BAT* (79%) hanno avuto incrementi misurabili del volume della milza. Del gruppo dei pazienti *BAT*, una proporzione simile di pazienti *BAT-trattati* (18 di 26, 69%) rispetto a coloro che non avevano ricevuto alcun trattamento farmacologico (13 di 19, 68%) aveva la milza aumentata di volume.

Alla settimana 24, né il braccio con placebo, né quello con *BAT* avevano riscontrato e riportato miglioramenti clinicamente significativi rispetto al basale, in base all'elaborazione dei dati delle *HRQoL* (Figura 3.) o dei punteggi assegnati ai sintomi (Figura 4.), mentre il sottogruppo *BAT-trattato* aveva mostrato un miglioramento clinicamente significativo in “*global health status/QoL*”.

Tra gli 80 pazienti dello studio *COMFORT-I* ed i 69 pazienti dello studio *COMFORT-II* che avevano mostrato durante lo studio una riduzione > o uguale al 35%, la probabilità che un paziente mantenesse una risposta con Ruxolitinib per almeno 24 settimane era, rispettivamente del 89% e dell'87%, mentre nel *COMFORT-II* la probabilità di mantenere una risposta per almeno 48 settimane era del 52%.

	COMFORT-I		COMFORT-II	
	Jakavi (N=155)	Placebo (N=153)	Jakavi (N=144)	Migliore terapia disponibile (N=72)
Tempi	Settimana 24		Settimana 48	
Numero (%) di soggetti con riduzione ≥35% del volume della milza	65 (41,9)	1 (0,7)	41 (28,5)	0
Intervalli di confidenza del 95%	34,1, 50,1	0, 3,6	21,3, 36,6	0,0, 5,0
Valore di p	<0,0001		<0,0001	

	COMFORT-I				COMFORT-II			
	Jakavi		Placebo		Jakavi		Migliore terapia disponibile	
Stato della mutazione di JAK	Positivo (N=113) n (%)	Negativo (N=40) n (%)	Positivo (N=121) n (%)	Negativo (N=27) n (%)	Positivo (N=110) n (%)	Negativo (N=35) n (%)	Positivo (N=49) n (%)	Negativo (N=20) n (%)
Numero (%) di soggetti con riduzione ≥35% del volume della milza	54 (47,8)	11 (27,5)	1 (0,8)	0	36 (32,7)	5 (14,3)	0	0
Tempi	Dopo 24 settimane				Dopo 48 settimane			

Figure 13 e 14 –Confronti dati degli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II*.

Ruxolitinib migliora anche i sintomi costitutivi associati alla malattia e la qualità della vita dei pazienti affetti dalla mielofibrosi. Nello studio *COMFORT-I* i sintomi della mielofibrosi sono stati raccolti attraverso il diario *MFSAF v2.0*, nient'altro che un diario elettronico che i pazienti compilavano quotidianamente. Una percentuale

significativamente più ampia di pazienti del gruppo che assumeva Ruxolitinib aveva ottenuto un miglioramento > o uguale al 50% del punteggio totale dei sintomi dal basale alla settimana 24, in confronto al gruppo con placebo. (Rispettivamente 49,5% e 5,3%, $p=0,0001$ utilizzando il test del chi quadrato)

Un miglioramento della qualità della vita nei pazienti che assumevano Ruxolitinib era stato valutato con uno strumento validato come il questionario *EORTC QLQ-C30* in entrambi gli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II*. Alla settimana 24 nello studio *COMFORT-I*, la variazione media del punteggio relativo allo stato di salute globale/qualità della vita era di +12,3 e -3,4 ($p<0,0001$), rispettivamente per Ruxolitinib e placebo.

Sicurezza

Le reazioni avverse del farmaco più frequentemente segnalate durante gli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II* sono state, dal punto di vista ematologico, anemia (82,4%), trombocitopenia (69,8%) e neutropenia (15,6%). Tali reazioni avverse sono, tutte e tre, dose-correlate.

Le tre reazioni avverse non ematologiche che si sono verificate con maggiore frequenza, in entrambi i protocolli di studio, sono state: ecchimosi (21,3%), vertigini (15%) e cefalea (13,9%).

Le tre anomalie di laboratorio che più frequentemente si sono verificate nei pazienti affetti da mielofibrosi in trattamento con Ruxolitinib sono state: l'aumento dell'alanina amino-transferasi (26,9%), l'aumento dell'aspartato amino-transferasi (19,3%) e l'ipercolesterolemia (16,6%).

Nel programma degli studi clinici la gravità delle reazioni avverse al farmaco è stata valutata sulla base dei *CTCAE*, che definiscono *grado 1* = lieve, *grado 2* = moderato, *grado 3* = grave, *grado 4* = potenzialmente fatale.

Nello studio *COMFORT-I*, 13 pazienti su 155 (8,4%) sono morti nel gruppo che assumeva Ruxolitinib, mentre 24 pazienti su 154 (15,6%) sono morti nel gruppo con placebo.

Nello studio *COMFORT-II*, 13 pazienti su 146 (8,9%) sono morti nel gruppo che assumeva Ruxolitinib, mentre 5 pazienti su 73 (6,8%) sono morti nel gruppo dei pazienti che assumevano la miglior terapia attualmente disponibile in commercio per il trattamento della mielofibrosi.

E' stata osservata una riduzione del rischio di morte del 52% nel braccio Ruxolitinib rispetto alla terapia tradizionale (HR=0,48; IC al 95%, 0,28-0,85; p=0,009) e la probabilità stimata di sopravvivenza globale era significativamente maggiore con Ruxolitinib rispetto alla terapia tradizionale (rispettivamente 81% rispetto al 61%) a 144 settimane.

In conclusione, in entrambi gli studi *COMFORT*, è stato dimostrato che un numero significativamente maggiore di pazienti che hanno ricevuto Ruxolitinib, rispetto al placebo (*COMFORT-I*) e rispetto alla *BAT* (*best available therapy, COMFORT-II*) ha avuto una rapida e durevole riduzione della splenomegalia, un miglioramento dei sintomi costituzionali e della qualità della vita e che questi miglioramenti si sono mantenuti per l'intero periodo di studio. [Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio J, et al., . 2012; Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al., 2012].

I dati di sopravvivenza sono stati recentemente riportati all'*EHA*, in Svezia, dove sono stati presentati anche i dati di un'analisi esplorativa della morfologia del midollo osseo, provenienti da una sperimentazione separata di fase I/II con Ruxolitinib rispetto a controlli storici di pazienti trattati con terapia tradizionale. Dopo quattro anni di trattamento con Ruxolitinib, la fibrosi del midollo osseo è migliorata nel 22% dei pazienti e si è stabilizzato nel 56% dei pazienti affetti da mielofibrosi. Un effetto sovrapponibile non è stato osservato con la terapia tradizionale a lungo termine. [Vannucchi, A, et al. Long-Term Outcomes From A Phase 3 Study Comparing Ruxolitinib With Best Available Therapy (BAT) For The Treatment of Myelofibrosis (MF): A 3 Year Update of Comfort II. Abstract #S1111.18th Congress of European Hematology Association (EHA). Stockholm, Sweden.].

3.2 miRNA

I microRNA (miRNA) sono una classe di corti RNA non codificanti che annovera un altissimo numero di molecole trascritte da numerosi geni sparsi nel genoma. Queste molecole agiscono a livello post-trascrizionale appaiandosi a regioni complementari di specifici RNA messaggeri bloccandone la traduzione. Il ruolo dei microRNA è stato confermato in molti processi fisiologici, quali la proliferazione, la differenziazione e morte cellulare, e l'ematopoiesi; alterazioni dell'espressione di queste molecole sono state osservate anche nella patogenesi di molte neoplasie. I miRNA, diffusi ubiquitariamente e molto conservati negli eucarioti superiori, sono molecole di RNA a singolo filamento di 19-25 nucleotidi, scoperte negli anni 90 nel nematode *C. elegans* (Lee et al., 1993). Essi sono trascritti dal genoma sia singolarmente, sia come gruppi di miRNA, sia congiuntamente ad altri geni. Caratteristica fondamentale utile alla definizione del miRNA è la molecola precursore, con la sua peculiare struttura secondaria. Proprio sull'identificazione dei precursori dei miRNA nel genoma si è basata la scoperta, ottenuta principalmente per via bioinformatica, degli oltre 700 miRNA umani attualmente conosciuti, oltre alle centinaia noti per le altre specie. L'azione del miRNA più frequentemente osservata negli organismi animali consiste nel legame alla sequenza 3'-UTR di un mRNA, il quale non potrà essere efficacemente tradotto in proteina. (Tong et al., 2008).

Al pari di ogni altro gene, un micro RNA può essere associato, in ragione della sua funzione biologica e della sua espressione specifica, ad uno stato fisiopatologico. Sin dalla loro scoperta, i miRNA sono oggetto di studio a tale proposito, e numerosissime pubblicazioni scientifiche negli ultimi anni hanno evidenziato correlazioni significative fra l'espressione di alcuni gruppi di miRNA e la presenza di determinate patologie, spesso neoplastiche (Blenkiron et al., 2007; Caldas et al., 2005; Calin et al., 2004; Cho et al., 2007; Stahlhut Espinosa et al., 2006).

Il meccanismo alla base della capacità dei miRNA di avere un ruolo attivo nello sviluppo del cancro può essere sintetizzato come segue: se un miRNA ha tra i suoi bersagli un determinato trascritto genico, e quel trascritto codifica per un oncosoppressore, un aumento dell'espressione locale del miRNA avrà l'effetto di favorire l'insorgenza o lo sviluppo di una neoplasia. Simile sarà chiaramente l'effetto della ridotta espressione di un miRNA che invece abbia tra i suoi bersagli un oncogene.

L'osservazione dell'espressione dei vari miRNA nelle neoplasie ha fornito la possibilità di individuare nell'espressione alterata di uno o più micro RNA, indipendentemente dalla conoscenza della loro funzione specifica, un marcatore identificativo di una determinata patologia potenzialmente utilizzabile come indicatore diagnostico con possibile impiego clinico. Nella maggior parte dei casi, questi studi sfruttano tecnologie di analisi su scala genomica, ovvero testano contemporaneamente l'espressione di tutti i miRNA conosciuti, utilizzando la tecnologia dei microarrays. Altri studi si basano invece sulla ricerca più circoscritta di gruppi ristretti di miRNA, con tecnologie standard come realtime PCR. La combinazione delle due tipologie di metodiche appare, al momento, la via di elezione per studi che intendano evidenziare, attraverso la determinazione dell'espressione dei miRNA, un loro ruolo diretto o indiretto nello sviluppo e nella progressione di patologie neoplastiche.

Naturalmente anche la mielofibrosi è stata oggetto di studio per quanto concerne l'espressione ed il ruolo dei miRNA: diversi studi hanno dimostrato nel corso degli anni che la regolazione dei MiRNA riveste un ruolo importante nella patogenesi del cancro [Calin G., et al PNAS 99:15524, 2002. Merritt MW et al N Engl J Med 25:2641, 2008; Munker R., et al, Clin Sci 121:141, 2011]

Pertanto, nei pazienti affetti da mielofibrosi sono stati studiati i cambiamenti dei livelli degli enzimi *RNasi III Dicer e Drosha*, che sono i due principali regolatori della MiR biogenesi. La deregolamentazione della loro espressione è risultata indicativa di possibili *alterazioni* miR in vari tipi di tumori, non solo nella mielofibrosi. E' stata studiata l'espressione di diversi *MiR 8h-miR-16, 21, 29a, 29b1, 29b2, 29c, 155, 181bis, 451* in pazienti trattati con ruxolitinib: utilizzando la RT-PCR quantitativa, sono stati riscontrati livelli di *miR-16, -21, -29 (A, B1, B2, C), -155, -451 e -188a* significativamente più elevati nei pazienti affetti da mielofibrosi rispetto ai controlli sani. In particolare, i livelli di *miR-155* erano significativamente più elevati al basale nei migliori responders, rispetto ai peggiori responders (p=0.024). Tuttavia, dopo due anni di trattamento sono diminuiti in modo significativo (p=0.055). Al contrario, i livelli di miR-188a si sono dimostrati più elevati nei peggiori responders rispetto ai migliori e sono rimasti invariati per tutta i due anni di trattamento previsti dallo studio (p=0.0021). Inoltre, i livelli dei due enzimi *RNase III Dicer e Drosha* erano significativamente

inferiori nelle cellule mononucleate dei pazienti affetti da mielofibrosi rispetto ai controlli sani, al basale. Tuttavia, dopo due anni di trattamento con Ruxolitinib, il livello di *Dicer* è aumentato in maniera significativa nei migliori responders, ma non nei peggiori responders ($p=0.0001$). In conclusione, il trattamento con Ruxolitinib sembra modulare i livelli di *miR* ed enzimi associati, per cui lo studio del profilo dei *miR* potrebbe essere, in futuro, utile nel predire la risposta dei pazienti al Ruxolitinib.

[Calin G., et al PNAS 99:15524, 2002. Merritt MW et al N Engl J Med 25:2641, 2008; Munker R., et al, Clin Sci 121:141, 2011]

Un altro studio ha valutato in maniera sistematica l'espressione differenziale dei miRNA descritti in letteratura associati a mielopoiesi e patogenesi delle malattie mieloproliferative. I risultati hanno mostrato che un'espressione aberrante di *miRNA-10a* e *-150* potrebbe essere dimostrata per trombocitemia essenziale e mielofibrosi secondaria a TE nonché per policitemia vera e MF post PV, rispettivamente. L'espressione del *miR-150* potrebbe essere ulteriormente correlato anche con gli alleli JAK2. I miRNA analizzati in questo studio sembrano essere potenziali *oncomiRs* marcatori nella diagnosi differenziale di CMPDs e possibilmente *miR-10°* potrebbe avere un potenziale ruolo nel meccanismo di patogenesi JAK2-indipendente.

[Gebauer N, Bernard V, Gebauer W, Feller AC, Merz H., MicroRNA expression and JAK2 allele burden in bone marrow trephine biopsies of polycythemia vera, essential thrombocythemia and early primary myelofibrosis., Acta Haematol. 2013; 129 (4) :251-6. doi: 10.1159/000345848. Epub 2013 Gen 19.]

Sono stati effettuati anche altri studi sui profili di espressione dei microRNA (*miRNA*) dei granulociti isolati da pazienti con mielofibrosi primaria (MFI), con l'obiettivo di identificare miRNA espressi in modo anomalo nella mielofibrosi rispetto a soggetti sani ed a soggetti affetti da policitemia vera (PV) e trombocitemia essenziale (TE). Nei granulociti dei pazienti affetti da mielofibrosi i livelli di *miR-31*, *miR-150* e *miR-95* erano significativamente inferiori rispetto al soggetto sano, mentre i livelli di *miR-190* erano maggiori rispetto ai controlli dei campioni con PV e TE. Dall'altro lato i livelli di

miR-34a, *miR-342*, *miR-326*, *miR-105*, *miR-149* e *miR-147* erano ridotti in modo simile sia nei pazienti affetti da mielofibrosi che in quelli con policitemia vera e trombocitemia essenziale rispetto ai controlli sani. L'aumentata espressione di *miR-182* e *miR183* sembra, inoltre, essere correlata con la mutazione di *JAK2 V617F*. Questa conclusione è stata possibile grazie all'osservazione dell'espressione di tre geni, quali *DTR*, *HMGGA2* e *MYB*, che risulta correlata ed in linea con l'aumentata espressione di *miR-182*, *-183*.

In conclusione, un determinato profilo di *miRNA* sembra essere in grado di distinguere granulociti affetti da mielofibrosi da quelli di soggetti sani ed, in parte, anche da quelli dei pazienti affetti da policitemia vera e trombocitemia essenziale.

[Guglielmelli P, Tozzi L, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Ponziani V, Poli G, Zini R, Ferrari S, Manfredini R, Bosi A, Vannucchi AM; MPD Research Consortium., Department of Hematology, University of Florence, Florence, Italy., *Exp Hematol.* 2007 Novembre; 35 (11) :1708-18.]

CAPITOLO 4

Materiali e metodi

4.1 - Il protocollo JUMP

Il protocollo JUMP è uno studio in aperto, multicentrico, di accesso allargato CINC424A2401 (Ruxolitinib) a pazienti con mielofibrosi primaria (MFI) e secondaria (post-policitemia vera, MF post-PV, e post-trombocitemia essenziale, MF post-TE)

Obiettivi dello studio

Si tratta di uno studio di ricerca clinica, disegnato per affrontare un'esigenza medica non soddisfatta, mettendo a disposizione *INC424* (Ruxolitinib) a pazienti con mielofibrosi primaria e secondaria, che non hanno alternative terapeutiche soddisfacenti e che abbiano già effettuato altre linee di terapia senza trarne più alcun beneficio.

Obiettivo primario dello studio è la raccolta di informazioni sulla sicurezza d'impiego del farmaco e sulla risposta al trattamento.

Altri obiettivi:

- documentare il miglior tasso di risposta globale al Ruxolitinib nei pazienti con mielofibrosi primaria o secondaria;
- valutare la qualità della vita (QoL) nei pazienti in trattamento, arruolati nel protocollo;
- documentare l'utilizzo delle scoperte e delle risorse (MRU) in pazienti affetti da mielofibrosi primaria o secondaria.

Ruxolitinib è un farmaco a bersaglio molecolare, che inibisce l'attività di *JAK1/2* attraverso l'interazione con il sito catalitico *ATP-binding* del dominio chinasi ed è selettivo per le proteine chinasi JAK1 e JAK2.

Il meccanismo d'azione di Ruxolitinib si basa sull'attenuazione del segnale delle citochine, tramite l'inibizione di *JAK1* e *JAK2* (sia nella forma wild type che in quella mutata [*JAK2 V617F*]), inducendo un effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico. [Mascarenhas J. et al., 2012].

La dose limitante la tossicità (DLT) è determinata dalla possibile comparsa di trombocitopenia. La massima dose tollerabile (MTD) è 25 mg/2 volte al giorno o 100 mg/1 volta al giorno. Queste sono risultate essere le dosi massime tollerabili dai pazienti in salute.

Con gli studi di fase I/II ed i successivi studi di fase III, *COMFORT-I* e *COMFORT-II* è stata dimostrata la sua attività in una gamma di dosaggio compresa fra 15 e 25 mg BID.

Descrizione del protocollo

Circa 1300 pazienti con diversi tipi di mielofibrosi (sia primitiva che secondaria) sono stati trattati con *INC424*, nel corso dei vari studi clinici sul farmaco. Tali studi hanno confrontato alcuni pazienti che sono stati sottoposti al trattamento con *INC424*, con altri che hanno ricevuto il placebo o la terapia migliore disponibile. L'obiettivo dello studio *JUMP* è stato quello di arruolare circa 1600 pazienti in vari paesi dell'Europa, del Medio Oriente, del Sud Africa dell'America. Lo studio si è concluso 104 settimane dopo che l'ultimo paziente è stato arruolato. Per ciascun paziente, quindi, lo studio prevedeva una durata di circa 104 settimane, durante le quali la somministrazione del farmaco poteva essere interrotta solo per determinate motivazioni (il primo che si verifica) quali: progressione della malattia, scarsa efficacia o presenza di effetti collaterali oppure per preoccupazioni riguardo alla sicurezza dell'impiego del farmaco..

La sospensione per uno di questi motivi veniva mantenuta e prolungata fino a quando il farmaco non sarebbe stato disponibile in commercio o fino a 24 mesi dopo la prima visita dell'ultimo paziente.

Il numero delle visite programmate per monitorare i pazienti durante il periodo di somministrazione del farmaco, era compreso tra 8 e 15, nel corso dell'intero studio. Potevano, però, essere necessarie visite aggiuntive, in caso di variazioni del dosaggio del farmaco, che avvenivano solitamente in base ai valori emocromo-citometrici e clinici del paziente, o in seguito al verificarsi di effetti collaterali o reazioni avverse.

Durante le prime 2 visite (V1 - Screening e V2 - Baseline) venivano effettuati esami, presso l'UO di Ematologia di riferimento, per confermare o meno l'idoneità del paziente a tale tipologia di studio.

Se il paziente era risultato idoneo, ovvero rispondente ai criteri di inclusione/esclusione dello studio, alla visita 3 (V3 - Day 1) veniva iniziato il trattamento con Ruxolitinib.

Il protocollo prevedeva, poi, visite di controllo periodiche ogni 28 giorni (V4 – Day 28; V5 – Day 56; V6 – Day 84; V7 – Day 168; V8 – Day 252; V9 – Day 336), alla fine delle quali, dopo 84 giorni, era prevista la “*visita di fine studio*”, poi, dopo altri 28 giorni, la “*visita di follow-up*”. Entrambe queste ultime due visite venivano eseguite, con la stessa cadenza, anche nei pazienti che erano costretti ad interrompere la sospensione del farmaco.

Rischi ed inconvenienti

Dal punto di vista ematologico i principali effetti collaterali riscontrati sono stati l’anemia (82,4%), la trombocitopenia (69,8%) e la neutropenia (15,6%).

Le tre reazioni avverse non ematologiche che si sono verificate con maggiore frequenza, in entrambi i protocolli di studio, sono state: ecchimosi (21,3%), vertigini (15%) e cefalea (13,9%).

Altri possibili effetti collaterali del farmaco: diarrea (5,9%), fatigue (4,3%), cefalea (3,3%) ed edemi periferici (2,6%).

Criteri di inclusione nel protocollo INC4242:

- pazienti concordi al trattamento, secondo i criteri previsti dal protocollo;
- pazienti di età superiore a 18 anni;
- pazienti non arruolabili per altri trials clinici INC4242 al momento in atto;
- pazienti che abbiano una diagnosi di MFI, MF post-PV o MF post-TE, indipendentemente dalla mutazione JAK2;
- pazienti con MFI tipo *HIGH RISK* (3 fattori prognostici negativi) oppure *INTERMEDIATE RISK level 2* (2 fattori prognostici negativi) oppure *INTERMEDIATE RISK level 1* (1 solo fattore prognostico negativo) più la splenomegalia. I fattori prognostici negativi sono:

- Et  > 65 anni
- Sintomi costituzionali (perdita di peso – febbre- sudorazione notturna)
- WBC > 25 x 10⁹/litro
- Blasti circolanti > 1%
- Hb < 10 g/dL
- Pazienti con malattia *INTERMEDIATE RISK level 1* e splenomegalia che abbiano una milza palpabile sporgente almeno 5 cm dall'arcata costale;
- Pazienti con una conta blastica periferica < 10%;
- Pazienti con adeguata funzionalit  epatica (bilirubina totale e diretta < 2.0 x UNL a AST < 2.5 x UNL);
- Pazienti con adeguata funzionalit  renale (creatinina sierica < 2 x UNL);
- Pazienti con ECOG performance status di 0.1 o 2;
- Donne in et  fertile con test di gravidanza risultato negativo 14 giorni prima della somministrazione del farmaco;
- Pazienti che debbano essere ricoverati o stabilizzati a sufficienza a seguito di reazioni avverse al farmaco.

Criteri di escusione dal protocollo INC424:

- Pazienti che abbiano avuto un tumore maligno nei 3 anni precedenti, esclusi i casi di *early-stages squamous* o *carcinoma in situ a cellule basali*.
- Pazienti che siano in trattamento con fattori di crescita, quali eritropoietina e *G-CSF* o qualsiasi altro, nelle due settimane precedenti allo screening o nelle 4 settimane prima del baseline.

- Pazienti che siano in trattamento con farmaci appartenenti alla categoria “*proihbited medication*” *
- Pazienti che abbiano disturbi gastro-intestinali, quali ulcere , vomito, diarrea, sindrome da malassorbimento o abbiano subito resezioni intestinali.
- Pazienti con disturbi cardiaci che, secondo l’opinione del medico responsabile del protocollo, possano mettere a rischio il paziente, quali angina instabile, fibrillazione atriale non controllata (non trattata), infarto del miocardio, sindrome coronarica acuta recente (nei 6 mesi precedenti);
- Pazienti che abbiano infezioni batteriche, fungine, virali o parassitarie significative, che richiedano terapia. Tra questi devono essere considerati in particolare i pazienti con infezione da HIV, HAV, HBV e HCV;
- Pazienti che abbiano un’inadeguata riserva midollare dimostrata con ANC < 1000/microlitro e PLT < 100000/microlitro, senza utilizzo di fattori di crescita e/o trasfusioni;
- Pazienti con storie di conte piastriniche < 50000/microlitro o ANC < 500/microlitro, eccetto casi di trattamento di disordini mieloproliferativi o terapie citotossiche;
- Pazienti che abbiano parametri della coagulazione > 1.5 x UNL (PT – aPTT – INR).

**prohibited medication*

- Corticosteroidi sistemici
- Aspirina > 150 mg/die
- Qualsiasi altro farmaco sperimentale;
- Qualsiasi altro trattamento per la mielofibrosi (Anagrelide, Busulfano, Idrossiurea, Interferone, Lenalidomid, Talidomide)
- Potenti induttori del CYP3A4 (Rifabutin, Rifampin, St John’s wort)

Posologia e somministrazione del farmaco

Il farmaco (Ruxolitinib) viene somministrato in compresse da 5 mg, dispensato in flaconi da 60 cp. Per ogni paziente la dose viene calcolata in base ai valori della conta piastrinica del baseline e, poi, in base agli emocromi successivi, sempre tenendo in considerazione la presenza di eventuali reazioni avverse.

- Se le piastrine < 150000/microL, il paziente inizia la somministrazione con una dose di 15 mg BID, ovvero 6 cp/die (3 cp al mattino e 3 cp la sera), indipendentemente dai pasti;
- Se le piastrine > 150000/microL, il paziente inizierà con una dose maggiore di 20 mg BID, ovvero 8 cp/die (4 cp al mattino e 4 cp la sera), indipendentemente dai pasti.

Successivamente, la dose del farmaco verrà ricalcolata ad ogni controllo previsto dal protocollo, cioè mediamente ogni 28 giorni, secondo i seguenti parametri:

Se il paziente non ha mai sospeso la terapia durante l'ultimo ciclo, è necessario controllare il follow-up clinico e la conta piastrinica, e poi, in base a tutti questi dati, calcolare la dose, secondo il seguente schema:

<i>Dose Ruxolitinib</i>					
	<i>(25 mg BID)</i> <i>(50mg/die)</i>	<i>20 mg BID</i> <i>(40 mg/die)</i>	<i>15 mg BID</i> <i>(30 mg/die)</i>	<i>10 mg BID</i> <i>(20mg/die)</i>	<i>5 mg BID</i> <i>(10mg/die)</i>
<i>PLT > 125000</i>	Continua	Continua	Continua	Continua	continua
<i>PLT 100-125000</i>	40mg/die	40mg/die	30mg/die	20mg/die	10mg/die
<i>PLT 75-100000</i>	20mg/die	20mg/die	20mg/die	20mg/die	10mg/die
<i>PLT 50-75000</i>	10mg/die	10mg/die	10mg/die	10mg/die	10mg/die
<i>PLT < 50000</i>	Stop	Stop	Stop	Stop	stop

Tabella 18 - Dosaggio di Ruxolitinib in base ai valori della conta piastrinica, nel caso che il paziente non abbia mai sospeso l'assunzione del farmaco.

Se il paziente, invece, ha interrotto il trattamento o ne ha diminuito la dose nell'ultimo ciclo, valutare il follow-up clinico, la conta piastrinica e la conta dei neutrofili. Calcolare poi la dose, secondo i seguenti schemi:

Conta PLT/microL	Dose Restart o Dose Increase
< 50000	Continue hold
50-75000	10 mg/die per 2 sett poi, se stabile, può aumentare a 20mg/die
75-100000	20 mg/die per 2 sett poi, se stabile, può aumentare a 30mg/die
100-125000	30 mg/die
> 125000	40 mg/die but no more than 5 mg below a dose that previously resulted in platelet count < 100000/microL

Tabella 19 - Dosaggio di Ruxolitinib in base ai valori della conta piastrinica, nel caso in cui il paziente abbia interrotto/diminuito l'assunzione del farmaco.

Conta ANC	Dose Restart o Dose Increase
< 500	Continue hold
500-750	10mg/die per 2 sett poi, se stabile, può aumentare a 20mg/die
750-1000	20mg/die per 2 sett poi, se stabile, può aumentare a 30mg/die
1000-1500	30mg/die per 2 sett poi, se stabile, può aumentare a 40mg/die
> 1500	40mg/die but no more than 5 mg below a dose that previously resulted in platelet count < 1000.

Tabella 20 - Dosaggio di Ruxolitinib in base ai valori dei neutrofilii, nel caso in cui il paziente abbia interrotto/diminuito l'assunzione del farmaco.

4.2 - Pazienti

All'interno dello studio aperto, multicentrico, di accesso allargato *CINC424A2401 (JUMP)*, sono stati inclusi e seguiti presso la UO Ematologia dell'Università di Pisa 14 pazienti affetti da mielofibrosi primaria e secondaria (post-policitemia vera, MF post-PV e post-trombocitemia essenziale, MF post-TE). Rispettivamente, 9 pazienti erano affetti da mielofibrosi primitiva o idiopatica (MFI) e 5 pazienti erano affetti da forme di mielofibrosi secondaria. In particolar modo, fra coloro che avevano sviluppato una forma secondaria, 3 pazienti avevano avuto un'evoluzione in fibrosi di una

trombocitemia essenziale (MF post-TE), mentre gli altri 2 avevano in precedenza una policitemia vera (MF post-PV).

Di 14 pazienti, 9 erano di sesso maschile e 5 di sesso femminile.

Per quanto riguarda la mutazione *JAK2 V617F*, su 14 pazienti, 9 presentavano la mutazione e 5, invece, sono risultati negativi per la ricerca mutazione.

<i>PZ</i>	<i>Sesso</i>	<i>età</i>	<i>IPPS</i>	<i>DIPSS</i>	<i>DIPSS plus</i>	<i>stadio istologico</i>	<i>diagnosi</i>	<i>JAK2</i>
1	M	70	3	4	6	MF 2	MF post PV	mutato
2	M	84	4	5	6	MF 2	MFI	mutato 75,3%
3	M	64	2	3	5	MF 3	MFI	mutato 37%
4	F	70	2	3	3	MF 2	MF post TE	non mutato
5	M	63	3	4	7	MF 3	MFI	non mutato
6	M	80	4	5	7	MF 2	MFI	mutato 71%
7	F	71	1	1	1	MF 2	MFI	mutato 88,2%
8	M	77	2	2	3	MF 3	MF post TE	non mutato
9	M	61	2	3	4	MF 3	MFI	mutato
10	M	66	1	1	2	MF 3	MFI	non mutato
11	F	50	1	1	1	MF 1-2	MF post PV	mutato 86%
12	F	44	2	3	5	MF 3	MFI	mutato 24%
13	M	57	2	3	3	MF 3	MFI	non mutato
14	F	76	2	2	2	MF 1	MF post TE	-

Tabella 21- Dati clinici ed istopatologici dei pazienti affetti da mielofibrosi arruolati nel protocollo JUMP.

4.3 - Campioni Biologici

La raccolta dei campioni biologici, sia sangue periferico che midollare, è stata fatta in collaborazione con il laboratorio di Genetica Medica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana che ha collaborato all'analisi dei *miRNA*.

Tali pazienti, per essere arruolati, avevano dovuto rispondere ai precisi criteri di inclusione/esclusione sopra citati. All'interno del protocollo era prevista, all'inizio dello screening, una biopsia ossea, dirimente per l'esame istopatologico e la stadiazione midollare della malattia ed un prelievo di sangue midollare che veniva destinato alle indagini citogenetiche.

Durante lo svolgimento di questo lavoro di tesi abbiamo analizzato il profilo d'espressione dei *miRNA* all'inizio della terapia (T0) e dopo tre cicli di trattamento al DAY 84 (T3) in 4 dei nostri pazienti. Inoltre, abbiamo analizzato altresì il profilo di espressione dei *miRNA* in un paziente evoluto in leucosi acuta durante lo studio stesso. Più in dettaglio, abbiamo effettuato:

- 3 analisi del *miRNoma* per il paziente # 6: analisi dell'espressione di 675 *miRNA* estratti al tempo T0 sia da sangue midollare che periferico ed analisi dell'espressione di 675 *miRNA* estratti al tempo T3 solo da sangue periferico.
- 3 analisi del *miRNoma* per il paziente # 9: analisi dell'espressione di 675 *miRNA* estratti al tempo T0 sia da sangue midollare che periferico ed analisi dell'espressione di 675 *miRNA* estratti al tempo T3 solo da sangue periferico.
- 2 analisi del *miRNoma* per il paziente # 10: analisi dell'espressione di 675 *miRNA* estratti da sangue periferico al tempo T0 ed analisi dell'espressione di 675 *miRNA* estratti solo da sangue periferico al tempo T3.

L'analisi al tempo T3 sul solo sangue periferico è stata condotta, come descritto nei "risultati", dopo aver concluso per l'assenza di significative differenze tra le analisi condotte su sangue midollare e periferico.

- Una sola analisi del *miRNoma* per il paziente # 5: analisi dell'espressione di 675 *miRNA* da RNA estratto da sangue midollare a tempo T0.

- analisi dell'espressione di 675 *miRNA* da RNA estratto da un campione di sangue midollare di un donatore sano, sottoposto ad espianto (campione 4).

Inoltre, per il controllo e la normalizzazione dei dati inter- ed intra-assay è stata analizzata l'espressione dei 675 *miRNA* in esame anche in un pool di RNA estratto da sangue periferico di 15 soggetti sani ottenuti dal laboratorio di analisi chimico-cliniche della AOUP.

I pazienti arruolati nello studio sono stati informati riguardo alla finalità puramente scientifica dello studio ed hanno acconsentito liberamente alla partecipazione.

4.4 - Citogenetica standard

L'analisi citogenetica è stata effettuata presso il laboratorio di Genetica Medica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana su campioni di sangue midollare concomitantemente prelevati. Tale sangue midollare, prelevato mediante puntato da cresta iliaca, in provetta eparinata, è stato messo in coltura senza stimolazione per 24 ore oppure sincronizzato a 48 o 72 ore. L'analisi del cariotipo è stata effettuata secondo le procedure internazionalmente standardizzate su un minimo di 20 metafasi.

4.5 - Estrazione dell'RNA

I campioni di sangue periferico e di sangue midollare, prelevati al paziente al momento della visita ambulatoriale, sono stati raccolti in provette contenenti EDTA. Ogni campione è stato diviso in due aliquote: una congelata a -20°C in RNAlater, mentre l'altra è stata utilizzata lo stesso giorno del prelievo per l'estrazione dell'RNA eseguita con il kit commerciale "*mirVana PARIS Kit*" (Life Technologies, Milano), specifico per l'isolamento dei *miRNA*.

4.6 - Analisi di espressione dei microRNA

Per l'analisi d'espressione dei *miRNA* è stata utilizzata la tecnologia delle *TaqMan® Low Density Arrays (TLDA)* (Life Technologies, Milano). Si tratta di piastre microfluidiche da 384 pozzetti, con sonde TaqMan per altrettanti *miRNA*. L'analisi dell'espressione è stata suddivisa in 2 fasi principali: un primo step di retro-trascrizione per la sintesi di

cDNA a partire dai *miRNA* estratti ed un altro step di amplificazione attraverso la *quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)* [attraverso tecnologia delle TaqMan®Low Density Arrays (TLDA) (*life technologies*)]

4.7 Analisi Statistica

Il confronto tra i pazienti al tempo T0 e al tempo T3 è stato fatto con un *Paired T-Test* con due softwares; il p-value è stato considerato significativo se < 0.05 . Inoltre, è stata effettuata la *correzione di Benjamini Hochberg FDR* per identificare i falsi positivi. I geni target predetti dei miRNA d'interesse sono stati individuati con *miRgator 3.0 V*, un portale di miRNA che evidenzia le relazioni tra miRNA e target determinate dai principali algoritmi. *MiRgator* ha utilizzato diversi algoritmi che hanno riportato le interazioni miRNA/target validate sperimentalmente.

CAPITOLO 5

Risultati

5.1 Risultati obiettivo 1

In base all'obiettivo 1 sono stati elaborati i dati sulla sicurezza e tossicità del farmaco Ruxolitinib (INC424) somministrato all'interno dello studio in aperto, multicentrico, di accesso allargato CINC424A2401 a pazienti con mielofibrosi primaria e secondaria (post-policitemia vera e post-trombocitemia essenziale) seguiti presso la UO Ematologia di Pisa, al fine di poter effettuare un confronto con i risultati degli studi *COMFORT I* e *COMFORT II* (i trials che hanno portato all'approvazione di ruxolitinib in Europa e negli USA).

I pazienti affetti da mielofibrosi sia primitiva che secondaria, seguiti presso la UO Ematologia di Pisa, all'interno dello studio JUMP sono stati in totale 14.

Di questi 14 pazienti, 9 erano di sesso maschile e 5 di sesso femminile. (*Grafico 1.*)

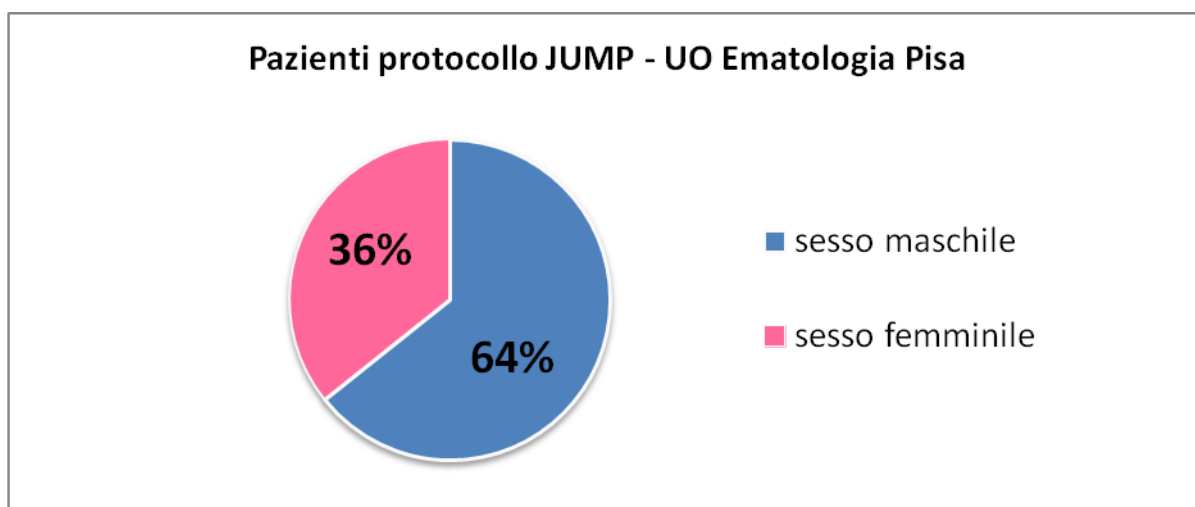


Grafico 1 - Pazienti arruolati nel protocollo JUMP presso UO Ematologia di Pisa, divisi per sesso.

Di questo campione di 14 pazienti, per quanto riguarda i fattori di rischio prognostici, 3 pazienti, cioè il 22%, avendo 1 solo fattore di rischio, avevano uno stadio di malattia *Intermediate Risk level-1 (IPPS 1)*, 8 pazienti, cioè il 57% del campione, avendo 2 fattori di rischio, erano classificabili come stadio di malattia *Intermediate Risk level-2 (IPPS 2)*, mentre 3 pazienti, cioè il 21%, avendo tre o più fattori di rischio, avevano

uno stadio di malattia *High Risk* (*IPPS* > 2). Tra i pazienti classificati come *High Risk*, rispettivamente 1 aveva *IPPS* 3 (7%), e 2 pazienti avevano *IPPS* 4 (14%). (Grafico 2.)

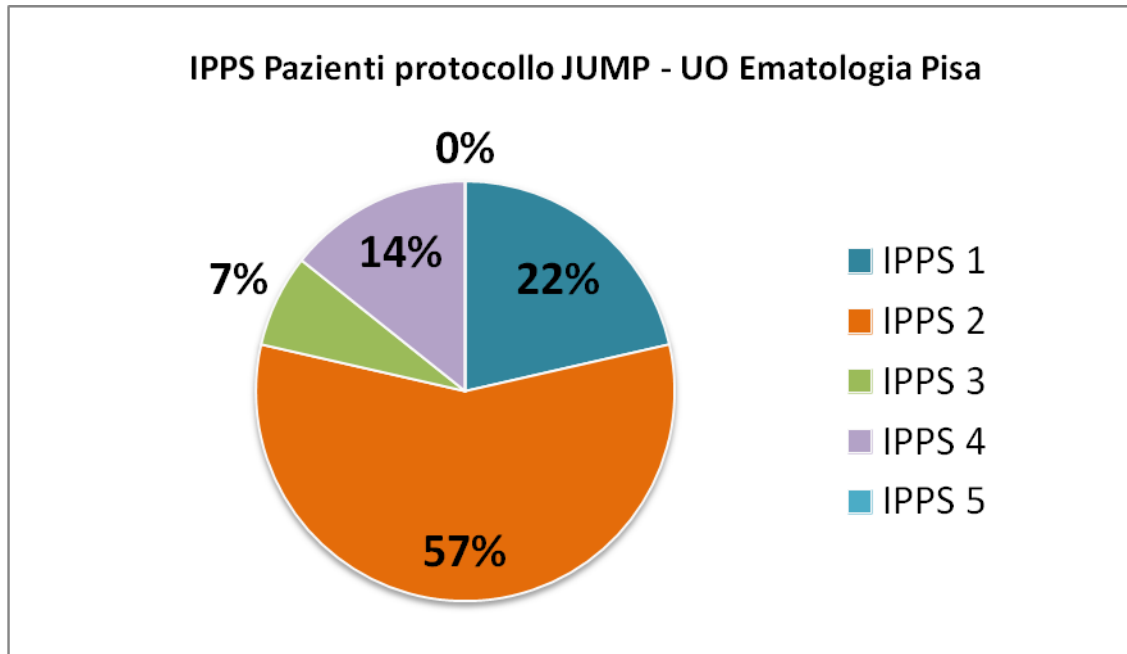


Grafico 2 - IPPS nei pazienti arruolati nel protocollo JUMP presso UO Ematologia di Pisa.

Per quanto riguarda gli altri score prognostici, sempre sul totale dei 14 pazienti presi in esame presso UO Ematologia di Pisa, nel protocollo JUMP, 3 pazienti avevano *DIPSS* 1 (22%), 2 pazienti un *DIPSS* 2 (14%), 6 pazienti un *DIPSS* 3 (43%), 1 pazienti aveva un *DIPSS* 4 (7%), 2 un *DIPSS* 5 (14%), mentre nessuno aveva un *DIPSS* 6. (Grafico 3.)

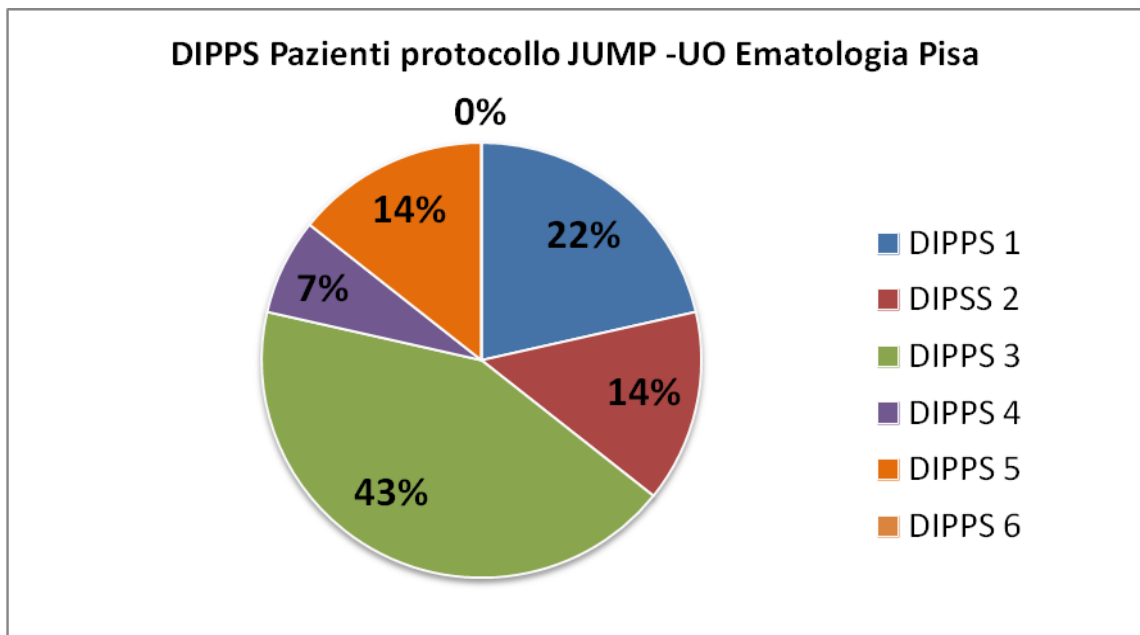


Grafico 3- DIPSS nei pazienti arruolati nel protocollo JUMP presso UO Ematologia di Pisa.

Per quanto riguarda, invece, il più recente score prognostico, *DIPSS-plus*, 2 pazienti avevano un *DIPSS-plus 1* (14%), 2 pazienti un *DIPSS-plus 2* (14%), 3 pazienti avevano un *DIPSS-plus 3* (22%), 1 solo paziente *DIPSS-plus 4* (7%), 2 pazienti un *DIPSS-plus 5* (14%), 3 pazienti avevano *DIPSS plus 6* (22%), 1 solo pazienti aveva un *DIPSS plus 7* (7%), mentre nessun paziente aveva un *DIPSS plus 8 o 9*. (*Grafico 4.*)

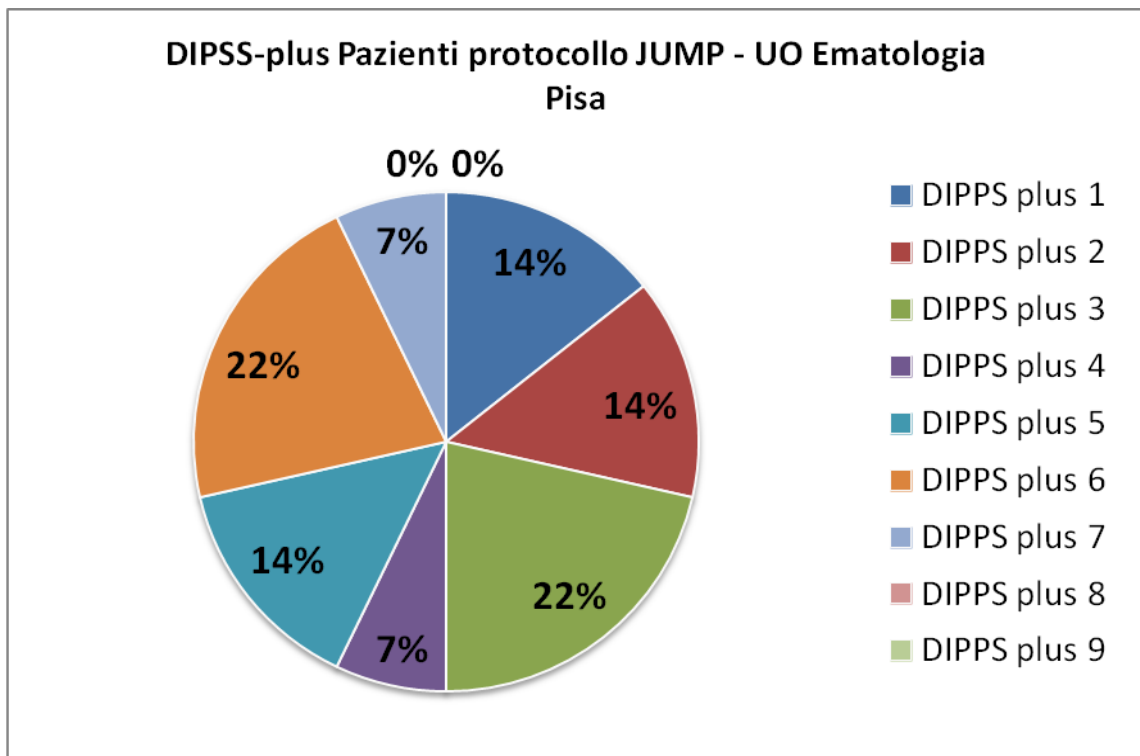


Grafico 4 - DIPSS-plus nei pazienti arruolati nel protocollo JUMP presso UO Ematologia di Pisa.

Per ciascun paziente arruolato sono state effettuate le visite e gli esami previsti dal protocollo JUMP al fine di valutare l'efficacia, la sicurezza e l'eventuale tossicità del farmaco presso i pazienti dell'UO Ematologia di Pisa e confrontare i dati raccolti con i risultati degli studi *COMFORT I* e *COMFORT II* pubblicati (trials che hanno portato all'approvazione di Ruxolitinib in Europa e negli USA).

Nonostante il campione non fosse particolarmente numeroso abbiamo potuto valutare diversi criteri.

Come primo dato, abbiamo valutato quali e quanti pazienti sono riusciti a portare a termine l'iter previsto dal protocollo. E, fra quelli che hanno dovuto interrompere, abbiamo cercato di capirne le cause. (*Grafico 5.*)

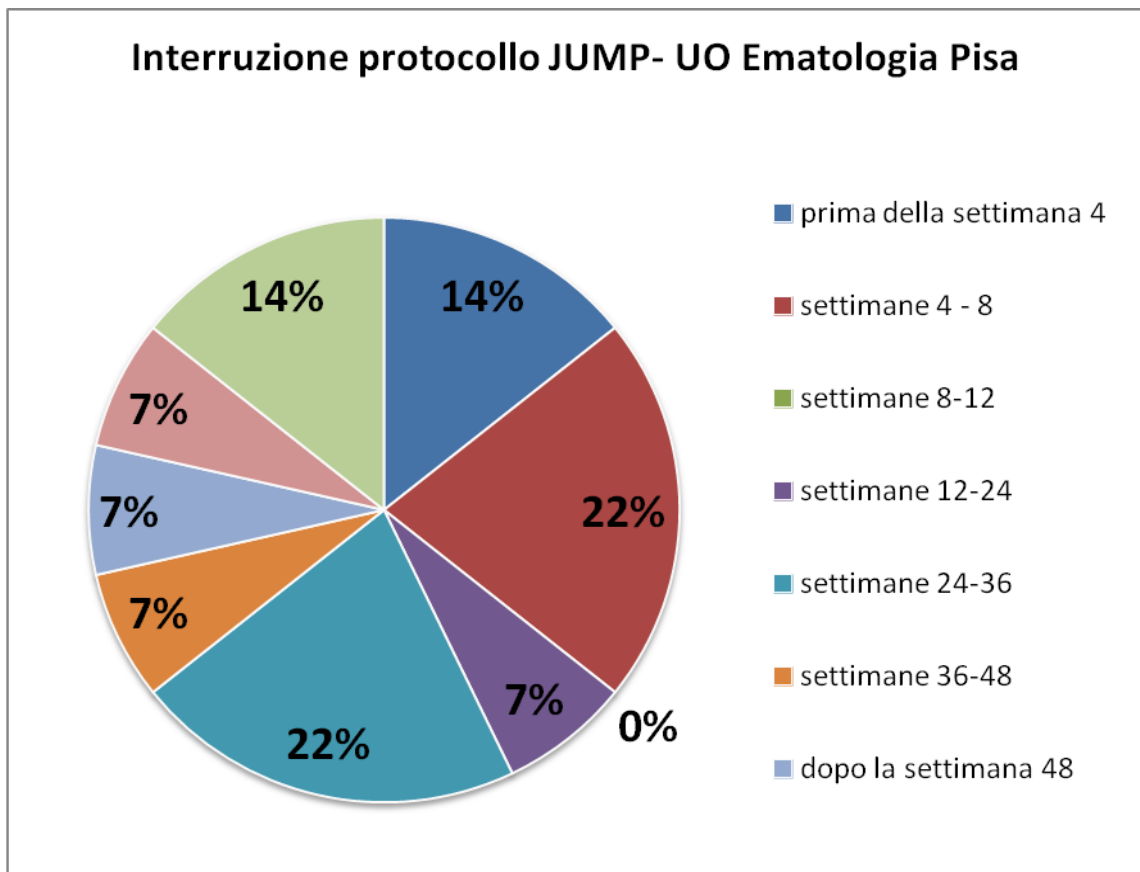


Grafico 5 - Interruzione dell'assunzione di Ruxolitinib con relativo abbandono del protocollo JUMP.

Fra coloro che hanno dovuto interrompere il protocollo di studio e quindi l'assunzione di Ruxolitinib, si distinguono:

- ✓ 2 pazienti (14%) che hanno interrotto prima della settimana 4 di assunzione del farmaco e quindi non sono valutabili per l'efficacia del farmaco
- ✓ 3 pazienti (22%) che hanno interrotto fra le settimane 4 e 8;
- ✓ nessun paziente che ha interrotto il protocollo fra le settimane 8 e 12;
- ✓ 1 paziente (7%) che ha interrotto fra le settimane 12 e 24;
- ✓ 3 pazienti (22%) che hanno interrotto fra le settimane 24 e 36;
- ✓ 1 paziente (7%) che ha interrotto fra la settimana 36 e 48;
- ✓ 1 paziente (7%) che ha dovuto interrompere oltre la settimana 48;

Fra coloro che hanno interrotto l'assunzione del farmaco prima della fine prevista dal protocollo JUMP, escludendo i tre pazienti deceduti, le cause principali sono state le reazioni avverse al Ruxolitinib, in particolare:

- il paziente # 3 ha interrotto in seguito alla presenza di tossicità ematologica, in particolar modo anemia e neutropenia entrambe di grado 3-4 fra le settimane 12 e 24;
- il paziente # 4 ha interrotto per un episodio di piastrinosi severa (PLT > 1000000), considerabile come una mancata risposta alla terapia fra la settimana 4 e la 8;
- il paziente # 6 ha dovuto interrompere l'assunzione del farmaco per tossicità ematologica, in particolare piastrinopenia di grado 3, fra le settimane 36 e 48;
- il paziente # 7 ha dovuto interrompere per tossicità ematologica, in particolare anemia di grado 3 e piastrinopenia di grado 2-3, fra la settimana 12 e la settimana 24;
- il paziente # 8 ha interrotto l'assunzione di Ruxolitinib a seguito di tossicità multiple quali angioedema di grado 2, anemia di grado 2 e dispnea di grado 2, fra le settimane 4 e 8;
- il paziente # 12 ha dovuto interrompere l'assunzione del farmaco in seguito al manifestarsi di tossicità ematologica, in particolare anemia di grado 4 di natura emolitica, associata ad un quadro di broncopolmonite e febbre. Tale paziente ha manifestato tali reazioni avverse nel periodo fra la settimana 24 e la settimana 36;
- il paziente # 13 ha dovuto interrompere il protocollo JUMP per tossicità ematologica, in particolare anemia di grado 2, mancata risposta sulla sintomatologia associata alla mielofibrosi e per una iperbilirubinemia di grado 3. Tale paziente ha manifestato queste reazioni avverse nel periodo successivo alla settimana 48, dopo aver effettuato la visita Day 336;

- il paziente # 14 infine, ha dichiarato alla visita di controllo del Day 28 di non aver mai assunto il farmaco nell'arco del mese precedente, per cui non è considerata valutabile.

Fra coloro che hanno dovuto interrompere la somministrazione del farmaco Ruxolitinib (11 pazienti su 14) si identificano anche 3 pazienti deceduti. In particolare:

- Il paziente # 2 è deceduto prima della settimana 4 di assunzione del farmaco. Le cause di morte di tale paziente sono ad oggi sconosciute. I parenti hanno riferito comparsa di dolore al rachide lombare 5 giorni prima del decesso, che si è poi rivelato, attraverso l'esame radiologico, trattarsi di un cedimento di una vertebra lombare.
- Il paziente # 5 è deceduto nell'intervallo di tempo dalla settimana 4 alla settimana 8 di assunzione del farmaco per evoluzione in leucosi acuta. Tale paziente alla visita del Day 28 aveva mostrato miglioramento dello splenomegalia ed assenza di sintomatologia sistemica. Il paziente è stato poi ricoverato presso il reparto di Ematologia di Pisa per essere sottoposto chemioterapia di induzione con antraciclina ed Aracytin, ma è poi deceduto per crisi respiratoria in corso di aplasia.
- Il paziente # 9 è deceduto nell'intervallo di tempo fra la settimana 24 e la settimana 36. Tale paziente, splenectomizzato nel 2011, aveva iniziato la terapia per la presenza di sintomi sistemici che non si erano, però, risolti durante il periodo di trattamento. Durante la terapia, i livelli di emoglobina si erano ridotti in misura significativa. Il decesso sembra poter essere attribuito ad una perforazione intestinale complicata.
- 2 pazienti sono ancora in corso di protocollo (entrambi hanno effettuato in luglio la visita Day 336) e soltanto 1 paziente è arrivato al termine (*visita di fine studio*), senza nessuna interruzione.

L'efficacia del farmaco è stata valutata sia sulle variazioni delle dimensioni della milza sia sui sintomi costituzionali, così come era stato fatto nei due protocolli di studio precedenti, *COMFORT-I* e *COMFORT-II*. Come è possibile vedere dai grafici

sottostanti (*Grafici 6a e 6b*), il farmaco, anche nei pazienti seguiti presso la UO Ematologia di Pisa, risulta efficace nel ridurre le dimensioni della milza e quindi nel favorire, di conseguenza, anche una migliore qualità della vita.

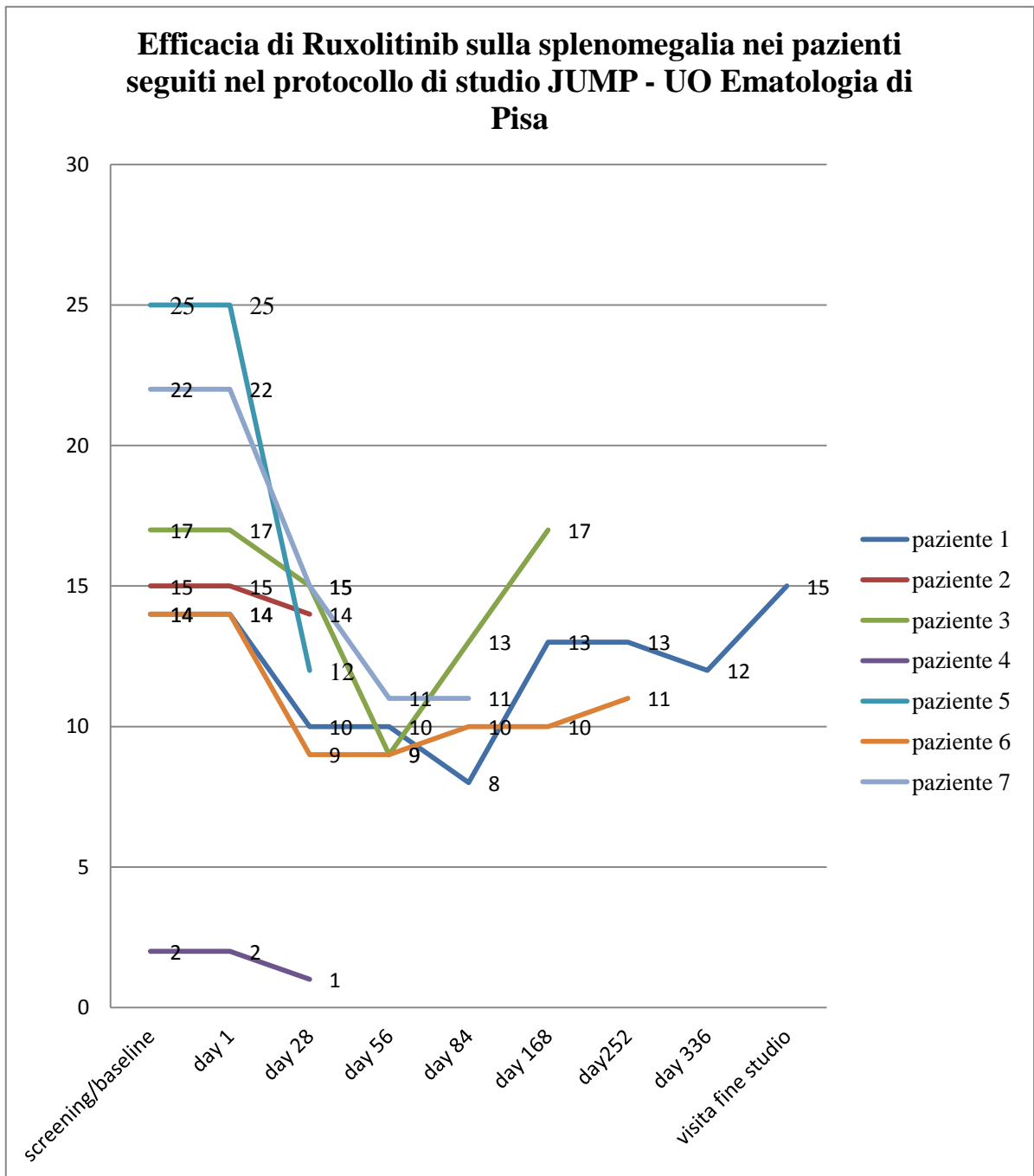


Grafico 6a - Efficacia di Ruxolitinib sulla splenomegalia (misurazione in cm dall'arcata costale inferiore) nei pazienti seguiti nel protocollo di studio JUMP UO Ematologia di Pisa, pazienti da 1 a 7.

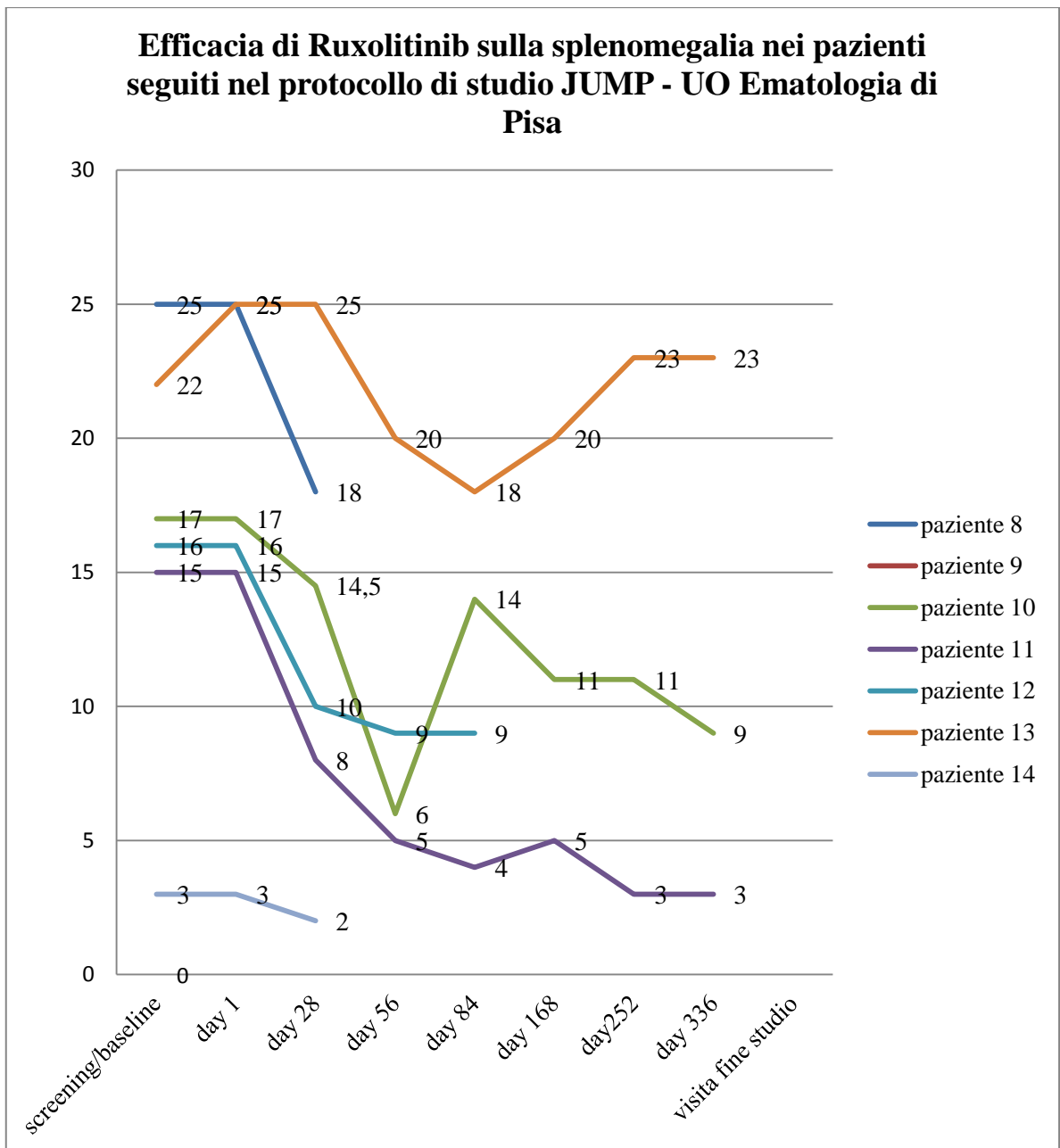


Grafico 6b - Efficacia di Ruxolitinib sulla splenomegalia (misurazione in cm dall'arcata costale inferiore) nei pazienti seguiti nel protocollo di studio JUMP UO Ematologia di Pisa, pazienti da 8 a 14.

Di seguito alcuni esempi dei risultati emersi dall'osservazione dell'oscillazione delle dimensioni spleniche in base alla dose di farmaco assunta dal paziente.

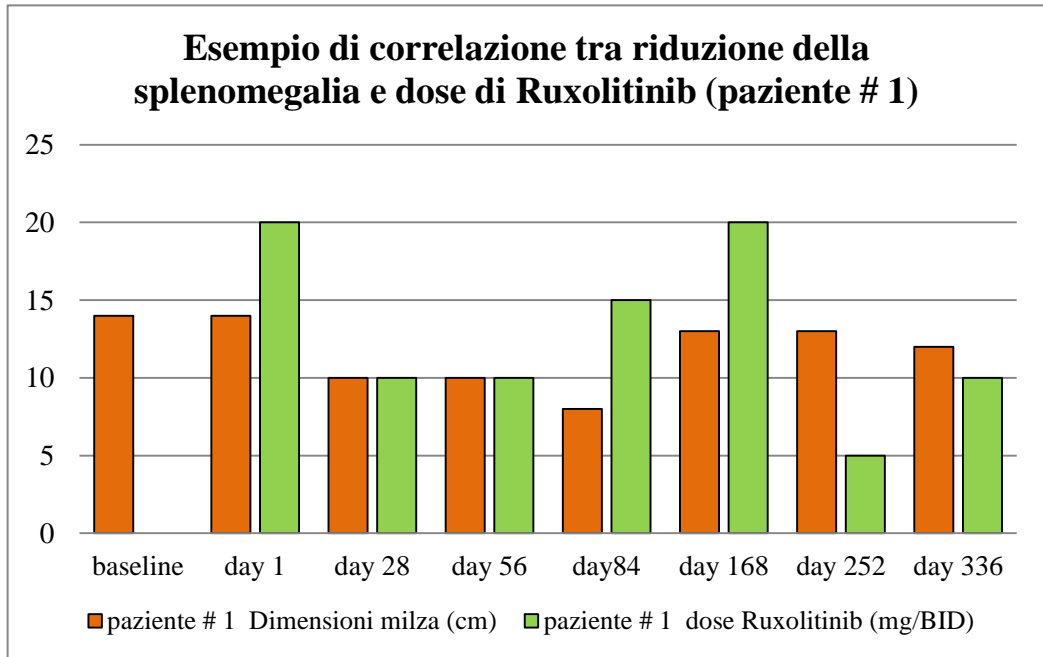


Grafico 7a: Correlazione tra riduzione della splenomegalia e dose di Ruxolitinib paziente # 1

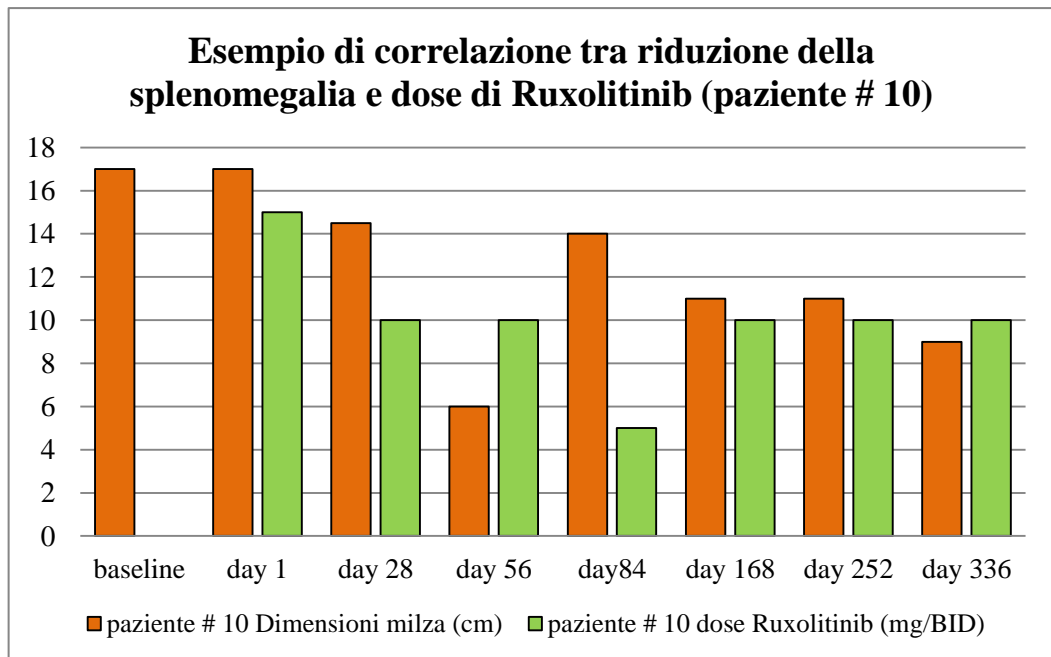


Grafico 7b: Correlazione tra riduzione della splenomegalia e dose di Ruxolitinib paziente # 10.

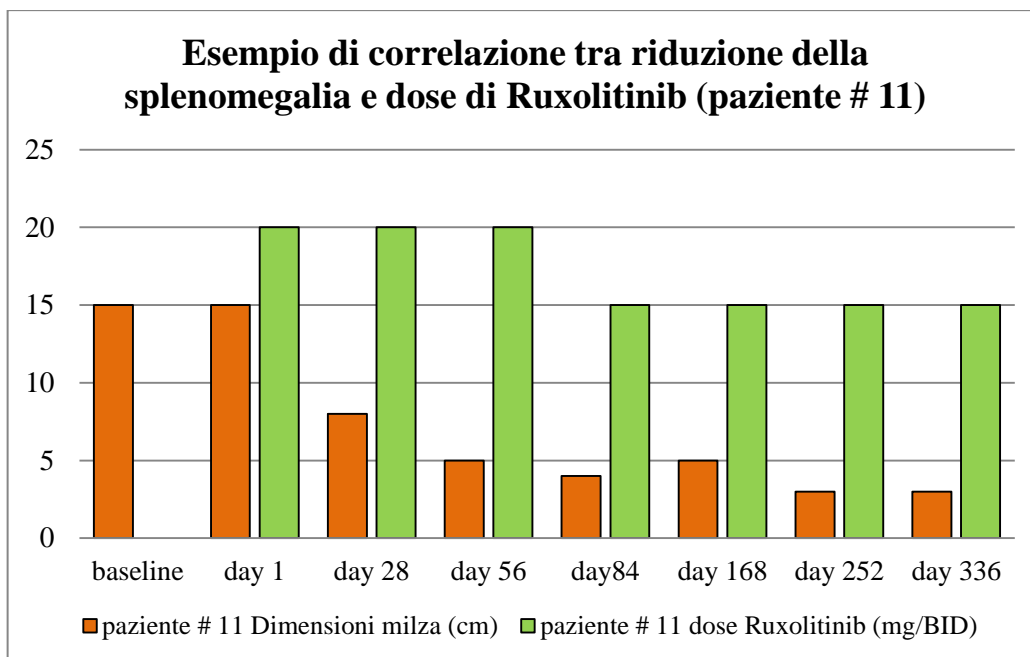


Grafico 7c: Correlazione tra riduzione della splenomegalia e dose di Ruxolitinib paziente # 11.

Altro dato che è stato preso in considerazione, in parallelo agli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II*, è stata l'efficacia del farmaco sui sintomi sistemici riferiti dai pazienti alle visite di controllo. Per valutare questo dato è stato necessario prendere in considerazione soltanto i pazienti che, al baseline, avevano in anamnesi e come fattori di rischio sintomi sistemici legati alla mielofibrosi. In totale si parla di 10 pazienti sui 14 totali del protocollo. Di questi 10 pazienti (come si può vedere nel grafico sottostante, *grafico 8.*), 7 hanno mostrato un netto miglioramento dei sintomi sistemici durante il tutto il periodo di trattamento con Ruxolitinib, mentre 3 pazienti non hanno avuto nessun beneficio, e questo è stato uno dei motivi che ha portato questi 3 pazienti all'interruzione del protocollo.

I sintomi sistemici più frequentemente identificati nei pazienti seguiti presso la UO Ematologia di Pisa sono stati: la sudorazione notturna e la perdita di peso.

Di seguito i risultati emersi da questa osservazione.

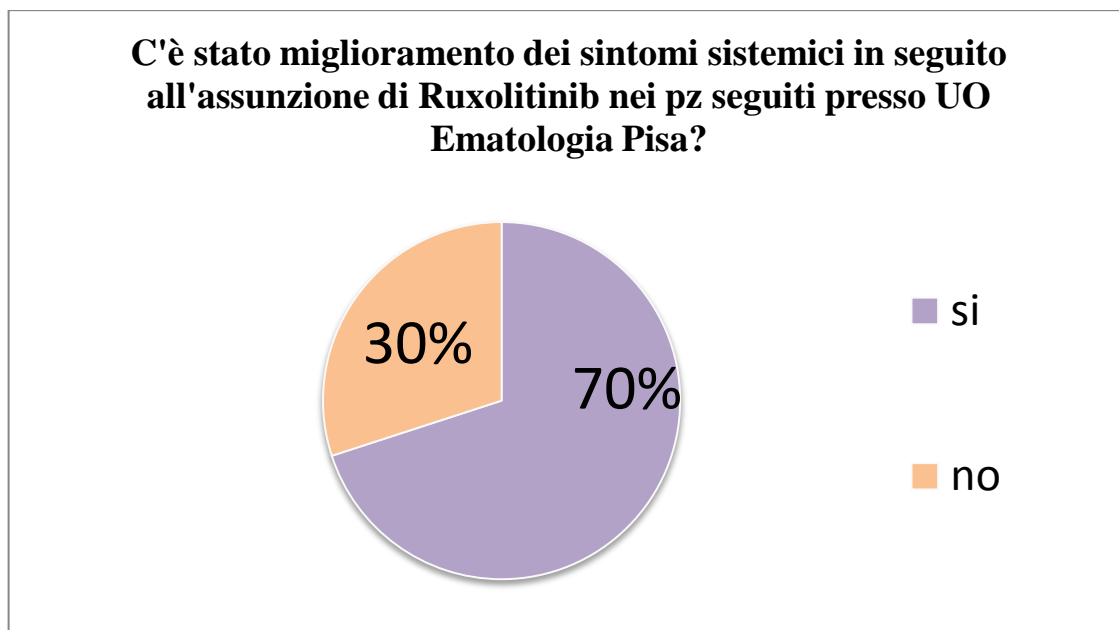


Grafico 8. Efficacia di Ruxolitinib sui sintomi sistemici nei pazienti seguiti nel protocollo di studio JUMP UO Ematologia di Pisa

Per quanto riguarda, invece, gli effetti avversi del farmaco, i dati raccolti mostrano che sono stati i principali motivi di interruzione del trattamento/uscita dal protocollo JUMP. Si evidenziano, infatti, sia eventi avversi in seguito ai quali, dopo un periodo di cessazione dell'assunzione di Ruxolitinib, il paziente ha iniziato di nuovo il trattamento come previsto dal protocollo, sia effetti avversi che hanno segnato la definitiva interruzione dell'assunzione del farmaco e l'uscita del paziente dal protocollo.

In particolar modo, possiamo dividere gli effetti avversi in: ematologici e non ematologici.

Fra le tossicità ematologiche, quelle più frequentemente riscontrate nei pazienti seguiti presso l'UO Ematologia di Pisa, sono state: anemia, piastrinopenia e neutropenia, anche se si sono registrati due episodi di piastrinosi (in pazienti con MF post-TE), uno dei quali, ha portato all'interruzione dell'assunzione del farmaco e l'uscita dal protocollo.

Per quanto riguarda i livelli di emoglobina durante la somministrazione di Ruxolitinib nel protocollo JUMP preso UO Ematologia di Pisa, si riscontrano i seguenti risultati. (*Grafico 9a e 9b*)

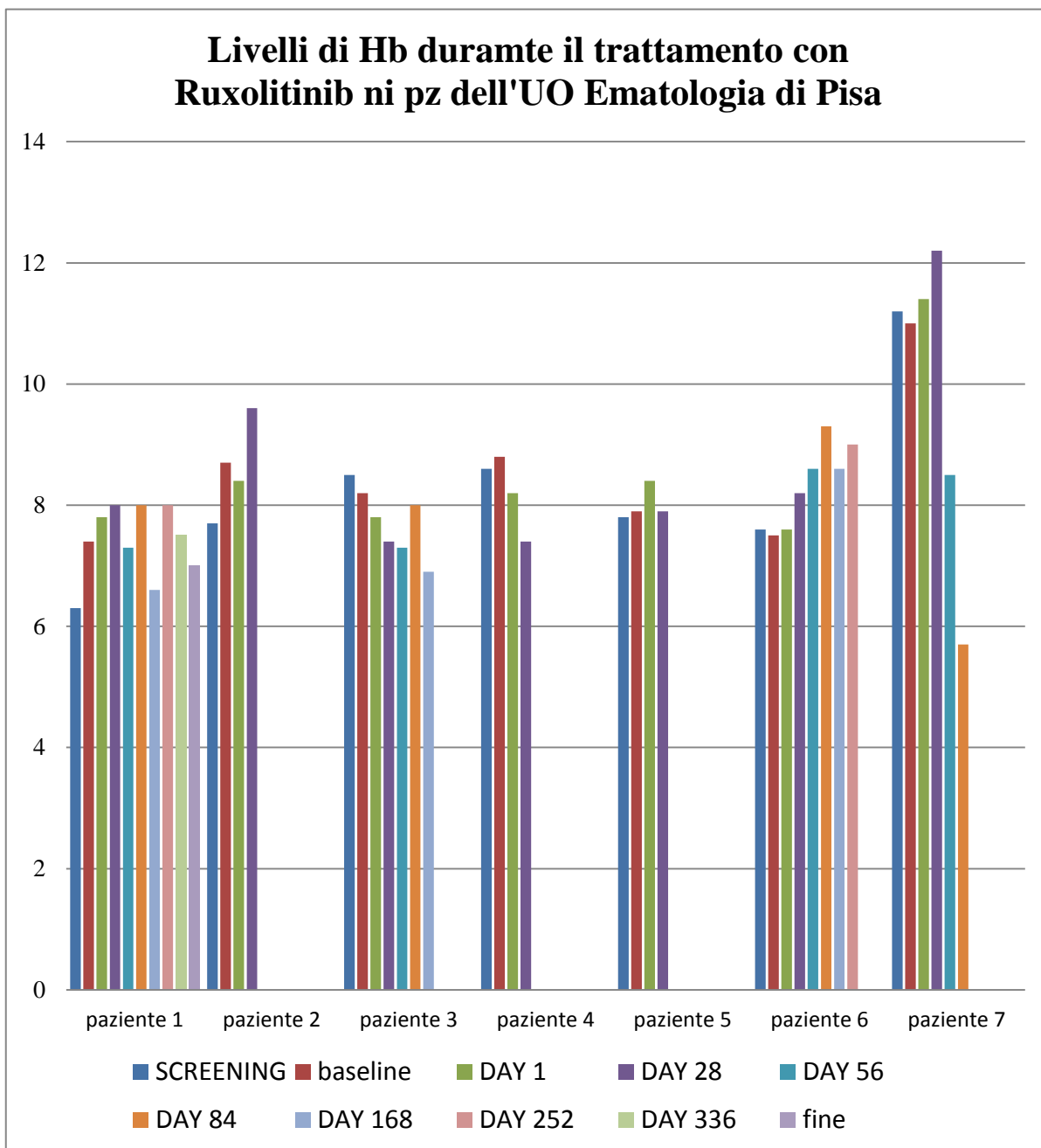


Grafico 9a. Livelli di Hb nei pazienti (dal paziente 1 al 7) del protocollo JUMP in trattamento con Ruxolitinib, seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

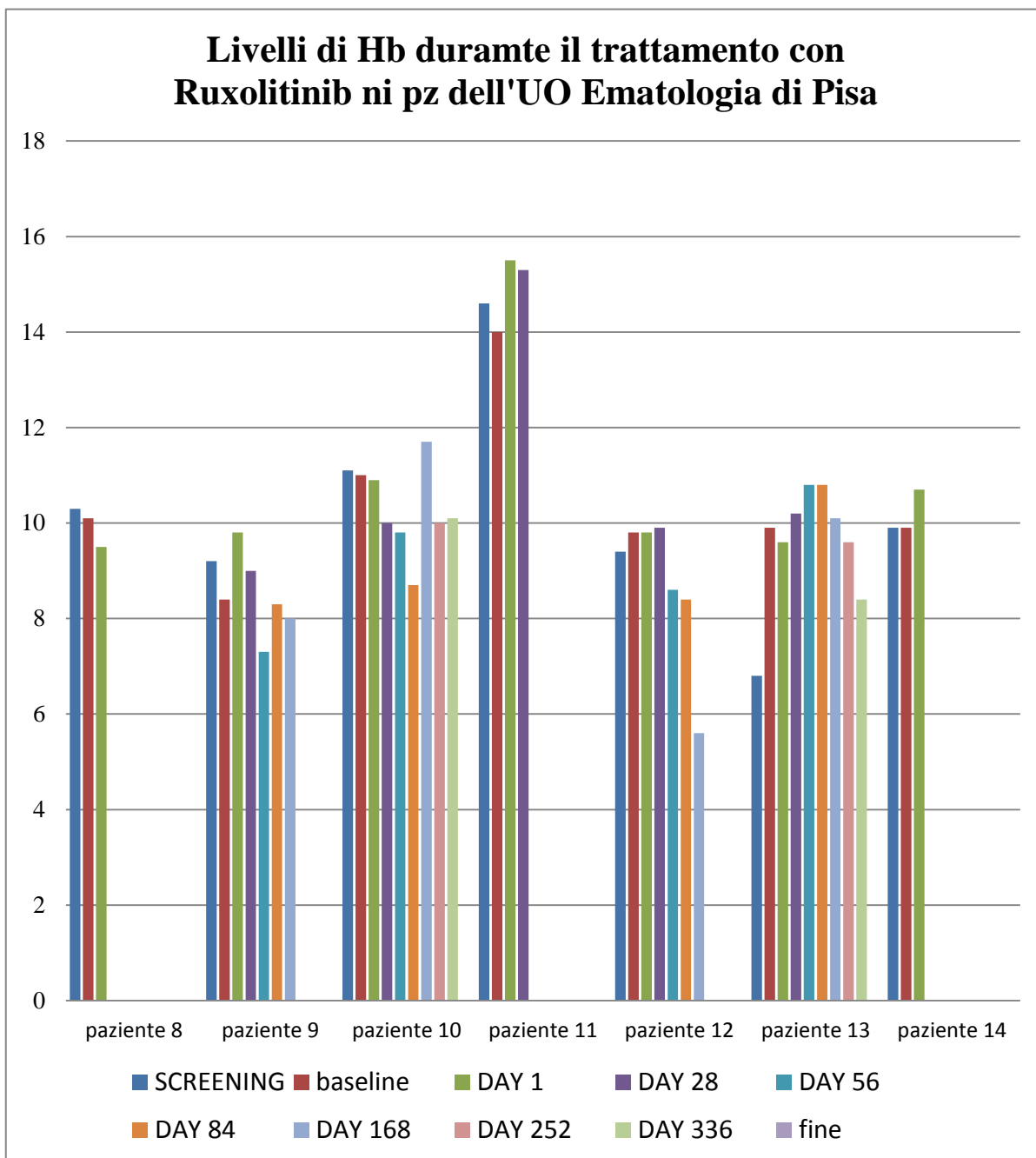


Grafico 9b. Livelli di Hb nei pazienti (dal paziente 8 al 14) del protocollo JUMP in trattamento con Ruxolitinib, seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Per l'anemia, si considerano 4 gradi di tossicità: anemia di grado 1 (9,5-10,9 g/dL); anemia di grado 2 (8,0-9,4 g/dL), anemia di grado 3 (6,5-7,9 g/dL), anemia di grado 4 (< 6,5 g/dL). Nel grafico 10. viene descritta la frequenza dei vari gradi di anemia.

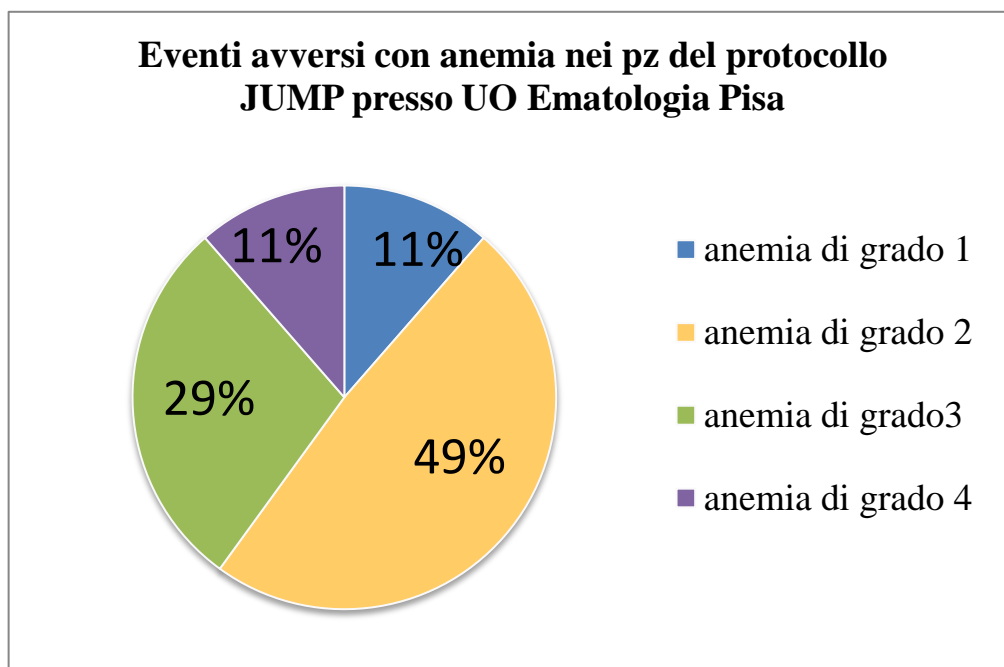


Grafico 10. Frequenza dell'anemia come evento avverso nei pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

In totale si sono riscontrati ben 35 eventi avversi di anemia, di grado variabile, così come dimostra il *grafico 10*. Per alcuni, in particolar modo per quelli di grado 3 (10 casi, 29%) o 4 (4 casi, 11%), il paziente ha interrotto temporaneamente o definitivamente l'assunzione di Ruxolitinib. Al contrario, per la maggior parte delle forme di anemia insorte durante il trattamento, principalmente per quelle di grado 1 (4 casi, 11%) e 2 (17 casi, 49%), è bastato diminuire la dose di Ruxolitinib per un tempo variabile in media dalle 2 alle 4 settimane, per ritornare ad avere livelli di Hb compatibili con la malattia e, fondamentalmente, sovrapponibili a quelli dello screening.

Per quanto riguarda la piastrinopenia, si considerano 4 gradi di tossicità: piastrinopenia di grado 1 (75000-150000/microL); piastrinopenia di grado 2 (50000-74000/microL), piastrinopenia di grado 3 (25000-49000/microL), piastrinopenia di grado 4 (< 25000/microL). Nel *grafico 11*. viene descritta la frequenza dei vari gradi di piastrinopenia.

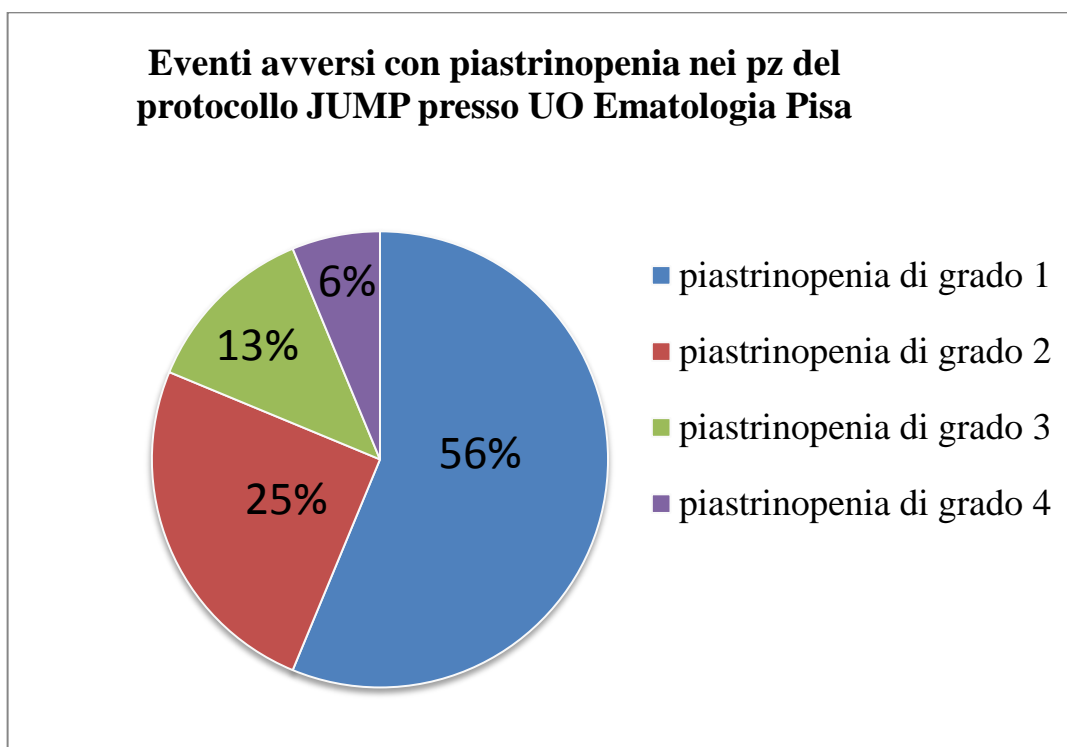


Grafico 11. Frequenza della piastrinopenia come evento avverso nei pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

In totale si sono riscontrati ben 16 eventi avversi di piastrinopenia, di grado variabile. Per alcuni, in particolar modo per quelli di grado 3 (2 casi, 13%) o 4 (1 solo caso, 6%), il paziente ha interrotto temporaneamente o definitivamente l'assunzione di Ruxolitinib. Per la maggior parte delle forme di piastrinopenia, insorte durante il trattamento, principalmente per quelle di grado 1 (9 casi, 56%) e 2 (4 casi, 25%), è bastato diminuire la dose di Ruxolitinib per un tempo variabile in media da 2 a 6 settimane, per ritornare ad avere livelli di PLT compatibili con la malattia di base e, fondamentalmente, sovrapponibili a quelli dello screening.

Per quanto riguarda la neutropenia, si considerano 4 gradi di tossicità: neutropenia di grado 1 (1500-2000/L); neutropenia di grado 2 (1000-1500/L), neutropenia di grado 3 (500-1000/L), neutropenia di grado 4 (< 500/L). Nel grafico 12. viene descritta la frequenza dei vari gradi di neutropenia.

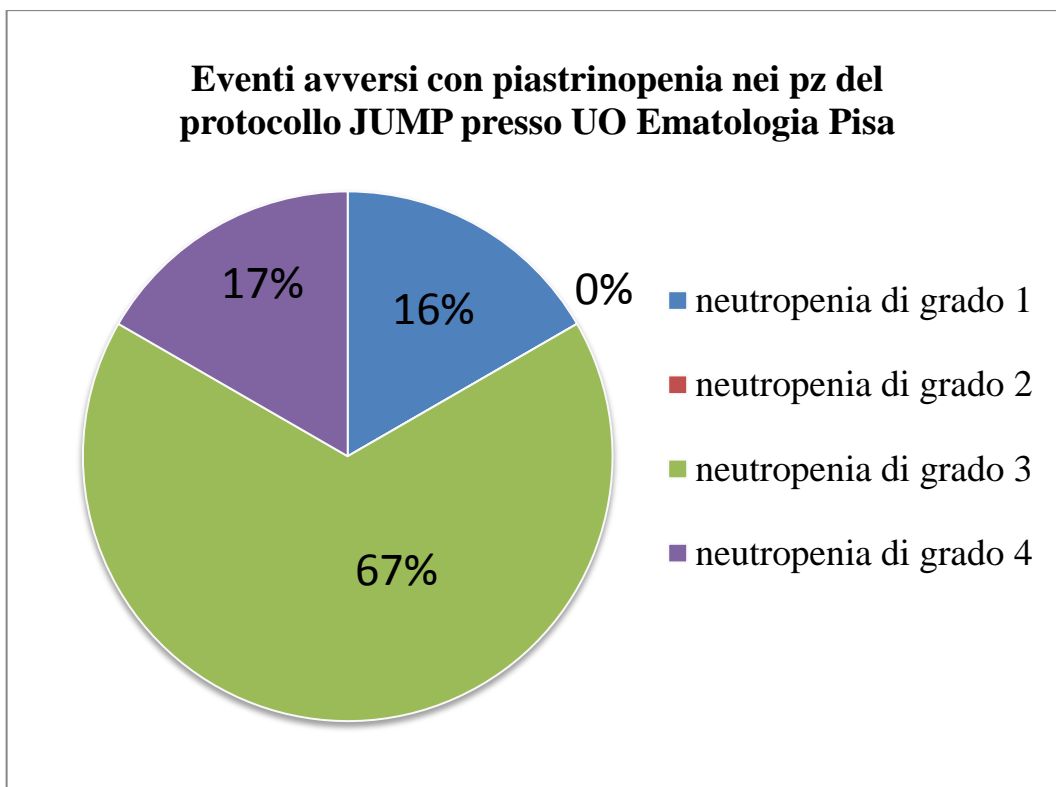


Grafico 12. Frequenza della neutropenia come evento avverso nei pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

In totale si sono riscontrati ben 6 eventi avversi di neutropenia, di grado variabile. Per alcuni, in particolar modo per quelli di grado 3 (4 casi, 67%) o 4 (1 solo caso, 17%), il paziente ha interrotto temporaneamente o definitivamente l'assunzione di Ruxolitinib. Per la maggior parte delle forme di neutropenia insorte durante il trattamento, principalmente per quelle di grado 1 (1 solo caso, 16%) è bastato diminuire la dose di Ruxolitinib per un tempo variabile in media da 2 a 4-6 settimane, per ritornare ad avere livelli di neutrofili compatibili con la malattia di base e, fondamentalmente, sovrapponibili a quelli dello screening.

Fra le tossicità non ematologiche, le più frequentemente riscontrate fra i pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa, sono quelle descritte nel *grafico 13*.

Eventi avversi non ematologici verificatesi nei pz del protocollo JUMP presso UO Ematologia Pisa

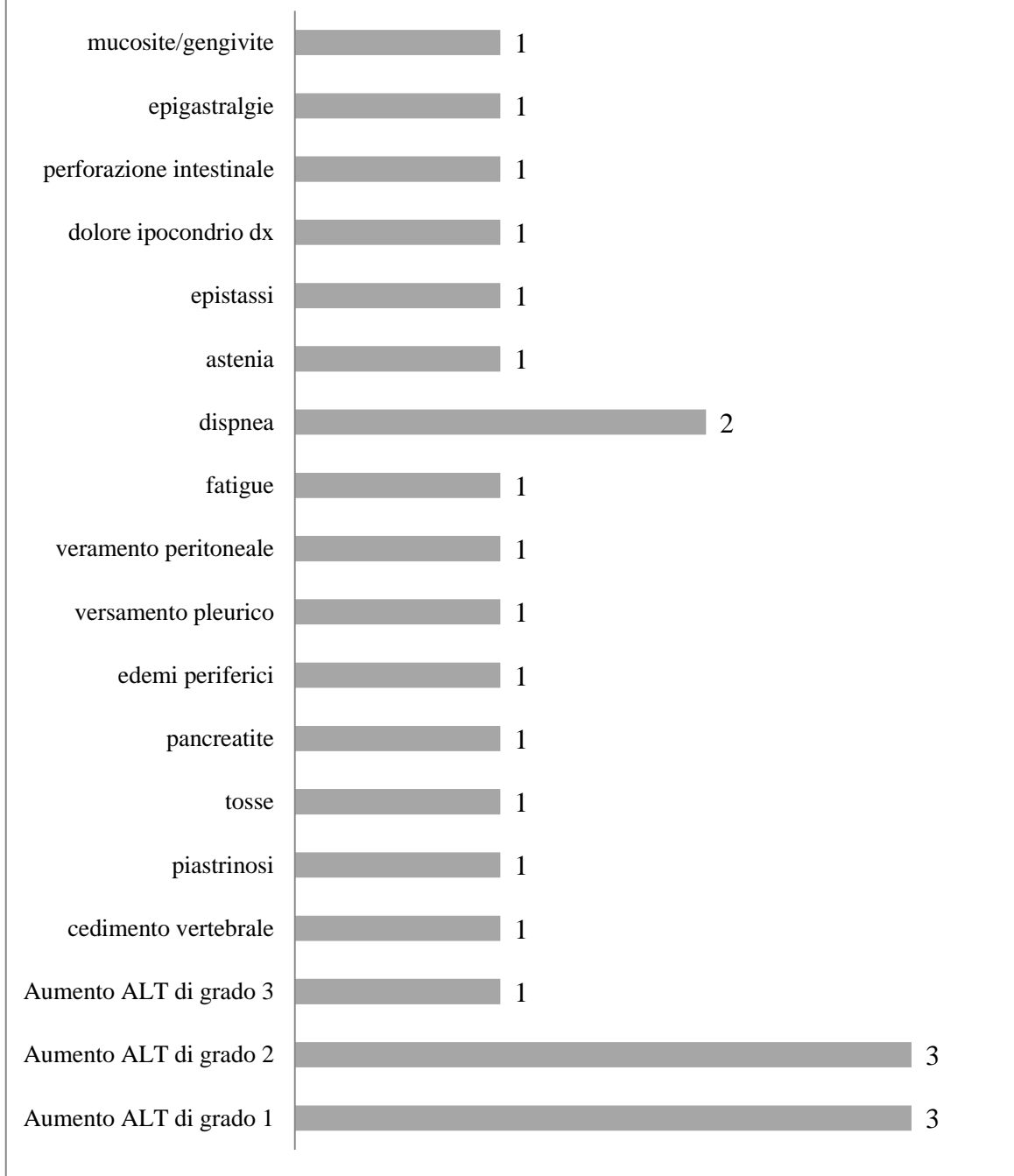


Grafico 13. Frequenza degli eventi avversi non ematologici più comuni nei pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Infine, sono stati valutati anche le oscillazioni dei livelli piastrinici nel corso dell'intero trattamento. (Grafico 14.)

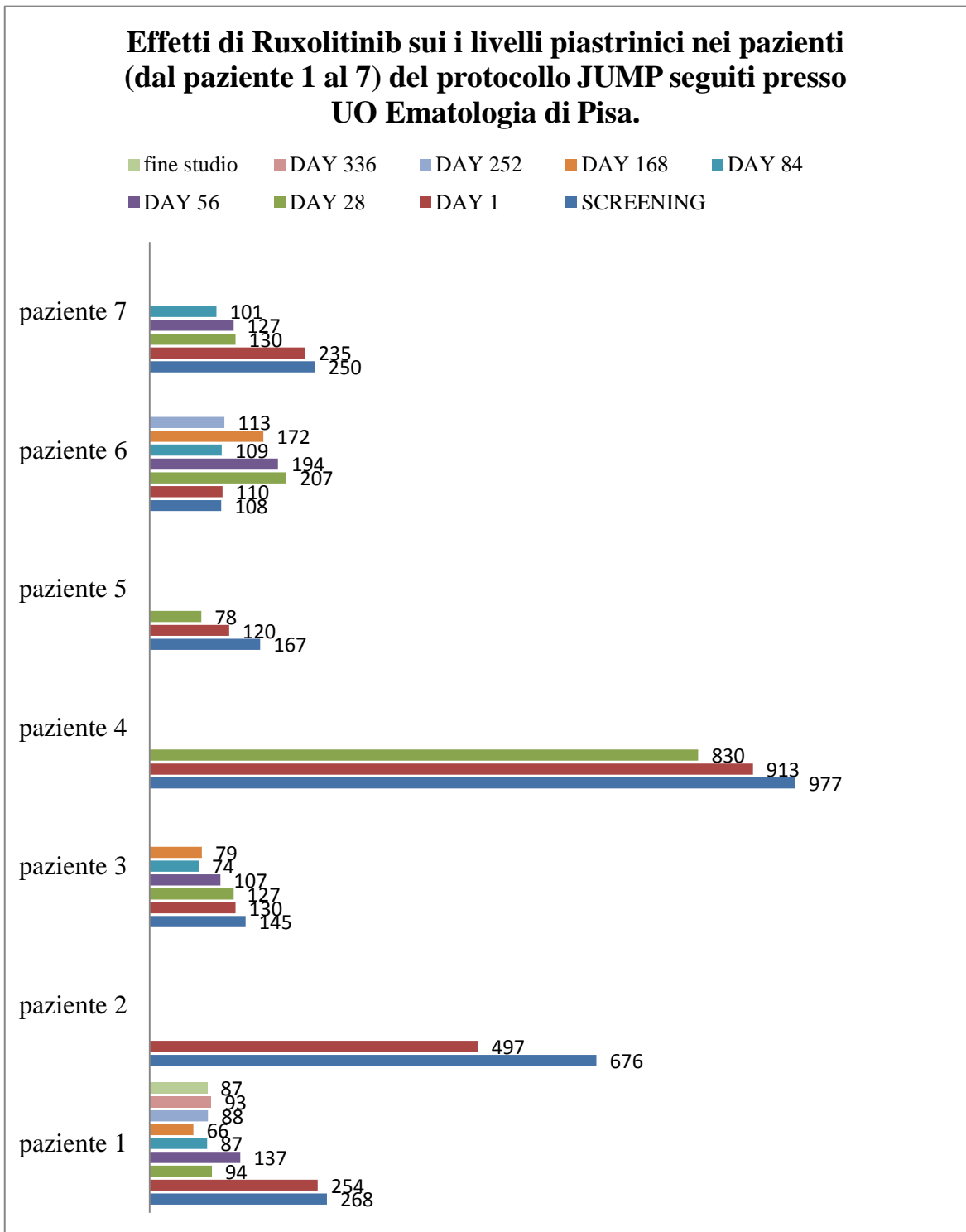


Grafico 14a. Effetti di Ruxolitinib sui i livelli piastrinici nei pazienti (dal paziente 1 al 7) del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

**Effetti di Ruxolitinib sui i livelli piastrinici nei pazienti
(dal paziente 8 al 14) del protocollo JUMP seguiti presso
UO Ematologia di Pisa.**

■ fine studio ■ DAY 336 ■ DAY 252 ■ DAY 168 ■ DAY 84
■ DAY 56 ■ DAY 28 ■ DAY 1 ■ SCREENING

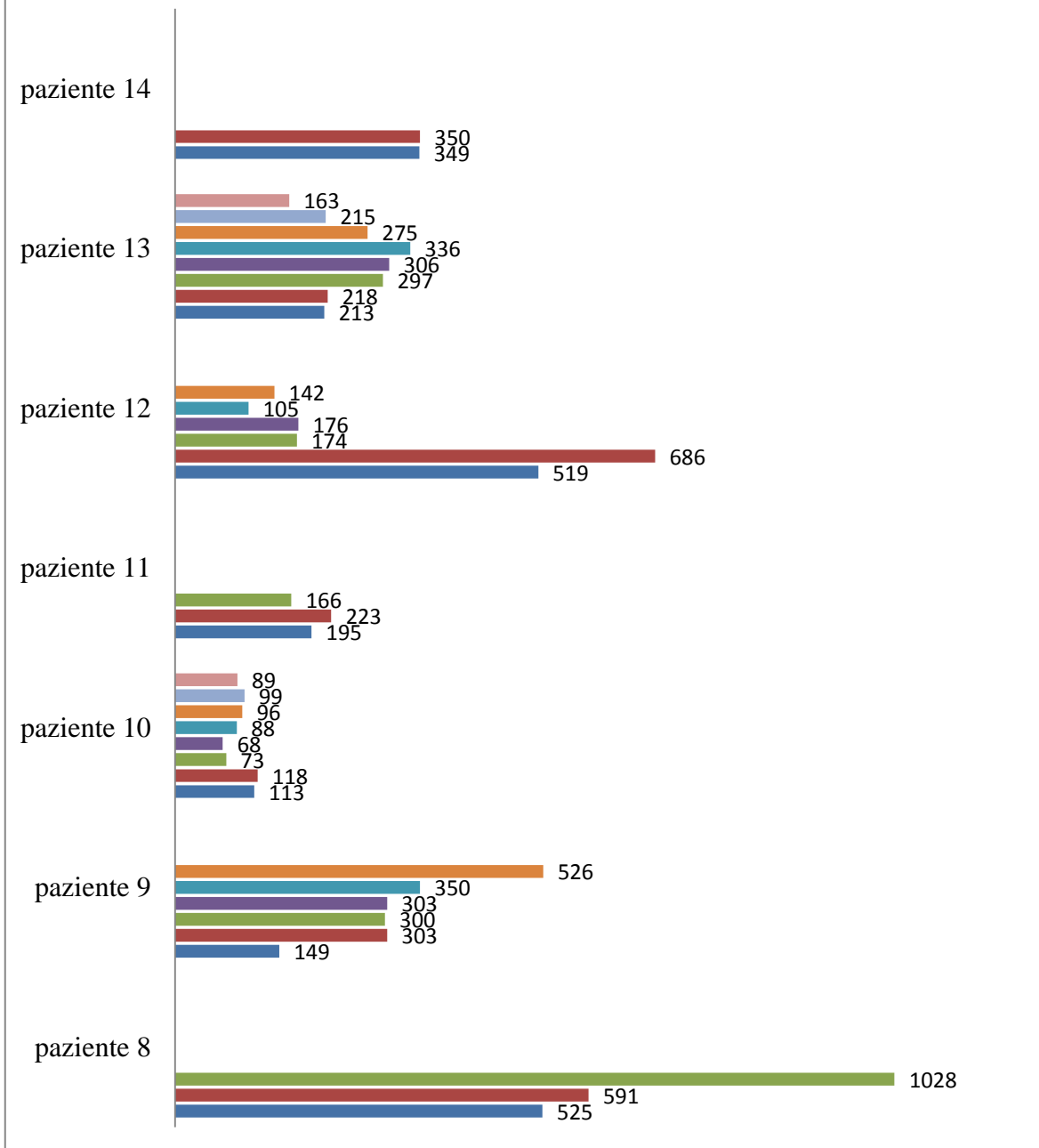


Grafico 14b. Effetti di Ruxolitinib sui i livelli piastrinici nei pazienti (dal paziente 8 al 14) del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

5.2 Risultati obiettivo 2

L'obiettivo 2 prevedeva lo studio dei profili di espressione dei *miRNA* di 4 dei pazienti arruolati nello studio clinico.

Confronto d'espressione dei miRNA tra sangue midollare e periferico degli stessi pazienti al tempo T0.

Nessun *miRNA* è risultato espresso in misura significativamente differente nel sangue midollare rispetto al periferico dello stesso paziente.

Per ciascun campione è stata analizzata una coorte iniziale di 675 *miRNA* (card A + card B), ma solo 74 *miRNA* per la piastra A e 40 *miRNA* per la piastra B sono stati usati per l'analisi statistica, dal momento che gli altri presentavano per almeno un campione valori di Ct > 35.

Sono stati eseguiti *Paired-T test* per valutare la differenza d'espressione dei *miRNA* sia tra campioni prelevati ai tempi T0 e T3, sia tra campioni di sangue midollare e sangue periferico dello stesso paziente.

E' stato effettuato un confronto del profilo d'espressione dei *miRNA* al tempo T0 e al tempo T3 nei pazienti presi in esame.

Il *T-test* calcolato sia con i $\Delta\Delta\text{Ct}$ che con i FC, in seguito alla correzione, ci ha permesso di individuare 9 *miRNA* up-regolati nei pazienti a tempo T3 rispetto a quelli a T0.

Si riportano di seguito i risultati relativi alle card A e B (*tabella*).

VALORI DEI MIRNA AL LIMITE DELLA SEGNIFICATIVITÀ			
Detector	p	Reg	piastra
hsa-miR-25-000403	0,033	up	A
hsa-miR-145-002278	0,034	up	A
hsa-miR-186-002285	0,045	up	A
hsa-miR-142-3p-000464	0,035	up	A
hsa-let-7b-002619	0,046	up	A
hsa-miR-30d-00420	0,01	up	B
hsa-miR-188-5p-002320	0,007	up	B
hsa-miR-942-002187	0,011	up	B
hsa-miR-378-002243	0,008	up	B

Tabella 22 - Risultati relativi ai valori dei miRNA al limite della significatività nelle piastrine A e B.

I risultati ottenuti con la statistica SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) confermano quelli ottenuti con Gene-Spring.

Confronto descrittivo dei valori di $\Delta\Delta Ct$ e FC tra il paziente deceduto ed il donatore sano.

Abbiamo quindi valutato se i *miRNA* risultati significativi presentassero valori di $\Delta\Delta Ct$ e *FC* differenti tra il paziente evoluto a LMA e deceduto ed il donatore sano, al fine di verificare se qualcuno dei *miRNA* di interesse avesse un livello di espressione particolarmente differente nel paziente in esame. Nessuno dei 9 *miRNA* significativi presenta valori d'espressione differenti tra il paziente leucemico e il donatore sano.

Ovviamente quest'ultimo non è un vero risultato sperimentale ma una semplice osservazione puramente descrittiva, da confermare una volta raccolti altri campioni con caratteristiche simili.

Target predetti e/o validati per i miRNA d'interesse

I target predetti e/o validati per i *miRNA* d'interesse sono riportati in 2 tabelle per ogni card, in una sono elencati i geni che presentano mutazioni in pazienti con mielofibrosi (tabella 19 A e 20 B. Esistono, poi, altri studi che hanno identificato i target espressi principalmente nei granulociti di pazienti con PMF. (Guglielmelli et al., 2007)

GENI CON MUTAZIONI IN PMF PUTATIVI TARGET DEI MIRNA, PIASTRA 1*					
	miR.142-3p	miR-25	miR-145-5p	let-7b-5p	miR-186-5p
JAK2	/	2 ALG	/	1 ALG	1 ALG
MPL	/	2 ALG	1 ALG	1 ALG	2 ALG
TET2	2 ALG	3 ALG	3 ALG	2 ALG	3 ALG
ASXL1	1 ALG	2 ALG	/	2 ALG	1 ALG
CBL	/	/	/	1 ALG	/
IDH1/IDH2	2 ALG	4 ALG (IDH1)	1 ALG (IDH1)	4 ALG (IDH2)	2 ALG (IDH2)
IKZF1	2 ALG	2 ALG	1 ALG	1 ALG	2 ALG
EZH2	/	2 ALG	/	4 ALG	1 ALG

GENI CON MUTAZIONI IN PMF PUTATIVI TARGET DEI MIRNA, PIASTRA 1B				
	miR-30d-5p	miR-188-5p	miR-378a-3p	miR-942
JAK2	1 ALG	/	/	/
MPL	3 ALG	1 ALG	/	/
TET2	1 ALG	2 ALG	1 ALG	2 ALG
ASXL1	2 ALG	/	1 ALG	/
CBL	/	/	2 ALG	/
IDH1/IDH2	4 ALG (IDH1)	2 ALG (IDH2)	1 ALG (IDH1)	1 ALG
IKZF1	2 ALG	1 ALG	1 ALG	1 ALG
EZH2	/	/	1 ALG	/

Tabella 23 e 24. Geni che presentano mutazioni in pazienti con PMF.

Infine sono riportati nella tabella sottostante i geni target di 2 o più miRNA d'interesse.

TARGET CHE SONO COMUNI A DUE O PIÙ MIRNA	
miR-145/miR-186	<i>ACSL4</i>
miR-25/miR-142-3p	<i>ZEB2</i>
miR-25/miR-186	<i>TOB1</i>
miR-186/miR-142-3p	<i>TARDBP</i>
miR-142-3p/let-7b	<i>TAB2</i>
miR-25/let-7b	<i>SPRYD4</i>
miR-145/miR-186	<i>SNX27</i>
miR-25/miR-186	<i>SMAD6</i>
miR-145/miR-25	<i>REV3L</i>
miR-25/miR-186	<i>OTUD4</i>
miRna-142-3p/let-7b	<i>MGATA4</i>
miR-145/miR-25	<i>KLF4</i>
miR-25/miR-142-3p	<i>ITGAV</i>
miR-25/let-7b	<i>HAND1</i>
miR-145/mir-142-3p/let-7b	<i>FNDC3A</i>
miR25/let-7b	<i>COL1A2</i>
miR-186/miR-142-3p	<i>CCNT2</i>
miR-25/let-7b/miR-142-3p	<i>ATP2A2</i>
miR-145/miR-186	<i>AKAP12</i>

Tabella 25. Geni target di 2 o più miRNA d'interesse.

CAPITOLO 6

Discussione

6.1 Discussione obiettivo 1

Confronto dei dati sulla sicurezza e tossicità del farmaco Ruxolitinib (INC424) somministrato all'interno dello studio in aperto, multicentrico, di accesso allargato CINC424A2401, a pazienti con mielofibrosi sia primaria che secondaria (post-policitemia vera, MF post-PV e post-trombocitemia essenziale, MF post-TE) seguiti presso la UO Ematologia di Pisa, con i risultati degli studi *COMFORT I* e *COMFORT II* (i trials che hanno portato all'approvazione di Ruxolitinib in Europa e negli USA).

Efficacia

Dimensioni spleniche

Nell'analisi dei dati relativi al follow-up a tre anni dello studio *COMFORT-II*, i pazienti trattati con Ruxolitinib hanno ottenuto un'importante e duratura riduzione delle dimensioni della milza. Infatti, il 51,4% dei pazienti trattati con Ruxolitinib, in tale studio, ha conseguito una riduzione $\geq 35\%$ delle dimensioni della milza rispetto ai valori basali. Tali pazienti, nel tempo, hanno continuato a mantenere la risposta splenica per tutta la durata del trattamento.

Per quanto riguarda i pazienti trattati con Ruxolitinib all'interno del protocollo JUMP e seguiti presso la UO Ematologia di Pisa, abbiamo preso in considerazione i valori delle dimensioni spleniche al baseline ed alla fine del trattamento. Per quanto concerne il valore delle dimensioni della milza alla "fine del trattamento", abbiamo considerato il valore riscontrato manualmente all'ultima visita effettuata all'interno del protocollo.

Nella tabella sottostante (*tabella 1*) sono riportati i dati delle dimensioni della milza (in cm rispetto all'arcata costale sinistra) ricavati all'esame obiettivo.

paziente	milza baseline (cm)	milza finale (cm)	minima dimensione raggiunta dalla milza (cm)	diminuzione %	Δ- milza
paziente 1	14	12	8	-14%	43%
paziente 2	15	15	15	0%	0
paziente 3	17	17	9	0%	47%
paziente 4	2	1	1	-50%	50%
paziente 5	25	12	12	-52%	52%
paziente 6	14	11	9	-21%	36%
paziente 7	22	11	11	-50%	50%
paziente 8	25	18	18	-28%	28%
paziente 9	-	-	-	-	-
paziente 10	17	9	6	-47%	65%
paziente 11	15	3	3	-80%	80%
paziente 12	16	9	9	-44%	44%
paziente 13	22	23	18	4%	18%
paziente 14	3	2	2	-33%	33%

Tabella 26. Efficacia di Ruxolitinib sulle dimensioni della milza nei pazienti del protocollo JUMP, seguiti presso la UO Ematologia di Pisa. Nella tabella si prendono in considerazione le variazioni della dimensioni spleniche tra il baseline e la visita finale, con conseguente calcolo in percentuale dell'entità della riduzione. In più, nella colonna a destra viene calcolato il Δ -milza: la differenza fra il valore delle dimensioni spleniche al baseline ed il valore minimo riscontrato nell'arco dell'intero periodo di trattamento.

In conclusione, la riduzione media delle dimensioni spleniche è stata di 4,923 cm, pari al 32,23%. Tale dato è in accordo con i risultati degli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II* che avevano dimostrato una riduzione del $\geq 35\%$.

Poiché 5 pazienti nel corso del trattamento avevano mostrato fluttuazioni delle dimensioni spleniche (riduzione e successivo incremento) abbiamo altresì calcolato un parametro (che abbiamo chiamato Δ -milza) che rappresenta la differenza fra il valore delle dimensioni spleniche al baseline ed il valore minimo riscontrato nell'arco dell'intero periodo di trattamento. Da tale analisi, la riduzione media delle dimensioni

spleniche è risultata ammontare al 42%. Se questa percentuale fosse risultata pari a zero avremmo concluso che tale farmaco non aveva avuto alcun effetto sulle dimensioni spleniche durante tutto il periodo del protocollo. Al contrario, con una percentuale pari al 42% possiamo concludere che Ruxolitinib ha realmente effetti benefici sul volume della milza, anche se in un terzo dei pazienti tale beneficio è risultato di breve durata.

Sintomatologia

Per quanto riguarda, invece, i sintomi sistemici, gli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II* hanno dimostrato che Ruxolitinib porta ad un miglioramento dei sintomi costituzionali associati alla malattia e della qualità della vita dei pazienti affetti da mielofibrosi. Nello studio *COMFORT-I* i dati riguardanti i sintomi della mielofibrosi sono stati raccolti attraverso un diario elettronico che i pazienti compilavano quotidianamente. Una percentuale significativamente più ampia di pazienti del gruppo che assumeva Ruxolitinib aveva ottenuto un miglioramento > o uguale al 50% del punteggio totale dei sintomi dal basale alla settimana 24, in confronto al gruppo trattato con placebo, con conseguente netto miglioramento della qualità della vita.

Dei pazienti arruolati nel nostro studio, 10 avevano riferito sintomi sistemici all'arruolamento (in particolare, sudorazione profusa e calo ponderale); di questi, 7 hanno mostrato un netto miglioramento dei sintomi sistemici durante tutto il periodo di trattamento con Ruxolitinib, mentre 3 pazienti non hanno avuto nessun beneficio, tanto da chiedere di interrompere lo studio. Inoltre, il miglioramento riferito si è mantenuto tale per tutta la durata dello studio.

Sicurezza

Per quanto concerne la sicurezza del farmaco, le reazioni avverse più frequentemente segnalate durante gli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II* sono state, dal punto di vista ematologico, anemia (82,4%), trombocitopenia (69,8%) e neutropenia (15,6%). Le tre reazioni avverse non ematologiche che si sono verificate con maggiore frequenza, in entrambi i protocolli di studio, sono state: ecchimosi (21,3%), vertigini (15%) e cefalea (13,9%). Le tre anomalie di laboratorio che più frequentemente si sono verificate sono

state: l'aumento dell'alanina amino-transferasi (26,9%), l'aumento dell'aspartato amino-transferasi (19,3%) e l'ipercolesterolemia (16,6%).

Nei 14 pazienti in trattamento con Ruxolitinib all'interno del protocollo JUMP, gli eventi avversi più frequentemente riscontrati sono stati: anemia, piastrinopenia e neutropenia; si sono registrati, inoltre, anche due episodi di piastrinosi (in pazienti con MF post-TE), uno dei quali ha portato all'interruzione dell'assunzione del farmaco e l'uscita dal protocollo.

Per quanto riguarda l'anemia si sono riscontrati ben 35 episodi, di grado variabile dal grado 1 al grado 4. Per alcuni, in particolar modo per quelli di grado 3 (10 casi, 29%) o 4 (4 casi, 11%), i pazienti hanno interrotto temporaneamente o definitivamente l'assunzione di Ruxolitinib. Al contrario, per la maggior parte delle forme di anemia insorte durante il trattamento, principalmente per quelle di grado 1 (4 casi, 11%) e 2 (17 casi, 49%), è bastato diminuire la dose di Ruxolitinib per un tempo variabile in media dalle 2 alle 4 settimane, per ritornare ad avere livelli di Hb compatibili con la malattia e, fondamentalmente, sovrapponibili a quelli dello screening.

Per quanto riguarda la piastrinopenia, in totale si sono riscontrati ben 16 eventi avversi, di grado variabile. Per alcuni, in particolar modo per quelli di grado 3 (2 casi, 13%) o 4 (1 solo caso, 6%), il paziente ha interrotto temporaneamente o definitivamente l'assunzione di Ruxolitinib. Per la maggior parte delle forme di piastrinopenia, insorte durante il trattamento, principalmente per quelle di grado 1 (9 casi, 56%) e 2 (4 casi, 25%), è bastato diminuire la dose di Ruxolitinib per un tempo variabile in media da 2 a 6 settimane, per ritornare ad avere livelli di PLT compatibili con la malattia di base e, fondamentalmente, sovrapponibili a quelli dello screening.

Per quanto riguarda la neutropenia, in totale si sono riscontrati ben 6 eventi avversi, di grado variabile. Per alcuni, in particolar modo per quelli di grado 3 (4 casi, 67%) o 4 (1 solo caso, 17%), il paziente ha interrotto temporaneamente o definitivamente l'assunzione di Ruxolitinib. Per la maggior parte delle forme di neutropenia insorte durante il trattamento, principalmente per quelle di grado 1 (1 solo caso, 16%) è bastato diminuire la dose di Ruxolitinib per un tempo variabile in media da 2 a 4-6 settimane, per ritornare ad avere livelli di neutrofili compatibili con la malattia di base e, fondamentalmente, sovrapponibili a quelli dello screening.

Fra le tossicità non ematologiche, le più frequentemente riscontrate fra i pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa, sono:

<i>Evento avverso</i>	<i>casi</i>
Aumento ALT di grado ½	6
Aumento ALT di grado 3	1
cedimento vertebrale	1
Tosse	1
Pancreatite	1
edemi periferici	1
versamento pleurico	1
versamento peritoneale	1
Fatigue	1
Dispnea	2
Astenia	1
Epistassi	1
perforazione intestinale	1
Epigastralgia/dolore addominale	2
mucosite/gengivite	1

Tabella 27. Eventi avversi non ematologici riscontrati nel gruppo dei 14 pazienti in trattamento con Ruxolitinib all'interno del protocollo JUMP, seguiti presso la UO Ematologia di Pisa.

Confronto fra i risultati degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

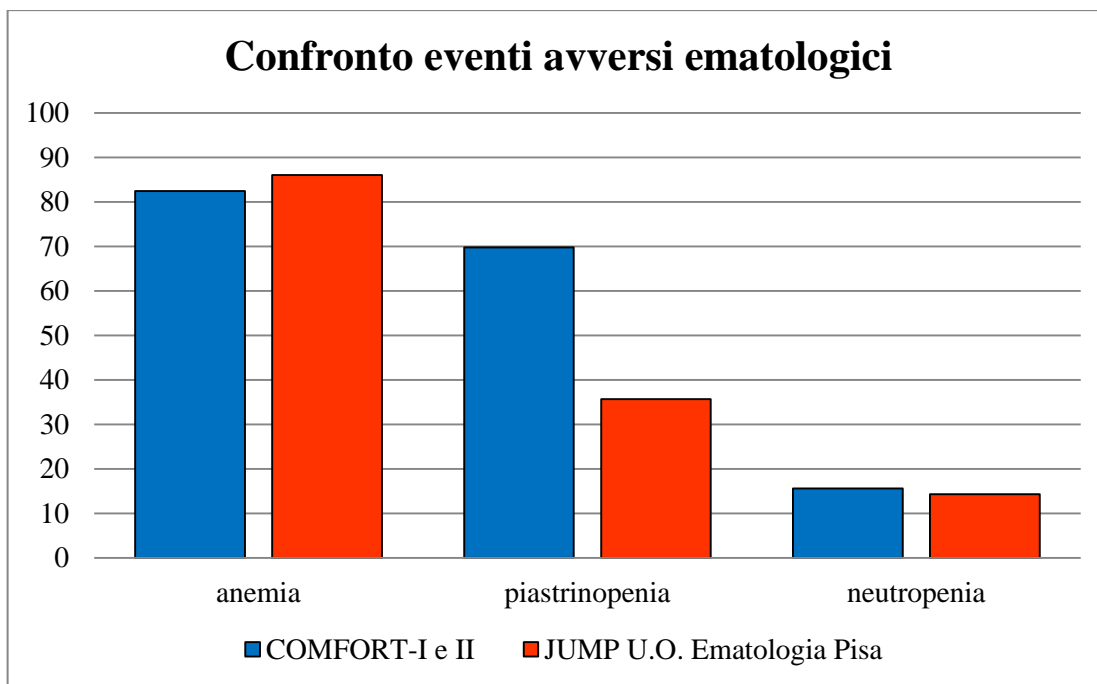


Grafico 15. Confronto eventi avversi ematologici fra i risultati degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

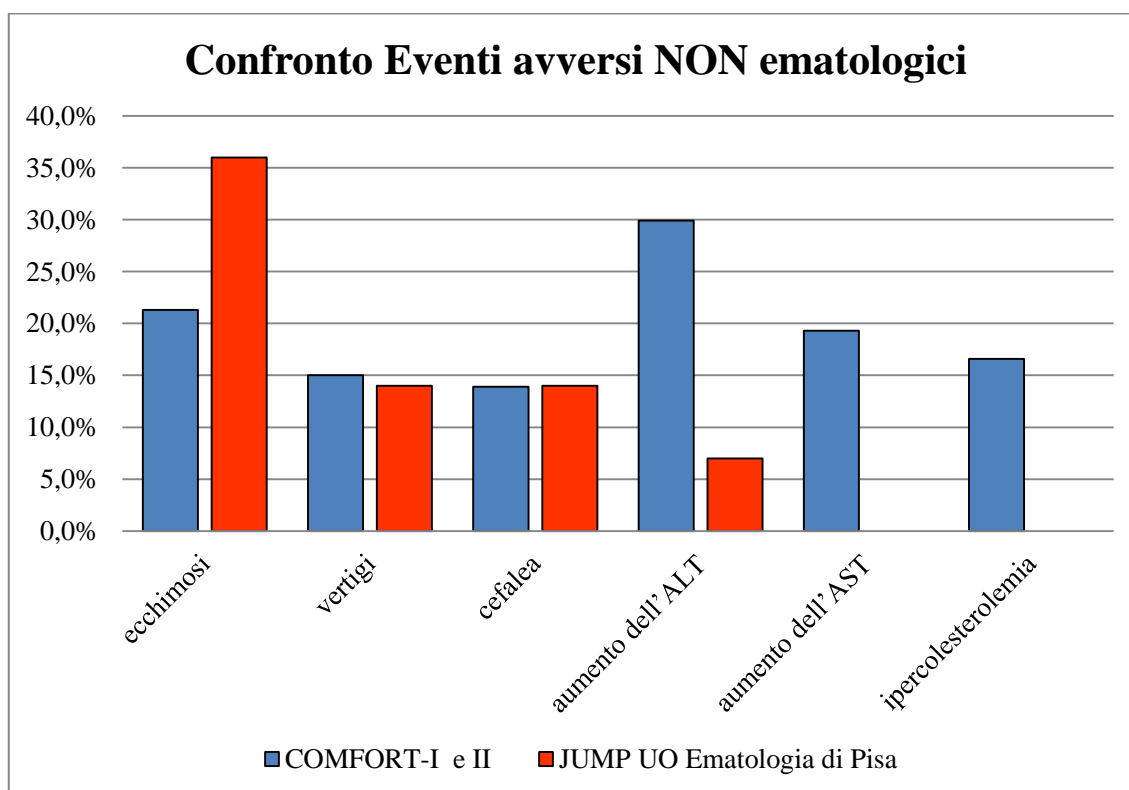


Grafico 16. Confronto eventi avversi ematologici fra i risultati degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

Nello studio *COMFORT-I*, 13 pazienti su 155 (8,4%) sono morti nel gruppo che assumeva Ruxolitinib, mentre 24 pazienti su 154 (15,6%) sono morti nel gruppo con placebo.

Nello studio *COMFORT-II*, 13 pazienti su 146 (8,9%) sono morti nel gruppo che assumeva Ruxolitinib, mentre 5 pazienti su 73 (6,8%) sono morti nel gruppo dei pazienti che assumevano la miglior terapia attualmente disponibile in commercio per il trattamento della mielofibrosi.

Nello studio JUMP seguito presso UO Ematologia di Pisa si sono riscontrati 3 decessi su un totale di 14 pazienti trattati con Ruxolitinib (21% del totale), percentuale più elevata rispetto ai dati degli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II*.

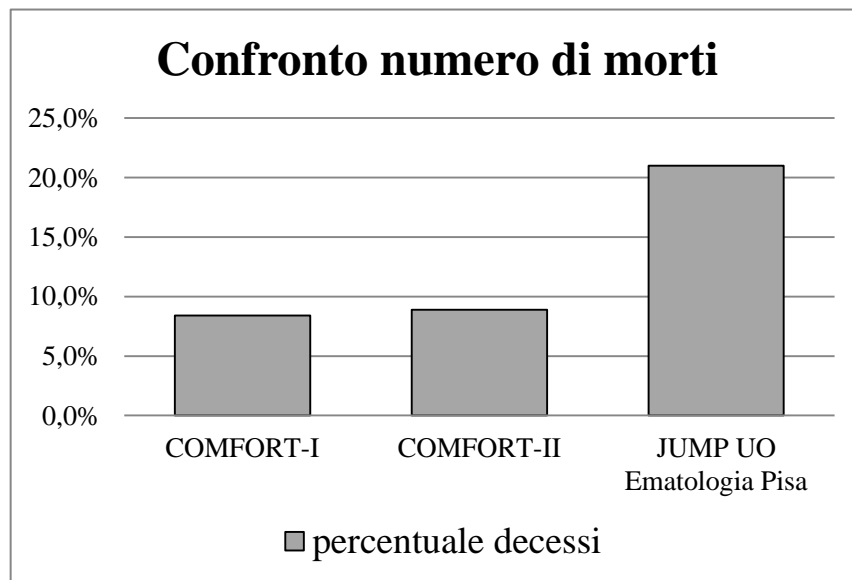


Grafico 17. Confronto fra le percentuali di decessi degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

E' necessario, altresì, aggiungere che fra questi 3 pazienti deceduti, soltanto di uno abbiamo documentazione di un'evoluzione della malattia (mielofibrosi) in LMA. Per gli altri 2 pazienti non ci sono dati che dimostrino una sicura correlazione con la malattia di base o con l'assunzione di Ruxolitinib. In particolare, 1 dei due pazienti è deceduto per cause ignote successivamente ad un intervento chirurgico di emergenza per perforazione intestinale; mentre l'altro è deceduto, anch'esso, per cause ignote, all'età di 84 anni, dopo la comparsa di dolore al rachide lombare per cedimento vertebrale.

Secondo i dati riportati negli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II* le sospensioni del trattamento nel braccio Ruxolitinib sono state principalmente dovute ad eventi avversi (16,4%) ed alla progressione della malattia (15,1%), mentre le sospensioni nel braccio che riceveva la terapia tradizionale erano principalmente dovute al ritiro del consenso ed ad altri motivi (ciascuno 12,3%). Solo due dei pazienti hanno sospeso a causa di anemia (1%) e sette pazienti a causa di trombocitopenia (3,6%). Fra i pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa, 4 pazienti hanno interrotto per il verificarsi di eventi avversi severi che non hanno permesso di riprendere il trattamento on Ruxolitinib, 4 pazienti hanno dovuto interrompere per mancata risposta al farmaco; i rimanenti 3 pazienti sono deceduti.

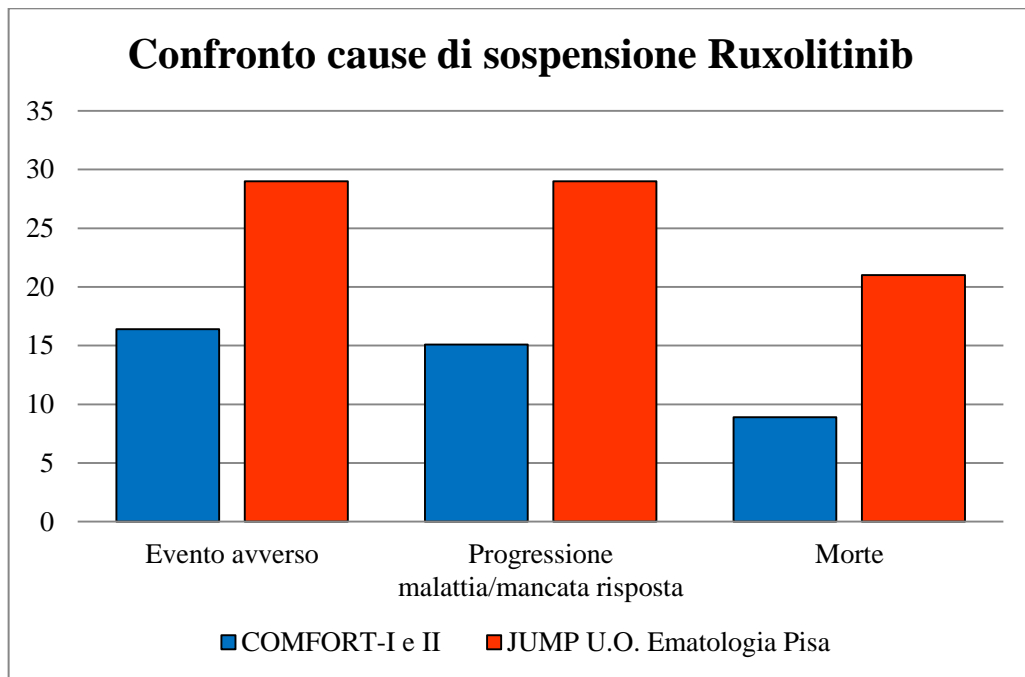


Grafico18. Confronto fra le cause di sospensione del trattamento degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

6.2 Discussione obiettivo 2

L'obiettivo 2 prevedeva lo studio dei profili di espressione dei miRNA nei pazienti con mielofibrosi. Nel nostro studio ruxolitinib ha indotto una aumentata espressione di *Hsa-miR-25/ Hsa-miR-145/ Hsa-miR-186/ Hsa-miR-142-3p/ Hsa-let-7b/ Hsa-miR-30d-5p/ Hsa-miR-188-5p/ Hsa-miR-378-3p/ Hsa-miR-942*. Alcuni di questi *miRNA* sono già stati correlati a processi di tumori genesi:

- ✓ il *miR145* sembra essere un oncosoppressore; non a caso la sua espressione è down-regolata nel tumore colon rettale, della mammella e della prostata [Esquela-Kerscher et al., 2006].
- ✓ il *miR142-3p* in alcuni tipi di leucemie ha un'espressione alterata data dalla traslocazione di *MYC*, che avviene nel locus del *miRNA* stesso. Questo sembra impedire il processamento del *miRNA* portando ad una aumentata espressione di *MYC* [Esquela-Kerscher et al., 2006].
- ✓ il *miRNA let7* regola negativamente l'oncogene *RAS* ed è in grado di inibire la crescita ed il differenziamento cellulare all'interno del tessuto polmonare. Esistono studi che riportano la diminuzione dell'espressione di questo *miRNA* nel tumore del polmone [Esquela-Kerscher et al., 2006].
- ✓ il *miR25* sembra agire da potenziale oncosoppressore nel tumore del colon [Li et al., 2013]
- ✓ il *miR186* sembra avere un ruolo di oncosoppressore nella progressione dell'adenocarcinoma polmonare [Cai et al., 2013].

La up-regolazione di questi miRNA oncosoppressori in corso di trattamento con ruxolitinib potrebbe pertanto avere un ruolo favorevole.

Al contrario, tra i target individuati per i miRNA di interesse si riscontrano alcuni *fattori di trascrizione (BACH2, AKT3, RARB, FOXA1 e HGMA)* coinvolti nella proliferazione e la sopravvivenza cellulare, oncogeni come *MYC* o geni che codificano per *proteine di trasduzione del segnale (ARF4 PDFGA, SOCS, BCL-2, NPM1, CCND2 e CASP2)*.

L'aumentata espressione dei miRNA di cui tali geni sono i targets potrebbe pertanto ritenersi vantaggiosa in quanto tali geni, negativi dal punto di vista patogenetico, potrebbero risultare silenziati.

Infine, tra i geni target dei *miRNA* d'interesse si annoverano anche geni la cui mutazione sembra giochi un ruolo patogenetico importante nelle malattie mieloproliferative croniche:

JAK2

MPL

ZEB2 e *ITGAV* sono target dei *miRNA* *miR-25* e *miR-142-3p*; il primo codifica per una proteina che regola la trascrizione agendo come repressore trascrizionale, inibendo così l'espressione genica dell' *IL-2*; il secondo codifica per un recettore per le integrine.

- *TOB1* e *SMAD6* sono target sia di *miR-25* e *miR-186*; *TOB1* importa le proteine *SMAD* nel nucleo, dove regolano negativamente il *signaling* di *BMP* ed il processo di apoptosi.
- *ACSL4*, *SNX27* e *AKAP12* sono target sia del *miR-145* che del *miR-186*. *ACSL4* è coinvolta nel metabolismo di acidi grassi e lipidi; *SNX27* è una proteina di trasduzione del segnale; *AKAP12* è una proteina di ancoraggio che media la compartimentalizzazione della *proteina chinasi A (PKA)* e della *proteina chinasi B (PKB)*.
- *TARDBP* e *CCNT2* sono regolati dal *miR-186* e dal *miR-142-3p*. *TARDBP* codifica per una proteina in grado di legare il DNA o l'RNA e mediare lo *splicing* e la trascrizione; *CCNT2* è una subunità regolatoria del complesso *ciclina/CDK9*.
- *TAB2* e *MGAT4A* sono bersaglio del *miR-142-3p* e di *let-7b*. *TAB2* promuove l'attivazione di *MAP3K7* nel *signaling* di *IL1* e *MGAT4A* è una glicolistrasferasi.

- *REV3L* e *KLF4* sono regolati dal *miR-145* e dal *miR-25*. *REV3L* è una proteina legante il DNA che agisce nella replicazione dello stesso, *KLF4* è un fattore di trascrizione.
- *HAND1* e *COL1A2* sono inibiti dal *miR-25* e da *let-7b*. *HAND1* svolge un ruolo importante come fattore di trascrizione nello sviluppo del cuore, *COL1A2* è una proteina della famiglia del collagene di tipo I.
- *ATP2A2* è target di tre dei 9 *miRNA* significativi: *miR-25*, *miR-142-3p* e *let-7b*. *ATP2A2* è un enzima magnesio dipendente che catalizza l'idrolisi dell'ATP accoppiata con la traslocazione del calcio dal citoplasma al lume del reticolo saccoplasmatico.

Visti i risultati ottenuti e gli innumerevoli dati raccolti sui target putativi dei *miRNA* upregolati a T3 piuttosto che a T0 siamo portati a credere che questi *miRNA* abbiano un reale coinvolgimento nei meccanismi biologici che stanno alla base della risposta terapeutica al farmaco.

CAPITOLO 7

Conclusioni

Dal confronto dei dati raccolti nel campione di 14 pazienti affetti da mielofibrosi, sia primitiva che secondaria, in trattamento con Ruxolitinib, all'interno del protocollo JUMP, seguiti presso UO Ematologia di Pisa, con i dati degli studi internazionali *COMFORT-I* e *COMFORT-II*, si può concludere che pur essendo un campione numericamente molto inferiore e nel quale pochi pazienti sono riusciti a portare a termine l'iter completo del protocollo, in linea generale, si sono riscontrati valori e dati pressoché sovrapponibili.

Possiamo affermare che il farmaco Ruxolitinib è risultato efficace nell'intero campione nel migliorare le dimensioni della milza per lo meno a breve termine. Per quanto riguarda, invece, i sintomi sistemici, l'efficacia di Ruxolitinib si è mantenuta anche a lungo termine. La sicurezza del farmaco è stata valutata considerando i vari eventi avversi verificatisi nel corso del monitoraggio dei pazienti, sia ematologici che non. Nel campione seguito presso la UO Ematologia di Pisa, si è riscontrato un numero maggiore di eventi avversi ematologici di anemia (86% nel nostro campione vs 82,4% negli studi *COMFORT*) e piastrinosi (14% vs 0% negli studi *COMFORT*) e una diversa frequenza degli eventi avversi non ematologici: ecchimosi (36% nel nostro campione di pazienti vs 21,3% negli studi *COMFORT*), vertigini (14% vs 15%), cefalea (14% vs 13,9%), aumento dei livelli di ALT (7% vs 29,9%), aumento dei livelli di AST (0% vs 19,3%) ed ipercolesterolemia (0% vs 16%).

Per quanto concerne l'uscita dal protocollo, nel nostro campione, si registra una percentuale più elevata rispetto agli studi *COMFORT-I* e *COMFORT-II*, in quanto 11 pazienti su 14 non hanno portato a termine l'iter del protocollo, interrompendo il trattamento con Ruxolitinib. Le cause che hanno portato all'uscita dal protocollo sono le stesse, ma le percentuali sono, di conseguenza, maggiori: evento avverso (29% nel nostro campione vs 14,6% negli studi *COMFORT*), progressione malattia/mancata risposta alla terapia (29% vs 15,1%), morte (21% vs 0%)

Per quanto concerne i miRNA, nonostante l'esiguità della casistica, i dati ci paiono rilevanti e suscettibili di validazione con la prosecuzione dello studio stesso: potremo infatti

1) testare l'espressione dei 9 miRNA sopra elencati nel sangue periferico di pazienti affetti da mielofibrosi valutandone la eventuale correlazione con stadio di malattia, splenomegalia, valori emocromo-citometrici, terapia in atto, in modo da poter valutare l'impatto di tali miRNA sulla presentazione/patogenesi della malattia;

2) valutare i 9 miRNA dopo 3 e 6 mesi di trattamento con Ruxolitinib e così valicare la up-regolazione già documentata nei nostri 3 pazienti;

3) valutare i pazienti con mielofibrosi per mutazioni di *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *MPL* e correlare la presenza o meno di mutazioni, ed eventualmente anche l'espressione genica dei suddetti geni, con i miRNA in esame. Utilizzare i dati mutazionali di *JAK2* disponibili dalla diagnostica routinaria per ulteriori correlazioni con i miRNA di interesse.

L'esito di tali test potrebbe fornirci ulteriori dati sulla patogenesi della MF e sul meccanismo d'azione di Ruxolitinib.

INDICE FIGURE

Figura 1 – Esempio di “receptor protein tyrosine kinases”: PDGF-r

Figura 2 – Jak-STAT pathway.

Figura 3 – Malattie mieloproliferative croniche.

Figura 4 - Ruolo della TPO nel processo di patogenesi.

Figura 5 - Mutazione JAK2 (9p24.2), V617F.

Figura 6 - La Via JAK/STAT

Figura 7 – Dacriociti su sangue periferico.

Figura 8- A) Esempio di fibrosi di grado-1 su biopsia osteo-midollare; B) esempio di osteosclerosi prominente (colorazione ematossilina-eosina) su biopsia osteo-midollare; C) e D) Esempio di prominente emopoiesi extra-midollare nella milza, con colorazione ematossilina-eosina.

Figura 9 – Algoritmo trattamento mielofibrosi associata ad anemia.

Figura 10 – Farmaci sperimentali attualmente in studio per il trattamento della mielofibrosi.

Figura 11 – Algoritmo per il trattamento della mielofibrosi

Figura 12 - Variazione in percentuale del volume della milza a partire dal valore basale, valutato mediante RMI o TC a distanza di 24 settimane.

Figure 13 e 14 –Confronti dati degli studi COMFORT-I e COMFORT-II.

INDICE GRAFICI

Grafico 1 - Pazienti arruolati nel protocollo JUMP presso UO Ematologia di Pisa, divisi per sesso.

Grafico 2 - IPPS nei pazienti arruolati nel protocollo JUMP presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 3- DIPSS nei pazienti arruolati nel protocollo JUMP presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 4 - DIPSS-plus nei pazienti arruolati nel protocollo JUMP presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 5 - Interruzione dell'assunzione di Ruxolitinib con relativo abbandono del protocollo JUMP.

Grafico 6a - Efficacia di Ruxolitinib sulla splenomegalia (misurazione in cm dall'arcata costale inferiore) nei pazienti seguiti nel protocollo di studio JUMP UO Ematologia di Pisa, pazienti da 1 a 7.

Grafico 6b - Efficacia di Ruxolitinib sulla splenomegalia (misurazione in cm dall'arcata costale inferiore) nei pazienti seguiti nel protocollo di studio JUMP UO Ematologia di Pisa, pazienti da 8 a 14.

Grafico 7a: Correlazione tra riduzione della splenomegalia e dose di Ruxolitinib paziente # 1

Grafico 7b: Correlazione tra riduzione della splenomegalia e dose di Ruxolitinib paziente # 10.

Grafico 7c: Correlazione tra riduzione della splenomegalia e dose di Ruxolitinib paziente # 11.

Grafico 8. Efficacia di Ruxolitinib sui sintomi sistemici nei pazienti seguiti nel protocollo di studio JUMP
UO Ematologia di Pisa

Grafico 9a. Livelli di Hb nei pazienti (dal paziente 1 al 7) del protocollo JUMP in trattamento con Ruxolitinib, seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 9b. Livelli di Hb nei pazienti (dal paziente 8 al 14) del protocollo JUMP in trattamento con Ruxolitinib, seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 10. Frequenza dell'anemia come evento avverso nei pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 11. Frequenza della piastrinopenia come evento avverso nei pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 12. Frequenza della neutropenia come evento avverso nei pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 13. Frequenza degli eventi avversi non ematologici più comuni nei pazienti del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 14a. Effetti di Ruxolitinib sui i livelli piastrinici nei pazienti (dal paziente 1 al 7) del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 14b. Effetti di Ruxolitinib sui i livelli piastrinici nei pazienti (dal paziente 8 al 14) del protocollo JUMP seguiti presso UO Ematologia di Pisa.

Grafico 15. Confronto eventi avversi ematologici fra i risultati degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

Grafico 16. Confronto eventi avversi ematologici fra i risultati degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

Grafico 17. Confronto fra le percentuali di decessi degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

Grafico 18. Confronto fra le cause di sospensione del trattamento degli studi COMFORT e del protocollo JUMP seguito presso la UO Ematologia di Pisa.

INDICE TABELLE

- Tabella 1* – La classificazione delle malattie mieloproliferative croniche, *WHO 2008*.
- Tabella 2* – Patologie associate a fibrosi midollare.
- Tabella 3* – Classificazione MF in rapporto al grado di cellularità/fibrosi
- Tabella 4* – Criteri maggiori e minori per la diagnosi di mielofibrosi (*WHO 2008*).
- Tabella 5* – Criteri IWG-MRT per la diagnosi di MF post-PV.
- Tabella 6* - Criteri IWG-MRT per la diagnosi di MF post-TE
- Tabella 7* – Tabella della gradazione della fibrosi midollare.
- Tabella 8*: 8a – criteri clinici e molecolari della MF; 8b staging clinico; 8c criteri istologici (*WHO*) della MF
- Tabella 9* – Diagnosi differenziale della mielofibrosi.
- Tabella 10* - *L'International Prognostic Scoring System – IPPS*
- Tabella 11* – Gruppi di rischio e sopravvivenza nei pazienti con MF.
- Tabella 12* – *DIPSS (Dynamic International Prognostic Scoring System)*.
- Tabella 13* – Gruppi di rischio secondo il *DIPSS plus*.
- Tabella 14* – criteri di inclusione nello studio *COMFORT-I*
- Tabella 15* – criteri di esclusione dello studio *COMFORT-I*
- Tabella 16* – Criteri di inclusione dello studio *COMFORT-II*.
- Tabella 17* – Criteri di esclusione dello studio *COMFORT-II*.
- Tabella 18* - Dosaggio di Ruxolitinib in base ai valori della conta piastrinica, nel caso che il paziente non abbia mai sospeso l'assunzione del farmaco.
- Tabella 19* - Dosaggio di Ruxolitinib in base ai valori della conta piastrinica, nel caso in cui il paziente abbia interrotto/diminuito l'assunzione del farmaco.
- Tabella 20* - Dosaggio di Ruxolitinib in base ai valori dei neutrofili, nel caso in cui il paziente abbia interrotto/diminuito l'assunzione del farmaco.
- Tabella 21*- Dati clinici ed istopatologici dei pazienti affetti da mielofibrosi arruolati nel *protocollo JUMP*.
- Tabella 22* - Risultati relativi ai valori dei miRNA al limite della significatività nelle piastre A e B.
- Tabelle 23 e 24*. Geni che presentano mutazioni in pazienti con PMF.
- Tabella 25*. Geni target di 2 o più miRNA d'interesse.

Tabella 26. Efficacia di Ruxolitinib sulle dimensioni della milza nei pazienti del protocollo JUMP, seguiti presso la UO Ematologia di Pisa. Nella tabella si prendono in considerazione le variazioni delle dimensioni spleniche tra il baseline e la visita finale, con conseguente calcolo in percentuale dell'entità della riduzione. In più, nella colonna a destra viene calcolato il Δ -milza: la differenza fra il valore delle dimensioni spleniche al baseline ed il valore minimo riscontrato nell'arco dell'intero periodo di trattamento.

Tabella 27. Eventi avversi non ematologici riscontrati nel gruppo dei 14 pazienti in trattamento con Ruxolitinib all'interno del protocollo JUMP, seguiti presso la UO Ematologia di Pisa.

Riferimenti bibliografici

- **Arsalan** Ahmed nd Chung-Che(Jeff) Chang. *Chronic Idiopathic Myelofibrosis: clinicopathologic Features, Pathogenesis and Prognosis*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2006; 130(8) 1133-1143.
- **Ballen K.** *How to manage the transplant question in myelofibrosis*. Blood Cancer J.2012 march; 2(3): e 59. Published online 2012 march 2.
- **Ballen KK, shrestha S., Sobocinski KA, et al.** *Outcome of transplantation for myelofibrosis*, Biol Blood marrow Transplant. 2010; 16 (3): 358-367
- **Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al.** *Philadelphia negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European*. LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2011;29(6):761 •]70.
- **Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al.** *Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders*. Lancet. 2005;365(9464):1054-61.
- **Besses C, Martinez-Sellés M.** *Anagrelide and cardiovascular events*. Much ado about nothing Leuk Res. 2011;35(12):1543-4.
- **Carulli G.**, *Manuale di ematologia per gli studenti di medicina*, Genova, casa editrice ECIG, febbraio 2011
- **Castoldi G., Liso V.**, *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*, the McGraw.Hill Companies, 6° edizione, 2012.
- **Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al.** *New prognostic scoring system for primary myelobrosis based on a study of the International Working Group for Myelobrosis Research and Treatment*. Blood. 2009;113:2895–2901.

- **Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al.** *New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment.* Blood. 2009;113(13):2895-901.
- **Cervantes F, Passamonti F, Barosi G.** *Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders.* Leukemia. 2008;22(5):905-14.
- **Cervantes, F, et al.** *Long-Term Safety, Efficacy, and Survival Findings From COMFORT-II, a Phase 3 Study Comparing Ruxolitinib with Best Available Therapy (BAT) for the Treatment of Myelofibrosis (MF)* Blood. 2012. Abstract #801. American Society of Hematology 2012 Annual Meeting. Atlanta, GA.)
- **Guglielmelli P, Tozzi L, Pancrazzi A, Bogani C, Antonioli E, Ponziani V, Poli G, Zini R, Ferrari S, Manfredini R, Bosi A, Vannucchi AM;** MPD Research Consortium., Department of Hematology, University of Florence, Florence, Italy., *Exp Hematol.* 2007 Novembre; 35 (11) :1708-18.
- **Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al.** *JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis.* N Engl J Med. 2012;366(9):787-98. *soba D, Rodrigues G, Myles J, Zee B, Pater J.* Interpreting the significance of changes in health-related quality-of-life scores. *J Clin Oncol.* 1998;16(1):139-44.
- **Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al.** *JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis.* New Eng J Med. 2012: March 1;366:787-98.
- **Harrison C, Kiladjian JJ, Gisslinger H, et al.** *Association of Cytokine Levels and Reductions in Spleen Size in COMFORT-II, a Phase 3 Study Comparing*

Ruxolitinib to Best Available Therapy (BAT). Abstract # 6625. American Society of Clinical Oncology 2012 Annual Meeting, Chicago, IL.

- **Heuck G.** *Zwei fälle von leukämie mit eigenthümlichem blut-resp knochenmarksbefund.* Arch Pathol Anat Physiol Virchows. 1879;78:475-96.
- **Incyte Corporation,** *Jakafi (ruxolitinib)* [package insert]. Wilmington, DE: Incyte Corporation; 2011.
- **James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al.** *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.* Nature. 2005;434(7037):1144-8.
- **Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A** *gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.* N Engl J Med. 2005;352(17):1779-90.
- **Kvasnicka, HM, et al.** *Long Term Intervention Effects on Bone Marrow Morphology in Myelofibrosis: Patients Treated With Ruxolitinib and Best Available Therapy.* Abstract #S591. 18th Congress of European Hematology Association (EHA). Stockholm, Sweden
- **Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al.** *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.* Cancer Cell. 2005;7(4):387 •]97.
- **Martinez •]Trillos A, Gaya A, Maffioli M, Arellano •]Rodrigo E, Calvo X, Diaz •]Beya M, et al.** *Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients.* Ann Hematol. 2010;89(12):1233 •]7.

- **Mesa RA, Green A, Barosi G, Verstovsek S, Vardiman J, Gale RP.** *MPN-associated myelofibrosis (MPN-MF)*. *Leuk Res.* 2011;35(1):12-3. [Haematologica](#). 2013 Aug 2. [Epub ahead of print]
- **Mesa RA, Kiladjian JJ, Verstovsek S, Al-Ali HK, Gotlib JR, Gisslinger H, Levy RS, Siulnik A, Gupta V, Khan M, Dipersio JF, McQuitty M, Catalano JV, Hunter DS, Knoops L, Deininger M, Cervantes F, Miller C, Vannucchi AM, Silver RT, Barbui T, Talpaz M, Barosi G, Winton EF, Mendeson E, Harvey JH, Arcasoy MO, Hexner E, Lyons RM, Paquette R, Raza A, Sun W, Sandor V, Kantarjian HM, Harrison C.** *Comparison of placebo and best available therapy for the treatment of myelofibrosis in the phase 3 COMFORT studies*. Source, Scottsdale, AZ, USA;
- **Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M, Verstovsek S, Camoriano J, Barnes S, et al.** *The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international Internetbased survey of 1179 MPD patients*. *Cancer.* 2007;109(1):68-76.
- **Mesa RA, Pardanani AD, Hussein K, Wu W, Schwager S, Litzow MR, et al.** *Phase 1/2 study of pomalidomide in myelofibrosis*. *Am J Hematol.* 2009;85(2):129 •]30.
- **Mesa RA, Schwager S, Radia D, et al.** *The myelofibrosis symptom assessment form (MFSAF): an evidence-based brief inventory to measure quality of life and symptomatic response to treatment in myelofibrosis*. *Leuk Res.* 2009.doi:10.1016/j.leukres.2009.01.035.
- **Mesa RA, Schwager S, Radia D, et al.** *The Myelofibrosis Symptom Assessment Form (MFSAF): an evidence-based brief inventory to measure quality of life and symptomatic response to treatment in myelofibrosis*. *Leuk Res.* 2009;33:1199-1203.

- **Mesa RA, Schwagera S, Radia D, et al.** *The Myelofibrosis Symptom Assessment Form (MFSAF): an evidence-based brief inventory to measure quality of life and symptomatic response to treatment in myelofibrosis.* Leuk Res. 2009;33:1199-1203.
- **Mesa RA, Shields A, Hare T, Erickson-Viitanen S, Sun W, Sarlis NJ, et al.** *The progressive burden of myelofibrosis in untreated patients: an assessment of patient-reported outcomes in patients randomized to placebo in the COMFORT-I study.* Blood. 2012; submitted.
- **Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, et al.** *Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post • JPV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post • JET MF), blast phase PMF (PMF • JBP): consensus on terminology by the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG • JMRT).* Leuk Res. 2007;31(6):737 • 140.
- **Moulard O., Metha J., Olivares R., Iqbal U., Mesa R.A.,** *Epidemiology of myelofibrosis (MF), Polycythemia vera (PV) and Essential Thrombocythemia (ET) in the European Union (EU),* Global Evidence & Value Development, Sanofi, Chilly Mazarin, France; Cambridge, MA, USA; Mayo Clinic Arizona, AZ, USA, abstract 1744 (???)
- **Novartis Pharmaceuticals Canada Inc,** *Jakavi (ruxolitinib) product monograph.* Dorval, QC, Canada: Novartis Pharmaceuticals Canada Inc; 2012.
- **Novartis Pharmaceuticals,** *Novartis drug Jakavi first medication to receive European Commission approval to treat patients with myelofibrosis* [Internet]. Switzerland: Novartis Pharmaceuticals. [updated 28 August 2012; cited 15 May 2013]. Available from: <http://www.novartis.com/newsroom/mediareleases/en/2012/1636508.shtml>.

- **Patriarca F, Bacigalupo A, Sperotto A, et al.** *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelofibrosis: the 20-year experience of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO)*. *Haematologica*. 2008;93(10):1514-1522.
- **Tefferi A.,** *I farmaci JAK2 inibitori*, The first Florence Day for patients with Myeloproliferative Neoplasms 2011, Mayo Clinic, Rochester, MN
- **Vannucchi A, Kiladjian JJ, Gisslinger H, et al.** *Reductions in JAK2V617F Allele Burden with Ruxolitinib Treatment in COMFORT-II, a Phase III Study Comparing the Safety and Efficacy of Ruxolitinib to Best Available Therapy (BAT)*. 2012. Abstract #802. American Society of Hematology 2012. Annual Meeting, Atlanta, GA.
- **Vannucchi, A, et al.** *Long-Term Outcomes From A Phase 3 Study Comparing Ruxolitinib With Best Available Therapy (BAT) For The Treatment of Myelofibrosis (MF): A 3 Year Update of Comfort II*. Abstract #S1111.18th Congress of European Hematology Association (EHA). Stockholm, Sweden. Leukemia & Lymphoma Society. Idiopathic myelofibrosis. Available at: <http://www.lls.org/#/diseaseinformation/myeloproliferativediseases/idiopathicmyelofibrosis/>. Accessed April 2013.
- **Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al.** *Safety and Efficacy of JAK1 & JAK2 Inhibitor, INCB018424, in Myelofibrosis*. *New Eng J Med*. 2010 September 16;363(12):1117-1127.
- **Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al.** *A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis*. *New Eng J Med*. 2012: March 1;366:799-807.
- **Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio J, et al.** *A double-blind, placebocontrolled trial of ruxolitinib for myelofibrosis*. *N Engl J Med*. 2012;366(9):799-807.