



## Protocollo di studio da essere sottoposto a indagine

Cod.: FARM6XAXBR

### A. Caratteristiche dello studio

#### A1. RICERCATORE PRINCIPALE

<b>Nome</b>	COSTANZO	<b>Cognome</b>	MORETTI
<b>Anno di nascita</b>	24/03/1953	<b>Sesso</b>	M
<b>Email</b>	moretti@med.uniroma2.it	<b>Tel.</b>	0672596665
<b>Fax</b>	0672596663	<b>Cell.</b>	3381558554

#### A2. ISTITUZIONE

Università pubblica (compresi policlinici)		<b>Istituzione:</b> UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA TOR VERGATA	
<b>Unità</b>	DEPARTMENTO DI MEDICINA INTERNA		
<b>Indirizzo</b>	Via Montpellier 1	Roma	RM
<b>Sito web</b>	www.web.uniroma2.it		

#### A3. TITOLO PROPOSTO

<b>Titolo</b>	Studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato sull'efficacia e la sicurezza del trattamento con bicalutamide in pazienti affetti da sindrome dell'ovaio policistico familiare			
<b>Titolo abbreviato</b>	LA BICALUTAMIDE NELLA PCOS FAMILIARE			
<b>Parole chiave</b>	BICALUTAMIDE	ECCESSO DI ANDROGENI	PCOS	HAIR-AN IRSUTISMO

#### A4. TEMA-ARGOMENTO

<b>AREA</b>	1. Farmaci orfani per il trattamento di patologie rare e farmaci per patologie che non rispondono
<b>Topic</b>	2. Valutazione del profilo rischio/beneficio dell'utilizzo di farmaci off-label nel

trattamento di patologie rare
-------------------------------

## A5. FARMACI NELLO STUDIO

n°	Farmaco	Info:	If Marketed
1.	Bicalutamide	commercializzato	Brevetto;

## A6.2 DISEGNO DELLO STUDIO

**Sperimentale**

Fase IV

Numero di pazienti: 105

Numero di Centri Clinici: 5

## B. Protocollo di Studio

### B1. ABSTRACT

**Premessa:** Una rara forma di eccesso di androgeni nelle donne è costituita dalla Sindrome dell'Ovaio Policistico Familiare (PCOS) caratterizzata da iperandrogenismo e grave insulino-resistenza. La sindrome HAIR-AN è una espressione severa di questa patologia, caratterizzata da una costellazione di sintomi tra cui iperandrogenismo (HA), insulino-resistenza (IR) ed acantosis nigricans (AN), rappresentando circa il 3% di tutti i casi di eccesso di androgeni nelle donne. Le manifestazioni cutanee della sindrome richiedono trattamento con antiandrogeni somministrati per os con lo scopo di ridurre la grave sintomatologia. Al momento attuale, non sono disponibili terapie tollerate ed efficaci attuate per controllare l'eccesso di androgeni e vengono attuati trattamenti non uniformi che non sono stati concordati in linee guida terapeutiche. La bicalutamide (BC) è un potente antiandrogeno privo di attività ormonale agonistica, considerato un puro antagonista del recettore androgenico

**Obiettivi:** Questo studio mira a valutare l'efficacia della BC nel controllo dei sintomi cutanei in donne affette da eccesso di androgeni secondario a PCOS familiare e a documentare il livello di successo a lungo termine della terapia.

**Metodi:** Lo studio è multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato a gruppi paralleli si svilupperà in una fase di trattamento di 18 mesi seguita da un periodo osservazionale di 6 mesi nell'ambito del secondo anno. Settanta soggetti selezionati verranno randomizzati e trattati con estroprogestinici (EP) in associazione a 50 mg/die di BC o placebo. Inoltre, un gruppo di 35 pazienti verrà trattato con EP in associazione a 150 mg/die di BC. Al momento della definizione della diagnosi, verranno escluse altre patologie con una simile presentazione clinica come l'Iperplasia Congenita Surrenale, la Sindrome di Cushing ed i tumori androgeno-secerntenti. Tutti i pazienti saranno esaminati all'inizio (tempo 0) e ogni 6 mesi durante i 24 mesi di durata dello studio. I segni e i sintomi verranno raccolti e registrati. In particolare, tutti i pazienti saranno valutati per l'irsutismo utilizzando l'indice di Ferriman & Gallway ed un programma di dermoscopia computerizzata. Il miglioramento dell'irsutismo e dell'iperseborrea saranno i principali risultati che verranno misurati per valutare l'efficacia della BC in associazione con EP.

**Risultati previsti:** il progetto di studio permetterà di dimostrare l'efficacia e la sicurezza della somministrazione orale di BC nel miglioramento dei segni da eccesso di androgeni in donne affette da PCOS familiare. In particolare il trattamento verrà valutato comparando gli effetti antiandrogenici dell'associazione BC ed EP contro un gruppo di pazienti di controllo trattati unicamente con estroprogestinico per stabilire la diminuzione della severità dell'irsutismo.

### B2. PREMESSA E RATIONALE

L'eccesso di androgeni clinicamente evidente è spesso associato alla PCOS familiare, una sindrome eterogenea caratterizzata da un cronico iperandrogenismo e oligo-anovulazione (1) che potrebbe originare dall'interazione tra varianti genomiche protettive e di suscettibilità sotto l'influenza di fattori ambientali (2). Le influenze poligeniche sembrano spiegare circa il 70% delle varianti patogenetiche. Quasi la metà delle sorelle di donne con PCOS ha elevati livelli plasmatici di testosterone anche se solo la

metà di queste è sintomatica. Le ovaie policistiche sembrano essere trasmesse come un tratto dominante, normalmente asintomatico, ma spesso accompagnato da una disfunzione ovarica subclinica simile alla PCOS (3). L'associazione familiare di ovaio policistico, iperandrogenemia ed anomalie metaboliche si ritrovano nella rara sindrome HAIR-AN, caratterizzata da una forma di insulino-resistenza dovuta a disordini da eccesso di androgeni in cui l'acantosis nigricans è ritenuta essere un epifenomeno causato da una grave iperinsulinemia (4). Le pazienti con PCOS che hanno irregolarità mestruali associate ad iperandrogenismo possono essere considerate le donne più gravemente affette sulla base dell'eccesso dei livelli di androgeni, volume delle ovaie e livelli di insulina. L'indice di massa corporea giustifica parzialmente gli aumentati livelli di insulina, suggerendo che l'aumento ponderale aggrava i sintomi della PCOS (5). Negli ultimi 30 anni, vari studi pubblicati hanno posto attenzione circa il fenomeno della familiarità nella PCOS (6). I criteri utilizzati per identificare i soggetti affetti ed i membri familiari sono cambiati considerevolmente nel corso del tempo, anche se non esiste a tutt'oggi un parere concorde circa il modo di ereditare la PCOS. Il meccanismo genetico che sta alla base dell'iperandrogenismo funzionale rimane sconosciuto. Varianti genomiche in geni legati alla regolazione della biosintesi e funzione degli androgeni, l'insulino-resistenza e i genotipi proinfiammatori possono essere implicati nella predisposizione genetica verso la PCOS (7). Abbiamo incentrato la nostra attenzione in questo studio sul ruolo del gene del recettore androgenico (AR) nelle manifestazioni cutanee e mucose di un raro disordine da eccesso di androgeni familiare nelle donne (8). AR è un componente della grande famiglia dei fattori di trascrizione attivanti il ligando che regolano molti processi biologici e viene codificato da un gene localizzato sul cromosoma Xq11-12 (9). AR ha tre domini funzionali responsabili rispettivamente della transattivazione, del legame con il ligando e del legame al DNA. L'esone 1 ha un polimorfismo VNTR che consiste di ripetizioni di (CAG)<sub>n</sub>, che codifica per un tratto di poliglutamina nel dominio di transattivazione N-ter della proteina AR. Il numero delle ripetizioni CAG, generalmente circa 20 nei soggetti normali, è inversamente correlato alla transattivazione di AR dunque alla sua attività (10). Per questo è stato suggerito che, il diminuito numero di ripetizioni CAG possa aumentare l'attività androgenica sui tessuti bersaglio, favorendo l'irsutismo e l'iperandrogenismo delle ovaie (11) così come i problemi cutanei dipendenti dagli androgeni sia negli uomini che nelle donne (12). Un diminuito numero di ripetizioni CAG del gene AR è stato indicato per spiegare i normali livelli sierici di androgeni trovati in alcune donne affette da ovaio policistico, infertilità, oligomenorrea, nelle quali i sintomi iperandrogenici sono appunto da addebitare ad un intrinseco aumento nell'attività di AR. Altri studi hanno mostrato che il numero delle ripetizioni CAG sono distribuite in modo uguale nelle pazienti irsute con o senza iperandrogenemia e in donne sane (12), suggerendo la possibilità che altri fattori, come i co-regolatori coinvolti nel meccanismo di trascrizione del AR, possano essere implicati nelle manifestazioni dermatologiche dell'iperandrogenismo (13). Una mancata regolazione di AR, a livello cutaneo e delle mucose, potrebbe essere responsabile delle severe manifestazioni cliniche in donne affette da PCOS familiare, inclusi irsutismo, acne, acantosis nigricans ed alopecia androgenica (14). La presenza di iperemia oculare congiuntivale, reazione follicolare, ipersecrezione di muco associato a prurito, secchezza e intolleranza alle lenti a contatto, sono anche sintomi descritti nelle donne iperandrogeniche affette da PCOS e i disturbi oculari, spesso lamentati da queste pazienti, si suppone siano secondari all'aumento della densità del numero delle cellule e dell'espressione del mRNA delle mucine nella congiuntiva confrontate a soggetti sani (15). Inoltre, le donne affette da PCOS hanno una diversa sensibilità verso l'azione degli steroidi sul tratto riproduttivo. In particolare, alterazioni mediate da uno squilibrio tra recettori degli androgeni ed estrogeni e co-regolatori potrebbe alterare la trascrizione dei geni coinvolti nel ciclo cellulare portando a patologie tissutali come disturbi vaginali ed iperplasia endometriale (13). Pertanto, lo scopo primario della terapia farmacologica verso i disturbi cutanei e delle mucose prodotte dall'iperandrogenismo è la riduzione dell'azione biologica degli androgeni. Per raggiungere questo scopo sono attualmente usati con una variabile efficacia, trattamenti che sopprimono gli androgeni, farmaci antiandrogeni ed agenti sensibilizzanti insulina (14). L'acantosis nigricans è difficile da trattare. L'obiettivo primario della terapia è costituito da cambiamenti nello stile di vita mediante perdita di peso. Migliorando la sensibilità insulinica e aumentando i livelli della globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG), la perdita di peso si può associare a riduzione dei livelli plasmatici di androgeni e può essere efficace a favorire ovulazione e gravidanza anche in donne resistenti ai farmaci che inducono ovulazione quali il clomiphene e le gonadotropine (16). L'irsutismo è il disturbo principale nelle donne affette da PCOS familiare. Esso viene oggi trattato usando estrogeni e ciproterone acetato o associazioni diverse di estroprogestinici e antiandrogeni non steroidei come lo spironolattone, la flutamide e la finasteride (14). Molti composti con proprietà anti-androgeniche sono *off-label* per la cura dei problemi cutanei dovuti a un eccesso di androgeni nelle donne e sono disponibili poche informazioni sulla loro efficacia, effetti collaterali e potenziale tossicità alle dosi richieste. Inoltre, tra le opzioni standard di trattamento usate per l'irsutismo grave, nessuna è considerata la terapia d'elezione in termini di efficacia e sicurezza. La bicalutamide (BC), un potente farmaco antiandrogenico non steroideo mancante di attività ormonale agonista, è considerato un puro antagonista del recettore androgenico. La BC che lega AR si localizza nel nucleo e in particolare si può legare agli elementi responsivi agli androgeni presenti sui geni target essendo inattiva sotto il profilo trascrizionale. In relazione a questa perdita di attività trascrizionale essa è incapace di stimolare il legame della parte N-terminale di AR con la parte C terminale del dominio di legame del ligando. Dunque la bicalutamide è farmacologicamente differente da altri antiandrogeni

correntemente usati, nel senso che essa non funziona come un antagonista di AR prevenendo il legame di AR al DNA target ma piuttosto stimola l'assemblaggio di un complesso trascrizionale inattivo sul DNA target (17) probabilmente anche influenzando componenti co-attivatrici o co-repressive del complesso trascrizionale (18). La bicalutamide è un racemato e la sua attività antiandrogena è quasi esclusivamente presente nella forma di enantiomero R(-), con poca attività nella forma di enantiomero S(+). L'enantiomero S(+) è rapidamente metabolizzato mentre l'enantiomero R(+) ha una emivita plasmatica di eliminazione di circa 1 settimana con un accumulo plasmatico 10 volte superiore a tutti i livelli di dosaggio, rendendo essa disponibile ad una somministrazione una volta ogni 24 ore. Essa è bene assorbita e seguendo la somministrazione orale le concentrazioni plasmatiche si incrementano in modo lineare con la dose che raggiunge un picco a circa 48 ore per quanto concerne l'effetto antiandrogeno di circa 50 mg. Essa ha una eliminazione con una lunga emivita plasmatica stimata attraverso le curve di fittaggio dei dati raccolti utilizzando dosi multiple intorno a 7-10 giorni (19). Non sono disponibili a tutt'oggi informazioni circa l'efficacia della bicalutamide orale in associazione con estroprogestinici per trattare i disturbi muco-cutanei da eccesso di androgeni in particolare per la sindrome di HAIR-AN, una rara endocrinopatia sottodiagnosticata nel corso della quale i sintomi sono particolarmente severi. In uno studio pilota pubblicato sulla rivista *Gynecological Endocrinology* nel febbraio 2002 Muderris et al. hanno dimostrato già dopo 3 mesi di terapia in 42 donne affette da irsutismo, l'efficacia della somministrazione di 25 mg/die di bicalutamide sulla riduzione della gravità della sintomatologia concludendo che la bicalutamide può essere un farmaco efficace nel trattamento dei pazienti con irsutismo (20).

Il presente studio clinico controllato, multicentrico, in doppio cieco, randomizzato consentirà con precisione di ottenere dati sulla tollerabilità ed efficacia del trattamento sistemico con bicalutamide in associazione a estroprogestinici in pazienti affette da disturbi della cute dovuti alla PCOS familiare. È importante rimarcare che la bicalutamide è attualmente commercialmente disponibile in Italia (CASODEX) e la sua tollerabilità, efficacia, farmacocinetica e beneficio clinico sono state valutate in pazienti con carcinoma prostatico avanzato (20). Noi abbiamo programmato nel presente studio un trattamento con basse dosi di bicalutamide (50 mg/die) in un gruppo di donne sintomatiche comparando i risultati a un gruppo simile di donne sintomatiche trattate con placebo e utilizzate come controlli. Un ulteriore gruppo di pazienti verrà posto sotto alte dosi di bicalutamide (150 mg/die). Basse ed alte dosi di bicalutamide sono state decise basandosi su quelle utilizzate come monoterapia antiandrogena negli stadi precoci ed avanzati del carcinoma della prostata (21,22). L'eccesso di androgeni nelle donne comporta lo sviluppo di un aspetto androgenico che al di là dell'irsutismo, il più riconoscibile tra i sintomi clinici, può includere alopecia androgenetica, acne, disfunzioni ovariche e, se grave e prolungato, anche virilizzazione e mascolinizzazione. Le pazienti affette sviluppano gravi problemi psicologici a causa dell'androgenizzazione. Per questa ragione il presente studio ha importanti implicazioni per il servizio sanitario nazionale e l'AIFA considerando che esso aiuterà a stabilire un rationale di trattamento uniforme, efficace e tollerato, per trattare i sintomi e i segni dovuti all'eccesso di androgeni nelle donne.

### **B3. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Obiettivo primario di questo progetto è valutare l'efficacia della somministrazione orale di bicalutamide in associazione con terapia estroprogestinica per controllare le manifestazioni cutanee da eccesso di androgeni in donne affette da PCOS familiare. Questo studio arruolerà come controlli un gruppo di donne con PCOS familiare poste sotto terapia estroprogestinica. La durata del trattamento per pazienti e controlli sarà di 18 mesi seguita da una fase osservazionale di 6 mesi senza terapia. Tutte le pazienti verranno valutate attraverso un esame clinico completo, il grado di irsutismo verrà valutato attraverso dermatoscopia computerizzata allo scopo di raggiungere una valutazione riproducibile del beneficio clinico del farmaco. Questo obiettivo verrà raggiunto attraverso uno studio di 2 anni multicentrico, randomizzato, in doppio cieco e placebo-controllato.

Gli obiettivi secondari di questo progetto consisteranno nella valutazione del trattamento con bicalutamide sull'eccesso di androgeni nelle donne. In particolare, tutte le pazienti verranno valutate per pressione sanguigna, glicemia e insulina a digiuno (HOMA test), circonferenza addominale (grasso addominale), test di laboratorio, ecografia pelvica (volume ovarico, numero di follicoli e spessore endometriale), e composizione corporea attraverso DXA al tempo 0 ed ogni 6 mesi sino alla fine dello studio, allo scopo di stabilire un miglioramento dei criteri che definiscono la sindrome metabolica dei soggetti selezionati per il trattamento comparati con i controlli. L'effetto del trattamento sul bilancio energetico verrà studiato al tempo 0 e al termine del periodo osservazionale. Una valutazione clinica oftalmologica verrà eseguita al tempo 0 ed ogni 6 mesi durante lo studio allo scopo di valutare segni e

sintomi correlati all'incremento del numero di densità delle cellule calciformi e all'espressione delle mucine congiuntivali. Inoltre, altro obiettivo secondario dello studio sarà la valutazione del pattern d'espressione dei geni che codificano per le mucine a livello vaginale ed endometriale attraverso immunohistochimica e prove molecolari. Verrà anche proposto un questionario sulla qualità della vita a tutti i soggetti coinvolti nello studio.

Verrà valutata anche l'espressione genica di geni coinvolti nel metabolismo androgenico e nel *pathway* endoteliale dell'insulina attraverso la costruzione di un microarray (AndroChip) applicato su culture di fibroblasti cutanei prelevati dai soggetti coinvolti nello studio. Quest'ultimo punto costituisce un obiettivo di uno studio di simile tematica condotto presso l'Ospedale "San Giovanni Calibita" Fatebenefratelli Isola Tiberina dalla nostra Unità di Endocrinologia in collaborazione con la Unità di Genetica dell'Università di Tor Vergata, già approvato dal Comitato Etico del Fatebenefratelli ed attualmente in corso dal titolo: "Analisi del trascrittoma cutaneo mediante exon arrays in donne affette da irsutismo idiopatico". (vedi allegato)

## B4. METODI – DISEGNO DELLO STUDIO

Questo studio ha lo scopo di valutare l'efficacia di due differenti dosi di BC, 50 e 150 mg, sul miglioramento dei segni cutanei e mucosi da eccesso di androgeni in donne affette da PCOS. La PCOS familiare è una rara variante di ovaio policistico e nella sua forma più severa di espressione clinica è chiamata sindrome HAIR-AN che consiste in iperandrogenismo (HA), insulino-resistenza (IR), e acantosis nigricans (AN). La diagnosi di HAIR-AN è basata sul rilievo di una insulina basale a digiuno > di 80 uIU/ml e/o livelli di insulina due ore dopo somministrazione orale di glucosio > di 300 uIU/ml. La sindrome è un modello di anovulazione cronica e iperandrogenismo. Un cluster genico familiare suggerisce la suscettibilità genetica al disordine. L'iperandrogenismo che produce per sé insulino-resistenza, produce irsutismo, acne e seborrea oltre a iperplasia endometriale, alterazione delle mucose tra cui una sintomatologia oculare. Per controllare le manifestazioni dell'iperandrogenemia sono attualmente organizzate diverse sostanze antiandrogene anche se non c'è ancora accordo su un rationale di trattamento uniforme.

Per quanto concerne i **criteri di inclusione** centocinque pazienti consecutivi affetti da PCOS familiare verranno arruolati per partecipare allo studio attraverso uno screening di donne irsute eseguito da 4 Centri coinvolti nel progetto per assicurare che quanto meno un minimo di 60 pazienti possano completare il *follow up*. Le istituzioni che partecipano al progetto sono l'Università di Roma Tor Vergata, l'Unità di Endocrinologia del "San Giovanni Calibita" Ospedale Fatebenefratelli, la II Università di Roma La Sapienza, Unità di Endocrinologia dell'Ospedale Sant'Andrea, l'Università di Roma La Sapienza, Dipartimento di Fisiopatologia Medica del Policlinico "Umberto I" e l'Università di Siena Unità di Ostetricia e Ginecologia del Policlinico "S. Maria delle Scotte". Il quinto Centro, l'Università di Roma Campus Bio-Medico, Unità di Oftalmologia, sarà il Centro di riferimento per la verifica dei sintomi oculari nelle pazienti affette. La popolazione di pazienti da studiare verrà selezionata valutando donne irsute affette da PCOS familiare (colpiti e membri familiari con iperinsulinemia ed iperandrogenismo). Il principale segno clinico per essere selezionati sarà un irsutismo con indice Ferriman & Gallway superiore a 6. Le pazienti selezionate saranno esaminate mediante studio biochimico (presenza di iperandrogenemia e iperinsulinemia), esame clinico (densità dei follicoli piliferi mediante videoscopia computerizzata per evitare una gestione soggettiva dell'irsutismo) ed ecografia pelvica (presenza di 12 o più follicoli in ogni ovaia che misuri 2-9 mm di diametro, e /o un aumentato volume ovarico (> 10 mL), oltre a una incrementata ecogenicità stromale). I **criteri di esclusione** saranno legati ad altri disordini con simile presentazione clinica, come un eccesso funzionale di androgeni, iperplasia surrenalica congenita, sindrome di Cushing e tumori androgeno-secernenti. L'esclusione dell'iperplasia surrenalica non-classica da mancanza di 21-idrossilasi (NCAH) sarà effettuata valutando il livello sierico basale al mattino del 17-idrossiprogesterone nella prima fase follicolare, con un valore di cut-off di circa 2 ng/mL. Saranno escluse dallo studio donne che non incontrano i criteri di eleggibilità per assumere estrogeni (storia familiare di tumore al seno o tromboflebiti), donne in corso di trattamento sistemico per altre patologie, o donne arruolate in studi sperimentali nei 6 mesi precedenti. In oltre, saranno escluse da questo studio pazienti in gravidanza o allattamento. Pertanto le donne inserite nello studio non debbono entrare in gravidanza. Questo è uno studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato, di gruppi paralleli, che prevede una fase di trattamento di 18 mesi seguita da una fase osservazionale di 6 mesi nel secondo anno. Dunque la totale durata del progetto sarà di 24 mesi. Per le donne che incontrano i criteri di eleggibilità e che stanno assumendo EP verrà proposto un periodo di *wash-out* durante il quale gli verrà richiesto di evitare qualsiasi trattamento steroideo. Un gruppo di 70 donne osservate consecutivamente

che avranno completato la fase di screening verranno nella visita basale poste sotto trattamento EP e in modo random verranno organizzate in un rapporto 1:1 per ricevere placebo o BC alla dose di 50 mg una volta al giorno. Un gruppo ulteriore di 35 donne riceverà 150 mg di BC 1 volta al giorno associata a EP. Tutte queste pazienti verranno valutate mediante esame clinico completo endocrino, ginecologico e oftalmologico, ultrasonografia pelvica, ecografia pelvica, videodermoscopia computerizzata, tests di laboratorio al tempo 0 (baseline) ed ogni 6 mesi fino alla fine dello studio. I livelli di steroidi plasmatici e i marcatori dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovarico saranno valutati al tempo 0 e alla fine del trattamento (18 mesi) ed ancora alla fine della fase osservazionale (24 mesi). Durante i 2 anni di studio pazienti e controlli saranno valutate per effetti collaterali al tempo 0 ed ogni 6 mesi sino alla fine dello studio. Se le pazienti svilupperanno nausea, vomito, emicrania, depressione, variazioni del tono dell'umore, infezioni vaginali, fatica, dispepsia, dolori addominali, frequenti palpitazioni, esse verranno eliminate dallo studio. In caso di infezioni vaginali, verrà eseguito un esame microbiologico che comprende tampone vaginale e colorazione Gram e Giemsa, culture per batteri aerobi e anaerobi, funghi, culture per Ureaplasma Urealiticum, PCR per Chlamidia ed Herpes virus. Pazienti che durante lo studio presenteranno effetti collaterali dovuti alla sistemica con EP, verranno sospesi dallo studio.

L'obiettivo primario dello studio è quello di ottenere dati su efficacia e tollerabilità di un trattamento orale con BC, associata a EP per controllare irsutismo e seborrea in pazienti con PCOS familiare. La gravità della malattia verrà classificata sulla base del grado di irsutismo utilizzando una scala da 0 a 4 di ciascuna regione androgeno sensibile del corpo ed un punteggio totale come descritto da Ferriman & Gallway. Verrà esaminata attraverso demoscopia computerizzata video PICO-I-SCOPE, con software alfadoc, Medical Hi-Tek, Roma (Italia), una regione dell'addome sulla linea alba 10 cm sotto l'ombelico, allo scopo di ottenere un controllo riproducibile della densità dei follicoli piliferi. Il fallimento del trattamento sarà definito sulla base di una 'assenza di diminuzione del punteggio totale di Ferriman & Gallway che è stato registrato al tempo 0, inizio dello studio. La percentuale di pazienti che dimostreranno meno del 35% di diminuzione dei follicoli piliferi all'esame dermoscopico computerizzato, durante i due anni di trattamento, saranno considerati non controllati dal protocollo di trattamento proposto. Obiettivo secondario dello studio sarà quello di valutare parametri biochimici e molecolari, il volume ovarico, il numero dei follicoli e lo spessore endometriale esaminati attraverso ecografia. Verrà anche studiato il pattern di espressione di geni che codificano per le mucine attraverso immunoistochimica e studi di amplificazione del DNA prelevato a livello vaginale ed endometriale. Verrà anche eseguita un'accurata valutazione della composizione corporea e del grasso addominale attraverso DXA, valutazione che includerà anche lo studio selettivo della regione del tronco (ROI) in relazione alla dimostrazione che l'eccesso di androgeni nelle donne favorisce l'adiposità addominale, un effetto che può essere prevenuto attraverso il trattamento con antinfiammatori tipo FANS. Considerando che l'insulino resistenza e l'insulinemia sono meccanismi patogenetici stabiliti di iperandrogenismo e che l'eccesso di androgeni facilita l'insulino resistenza attraverso l'aumento dell'adiposità addominale, verrà anche valutato un indice di resistenza insulinica (HOMA test) tra l'esame iniziale e durante le visite di follow-up ogni sei mesi. Il profilo steroideo e l'HOMA test saranno valutati in tutti i soggetti selezionati e comparati tra donne trattate con 50 mg di BC + EP e donne trattate con placebo + EP. Inoltre, verranno anche valutate e comparate differenze nella sintomatologia specifica e sintomi clinici, BMI, punteggi sulla qualità della vita, iperemia congiuntivale oculare associata a ipersecrezione mucosa e prurito e parametri citologici. Tutti i pazienti verranno valutati attraverso un esame completo endocrinologico, ginecologico e oftalmologico al tempo 0 e ogni 6 mesi fino alla fine del trattamento e nei 6 mesi successivi alla fine della fase osservazionale. Gli esami aggiuntivi saranno programmati su richiesta in caso di sintomi di peggioramento durante il periodo dello studio. I parametri riportati sotto saranno valutati e registrati in un case report form (CRF) elettronico che verrà creato apposta per questo studio.

Il controllo clinico che sarà effettuato al tempo 0, al sesto, al dodicesimo, al diciottesimo e al ventiquattresimo mese comprenderà:

- anamnesi generale (età, razza, altezza, peso, BMI, pressione sanguigna, circonferenza della vita) particolarmente incentrato su i report riguardanti sistema endocrino ginecologico (grado di disfunzione ovulatoria/mestruale, metrorragia, dismenorrea, dolore pelvico, spotting e secrezione vaginale)
- indice Ferriman & Gallway (nell'irsutismo il range del punteggio è tra 6 e 36)
- videodermoscopia computerizzata in relazione alla registrazione di una riproducibile valutazione della densità dei peli terminali e della secrezione sebacea, apparecchio dotato di una videocamera a colori collegata a un pc attraverso una porta USB che applica un software alfadoc che consente di immagazzinare fotografie prese sulla cute dei pazienti.
- Ecografia pelvica per calcolare volume ovarico, numero stimato di follicoli presenza di 12 o più follicoli misurati in ciascun ovaio di dimensione 0,9 mm di diametro con distribuzione coronale subcapsulare, sia in sezioni longitudinale che antero-posteriori. Il diametro dei follicoli minore di 10 sarà espresso come media dei diametri misurati nelle due sezioni
- trigliceridi
- colesterolo totale, HDL, LDL
- glicemia a digiuno e dopo carico orale con glucosio per 120 minuti
- valutazione oftalmologia

Il controllo clinico che verrà effettuato al tempo 0 (baseline), alla fine del trattamento e alla fine della fase osservazionale includerà:

- testosterone totale
- SHBG
- Testosterone libero
- Testosterone biodisponibile
- 3-alfa-androstenediolo glucuronide
- diidrotestosterone (DHT)
- deidroepiandrosterone (DEAS)
- composizione corporea attraverso esame DXA
- test metabolico attraverso calorimetria indiretta con valutazione della RMR (Resting Metabolic Rate) corretto per la composizione corporea
- questionario sulla qualità della vita

Tutti i prelievi destinati al profilo ormonale per i pazienti dei vari centri verranno eseguiti in un laboratorio centralizzato allo scopo di migliorare i controlli di qualità. All'inizio e alla fine dello studio, verrà proposto un questionario sulla qualità della vita ai pazienti con irsutismo e PCOS familiare redatto in lingua italiana. Verranno utilizzati i seguenti indicatori per valutare la qualità della terapia eseguita:

- riduzione del numero dei follicoli piliferi terminali (quanto meno il 35% di riduzione registrato attraverso software in un campo osservazionale di 4 cm<sup>2</sup>)
- riduzione nell'indice totale di Ferriman & Gallway di almeno 5 punti
- miglioramento dei sintomi e della qualità della vita

Come indicatori accessori verranno considerati:

- riduzione del volume ovarico e del numero valutabile di follicoli (meno di 12 in ciascun ovaio con misura tra 2 e 9 mm di diametro) valutati attraverso ecografia pelvica
- miglioramento della composizione corporea
- sintomi e segni oculari

Il principale fattore che può confondere la raccolta dei dati in questo studio, è dato dalla necessaria somministrazione di preparazioni EP dal momento che differenti regimi terapeutici e differenti farmaci sono di fatto utilizzati in questo studio. Dal momento che la terapia EP dovrebbe essere organizzata individualmente per ciascun paziente basandosi sulla risposta a precedenti farmaci utilizzati, si potranno verificare tra le pazienti differenze nella tolleranza e negli effetti collaterali. Per minimizzare questo fattore è stato deciso di usare solo preparati transdermici o EP contenenti 15-20 mcg di etinilestradiolo e 60 mcg di gestodene o 3 mg di drospirenone. Pazienti irsute con severa iperinsulinemia richiedenti alte dosi di steroidi o metformina, saranno escluse da questo studio. Saranno escluse dallo studio anche pazienti che nel corso di questo studio richiederanno variazioni nella terapia di soppressione ovarica o dimostreranno intolleranza o effetti collaterali a causa di questi. In accordo con il volume dei campioni di popolazione selezionata, l'efficacia della BC orale sarà valutata nelle differenti espressioni fenotipiche di eccesso di androgeni includendo solo quelle in cui esiste una chiara storia familiare ed a causa della quale i soggetti dimostrano una spiacevole sintomatologia cutanea. L'aspettativa stimata di perdita del follow-up (drop out) è del 15-20% delle pazienti in accordo con la letteratura, in particolare riferita ai pazienti che potranno sviluppare i tipici effetti collaterali della terapia ovario-soppressiva. Le attività di monitoraggio dovranno essere portate avanti come segue: ogni Centro completerà un rapporto circa il lavoro svolto ogni 3 mesi per monitorare i progressi e discutere dei possibili problemi. Il coordinatore visiterà i colleghi ogni sei mesi fino al termine dello studio. Un ricercatore di una Istituzione indipendente (da decidere) visiterà ogni Centro ogni sei mesi fino al termine dello studio. All'inizio dello studio e sei mesi dopo, verranno organizzati incontri che coinvolgono il personale di ogni Centro, in modo da stimolare il cambiamento di idee, dell'approccio metodologico, analisi dei dati, discussione e integrazione dei risultati.

Campionamento

Considerando come principale obiettivo la percentuale di riduzione del numero dei follicoli piliferi terminali registrato in un campo osservazionale di 4 cm<sup>2</sup> il livello atteso di miglioramento sarà del 35% di riduzione nelle pazienti trattate giornalmente con 50 mg/die di BC ed EP contro un 10% di miglioramento nelle pazienti trattate con placebo ed EP e considerando una randomizzazione 1:1, un valore statistico di  $p = 0,9$  ed una significanza di  $\alpha = 0,05$ , il campione è stato calcolato essere  $n = 54$  pazienti. Allo scopo di assicurare che 54 pazienti completino il follow-up, saranno randomizzati 70 pazienti con irsutismo causato da PCOS familiare randomizzati tra assunzione di BC 50 mg/die + EP e placebo + trattamento EP.

Caratteristiche organizzative

Le Istituzioni che partecipano a questo progetto sono l'Università di Roma Tor Vergata (Coordinamento e Centro Clinico), l'Università di Roma "La Sapienza", l'Università di Siena, l'Università di Roma Campus-Biomedico, tutti sono Centri di riferimento nazionale per i disturbi riproduttivi, con un vasto numero di pazienti affette da irsutismo e PCOS. Essendo collocate in differenti aree, la gestione dei campioni biologici e il monitoraggio delle attività saranno portate avanti dal Centro Coordinatore. In particolare, il passaggio dei campioni biologici da ciascun Centro al Centro Coordinatore verrà fatto ogni 3 mesi usando un corriere specializzato. Questo progetto comprende studi clinici, biochimici, genetico-molecolari e

immunocitochimici. Ciascun partner darà il suo contributo specifico e individuale al progetto. In particolare, tutti i centri clinici partecipanti allo studio sono dotati di Unità di Biochimica, Patologia e Biologia Molecolare. Tutti questi centri arruoleranno pazienti, eseguiranno la valutazione clinica, riempiranno la cartella elettronica e raccoglieranno i campioni ematici che saranno centralizzati in un Laboratorio di riferimento. La valutazione citologico-oculare sarà condotta presso l'Università di Roma Campus Bio-Medico che eseguirà un'analisi biochimica e molecolare grazie alla esperienza a lungo termine maturata nella valutazione della citologia congiuntivale. Il Centro di coordinamento organizzerà l'approvazione del Comitato Etico locale, la disponibilità del farmaco, la randomizzazione e la valutazione dei dati, preparerà la cartella clinica in associazione con un ricercatore indipendente organizzerà dei meeting periodici tra i centri e compilerà i report progressivi e finali.

Il gruppo proponente dello studio possiede una vasta esperienza nella gestione dei disordini riproduttivi, rappresentando centri di riferimento per queste patologie a livello nazionale. In aggiunta, numerose pubblicazioni scientifiche testimoniano l'intensa attività di ricerca sviluppata dai gruppi coinvolti nello studio nei meccanismi di fisiopatologia e nel trattamento dei disordini dell'eccesso di androgeni. Il coordinatore presenta un'esperienza decennale di contributi alla fase 2 e alla fase 3 di progetti clinici nazionali e internazionali. Inoltre, la Unità di Endocrinologia dell'Università di Tor Vergata presso l'Ospedale San Giovanni Calibita Fatebenefratelli di Roma, nella quale il ricercatore principale coordinatore del presente studio sta lavorando, è uno dei centri europei di una sperimentazione clinica in fase 4 sul trattamento con gel di testosterone nell'uomo anziano. Il Dipartimento di Medicina Interna che si trova all'Università di Roma Tor Vergata fornisce tutti i supporti clinici e pre-clinici. I supporti clinici comprendono un Centro di riferimento di Endocrinologia della Riproduzione ben organizzato, che è strutturato con i più recenti e moderni strumenti e supporti tecnologici. La facilitazione preclinica, comprende un laboratorio ben organizzato che può coprire tutti gli aspetti correlati alla fisiopatologia ipotalamo-ipofisi-ovarica quali la istologia endometriale, la citologia vaginale, la istopatologia (microscopio ottico e confocale e correlato apparato di acquisizione di immagini, il fluorocitometro) molecolari (la PCR in Real Time) e biochimici (Western Blotting ed ELISA).

Non esistono potenziali rischi in questo studio per i soggetti che verranno arruolati dal momento che il trattamento standard è assicurato per ciascun paziente in studio. La procedura sperimentale è utilizzata come trattamento addizionale per migliorare l'obiettivo clinico. Inoltre, gli studi con la BC nell'uomo hanno già dimostrato che questo farmaco non ha rischi potenziali per i pazienti che l'assumono. La BC (CASODEX) è approvata e commercialmente disponibile in Italia, utilizzata per la terapia standard di pazienti con carcinoma prostatico localizzato e avanzato. Gli aspetti psicologici verranno monitorizzati mediante uno specifico questionario sulla qualità della vita. L'intero studio sperimentale prenderà 2 anni di lavoro per essere completato. Verranno utilizzati e comparati gli indicatori della gravità della malattia nei 2 gruppi di pazienti in osservazione utilizzando il test non parametrico Mann-Whitney U test e il test ANOVA. In particolare verranno analizzate statisticamente le differenze esistenti nei pazienti nell'obiettivo primario (grado di irsutismo) e negli obiettivi secondari come pure la sicurezza nei parametri correlati agli effetti collaterali (assenza di eventi avversi).

## B5. BIBLIOGRAFIA

1. Zawadzky J, Dunaif A 1992 Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens J, Hseltine F, Merriam G (eds) Polycystic Ovary Syndrome. Blackwell Scientific Publications, Cambridge, MA, pp 377-384
2. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL 2005 The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 26: 251-282
3. Mortensen M, Rosenfield R, Littlejohn E 2006 Functional significance of polycystic-size ovaries in healthy adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* e-pub Aug 8
4. Roger KM, Omar HA 2006 Androgen excess disorders in women: the severe insulin-resistant hyperandrogenic syndrome. *ScientificWorldJournal* 6: 116-21
5. Welt C.K., Gudmundsson J.A., Arason G, Adams J, Palsdottir H, Gudlaugsdottir G, Ingadottir G and Crowley W.F. 2006 Characterizing discrete subsets of polycystic ovary syndrome as defined by the Rotterdam Criteria: the impact of weight on phenotype and metabolic features. *J Clin Endocrinol Metab* 12: 4842-4848
6. Franks S, Cella E, Gharani N, Waterworth D and McCarthy M 2000 The inheritance of polycystic ovary syndrome. *Polycystic Ovary Syndrome*, Cambridge 3: 23-32
7. Luque-Ramirez M, San Millan JS, Escobar-Morreale 2006 Genomic variants in polycystic ovary



syndrome. *Clin Chim Acta.* 366(1-2):14-26

8. Lowenstein EJ 2006 Diagnosis and management of the dermatologic manifestations of the polycystic ovary syndrome. *Dermatol Ther.* 19(4):210-23

9. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM 1988 Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240:327-330

10. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfield RL 1994 The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 22:3181-3186

11. Ibanez L, Ong KK, Mongan N, Jaaskelainen J, Marcos MV, Hughes IA, De Zegher F, Dunger DB 2003 Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3333-3338

12. Sawaya ME, Shalita AR 1998 Androgen receptor polymorphism (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism and acne. *J Cutan Med Surg* 3:9-15

13. Villavicencio A, Bacallao K, Avellaira C, Gabler F, Fuentes A, Vega M 2006 Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol.* 103(1):307-14

14. Essah PA, Wickham EP 3rd, Nunley JR, Nestler JE 2006 Dermatology of androgen-related disorders. *Clin Dermatol.* 24(4):289-98

15. Bonini S, Mantelli F, Moretti C, Lambiase A, Bonini S, Micera A. Itchy-Dry-Eye associated with Polycystic Ovary Syndrome. *AM J Ophthalmol.* In press, 2007

16. Barbieri RL 2000. Induction of ovulation in infertile women with hyperandrogenism and insulin resistance. *Am J Obstet Gynecol.* 183(6):1412-8

17. Masiello D, Cheng S, Bubley GJ, Lu ML, Balk SP 2002. Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J Biol Chem.* 19;277(29):26321-6

18. Kang Z, Janne OA, Palvimo JJ 2004. Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 18(11):2633-48.

19. Denis L, Mahler C 1996. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of bicalutamide: defining an active dosing regimen. *Urology* ;47(1A Suppl):26-8

20. Muderris I, Bayram F, Ozcelik B, Guven M 2002. New alternative treatment in hirsutism: bicalutamide 25 mg/day. *Ginecol Endocr* 16(4): 63-66

21. Anderson J 2003. The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU Int.* 91(5):455-61

22. Goodman & Gilman's. Antiandrogens. *Chemotherapy of neoplastic diseases. The pharmacological basis of therapeutics* 10th ed 2001; 1442

23. Iversen P 2002. Antiandrogen monotherapy: indications and results. *Urology* 60(3 Suppl 1):64-71