

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

XXIII CICLO

Direttore: Prof. Eusebio Tolu

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI TUMORI

Direttrice: Prof.ssa Rosa Maria Pascale

ATTIVITA' ANTITUMORALE DEL SORAFENIB NEI

PAZIENTI CON EPATOCARCINOMA

Relatore:

Prof. Antonio Farris

Tesi di Dottorato della:

Dr.ssa Manuela Dettori

*La scienza conosce solo un comandamento:
contribuire allo sviluppo scientifico.*

Bertolt Brecht

INDICE

PARTE GENERALE.....	pag. 1
NOTE EPIDEMIOLOGICHE E PATOGENETICHE.....	pag. 2
IL TRATTAMENTO MEDICO DELL'EPATOCARCINOMA.....	pag. 8
Background.....	pag. 10
Sorafenib.....	pag. 13
Meccanismo d'azione.....	pag. 14
Letteratura.....	pag. 16
Tossicità.....	pag. 21
PARTE SPERIMENTALE.....	pag. 24
DESCRIZIONE DELLO STUDIO.....	pag. 25
Obiettivi.....	pag. 25
Criteri di eleggibilità.....	pag. 26
Trattamento farmacologico.....	pag. 27
Valutazione dell'efficacia.....	pag. 27

Valutazione della tossicità.....	pag. 29
Valutazione dei fattori molecolari.....	pag. 30
RISULTATI.....	pag. 31
Caratteristiche dei pazienti	pag. 31
Trattamento.....	pag. 34
Efficacia.....	pag. 34
Tossicità.....	pag. 36
Fattori molecolari e risposta clinica.....	pag. 39
DISCUSSIONE.....	pag. 42
Bibliografia	pag. 49

II

PARTE GENERALE

NOTE EPIDEMIOLOGICHE E PATOGENETICHE

L'epatocarcinoma rappresenta il più comune tipo istologico tra i tumori primitivi del fegato¹.

Ogni anno si registrano circa 350.000 nuovi casi di epatocarcinoma nel mondo con considerevoli variazioni geografiche: esistono zone ad alta incidenza come il Sud-Est Asiatico (Corea, Cina e Vietnam) ed alcune aree africane (Mozambico), mentre è più raro in Europa e in America² (fig. 1).

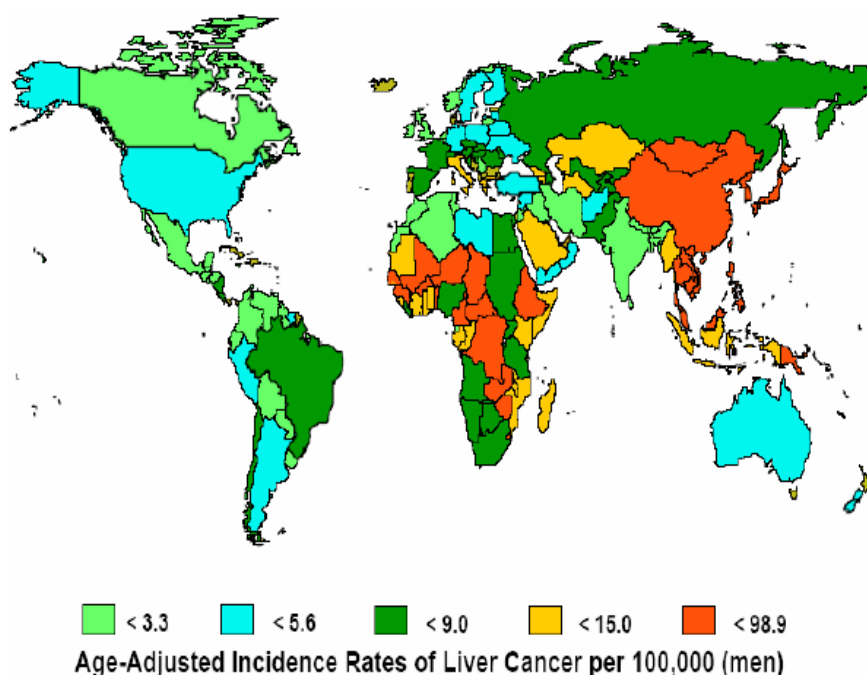


Figura 1. L'incidenza dell'epatocarcinoma nel mondo

Tuttavia negli ultimi 30 anni ha fatto registrare un progressivo incremento di incidenza anche nei Paesi Industrializzati, tanto da rappresentare sino al 3-6% di tutti i tumori solidi.

Il sesso maschile è il più frequentemente colpito (rapporto 4:1); si tratta di una neoplasia rara sotto i 40 anni e che nelle popolazioni occidentali a basso rischio si manifesta nelle persone d'età maggiore ai 75 anni³.

La prognosi infausta di questa neoplasia rende l'epatocarcinoma la sesta causa di morte per tumore nel mondo⁴.

In particolare, in Italia ogni anno si contano 12.000 nuove diagnosi e circa 5.000 decessi⁵.

L'epatocarcinoma si associa alla cirrosi epatica nell'80-90% dei pazienti; nella maggior parte dei casi si tratta di cirrosi post-epatitiche, meno frequentemente di cirrosi alcoliche o secondarie a malattie genetico-metaboliche. I risultati di una metanalisi di 32 studi caso-controllo riportati in letteratura hanno mostrato un rischio relativo di 20 per i portatori di HBV, di 24 per l'HCV e di ben 135 per la compresenza di entrambi i

marcatori⁶.

E' ben noto come l'epatite cronica/cirrosi epatica costituisca un terreno fertile per la comparsa di lesioni epatocellulari a significato displastico e francamente maligno in un processo tipicamente multifasico (fig. 2).

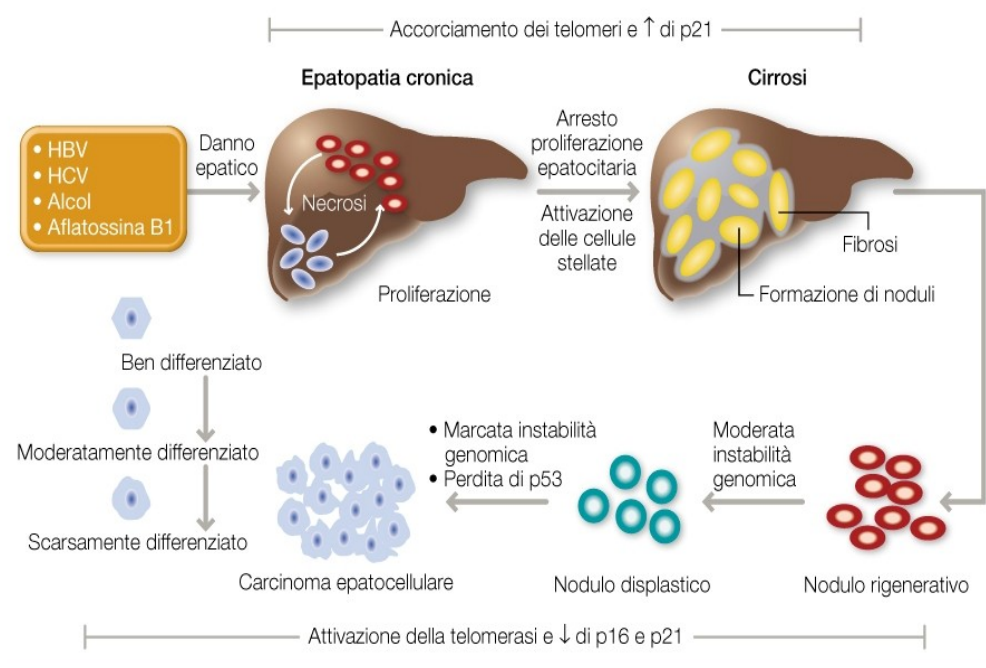


Figura 2. Progressione istopatologia e caratteristiche morfologiche dell'epatocarcinogenesi⁷

L'accorciamento dei telomeri riveste un ruolo cruciale nell'epatocarcinogenesi: un accelerato accorciamento induce l'accumulo nello stadio cirrotico di epatociti senescenti particolarmente sensibili a subire alterazioni molecolari

predisponenti allo sviluppo di neoplasia, come ad esempio l'instabilità cromosomiale⁸. Quest'ultima è alla base dell'eterogeneità della malattia, in cui diverse vie molecolari possono essere attivate singolarmente o in maniera collettiva. Le principali vie oncogeniche descritte nella cancerogenesi epatica sono le seguenti:

- La via della Wnt/ β -catenina;
- La via delle proteine Hedgehog;
- La via di Ras-MAP chinasi;
- La via della PI3K/Akt/mTOR

e su di esse si concentrano gli studi con lo scopo di identificare il bersaglio per terapie molecolari mirate (fig. 3).

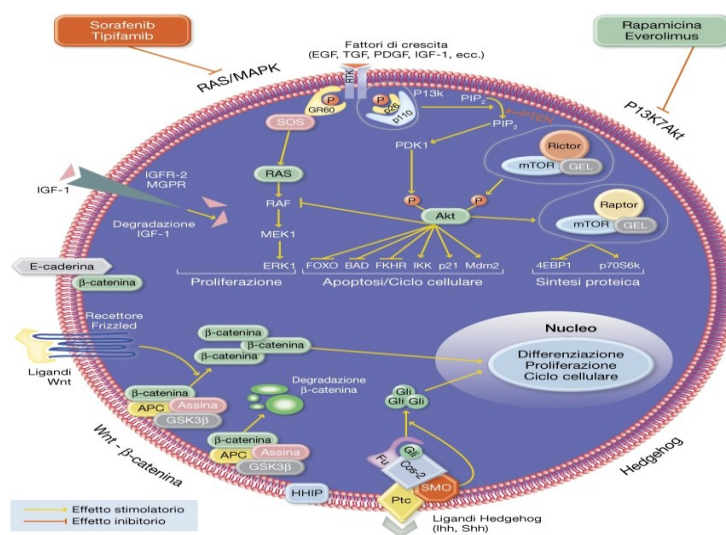


Figura 3. Vie molecolari coinvolte nell'epatocarcinogenesi e possibili bersagli di terapia⁹

La storia naturale dell'epatocarcinoma è complessa e severa, come dimostra la sovrapposizione dei tassi di incidenza e mortalità per questo tumore a livello mondiale ¹⁰. Questa sovrapposizione riflette il prevalere di casi diagnosticati tardivamente, evento frequente nelle aree geografiche ad elevata endemia dove mancano i programmi di screening e in cui oltre la metà dei pazienti presenta metastasi alla diagnosi contro il 30% dei Paesi Industrializzati¹¹.

Ma la storia naturale è resa complessa e severa anche dalla coesistenza della cirrosi che aggrava il decorso clinico e, in genere, limita gli interventi terapeutici. Per questo motivo i più utilizzati sistemi di stadiazione dell'epatocarcinoma tengono conto, oltre che dell'estensione della malattia tumorale, anche della gravità della cirrosi sottostante (Tab. 1).

La prognosi della cirrosi è differente in base al fatto che la cirrosi sia in uno stadio scompensato (ovvero in presenza di ascite, encefalopatia portosistemica, emorragia digestiva dovuta a ipertensione portale, peritonite batterica spontanea, sindrome epatorenale, epatocarcinoma), oppure in uno stadio compensato

(in assenza delle sopracitate complicanze). Il punteggio di Child-Pugh comprende tre diverse classi A (5, 6 punti), B (7, 8, 9 punti) e C (10, 11, 12, 13, 14, 15 punti) a ciascuna delle quali è associata una prognosi più o meno favorevole. La somma dei punti associati ai valori o al grado di ognuno dei singoli parametri determina la classe prognostica di Child-Pugh (tab. 2).

	Stadio BCLC	Performance status	Volume, numero e invasività	Child-Pugh
A	Precoce	0	Singolo o 3 noduli < 3 cm	A – B
B	Intermedio	0	Multinodulare/grande	A – B
C	Avanzato	1 – 2	Invasione vascolare e/o diffusione extraepatica	A – B
D	Terminale	3 - 4	Qualsiasi	C

Tabella 1. Classificazione dell'epatocarcinoma secondo la stadiazione Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)¹²

PARAMETRO	1 punto	2 punti	3 punti
Bilirubina (totale)	< 2,0	2,0 - 3,0	> 3,0 mg/dl
Albumina sierica	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8 g/dl
Tempo di protrombina (I.N.R.)	< 1,7	1,7- 2,3	> 2,3
Ascite	assente	scarsa	moderata
Encefalopatia epatica	assente	Stadio I - II	Stadio III - IV

Tabella 2. Classificazione Child-Pugh nella cirrosi epatica

IL TRATTAMENTO MEDICO DELL'EPATOCARCINOMA

Il fatto che l'epatocarcinoma sia sostanzialmente una neoplasia che cresce per anni confinata al fegato costituisce il razionale per il successo dei trattamenti loco-regionali (chirurgici o ablativi), mentre il trattamento sistemico ha sempre rappresentato la sola opzione terapeutica per i pazienti affetti da epatocarcinoma in fase avanzata.

Tuttavia, l'epatocarcinoma è un tumore chemioresistente. Negli ultimi decenni, un gran numero di farmaci citotossici è stato testato in monoterapia o in combinazione in vari studi, ma pochi agenti hanno evidenziato tassi di risposta superiori al 20% e pertanto sono stati poco impiegati nella pratica clinica¹³.

I pazienti affetti da epatocarcinoma in stadio avanzato non trattati hanno una mediana di sopravvivenza di 6-7 mesi¹⁴. Non vi sono evidenze convincenti che la chemioterapia sistemica aumenti la sopravvivenza in questi pazienti¹⁵.

L'epatocarcinoma in fase avanzata è una patologia difficile da trattare per varie ragioni, tra cui la presenza di sistemi di metabolizzazione attiva del farmaco che contribuiscono a rendere questo tumore resistente alle chemioterapie citotossiche convenzionali. Inoltre l'epatocarcinoma ha un'aumentata espressione di proteine che trasportano i farmaci chemioterapici attraverso la membrana plasmatica. Un altro fattore che rende difficile il trattamento di questa patologia è l'epatotossicità intrinseca di molti farmaci, che influisce negativamente sulla patologia epatica sottostante; infine la leucopenia e la trombocitopenia causate dal sequestro splenico dovuto all'ipertensione portale compromettono l'impiego di agenti che inducono soppressione midollare¹⁶.

Nel corso degli ultimi anni, la crescente conoscenza delle vie che regolano l'insorgenza e la progressione neoplastica e l'acquisizione di informazioni biomolecolari sulle alterazioni dei segnali proliferativi nelle cellule neoplastiche hanno rappresentato il razionale per lo sviluppo di molecole antitumorali dirette contro nuovi e più specifici bersagli biologici.

BACKGROUND

La doxorubicina in monoterapia ha una percentuale di risposta del 10-15% senza alcun beneficio sulla sopravvivenza, con tossicità significativa di grado 3 e 4, soprattutto neutropenia¹⁷.

Altri agenti chemioterapici, come l'epirubicina, il cisplatino, il 5-fluorouracile e l'etoposide, sono stati studiati con bassi tassi di risposta e nessun beneficio sulla sopravvivenza¹⁸. Anche gli agenti chemioterapici di ultima generazione, come la gemcitabina, l'irinotecan e la doxorubicina liposomiale peghilata, hanno prodotto risultati deludenti^{19,20}.

I chemioterapici in combinazione hanno mostrato attività promettenti in studi di fase II, ma non hanno mostrato vantaggi di sopravvivenza negli studi randomizzati di fase III. La combinazione di cisplatino, interferon- α_{2b} , doxorubicina e fluorouracile (PIAF) ha suscitato molto entusiasmo, mostrando, nello studio di fase II, il 26% di risposte parziali con 4 pazienti con risposta patologica completa; tuttavia, nello studio di fase III questa combinazione non ha dimostrato alcun beneficio in

termini di sopravvivenza a fronte di importanti tossicità²¹.

In passato, sono state sperimentate anche terapie ormonali, tra cui il tamoxifene. I presupposti biologici di questo trattamento stanno nella ormono-dipendenza della proliferazione epatocitaria benigna e maligna; nella presenza di recettori (wild-type, mutated) nell'epatocita e nell'attività biologica specifica del tamoxifene non mediata dal recettore per gli estrogeni su fattori di crescita e proteine mediante i processi di citoproliferazione. Una serie di studi prospettici randomizzati e controllati sembravano confermare una efficacia terapeutica del farmaco^{22,23,24,25}, ma due più recenti trials^{26,27} e la review di Llovet del 2003²⁸ non hanno confermato i dati precedenti. Gli antiandrogeni sono risultati inutili nella terapia dell'epatocarcinoma, se non addirittura dannosi^{29,30}.

È stato poi utilizzato l'interferone con il presupposto di ottenere uno stimolo della risposta immune cellulo-mediata anti-tumorale, una stimolazione espressione antigeni HLA ed una attività anti-proliferativa. Lai et al. in un trial clinico randomizzato su 75 pazienti ha ottenuto un aumento non

significativo della sopravvivenza nei pazienti trattati con interferone e con sopravvivenza ad 1 anno del 15% nei trattati versus 0% nei controlli³¹. Sempre lo stesso autore in uno studio simile ma con confronto verso best supportive care ha però riportato un aumento non significativo della sopravvivenza con, tra l'altro, deterioramento psichico in 6 pazienti trattati. Falkson et al. in uno studio randomizzato con interferone β versus chemioterapia ha ottenuto un aumento non significativo della sopravvivenza sempre con effetti collaterali neurologici ed ematologici³². L'immunoterapia è stata tentata anche con interleukine e cellule LAK ma con un 54% di progressioni.

Infine, in uno studio randomizzato è stata testata la terapia con octreotide con lo scopo di bloccare la crescita neoplastica mediante un approccio recettore-mediato³³.

Tuttavia, prima del 2008 non esistevano terapie di comprovata efficacia per l'epatocarcinoma in stadio avanzato³⁴.

SORAFENIB

Per anni, il trattamento medico dell'epatocarcinoma è rimasto uno dei maggiori “buchi neri” dell'oncologia.

Questo sconcertante quadro si è improvvisamente modificato in seguito ai risultati positivi ottenuti con il sorafenib, dimostratosi in grado di prolungare la sopravvivenza globale, tanto da essere diventato il trattamento standard di I linea nella malattia avanzata.

Nelle linee guida internazionali NCCN l'utilizzo del sorafenib nella malattia avanzata è fortemente consigliato (fig. 4).

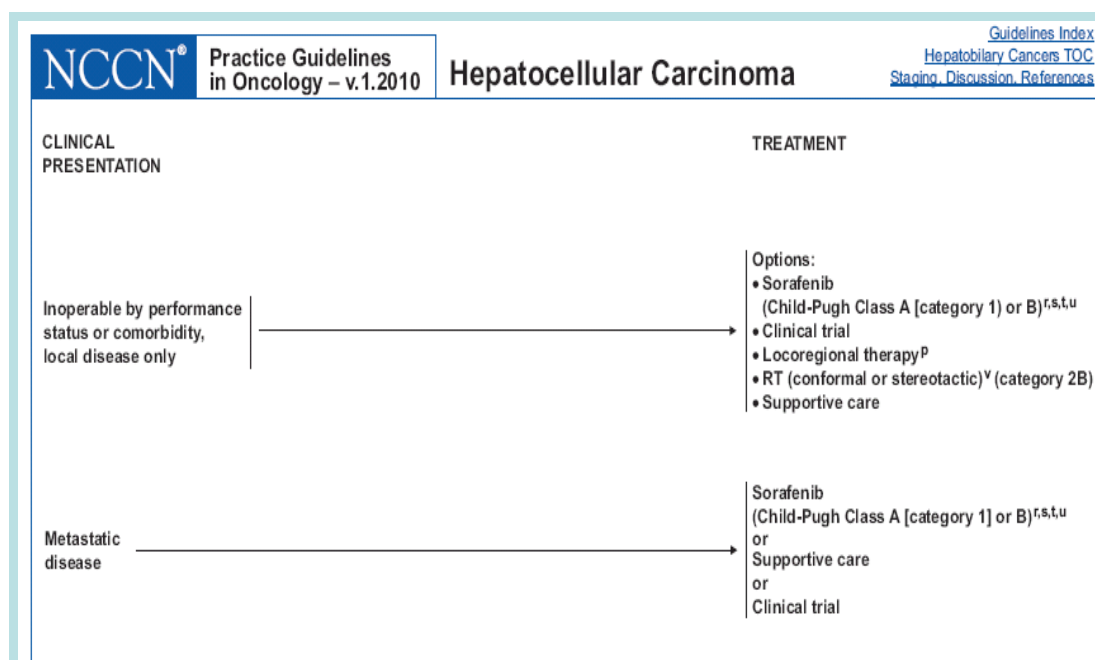


Figura 4. Linee guida NCCN 2010

Meccanismo d'azione

Sorafenib è un inibitore orale multi-chinasi che interferisce con la cascata intracellulare Ras/Raf/MEK/ERK coinvolta nella proliferazione della cellula tumorale, agendo su Raf1 ed entrambe le varianti, wild-type e mutante V600E di B-Raf³⁵.

La cascata Ras/MAP chinasi trasmette il segnale extracellulare dalla membrana citoplasmatica attraverso il citoplasma fino al nucleo. Questa via è attivata quando un fattore di crescita si lega al suo recettore determinando l'autofosforilazione dei residui di tirosina del recettore e il successivo richiamo delle proteine Grb-Sos. Questo complesso attivato causa lo scambio GDP-GTP di Ras, il quale richiama la proteina Raf sulla membrana, dove è fosforilata da una chinasi e infine attivata. Raf attiva fosforilando un'altra chinasi MEK, che a sua volta fosforila e attiva un'altra chinasi chiamata ERK³⁶. Sorafenib agisce anche sui recettori tirosin chinasi presenti sulla superficie cellulare coinvolti nella crescita tumorale e nell'angiogenesi, inclusi i VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) 1, 2 e 3, PDGFR- β (platelet-derived growth

factor receptor beta), c-Kit, FLT-3 (FMS-like tyrosine kinase 3) e RET³⁷ (fig. 5).

In studi preclinici, sorafenib ha dimostrato attività antiproliferativa con riduzione dell'angiogenesi tumorale e incremento dell'apoptosi³⁸.

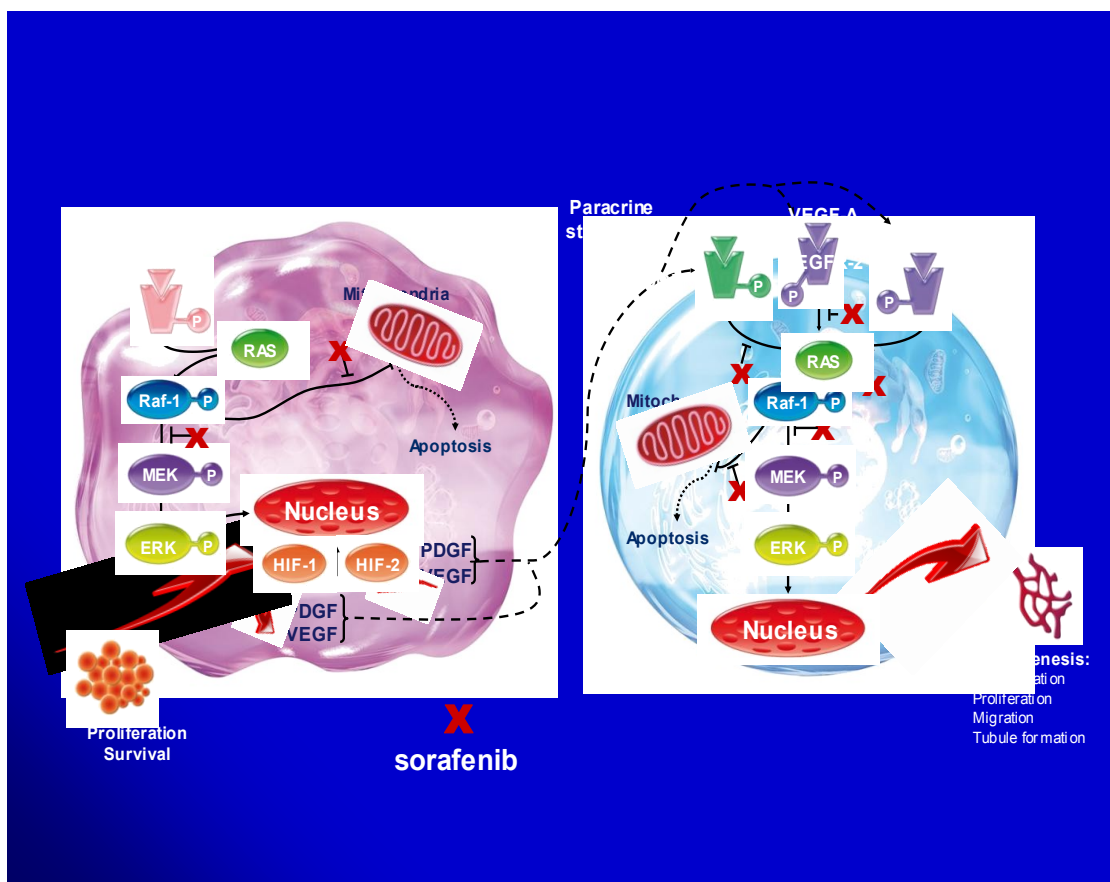


Figura 5. Meccanismo d'azione del Sorafenib³⁹

Letteratura

Alla luce dei dati emersi da uno studio di fase II⁴⁰, per verificare ulteriormente l'efficacia e la tollerabilità di sorafenib in monoterapia in pazienti affetti da epatocarcinoma in fase avanzata sono stati condotti due studi randomizzati, in doppio cieco, multicentrici, di fase III: lo studio Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol (SHARP)⁴¹, condotto in 121 Centri di 21 Stati in Europa, America, Australia e Nuova Zelanda, dove l'insorgenza del tumore è legata all'infezione da HCV e all'alcol, e lo studio Asia-Pacific⁴², condotto in 23 Centri in Cina, Taiwan e Corea del Sud, dove l'infezione cronica da HBV è responsabile dell'insorgenza della maggior parte degli epatocarcinomi.

Entrambi gli studi hanno incluso pazienti con epatocarcinoma in stadio avanzato, istologicamente accertato, con lesioni misurabili, non pretrattati con terapia sistemica, Child-Pugh A, ECOG PS 0-2, con aspettativa di vita di almeno 12 settimane e adeguata funzionalità renale, epatica, ematologica e midollare.

Nello studio SHARP, dei 902 pazienti sottoposti a screening, 602 sono stati randomizzati 1:1 a ricevere sorafenib 400 mg x 2 volte/die (299 pazienti) o placebo (303 pazienti). I pazienti hanno proseguito l'assunzione del farmaco assegnato fino a progressione radiologica, valutata secondo i criteri RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), e progressione sintomatica, verificata attraverso il questionario FHSI-8 (Functional Assessment of Cancer Therapy- Hepatobiliary Symptom Index 8). Prima della randomizzazione i pazienti sono stati stratificati in base alla presenza di invasione vascolare e/o di malattia extraepatica, all'ECOG PS e alla regione geografica.

Nello studio Asia-Pacific sono stati arruolati 226 pazienti, randomizzati 2:1 a ricevere sorafenib (150 pazienti) o placebo (76 pazienti).

Sia nello SHARP sia nell'Asia-Pacific la rivalutazione radiologica era ripetuta ogni 6 settimane e i pazienti venivano visitati ogni 3 settimane per verificare compliance, tollerabilità, effetti collaterali ed eventuale progressione sintomatica del

tumore. Gli obiettivi primari dello SHARP erano la sopravvivenza e il tempo alla progressione sintomatica, calcolato come aumento del punteggio al questionario FHSI-8 di 4 punti o peggioramento dell'ECOG fino a 4 o la morte. Gli obiettivi secondari erano il tempo alla progressione radiologica e la percentuale di controllo della malattia (risposta completa + risposta parziale + stabilità).

L'arruolamento è stato interrotto prematuramente alla seconda analisi ad interim, quando è stato evidenziato un beneficio in termini di sopravvivenza nei pazienti che assumevano sorafenib.

Lo studio Asia-Pacific è stato disegnato in parallelo allo studio SHARP per verificare l'efficacia e la sicurezza di sorafenib nella popolazione con caratteristiche epidemiologiche e cliniche dell'epatocarcinoma diverse dall'Occidente, ai fini della registrazione del farmaco in Asia; in questo studio non erano definiti obiettivi primari.

In entrambi gli studi di fase III, la sopravvivenza mediana globale è risultata significativamente maggiore nei pazienti che hanno assunto sorafenib: 10,7 mesi versus 7,9 mesi dei pazienti

che hanno ricevuto placebo nello studio SHARP e 6,5 mesi versus 4,2 mesi nello studio Asia-Pacific (figg. 6 e 7).

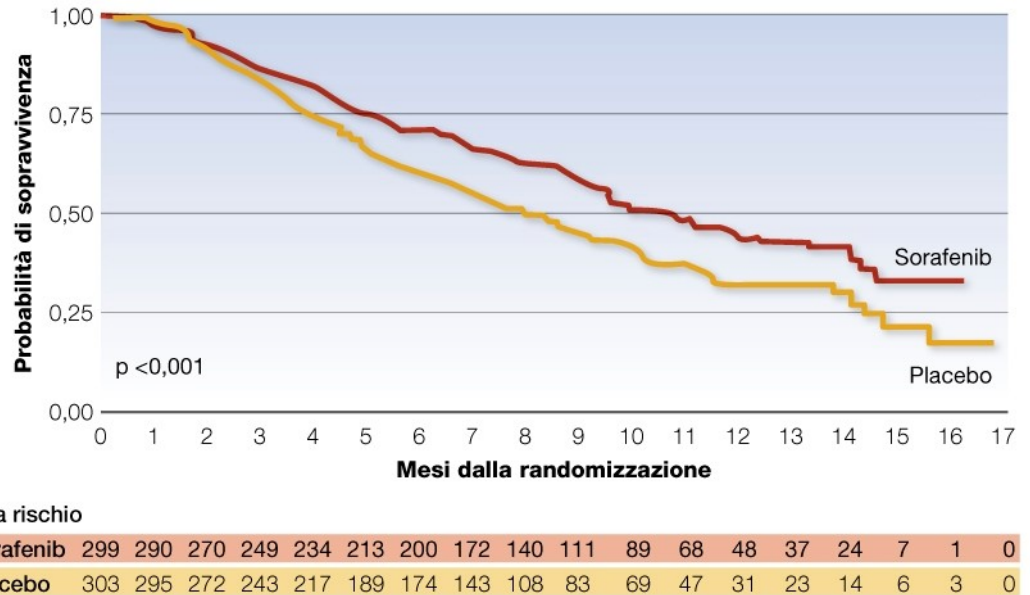


Figura 6. Curve di sopravvivenza globale nello studio SHARP

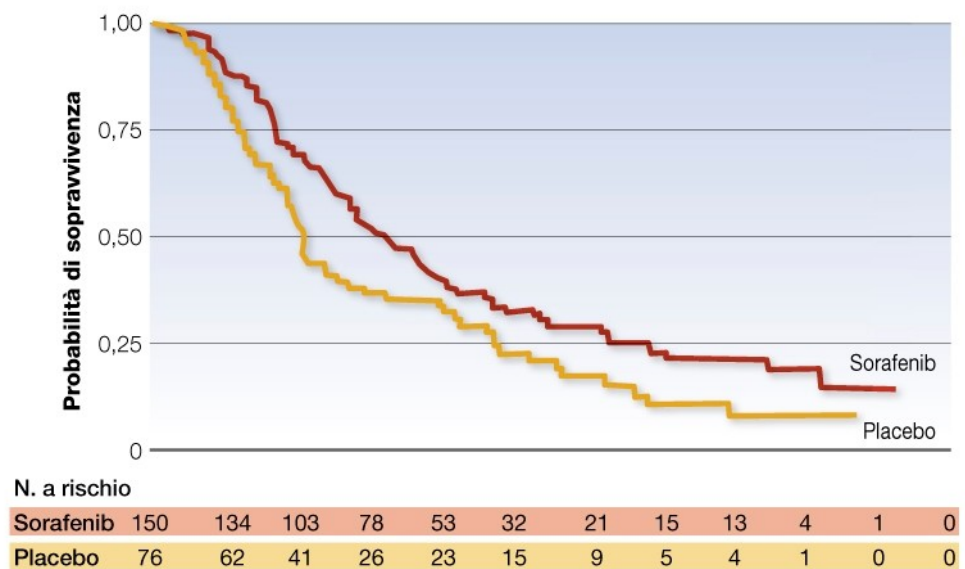


Figura 7. Curve di sopravvivenza nello studio Asia-Pacific

La sopravvivenza libera da progressione di malattia è stata di 5,5 mesi nei pazienti che assumevano sorafenib e di 2,8 mesi nei pazienti che ricevevano placebo nello studio SHARP e di 2,8 mesi nei pazienti che assumevano sorafenib versus 1,4 mesi nei pazienti che ricevevano placebo nello studio Asia-Pacific, con una differenza statisticamente significativa in entrambi gli studi.

Il controllo di malattia a favore del sorafenib è stato del 43% versus 32% nello studio SHARP e del 35% versus il 16% nello studio Asia-Pacific.

Otto caratteristiche basali sono risultate in grado di predire la sopravvivenza: ECOG PS, invasione vascolare macroscopica, carico di malattia, stato Child-Pugh, livelli basali di alfa-fetoproteina, albumina, fosfatasi alcalina e bilirubina totale.

Un'analisi dei sottogruppi ha mostrato un migliore andamento nei pazienti con Child-Pugh A rispetto ai Child-Pugh B in termini di efficacia, con profili di tollerabilità simili nei due gruppi.

Vari studi hanno indagato l'efficacia di sorafenib in combinazione con agenti chemioterapici in pazienti affetti da

epatocarcinoma in stadio avanzato. Uno studio randomizzato di fase II in doppio cieco ha confrontato l'efficacia di sorafenib più doxorubicina con placebo più doxorubicina⁴³. Questo studio ha mostrato risultati incoraggianti senza tuttavia dimostrare alcun sinergismo tra sorafenib e l'agente chemioterapico, vista la mancanza di un gruppo di controllo trattato con sorafenib in monoterapia.

Tossicità

Nello studio SHARP, l'incidenza di eventi avversi di qualsiasi grado correlabili al farmaco è risultata più elevata nel gruppo sorafenib che nel gruppo placebo (80% versus 52%).

Gli eventi avversi più comuni in corso di trattamento con sorafenib sono la diarrea (43% dei pazienti), la sindrome mano-piede (31%), l'affaticamento (30%), la desquamazione cutanea (17%), la nausea (16%), l'anoressia (14%), la stomatite (11%), il vomito (10%) e l'alopecia (10%). In termini di anomalie di laboratorio, un'ipofosfatemia di grado 3 e una piastrinopenia di grado 3-4 sono risultate di più frequente riscontro.

Anche nello studio Asia-Pacific, gli eventi avversi di grado 3 più frequentemente riportati sono stati la diarrea e la sindrome mano-piede.

Nella gestione della diarrea nel paziente che assume sorafenib è necessario indagare le abitudini intestinali, identificare ed eventualmente eliminare i cibi che possono favorirla, adottare provvedimenti farmacologici (loperamide) ed evitare attentamente la disidratazione.

La sindrome mano-piede si riferisce a un gruppo di segni e sintomi che possono colpire, in genere bilateralmente, mani e/o piedi (fig. 8). A seconda dell'entità possiamo classificarla in:

- Grado 1: intorpidimento, disestesia, parestesia, formicolio, gonfiore non doloroso ed eritema, che non compromettono le normali attività quotidiane del paziente;
- Grado 2: eritema doloroso, gonfiore, ipercheratosi di mani e piedi, che interferiscono con le normali attività quotidiane del paziente;
- Grado 3: desquamazione o esfoliazione, ulcerazione,

formazione di vescicole, ipercheratosi, dolore, che impediscono al paziente di svolgere le normali attività quotidiane.

La sindrome mano-piede insorge solitamente durante le prime 6 settimane di terapia, con un'intensità generalmente decrescente in maniera spontanea nel corso del trattamento.



Figura 8. Sindrome mano-piede con crescenti gradi di tossicità

Il rash cutaneo acneiforme, evento avverso tipico dei farmaci anti-EGFR, può verificarsi anche in corso di terapia con sorafenib. Si tratta di un'eruzione maculare, papulare o eritematosa che appare su viso e dorso, spesso senza sintomi associati (grado 1); può evolvere in desquamazione in meno del 50% della superficie corporea (grado 2) o in più della metà del corpo (grado 3).

PARTE SPERIMENTALE

DESCRIZIONE DELLO STUDIO

Il buon esito dei due studi di fase III SHARP e Asia-Pacific ha portato all'approvazione del sorafenib nel trattamento dell'epatocarcinoma avanzato e alla sua rimborsabilità; ciò ha reso possibile il nostro studio spontaneo, la cui parte sperimentale si è svolta presso l'Oncologia Medica dell'Università degli Studi di Sassari.

OBIETTIVI

Gli obiettivi dello studio erano valutare l'efficacia, in termini di risposte obiettive e di tempo alla progressione (ossia tempo intercorso dalla data del primo giorno di trattamento alla data della progressione di malattia), e la tollerabilità del trattamento e individuare eventuali fattori molecolari correlati con la risposta clinica.

CRITERI DI ELEGGIBILITA'

I criteri di inclusione nello studio erano:

- diagnosi istologica di epatocarcinoma;
- evidenza radiologica di malattia misurabile;
- malattia avanzata, non suscettibile di trattamenti loco-regionali;
- performance status (PS) ≤ 2 secondo il sistema Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG);
- età > 18 anni;
- classe Child-Pugh A;
- consenso informato scritto.

I criteri di esclusione comprendevano invece:

- presenza di metastasi cerebrali;
- gravi malattie cardiovascolari e/o neurologiche associate;
- gravi patologie vascolari trombotiche e/o emorragiche;
- funzionalità epatica compromessa;
- leucociti $< 3000/\text{mm}^3$, neutrofili $< 1500/\text{mm}^3$, piastrine $< 100.000/\text{mm}^3$.

TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

Previa registrazione dei dati sul sito AIFA, il sorafenib veniva somministrato al dosaggio di 400 mg (due compresse da 200 mg) x 2 volte/die continuativamente, equivalente ad una dose totale giornaliera di 800 mg. Sorafenib doveva essere assunto lontano dai pasti o con un pasto a contenuto lipidico basso o moderato. L'assunzione del farmaco avveniva al domicilio del paziente e le visite ambulatoriali avvenivano a cadenza mensile.

La terapia era di tipo continuativo, ma per convenzione era codificata in cicli, ciascuno della lunghezza di 28 giorni.

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA

A 12-16 settimane dall'inizio del trattamento era prevista la rivalutazione della malattia attraverso un accurato esame obiettivo, l'eventuale marcatore (se elevato alla valutazione basale, il dosaggio dell'alfafetoproteina veniva ripetuto il giorno uno di ciascun ciclo) e l'esecuzione di una TC addome (ed eventuale TC di altri segmenti a seconda delle localizzazioni extra-epatiche).

La risposta strumentale al trattamento era valutata secondo i criteri mRECIST (Modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors⁴⁴), che prendono in considerazione una valutazione funzionale e non solo dimensionale. Questo perché i nuovi trattamenti biologici mirati all'angiogenesi distruggono la neovascolarizzazione ed inducono necrosi spesso senza cambiamenti di volume del tumore. I criteri mRECIST tengono conto della quota vitale della neoplasia.

In particolare, per risposta completa (RC) s'intende la scomparsa dell'enhancement arterioso intratumorale in tutte le lesioni target.

La RP è definita come una riduzione $\geq 30\%$ della somma dei diametri delle aree vitali nelle lesioni parametro, rispetto alle dimensioni basali.

La progressione di malattia (PD) è definita, invece, come un aumento $\geq 20\%$ della somma dei diametri delle aree vitali nelle lesioni parametro, rispetto alle dimensioni basali.

Per SD s'intendono i casi non classificabili tra le risposte parziali e le progressioni.

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA'

La tossicità era valutata secondo i criteri National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE versione 4.0) ad ogni ciclo. In base al grado di tossicità erano previste riduzioni di dose o sospensioni del trattamento.

Per gli eventi avversi di grado 1 si consigliava di istituire misure di supporto e proseguire con l'assunzione di sorafenib. Alla prima comparsa di eventi avversi di grado 2 si suggeriva di istituire misure di supporto e considerare la riduzione di sorafenib a 400 mg/die per 28 giorni; se la tossicità regrediva a grado 1, era indicato reincrementare il dosaggio a 400 mg x 2 volte/die. Se la tossicità non regrediva, si consigliava di sospendere sorafenib per almeno 7 giorni e alla riassunzione somministrare prima la dose ridotta a 400 mg/die, poi la dose piena. All'eventuale seconda o terza comparsa di tossicità di grado 2, alla riassunzione del farmaco si somministrava definitivamente la dose ridotta di 400 mg/die. In caso di quarta comparsa di tossicità di grado 2 si doveva considerare la sospensione definitiva del farmaco. Al

manifestarsi di tossicità di grado 3, era indicato interrompere sorafenib per almeno 7 giorni o finché la tossicità non diventava di grado 0-1, poi prescrivere la dose ridotta (400 mg/die) e, nel caso la tossicità non ricomparisse, aumentare la dose a 400 mg x 2 volte/die. Alla seconda comparsa di tossicità di grado 3 ci si doveva comportare come al primo episodio, ma al momento della riassunzione del farmaco si prescriveva definitivamente la dose ridotta (400 mg/die).

VALUTAZIONE DEI FATTORI MOLECOLARI

Di ogni paziente venivano rianalizzati i tasselli istologici e la neoplasia era definita in base al sistema di classificazione corrente. Veniva stabilito il grading della neoplasia secondo Edmonson e con metodiche immunohistochimiche veniva eseguita una valutazione semiquantitativa di EGFR, RAS, RAF-1, p70s, HIF-alfa, distinguendo le tre sedi di distribuzione (membranosa, nucleare e citoplasmatica).

Questa parte del lavoro è stata eseguita in collaborazione con l'Anatomia Patologica dell'Università degli Studi di Sassari.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Dal settembre 2007 all'agosto 2010, in uno studio monoistituzionale sul sorafenib nell'epatocarcinoma, sono stati osservati 13 pazienti di cui 12 di sesso maschile e 1 di sesso femminile. Le caratteristiche generali della popolazione sono mostrate nella tabella 3.

L'età mediana era di 73 anni (range 54-82); ben 3 pazienti erano ultraottantenni.

Tutti i pazienti, come stabilito dai criteri di inclusione, avevano una malattia avanzata e non suscettibile di trattamenti loco-regionali. Nel 54% dei casi la malattia era già avanzata all'esordio. Nel restante 46% dei casi, la mediana di tempo intercorso dalla diagnosi era pari a 16 mesi, con un range variabile da 11 a 65.

Un paziente era stato precedentemente sottoposto a intervento di epatectomia parziale, mentre 3 avevano eseguito in

precedenza trattamenti loco-regionali (due pazienti alcolizzazione + chemoembolizzazione, uno termoablazione).

Le sedi extra-epatiche più frequenti di malattia erano quella polmonare e quella ossea.

Nel 70% dei casi i pazienti presentavano una parziale compromissione dell'ECOG Performance Status al basale; solo 2 pazienti erano del tutto asintomatici.

Tabella 3. Caratteristiche generali dei pazienti

Età mediana all'arruolamento (anni)	73 (54-82)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maschi ▪ Femmine 	12 (92%) 1 (8%)
ECOG Performance Status:	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0 ▪ 1 ▪ 2 	2 (15%) 2 (15%) 9 (70%)
Cirrosi correlata:	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ HCV+ ▪ altre cause ▪ non evidenza di cirrosi 	6 (46%) 4 (31%) 3 (23%)
Pregressi trattamenti:	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ sì (chirurgia, alcolizzazione, termoablazione, chemoembolizzazione) ▪ no 	6 (46%) 7 (54%)

In 10/13 casi era coesistente una condizione cirrotica, principalmente (60%) HCV-relata; nel 10% dei casi era su base alcolica e nel restante 30% aveva un'eziologia mista.

Solo 4 pazienti presentavano un'alterazione dell'alfafetoproteina alla visita basale.

Undici pazienti risultavano valutabili per le caratteristiche molecolari (tab. 4); mentre in 2 casi non è stato possibile eseguire l'immunoistochimica per l'esiguità del campione istologico.

Nel 54% dei casi si trattava di epatocarcinomi scarsamente differenziati. In 10/11 pazienti il RAF-1 era iperespresso in sede nucleare; anche la phP70s era ampiamente rappresentata, per lo più a livello nucleare, in quasi la totalità dei casi; più eterogenea era la distribuzione dell'EGFR. L'espressione di RAS, p70s e HIF-alfa era assente in tutti i campioni istologici.

Tabella 4. Caratteristiche molecolari negli 11 pazienti valutabili

Grading	EGFR			RAF-1			phP70s		
	sede	intensità	%	sede	intensità	%	sede	intensità	%
2	m	+/-	<5	n	+++	90	nc	+++	80
2	-	-	-	n	+++	90	nc	++	90
1	NV			n	++	70	n	++	80
3	-	-	-	n	+	<5	n	+	<5
3	m	++	70	n	+++	90	nc	+++	90
3	mc	++/+++	60	n	++	60	-	-	-
2	m	++	70	n	++	90	n	+	70
3	-	-	-	n	++	70	nc	++	80
3	-	-	-	n	+	70	n	+++	70
3	m	++/+++	40	-	-	-	nc	++	50
1	m	+	<5	n	++	80	n	++	50

m: membranosa; n: nucleare; c: citoplasmatica; NV: non valutabile

TRATTAMENTO

Il numero totale di cicli somministrati è stato di 90, con una mediana di 3 cicli per paziente e con un range variabile da 1 a 37.

In un paziente con secondarismi ossei sono stati somministrati contestualmente bifosfonati per via endovenosa a cadenza mensile.

EFFICACIA

Per ciascun paziente è stata presa in considerazione la miglior risposta.

Sono state riscontrate:

- 1 risposta completa (8%);
- nessuna risposta parziale;
- 3 stabilità di malattia (23%);
- 7 progressioni di malattia (54%), di cui cinque a livello epatico, una a livello extra-epatico e una a livello sia epatico che extra-epatico.

Due pazienti non erano valutabili per la risposta a causa di

una sospensione precoce del trattamento per intolleranza.

Per quanto riguarda il tempo alla progressione, la mediana era di 3 mesi (range 1-37).

Il dato più interessante è relativo a due pazienti considerabili long responders, in quanto in trattamento da oltre 30 mesi, senza dimostrazione di progressione: uno manteneva una stabilità di malattia da 37 mesi e l'altro presentava una risposta completa.

All'1.09.2010 tre pazienti risultavano ancora ongoing: 10 pazienti avevano, invece, concluso il trattamento, per lo più per progressione (73%) o per decisione medica (27%) e risultavano deceduti.

In corso di trattamento, è stata osservata una riduzione $\geq 50\%$ dell'alfafetoproteina in 3 pazienti su 4 che presentavano un'alterazione del marcatore alla valutazione basale. La risposta del markers tumorale era associata ad una stabilità di malattia in 2 casi e ad una progressione strumentale nel restante caso.

TOSSICITA'

Su 90 cicli totali, solo 64 (pari al 71%) sono stati somministrati al 100% delle dosi previste. Tre pazienti (il 23%) hanno iniziato il trattamento con dosaggi già ridotti ab inizio: per alterazione del profilo epatico al basale o per scaduto performance status. Nei successivi cicli le riduzioni di dose erano dovute principalmente a tossicità clinica di tipo gastro-enterico e alla sindrome mano-piede.

In 2 casi (15%) il trattamento è stato interrotto per intolleranza.

Le tossicità cliniche sono riportate nella tabella 5.

Tra le tossicità gastroenteriche di grado > 2 , la più frequente è stata la diarrea (31%).

In 2 pazienti (15%) si è manifestata nausea di grado moderato, non associata generalmente a vomito.

La sindrome mano-piede si è verificata in 5 pazienti (38%), in 1 caso (8%) era di grado 3 ed ha richiesto la sospensione temporanea del trattamento. Tra le altre tossicità cliniche si segnala, infine, mucosite G2 in un paziente (8%). La tossicità

neurologica non è stata clinicamente rilevante. La maggioranza dei pazienti (62%) ha riferito astenia di grado moderato persistente per tutta la durata del trattamento. In 3 pazienti si è verificato un significativo calo ponderale.

Gli esami ematochimici, eseguiti regolarmente tra un ciclo e l'altro, hanno mostrato un rialzo delle transaminasi di grado ≥ 2 nel 23% delle pazienti; in un caso le ALT hanno raggiunto un valore superiore a 10 volte il valore normale. Da ultimo, in 2 pazienti si è documentata iperbilirubinemia. Non è stata riscontrata tossicità renale di rilievo.

	G2		G3		G4	
	N°	%	N°	%	N°	%
Nausea	2	15	-	-	-	-
Vomito	-	-	-	-	-	-
Diarrea	2	15	4	31	-	-
Stipsi	2	15	-	-	-	-
Mucosite	1	8	-	-	-	-
Calo ponderale	3	23	-	-	-	-
Sdr mano-piede	4	31	1	8	-	-
Parestesie	2	15	-	-	-	-
Astenia	8	62	-	-	-	-
Ipertransaminasemia	1	8	1	8	1	8
Iperbilirubinemia	-	-	2	15	-	-

Tabella 5. Tossicità cliniche

Per quanto riguarda la tossicità ematologica ≥ 2 (tab. 6), la leuconeutropenia si è verificata nell'8% dei pazienti; piastrinopenia G2 si è presentata in 4 pazienti (31%), in 1 paziente si è verificata una piastrinopenia G4 per cui non è stato necessario, tuttavia, ricorrere a trasfusione di piastrine. Sono stati registrati, infine, 4 casi di anemia G2.

Tabella 6. Tossicità ematologica

	Gradi	N°	%
Leucociti	2	1	8
	3	-	-
	4	-	-
Neutrofilo	2	1	8
	3	-	-
	4	-	-
Piastrine	2	4	31
	3	-	-
	4	1	8
Emoglobina	2	4	31
	3	-	-
	4	-	-

La coesistenza della cirrosi rendeva difficile l'interpretazione delle alterazioni laboratoristiche della funzionalità epatica e dell'emocromo.

FATTORI MOLECOLARI E RISPOSTA CLINICA

I dati molecolari sono stati rianalizzati alla luce dei risultati clinici al fine di identificare eventuali correlazioni tra outcomes clinici e caratteristiche biologiche e di individuare fattori molecolari di possibile significato predittivo di risposta al farmaco.

Le caratteristiche molecolari sono state correlate ai due end-points primari della studio: le risposte obiettive e il tempo alla progressione.

In base alle risposte obiettive, sono stati identificati 3 sottogruppi di pazienti:

- “well responders” (1 paziente con risposta completa);
- “intermediate responders” (3 pazienti con stabilità di malattia);
- “non responders” (7 pazienti con progressione di malattia).

Due pazienti non erano valutabili per la risposta.

Confrontando le caratteristiche dei sottogruppi non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i 3 sottogruppi (tab. 7). Una certa eterogeneità era presente anche

all'interno dei singoli gruppi.

L'unico dato peculiare, ma che necessita di ulteriori conferme, è la negatività dell'espressione del RAF-1 nell'unico paziente well responder.

Grading	EGFR			RAF-1			phP70s		
	sede	intensità	%	sede	intensità	%	sede	intensità	%
Well responders									
3	m	++/+++	40	-	-	-	nc	++	50
Intermediate responders									
2	m	+/-	<5	n	+++	90	nc	+++	80
3	m	++	70	n	+++	90	nc	+++	90
3	-	-	-	n	+	70	n	+++	70
Non responders									
2	-	-	-	n	+++	90	nc	++	90
1	NV			n	++	70	n	++	80
3	-	-	-	n	+	<5	n	+	<5
3	mc	++/+++	60	n	++	60	-	-	-
2	m	++	70	n	++	90	n	+	70
3	-	-	-	n	++	70	nc	++	80
1	m	+	<5	n	++	80	n	++	50

Tabella 7. Correlazione tra caratteristiche molecolari e risposte obiettive al trattamento

L'altra correlazione è stata eseguita in funzione del tempo alla progressione tra i due sottogruppi:

- Long responders (2 pazienti in trattamento da almeno 30

mesi) e

- Short responders (9 pazienti in progressione entro i 3 mesi).

Anche questa correlazione non mostrava differenze molecolari statisticamente significative (tab. 8).

Tuttavia, si può notare come nel sottogruppo dei long responders il RAF-1 fosse negativo o debolmente positivo, mentre nel gruppo dei short responders vi fosse tendenzialmente un'iperpressione di questo fattore molecolare.

Grading	EGFR			RAF-1			phP70s		
	sede	intensità	%	sede	intensità	%	sede	intensità	%
Long responders									
3	m	++/+++	40	-	-	-	nc	++	50
3	-	-	-	n	+	70	n	+++	70
Short responders									
2	m	+/-	<5	n	+++	90	nc	+++	80
3	m	++	70	n	+++	90	nc	+++	90
2	-	-	-	n	+++	90	nc	++	90
1	NV			n	++	70	n	++	80
3	-	-	-	n	+	<5	n	+	<5
3	mc	++/+++	60	n	++	60	-	-	-
2	m	++	70	n	++	90	n	+	70
3	-	-	-	n	++	70	nc	++	80
1	m	+	<5	n	++	80	n	++	50

Tabella 8. Correlazione tra caratteristiche molecolari e tempo alla progressione

DISCUSSIONE

Questa esperienza conferma l'efficacia del sorafenib come agente anti-tumorale attivo nei pazienti con epatocarcinoma avanzato.

La percentuale di controllo di malattia è stata del 36%, con due pazienti considerabili non responders in quanto in trattamento da oltre 30 mesi (uno in risposta completa strumentale).

Il piccolo campione e i differenti end-points non consentono un confronto diretto con i risultati ottenuti nello studio SHARP, dove, tra l'altro, le risposte erano valutate sulla base dei criteri RECIST e non mRECIST come invece nel nostro studio.

Il profilo di tossicità era accettabile, fatta eccezione per due pazienti che hanno interrotto precocemente il trattamento per intolleranza e decadimento delle condizioni generali.

Va sottolineato che nel nostro studio era più alta la

percentuale di pazienti con performance status di 2 alla valutazione basale rispetto allo studio SHARP (70% versus 7,5%).

Le tossicità cliniche più frequenti erano quelle attese sulla base dei dati dei due studi registrativi SHARP e Asia-Pacific: diarrea e sindrome mano-piede.

Anche l'incidenza delle tossicità era sovrapponibile, nonostante l'età mediana fosse più avanzata rispetto allo studio SHARP (73 anni versus 65,5 anni) e ben 3 pazienti fossero ultra80enni, suggerendo un discreto profilo di tollerabilità anche nella popolazione più anziana.

Negli ultimi anni la ricerca sui nuovi farmaci antineoplastici si è concentrata proprio sull'identificazione di terapie più specifiche e quindi meno tossiche.

La terapia a bersaglio molecolare (o target therapy) è mirata: ciò significa che la sua azione è specifica soltanto per il 'bersaglio' contro cui è diretta e che è presente soltanto nelle cellule tumorali.

Il bersaglio può essere un recettore presente sulla superficie o all'interno della cellula neoplastica: in entrambi i casi si tratta di

componenti indispensabili per la crescita della cellula, che sono bloccati e non possono più svolgere la loro azione.

In ambito clinico esistono già esempi positivi in tal senso: i recettori Her-2 per la terapia con trastuzumab o il k-ras per la terapia con cetuximab o panitumumab.

L'utilizzo del trastuzumab nelle pazienti con neoplasia mammaria che iperesprime l'Her-2 (20-25% di tutti i tumori mammari), sia in fase adiuvante che metastatica, ha modificato la storia naturale di questa malattia⁴⁵.

Nello studio Crystal l'aggiunta del cetuximab al regime chemioterapico Folfiri ha determinato un prolungamento della sopravvivenza libera da progressione e un incremento delle risposte rispetto alla sola chemioterapia con Folfiri. Tale miglioramento era però evidente solo nel sottogruppo di pazienti con k-ras wild-type e non nel sottogruppo con k-ras mutato⁴⁶.

Her-2 e k-ras sono due esempi di bersagli molecolari ed hanno il significato di fattori predittivi di risposta.

Nonostante sia noto il meccanismo d'azione del sorafenib, ad oggi non esiste un bersaglio molecolare specifico che possa

indirizzarci nella selezione del paziente da trattare con questo farmaco.

Questo determina un over-treatment, ossia la necessità di trattare tutti affinché un piccolo sottogruppo se ne avvantaggi. Nel nostro studio abbiamo avuto un 64% di pazienti (7/11 valutabili) non responders che sono stati esposti inutilmente alla tossicità del farmaco. Questo si riflette, inevitabilmente, in un peggioramento della qualità della vita dei pazienti e in un aumento dei costi.

La letteratura è povera di studi simili al nostro.

Nello studio di fase II con 33 pazienti il tempo alla progressione è risultato significativamente più lungo nei pazienti con elevata espressione cellulare di ERK (extracellular signal-regulated kinase) fosforilato (pERK), indice di attivazione della via Ras/MAPK, suggerendo che le neoplasie contenenti livelli di pERK più elevati sono più sensibili, o responsive, a sorafenib⁴⁰.

In un analogo studio in vitro il sorafenib inibisce la fosforilazione di ERK in modo dose-dipendente ed è significativamente correlato con i livelli basali di ERK

fosforilato⁴⁷.

Sempre al fine di ottenere un approccio terapeutico personalizzato per i pazienti affetti da epatocarcinoma sono stati studiati i campioni plasmatici e istologici dei pazienti partecipanti allo studio SHARP, con l'obiettivo di identificare biomarcatori in grado di predire la prognosi e/o la risposta al sorafenib. I risultati hanno mostrato che bassi livelli di HGF ed elevati livelli di c-kit sono associati a una più lunga sopravvivenza nei pazienti trattati con sorafenib⁴⁸.

Attualmente vi sono studi in corso, quali quelli sulla perfusione all'ecografia con contrasto (studio STIC in Francia o Bracco BR129 in Italia), che hanno come end-point primario l'identificazione precoce a 2 e 4 settimane dei non responders. Studi analoghi sono stati condotti per esplorare l'importanza dei livelli di alfafetoproteina o l'impiego della PET come fattori predittivi di precoce risposta al sorafenib.

In un piccolo studio di 6 pazienti la valutazione della risposta era eseguita, oltre che con la TC ogni 12 settimane, con una PET prima di iniziare la terapia e dopo 3 settimane di

trattamento. Tre pazienti hanno mostrato una diminuzione nella captazione PET dopo 3 settimane di terapia; due di questi hanno sviluppato una risposta parziale alla TC alla 12^a settimana, il terzo ha interrotto per tossicità⁴⁹.

In questi casi si tratta però di fattori migliori “ a posteriori”, cioè che non consentono una preselezione del paziente da trattare.

Il nostro studio è originale nel ricercare in vivo fattori molecolari da correlare agli outcomes clinici, ma non ha evidenziato alcuna significatività statistica.

Il fatto che si trattasse di un’esperienza monoistituzionale e non sponsorizzata, la relativa bassa incidenza della neoplasia, l’assenza in qualche caso di una conferma istologica e la necessità di chiudere l’arruolamento entro agosto 2010 hanno limitato l’accrua. E forse l’esiguità del campione (solo 13 pazienti) può aver influenzato negativamente la potenza statistica.

E’ evidente che si rendono necessari studi più ampi per poter approfondire questi aspetti biomolecolari. In particolar modo, dovrà essere oggetto di studio il ruolo del RAF-1 che ipotizziamo possa avere un ruolo come fattore predittivo di

risposta al trattamento.

Nella nostra piccola esperienza i due pazienti long responders mostravano la negatività o la debole espressione di questo fattore molecolare che è coinvolto della cascata Ras/MAP chinasi. Il paziente con malattia RAF-1 negativa era l'unico well responder: on going da oltre 30 mesi, mantiene una risposta completa.

Infine, appare utile sottolineare l'importanza della multidisciplinarietà nella gestione di in una neoplasia così complessa per la coesistenza, in un'ampia percentuale di casi, di una cirrosi sottostante che influisce sul decorso clinico e sulle scelte terapeutiche. Questo studio è un bell'esempio di collaborazione tra clinici e patologi.

In futuro solo la collaborazione tra epatologi, oncologi, patologi, chirurghi e radiologi porterà all'ottimizzazione della cura dell'epatocarcinoma.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-538
- ² Hel-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
- ³ Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J et al. Cancer incidence in five continents. Vol VIII. *IARC Scientific Publication* 2002 (No 155).
- ⁴ Garcia M, Jemal A, Ward EM, et al. *Global Cancer Facts & Figures 2007*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2007
- ⁵ www.registri-tumori.it
- ⁶ Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 75: 347-354

-
- ⁷ Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from gene to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 674-687
- ⁸ Plentz RR, Park YN, Lechel A et al. Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2007; 45: 968-976
- ⁹ Villanueva A, Newell P, Chiang DY et al. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55-76
- ¹⁰ Bosch FX, Ribes J, Cléries R et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 191-211
- ¹¹ Toyoda H, Kumada T, Kiriyaama S et al. Impact of surveillance on survival of patients with initial hepatocellular carcinoma: a study from Japan. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1170-1176
- ¹² Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698-711

-
- ¹³ Boucher E, Forner A, Reig M et al. New drugs for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2009; 29(S1): 148-158
- ¹⁴ Llovet JM, Brù C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19(3): 329-338
- ¹⁵ Palmer DH, Hussain SA, Johnson PJ. Systemic therapie for hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Invest Drugs* 2004; 13: 1555-1568
- ¹⁶ Roberts LR. Sorafenib in liver cancer: Just the beginning? *N Engl J Med* 2008; 359: 420-422
- ¹⁷ Gish RG, Porta C, Lazar L et al. Phase III randomized controller trial comparing the serviva of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3069-3075
- ¹⁸ Zhu AX. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: How hopeful should we be? *Oncologist* 2006; 11: 790-800

¹⁹ O'Reilly EM, Stuart KE, Sanz-Altamira PM et al. A phase II study of irinotecan in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 101-105

²⁰ Halm U, Etzrodt G, Schiefke I et al. A phase II study of pegylated liposomal doxorubicin for treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 2000; 11: 113-114

²¹ Yeo W, Mok TS, Zee B et al. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/inteferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1532-1538

²² Farinati F, Salvagnini M, De Maria N et al. Unresectable hepatocellular carcinoma: a prospective controlled trial with tamoxifen. *J Hepatol* 1990; 11: 297

²³ Martinez Cerezo FJ, Tomas A, Donoso L, et al. Controlled trial of tamoxifen in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1994; 20 (6): 702-706

²⁴ Elba S, Giannuzzi V, Misciagna G et al. Randomized controlled trial of tamoxifen versus placebo in operable hepatocellular carcinoma. *Ital J Gastroenterol* 1994; 26: 66

-
- ²⁵ Manesis EK, Gianoulis G, Zouboulis P. Treatment of hepatocellular carcinoma with combined suppression and inhibition of sex hormones: a randomized controlled trial. *Hepatology* 1995; 21(6): 1535-1542.
- ²⁶ Castells A, Bruix J, Bru C et al. Treatment of hepatocellular carcinoma with tamoxifen: a double-blind placebo-controlled trial in 120 patients. *Gastroenterology* 1995; 109(3): 917-922
- ²⁷ No authors listed. Tamoxifen in treatment of hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial CLIP Group. *Lancet* 1998; 352(9121): 17-20
- ²⁸ Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003; 37: 429-442
- ²⁹ Chao Y, Chan WK, Huang YS et al. Phase II study of flutamide in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1996; 77(4): 635-639
- ³⁰ Grimaldi C, Bleiberg H, Gay F et al. Evaluation of antiandrogen therapy in unresectable hepatocellular carcinoma: Results of European Organization for Research and Treatment of

Cancer multicentric double-blind trial. *J Clin Oncol* 1998; 16(2): 411-417

³¹ Lai CL, Lau JY, Wu PC et al. Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Hepatology* 1993; 17(3): 389-394

³² Falkson G, Lipsitz S, Borden E et al. Hepatocellular carcinoma. An ECOG randomized phase II study of beta-interferon and menogaril. *Am J Clin Oncol* 1995; 18(4): 287-92

³³ Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K et al. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomized controlled study. *Gut* 1998; 42: 442-447

³⁴ Simonetti RG, Liberati A, Angiolini C et al. Treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review of randomized controller trials. *Ann Oncol* 1997; 8: 117-136

³⁵ Wilhelm SM, Carter C, Tang L et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109

-
- ³⁶ Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapie in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1312-1327
- ³⁷ Adnane L, Trail PA, Taylor I et al. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol* 2005; 407: 597-612
- ³⁸ Liu L, Cao Y, Chen C et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006; 66: 11851-11858
- ³⁹ Wilhelm SM, Adnane L, Newell P et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1001-1006
- ⁴⁰ Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4293-4300
- ⁴¹ Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl Med* 2008; 359: 378-390

⁴² Cheng AL, Kang YK, Chen Z et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: A phase III randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25-34

⁴³ Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox J et al. Final results from a phase II (PhII), randomized, double-blind, study of sorafenib plus doxorubicin (P + D) in patients with advanced hepatocellular carcinoma (AHCC) [abstract no.128] 2008 *Gastrointestinal Cancer Symposium* 2008 January 25-27, Orlando, FL, USA

⁴⁴ Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2010; 30:52-60

⁴⁵ Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B et al. Trastumab after adjuvant chemotherapy in HER-2 positive breast cancer. *N Engl Med* 2005; 353 (16): 1659-1672

⁴⁶ Van Cutsem E, Nowacki M, Lang I et al. Randomized phase III study of irinotecan and 5-FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): the Crystal trial. *J Clin Oncol*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings; 25 (18S): 4000

⁴⁷ Zhang Z, Zhou X, Shen H et al. Phosphorylated ERK is a potential predictor of sensitivity to sorafenib when treating hepatocellular carcinoma: evidence from an in vitro study. *BMC Med* 2009; 24: 7-41

⁴⁸ Llovet J, Pena C, Shan M et al. Biomarkers predicting outcome of patients with hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III SHARP trial [abstract no. 149]. *Hepatology* 2008; 48 (4 suppl): 372A

⁴⁹ Siemerink E, Mulder NH, Brouwers AH et al. Early prediction of response to sorafenib treatment in patients with hepatocellular carcinoma with 18fluorodeoxyglucose-positron emission tomography [abstract no. 15600]. *44th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*. 2008 Chicago (IL).

Un sincero ringraziamento...

al Prof. Antonio Farris per avermi accompagnato in questa crescita professionale

alla Prof.ssa Rosa Maria Pascale per l'entusiasmo con cui ha accolto lo studio

al Dr. Paolo Cossu Rocca, al Dr. Vincenzo Marras ed al personale tecnico dell'Anatomia Patologica per la valutazione delle caratteristiche biomolecolari

alle colleghe Silvia Mura, Chiara Porcu, Maria Pittalis, Laura Pisanu, Francesca Spada e all'infermiera Antonella Delogu per l'aiuto fornitomi nella raccolta dati

alla collega Barbara Frau per il supporto nella stesura della tesi.