



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE
XXIV CICLO

Direttore Prof. Eusebio Tolu

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI TUMORI

Direttrice Prof.ssa Rosa Maria Pascale

***VALUTAZIONE DI EFFICACIA DI UN ANTIANGIOGENETICO (BEVACIZUMAB)
ASSOCIATO A CHEMIOTERAPIA IN PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA
MAMMELLA METASTATICO***

Relatore:

Prof. A. Farris

Tesi di dottorato della:

Dr.ssa Maria Pittalis

Indice

PARTE GENERALE	pag 3
EPIDEMIOLOGIA E NOTE PATOGENETICHE	pag 4
LA TERAPIA DEL CARCINOMA MAMMARIO METASTATICO	pag 11
RUOLO DELL'ANGIOGENESI E DEL VEGF NELLA CRESCITA TUMORALE	pag 17
EFFETTI DEL VEGF SULLE CELLULE ENDOTELIALI	pag 27
IL BEVACIZUMAB	pag 30
• Meccanismo d'azione	pag 30
• Letteratura: attività del Bevacizumab nel carcinoma mammario metastatico	pag 34
• Letteratura: attività del bevacizumab in studi clinici di fase III del Carcinoma mammario metastatico	pag 37
PARTE SPERIMENTALE	pag 44
DISEGNO DELLO STUDIO	pag 45
• OBIETTIVI	pag 45
• CRITERI DI ELEGIBILITA'	pag 45
• TRATTAMENTO FARMACOLOGICO	pag 48
• VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA	pag 48
• VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA'	pag 50
• TRATTAMENTI CONCOMITANTI	pag 56
• VALUTAZIONE DEI FATTORI MOLECOLARI	pag 58

RISULTATI	pag 59
• CARATTERISTICHE DELLE PAZIENTI	pag 59
• TRATTAMENTO	pag 64
• EFFICACIA	pag 64
• TOSSICITA'	pag 67
• FATTORI MOLECOLARI E RISPOSTA CLINICA	pag 70
DISCUSSIONE	pag 73
BIBLIOGRAFIA	pag 80

PARTE GENERALE

Maria Pittalis

Valutazione di efficacia di un antiangiogenetico (Bevacizumab) associata a chemioterapia in pazienti con carcinoma della mammella metastatico

Tesi di dottorato in scienze Biomediche-Epidemiologia molecolare dei tumori
Università degli Studi di Sassari

EPIDEMIOLOGIA E NOTE PATOGENETICHE

Il carcinoma della mammella rappresenta la più comune neoplasia femminile in tutto il mondo, con la percentuale di ricaduta più alta nei Paesi dell'Europa Occidentale e del Nord America.

Tale patologia è pari al 26.5% di tutti i nuovi casi di tumore tra le donne nei Paesi Europei e rappresenta il 18% circa di tutte le cause di morte. [1]

È stato stimato che nel 2000 si siano raggiunti circa 350000 nuovi casi di carcinoma mammario in Europa e che ben circa 130000 donne siano decedute a causa di esso.

Il carcinoma mammario è caratterizzato dal punto di vista morfologico da un'ampia eterogeneità a cui corrisponde una varietà di comportamenti clinici, diverse risposte ai trattamenti utilizzati anche a parità di stadio clinico e patologico.

La sopravvivenza a cinque anni, considerando tutti gli stadi di malattia, si aggira approssimativamente all'80%. [2]

Le donne con recidiva mammaria solitamente muoiono per tale malattia; tuttavia il decorso clinico delle pazienti con malattia metastatica è altamente variabile: alcune vanno incontro ad una crescita esplosiva, mentre altre ad una lenta e graduale progressione.

Le pazienti che si presentano con una malattia metastatica, o al momento della diagnosi, (ex novo) o successivamente a terapie radicali di tipo medico-chirurgico, vengono trattate nella maggioranza dei casi con intento palliativo, dal momento che la progressione e l'exitus in questa condizione risulta essere pressoché inevitabile.

La mediana di sopravvivenza per le donne con malattia metastatica alla diagnosi si aggira intorno ai 2-3 anni con meno del 20% che ancora vive a 5 anni. [3]

L'evoluzione del carcinoma della mammella e la relazione tra fattori genetici predisponenti (ad esempio BRCA1/2) e cambiamenti somatici è molto complessa. Analisi citogenetiche e

di genetica molecolare hanno fatto emergere come lo sviluppo di un carcinoma primario della mammella, così come avviene anche per altre neoplasie, derivi da un processo *multistep* caratterizzato dall'accumulo di varie alterazioni genetiche (Beckmann *et al*, 1997). Tra i modelli esistenti, uno dei maggiormente riconosciuti è quello proposto da Wellings e Jansen (Figura 1), nel quale, a partire dall'epitelio normale, si può avere lo sviluppo di una iperplasia che, successivamente, può diventare lesione premaligna, carcinoma *in situ* ed infine carcinoma invasivo capace di metastatizzare (Wellings *et al*, 1973; Wellings *et al*, 1975).

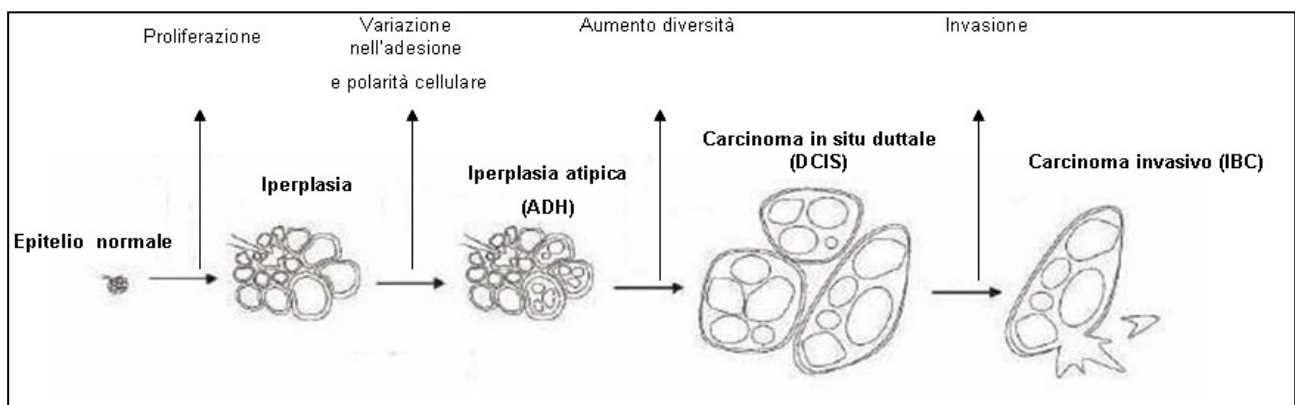


Figura 1. Modello di evoluzione del carcinoma mammario proposto da Wellings e Jensen .

Nonostante i notevoli progressi nel trattamento del carcinoma mammario, le recidive e la formazione di secondarismi continuano a rappresentare il problema maggiore nella gestione clinica delle pazienti. La visione tradizionale del processo di metastatizzazione della neoplasia primaria suggeriva che le cellule metastatizzanti del tumore primitivo infiltrassero lo stroma, i linfatici ed i vasi sanguigni solo dopo aver subito un processo di selezione che portava all'acquisizione di alterazioni genetiche aggiuntive in grado di conferire loro la capacità invasiva. Tale processo era quindi considerato una caratteristica evolutiva della fasi avanzate nella progressione del tumore primitivo [4,5]. Tale modello è

stato recentemente messo in discussione da dati epidemiologici e da risultati sul profilo genico dei tumori primitivi e delle loro metastasi. Per quanto riguarda i dati epidemiologici, studi coinvolgenti più di 12000 pazienti affette da carcinoma mammario indicano che la metastatizzazione inizia tra i 5 ed i 7 anni prima della diagnosi clinica [6]. Inoltre, benché la presenza di linfonodi patologici sia considerato un fattore prognostico negativo, circa un terzo delle pazienti senza invasione linfoghiandolare sviluppa, in seguito, metastasi a distanza [7]. In questi casi il processo sembra dipendere da cellule neoplastiche disseminate per via ematica e presenti nel midollo osseo già dalle prime fasi di sviluppo del carcinoma. Infatti, dopo un intervento chirurgico per ca mammario, circa il 30% delle pazienti mostra aspetti di minima malattia residua sotto forma di citocheratina positive disseminate nel midollo osseo [7-10]. L'eventuale iperespressione di Erb-B2/HER2 in tali cellule costituisce un aggiuntivo fattore negativo [11]. Oltre ai linfonodi, il midollo osseo costituirebbe quindi una sede privilegiata nella quale le cellule tumorali possono adattarsi a nuove condizioni ambientali e da qui migrare in altri organi. Conferme alla nuova teoria della metastatizzazione come evento precoce vengono anche da recenti studi di profiling genico attraverso cDNA-microarray. Numerosi gruppi analizzando l'espressione genica di casistiche di tumori primari, hanno dimostrato che particolari profili genici sono indicativi di differenti prognosi [12-15]. L'analisi dell'espressione genica è in grado di distinguere tumori che svilupperanno metastasi da quelli che non lo faranno [14-15]. Da ciò deriva che il "fenotipo metastatico" è già presente nella maggioranza delle cellule dei tumori primari fin dalle fasi iniziali [16]. Ulteriori studi [17] hanno dimostrato che il profilo genico espresso dalle metastasi è in gran parte differente da quello dei tumori primitivi, suggerendo che le cellule metastatizzanti, lasciato il tumore nelle sue fasi precoci di crescita, accumulino ulteriori alterazioni nella sede metastatica. L'evoluzione delle alterazioni geniche

seguirebbe dunque, dopo la disseminazione, vie separate nel tumore primitivo e nelle metastasi. Tale ipotesi verrebbe confermata dagli studi effettuati sulle cellule disseminate nel midollo osseo in pazienti con cancro privi di metastasi clinicamente evidenti. Tali cellule mostrano, infatti, un profilo genico in parte differente dalla neoplasia primitiva suggerendo che le cellule disseminano in fasi estremamente precoci ed accumulano, poi, nel midollo le ulteriori anomalie evolvendo geneticamente in maniera indipendente da primitivo [18,19]. La propensione delle cellule tumorali a disseminare per via ematica o linfatica sembra determinata dal loro assetto genetico. Quindi sono state individuate categorie di geni particolarmente influenti sulla metastatizzazione per via ematica quali quelli codificanti per proteine coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare, nella plasticità del citoscheletro e nelle varie vie di segnale [14]. Estremizzando i dati ottenuti dal profilig genico si è arrivati a proporre una classificazione molecolare del carcinoma della mammella in due grandi sottogruppi molecolari: i “luminal” (LUMINAL A e B) ed i “triple negative” cui appartengono i sottotipi basal like e claudin low [20-22] Il primo include carcinomi positivi per ER esprimenti geni relativamente più presenti nelle cellule luminali; i secondi, invece neoplasie negative all’interno dei quali esiste una sottopopolazione di carcinomi con ER per lo più negativi esprimenti markers nelle cellule basali. Le neoplasie che iperesprimono l’HER-2 tendono ad aggregarsi a carcinomi di tipo basale e condividono con essi una prognosi negativa .

E’ indubbio che una classificazione di questo tipo non fornisce parametri prognostici direttamente trasferibili alla pratica clinica e, deve essere integrata non solo dalla validazione dei dati ottenuti dai array ma anche da quelli ottenuti ed ottenibili tramite le analisi istologiche ed immunohistochimiche su campioni tissutali. Infatti la strategia che vede il confronto delle analisi di espressione genica mediante cDNA microarrays e

l'analisi del fenotipo tumorale mediante studi di immunohistochimica su tessute microarrays (TMAs) rappresenta un valido approccio per facilitare il trasferimento delle nuove scoperte di biologia molecolare da ambiti di ricerca alla pratica clinica [23,24]. Topi transgenici per oncogenie/o mancanti dell'espressione di geni oncosoppressori sono modelli di sviluppo tumorale che possono fornire importanti indicazioni sull'origine dei tumori e sulla loro progressione oltre che essere di aiuto nell'analisi dei geni coinvolti nel processo di metastatizzazione [25]. Questi sistemi murini sono anche ideali per la valutazione preclinica dell'efficacia di strategie di prevenzione e di modalità terapeutiche mirate agli stadi precoci e/o alla diffusione sistemica della patologia.

Per quanto attiene alla classificazione biopatologica essa si basa prevalentemente su caratteristiche morfologiche

1.1 Parametri di caratterizzazione biopatologica

La classificazione dei tumori della mammella si basa prevalentemente su caratteristiche morfologiche (WHO 1981; Rosen *et al*, 1996; Tavassoli *et al*, 2003), quali il grado di differenziazione tumorale, la dimensione del tumore (T), la presenza o meno di metastasi linfonodali o a distanza (M). Nella mammella il sistema più comune di assegnazione del grado tumorale è quello di Elston Ellis : in esso il grado è calcolato a partire da determinati scores che considerano la velocità di divisione cellulare (mitosi), il pleomorfismo nucleare e la formazione di microtubuli (acinare). Tuttavia per i tumori *in situ*, la classificazione del grado è a sé stante (classificazione di Holland) e tiene conto di criteri diversi, quali l'atipia cellulare e la necrosi intraluminale.

• Recettori ormonali

Da oltre venti anni la determinazione immunohistochimica sui tessuti tumorali dei recettori

ormonali (recettori per estrogeno e progesterone) è utilizzata per una corretta valutazione biologica di tali parametri, al fine di poter dare al clinico precise indicazioni terapeutiche. Circa il 60-75% di tutti i tumori mammari esprime i recettori per gli estrogeni e circa il 55-70% quelli per il progesterone (Beckmann *et al*, 1997). Una elevata concentrazione di tali recettori non solo è altamente predittiva della risposta alla terapia ormonale, ma, dato che in genere la loro presenza si accompagna ad una maggiore differenziazione, può essere utile anche nella stima della sopravvivenza libera da malattia (Mansour *et al*, 1994; Bast *et al*, 2001)

• **Indici di proliferazione**

I più diffusamente impiegati sono la valutazione in immunisto chimica dell'antigene nucleare Ki67, alla elevata concentrazione del quale si accompagna una maggiore aggressività della lesione; la determinazione della cinetica cellulare mediante captazione di timidina triziata (TLI: thymidine labeling index); la valutazione dell' INDICE DI ATTIVITA' MITOTICA (MAI). Quest'ultimo è uno dei criteri di determinazione del grading istologico nei carcinomi duttali infiltranti, è direttamente correlato alla dimensione del tumore, inversamente correlato ai recettori steroidei e non è in relazione con lo stato menopausale o l'età. Il MAI misura l'attività mitotica del tumore espressa come numero di mitosi presenti in 10 campi a forte ingrandimento : in linea di massima sembra che le pazienti con più di 4-5 figure mitotiche per 10 campi abbiano una probabilità quasi 3 volte maggiore di soccombere alla malattia (Medri *et al*, 2003). Dunque, nonostante sia necessaria una standardizzazione degli *steps* analitici ed un buon controllo di qualità, l'indice di attività mitotica ha un ruolo nell'influenzare la sopravvivenza a lungo termine. In questi ultimi anni un marcatore che si è rivelato molto importante per una corretta scelta terapeutica e per la valutazione prognostica dei pazienti affetti da neoplasia mammaria è HER2-neu: tale

marker è un recettore tirosin chinasi appartenente alla famiglia degli EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), che risulta overespresso in circa il 25-30% dei carcinomi della mammella (Slamon *et al*, 1989). Il fatto che l'overespressione di HER2 sia presente solo nella componente tumorale del tessuto mammario, specialmente nei DCIS e nelle forme più indifferenziate dei carcinomi infiltranti, fa di questa proteina un ottimo *target* terapeutico ed un buon marcatore di prognosi avversa. Per la sua valutazione i metodi più comunemente usati sono l'immunoistochimica che rileva l'espressione della proteina a livello della membrana cellulare, e la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), che evidenzia lo stato del gene HER2. I pazienti in cui risulta l'amplificazione del gene o la overespressione della proteina sono buoni candidati per la terapia con Trastuzumab, anticorpo monoclonale diretto specificatamente contro questo recettore.

Oltre a tali parametri, nelle varie consensus (S.Gallen ecc.) sono stati considerati utili per una corretta caratterizzazione biopatologica ed importanti dal punto di vista della ricaduta clinica i seguenti marcatori:

- **EGFR** (recettore per il fattore di crescita epidermica):

Fa parte dei recettori cellulari sensibili alla tirosin kinasi ed è iperespresso nel 35-60% dei tumori mammari; il suo reale significato prognostico è ancora da valutare; sembra comunque certo che la sua sovra-espressione sia correlata con una resistenza alla terapia ormonale, anche nelle pazienti ER+PgR+.

- **P53**:

p53 è un gene oncosoppressore, localizzato sul cromosoma 17 (come EGFR) che appare alterato in molte malattie neoplastiche: nel carcinoma mammario la mutazione di questo gene è piuttosto frequente e riflette un andamento sfavorevole, specialmente nelle pazienti con linfonodi ascellari metastatizzati.

In generale, le pazienti hanno una prognosi migliore quando sono in postmenopausa, quando hanno un lungo intervallo libero da malattia, quando ottengono una risposta ottimale alla terapia iniziale, quando la malattia metastatica è limitata a pochi siti interessando esclusivamente i tessuti molli, linfonodi ed ossa (malattia indolente), quando le metastasi non sono viscerali.

Inoltre donne con recettori estrogenici negativi ricadono più spesso a livello viscerale e nei tessuti molli, mentre quelle con recettori positivi più frequentemente a livello osseo.

Tuttavia, a parità di sito metastatico, le pazienti con espressione dei ER hanno una più lunga sopravvivenza. [26]

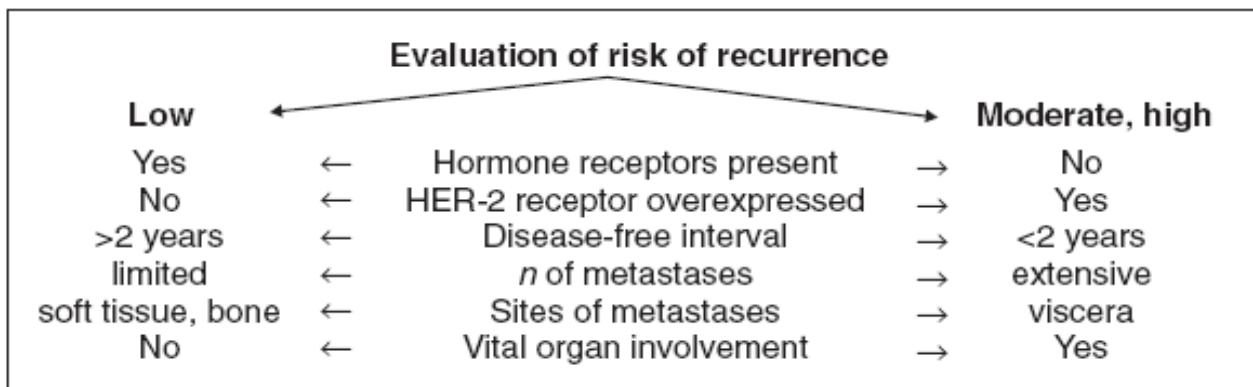
LA TERAPIA DEL CARCINOMA MAMMARIO METASTATICO

Il trattamento del Carcinoma mammario metastatico ha usualmente un intento palliativo; tuttavia, in molte pazienti, la malattia risponde prontamente alla terapia sistemica, grazie al progresso dei farmaci attualmente a nostra disposizione, cosicché il prolungamento della sopravvivenza e la palliazione dei sintomi sono ora possibili.

I trattamenti sistemici sono in continua evoluzione: ad oggi numerosi sono gli agenti antitumorali attivi ed efficaci così come i nuovi farmaci biologici sono ormai diventati parte integrante della terapia stessa .

Il trattamento della malattia metastatica rimane un problema importante e controverso. La terapia sistemica, endocrina, citotossica e biologica, può essere somministrata sequenzialmente, in combinazione, o come singolo trattamento. Da questo presupposto nasce l'importanza di selezionare la cura ottimale alla singola paziente in base alla valutazione individuale del rischio di evoluzione, dei fattori predittivi di risposta, del profilo di tossicità e, non trascurabile della preferenza della paziente medesima. [27]

Seguendo la valutazione nel determinare l'estensione della malattia, la presenza di complicazioni imminenti che richiedono un trattamento aggressivo e un rapido controllo del dolore, le pazienti possono essere classificate in due gruppi: a basso rischio di evoluzione (usualmente ormonoresponsive) od ad alto rischio (di solito non ormonoresponsive). [28]



La terapia ormonale è d'elezione per le forme ormonoresponsive con malattia metastatica che non rappresenta una minaccia per la vita (forme non viscerali, indolenti). Tale trattamento ha il vantaggio di essere efficace, di facile somministrazione e ben tollerato. [27]

Per contro per le donne che non sono candidate alla terapia ormonale la chemioterapia rimane ad oggi il trattamento di scelta.

Molte sostanze citotossiche disponibili per la cura del carcinoma mammario metastatico sono utilizzate ormai da più di quattro decenni come singoli agenti od in combinazione, in accordo alla situazione clinica. Più efficaci ed attivi sono i regimi contenenti antracicline, taxani, agenti alchilanti ed alcaloidi della vinca. Usati come singoli agenti producono risposte obiettive del 20%-80%, tuttavia le rare risposte complete hanno una breve durata e la progressione di malattia è pressoché inevitabile. [27]

Nel 1990 l'introduzione del Paclitaxel e del Docetaxel ha portato un miglioramento aggiuntivo al trattamento del carcinoma mammario.

L'attuale comune uso delle Antracicline nella terapia adiuvante del Carcinoma mammario ha incrementato l'incidenza di fenomeni di resistenza verso di esse nel setting metastatico e, quindi, ristretto l'utilizzo di tali molecole negli stadi più avanzati di malattia (con il fine di evitare una tossicità dose-limitante, in particolare la cardiotossicità).

Negli ultimi anni si è presentato altresì, un incremento dell'uso dei taxani nelle fasi precoci del trattamento del Carcinoma metastatico in pazienti con nessuna o minima esposizione alle Antracicline da soli od combinazione con le Antracicline. [29]

L'attività dei taxani nel carcinoma mammario è stata infatti dimostrata nelle donne sia precedentemente esposte o non sia alle antracicline. [29]

Nel trial TAX 303 pazienti con precedente esposizione ad agenti Alchilanti venivano assegnate a random a ricevere Docetaxel 100 mg/mq o Doxorubicina 75 mg/mq giorno 1 ogni 3 settimane. [30]

L'uso del Docetaxel ha prodotto una percentuale di risposte superiore (48% verso il 33% $p=0,008$); in aggiunta, tale farmaco si è rivelato meno mielotossico, con percentuali più basse, statisticamente significative, di trombocitopenia, anemia e, di conseguenza, una minore necessità di ricorrere a trasfusioni di emazie e piastrine, riduzione, inoltre, di eventi legati alla neutropenia febbrile. [30]

In due trial clinici il Paclitaxel è stato, invece, paragonato alla doxorubicina come trattamento di prima linea nella fase metastatica.

Nel EORTC trial del 2000 [31] il Paclitaxel, alla dose di 200 mg/mq in tre ore di infusione, non ha evidenziato una superiorità significativa rispetto alla doxorubicina;

così come nello studio randomizzato di fase III, l'E1193 prodotto dall'ECOG nel 2003, la somministrazione del taxano ha prodotto risultati equivalenti alla doxorubicina. [32]

Il Docetaxel è stato estensivamente studiato nelle pazienti con carcinoma mammario metastatico precedentemente trattate con antracicline.

Come singolo agente ha dimostrato la sua superiorità rispetto a regimi contenenti due farmaci (mitomicina/vinblastina; methotrexate/5 fluorouracile). [33-35]

Invece Il paclitaxel, quando paragonato ad un regime di salvataggio contenente cisplatino/etoposide, non ha mostrato superiorità in termini di risposte obiettive e di tempo alla progressione. [36]

Questi dati suggeriscono che il docetaxel potrebbe essere il taxano più attivo nel setting metastatico.

<i>Randomized trial of single agent docetaxel in MBC patients with prior athracycline exposure</i>			
Regimen	RR	TTP	OS
TAX vs MV (11)	30% vs 12% P< 0,001	19 vs 11weeks P< 0,001	11.4 vs 8.7ms P< 0,0097
TAX vs MF (12)	42% vs 21% P< 0,0001	27 vs 13weeks P< 0,0001	11.4 vs 8.7ms NS
TAX vs FUN (13)	43% vs 39% NS	6.5 vs 5.1weeks NS	16 vs 15 ms NS

MV= mitomycin+vinblastine; MF= methotrexate+5-FU; FUN= 5-FU+Vinorelbine

Tuttavia, con l'evoluzione di nuovi agenti, il prolungamento della sopravvivenza è diventato importante nella fase metastatica; altri obiettivi della terapia, come il miglioramento del tempo alla progressione e la durata delle risposte sono stati raggiunti con nuove combinazioni farmacologiche, cosichè, mentre la percentuale della sopravvivenza a lungo termine rimane modesta, molte pazienti con malattia metastatica vivono attualmente con paucisintomaticità. [37]

Oltre alla scelta della terapia più appropriata ugualmente importante è la decisione di quando interrompere il trattamento nelle pazienti metastatiche.

Diverse metanalisi di studi clinici hanno dimostrato come la terapia dovrebbe essere continuata sino a progressione, cessazione del beneficio clinico od il raggiungimento di una tossicità inaccettabile. [38-39]

La chemioterapia è stata per decenni la pietra miliare nel trattamento dei tumori. Tuttavia gli agenti antitumorali hanno notevoli tossicità che ne limitano il dosaggio. Inoltre è frequente una resistenza al trattamento, pertanto, con la crescente comprensione della biologia della neoplasia della mammella e l'avvento di sofisticate tecniche genomiche e proteomiche, sono state identificate numerose nuove terapie dirette contro specifici bersagli anticancro. Queste molecole sono implicate in diverse pathways molecolari rilevanti per la crescita tumorale, quali l'attivazione dei segnali di trasduzione, il ciclo cellulare, l'apoptosi e, non di minore importanza, la via dell'angiogenesi.

Il Trastuzumab, anticorpo monoclonale diretto contro il recettore HER-2, è stato approvato in monoterapia o in combinazione alla chemioterapia nelle pazienti con carcinoma mammario metastatico che overesprimono il recettore per HER-2, in seguito

alla pubblicazione di numerosi studi clinici che ne hanno sottolineato e confermato la sua efficacia. [27]

Numerosi trial clinici e preclinici hanno infatti evidenziato come la sua amplificazione od overespressione correli con una prognosi peggiore sia nelle pazienti con linfonodi positivi sia in quelle con linfonodi negativi e l'uso di un anticorpo che inibisce la crescita della proteina HER 2 promuove un efficace effetto antiproliferativi. [40]

La sua approvazione ha permesso ai medici oncologi di stabilire il trattamento sulla base dello stato di HER-2, dal momento che anche la sua espressione correla con una differente prognosi delle pazienti. Infatti, attualmente, un adeguato management clinico del carcinoma metastatico della mammella deve prendere in considerazione non solo le condizioni cliniche generali, la storia medica, la crescita della neoplasia, lo status dei recettori estro-progestinici, ma anche la valutazione dell'HER-2. [27] Pertanto il suo utilizzo è limitato alle sole neoplasie mammarie HER-2 positive.

Sebbene il trattamento del Carcinoma mammario metastatico abbia un intento palliativo piuttosto che curativo, il miglioramento della sopravvivenza risulta un importante obiettivo della terapia. [37]

Nonostante le diverse ed efficaci combinazioni chemioterapiche, la crescente conoscenza delle vie che regolano l'insorgenza e la progressione tumorale e l'acquisizione di informazioni biomolecolari sulle alterazione dei segnali proliferativi nelle cellule neoplastiche hanno rappresentato il razionale per lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali diretti contro più specifici bersagli molecolari (targhet therapy) dotati di meccanismi d'azione diversi come l'inibizione dell'angiogenesi responsabile della crescita tumorale e capaci di essere utilizzati in combinazione con gli schemi conosciuti in quanto scevri delle tossicità tipiche degli antiproliferativi.

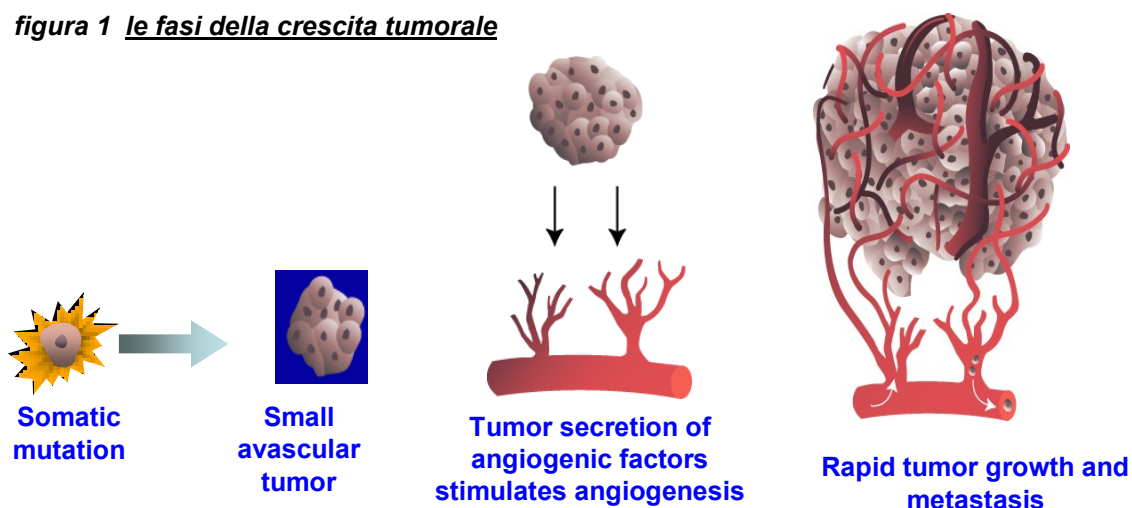
RUOLO DELL'ANGIOGENESI E DEL VEGF NELLA CRESCITA

TUMORALE

La ricerca preclinica ha identificato recentemente alcune terapie capaci di colpire selettivamente la crescita delle cellule tumorali, risparmiando i tessuti normali. Una delle strategie finora seguite consiste nell'inibizione della neoangiogenesi: le cellule tumorali infatti, come altri tipi di cellule, richiedono una vascolarizzazione che permetta loro di ricevere ossigeno ed altri nutrienti, nonché di eliminare i propri cataboliti.

Il primo a chiarire questo concetto nel 1945 fu Glenn Algire del National Cancer Institute, che ebbe a sostenere che la rapida crescita del tumore dipendeva da un continuo sviluppo di nuovi vasi. D'altra parte nel 1971 Judah Folkman propose per la prima volta il concetto che i tumori non crescono oltre una certa misura senza l'ausilio di uno specifico sistema di rifornimento di sangue a loro dedicato e che le neoplasie in fase di accrescimento liberano una sostanza ignota (tumor angiogenesis factor) che stimola la formazione di nuovi vasi.

figura 1 le fasi della crescita tumorale



Carmeliet and Jain. *Nature*. 2000; 407:249;
Bergers and Benjamin. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:401.

Sulla base dell'osservazione che le metastasi si sviluppano spesso dopo la rimozione del tumore principale, egli dedusse successivamente che le cellule neoplastiche producono fattori sia attivanti che inibenti l'angiogenesi.

Folkman inoltre fu il primo ad ipotizzare che gli inibitori dell'angiogenesi potessero essere utilizzati per curare il cancro.

Nonostante sia noto da tempo il fatto che la neoformazione di microvasi da parte delle cellule endoteliali accompagni la crescita tumorale e favorisca la disseminazione metastatica, l'identità e le caratteristiche dei fattori di crescita coinvolti in questo processo sono state definite solo negli ultimi anni.

Il cosiddetto "switch angiogenetico" da una fase avascolare ad una fase vascolare rappresenta un punto fermo del processo neoplastico; esso consiste nella fase in cui il meccanismo pro-angiogenetico prevale sui regolatori negativi dell'angiogenesi. [41]

Lo switch angiogenetico è dunque indotto dalla sintesi e secrezione di fattori di crescita selettivi per le cellule endoteliali. Questi fattori, dotati di azione paracrina, possono essere prodotti o dal tumore stesso o da cellule immunitarie infiltratesi nel tumore, quali macrofagi, mastociti e linfociti. Il primo fattore proteico ad essere identificato è stato il basic Fibroblast Growth Factor (bFGF). Sono stati successivamente isolati numerosi altri fattori in grado di contribuire al processo angiogenico. E' tuttavia riconosciuto che un ruolo preponderante nella neovascolarizzazione tumorale vada ai membri della famiglia degli FGF, ma soprattutto al VEGF, la cui genesi è indotta da fattori di crescita e citochine, da un'elevata espressione di oncogeni quali ras, raf, ed src nonché da ipossia. Altri fattori di crescita sono il TGF α , la Pleiotropina e l'Angiopoietina 1. [42] Il modello attuale di angiogenesi tumorale suggerisce che questo processo consista nel

reclutamento di vasi da vasi sanguigni esistenti e l'incorporazione di progenitori endoteliali nel letto vascolare nascente. [43]

Si tratta di un processo multistep che include numerose fasi, che schematicamente possono essere riassunte come segue:

- digestione della membrana basale ad opera di proteasi secrete dalle cellule endoteliali
- migrazione di cellule endoteliali circolanti nella sede di formazione di nuovi vasi
- proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali per allungare i vasi e formare il lume
- secrezione di fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali, che richiamano cellule muscolari lisce e periciti per costruire la membrana basale
- maturazione di queste cellule sottoforma di vasi e loro successiva regressione.

A ciascuno step partecipa una grande varietà di enzimi, citochine e recettori pro ed antiangiogenetici, alcuni (es VEGF) altamente specifici per le cellule endoteliali, altri (es. FGF) con azione a più largo spettro.

PRO-ANGIOGENETICI	ANTI-ANGIOGENETICI
FGF IL- 8 PDGF TGF TNF α VEGF IGF-1 Angiogenina Leptina Fattore di crescita degli epatociti Pleiotropina Fattore di crescita placentare	Angiostatina Endostatina IFN α -IFN β IL -12 Maspina Inibitore dell'attivatore del plasminogeno Fattore piastrinico 4 Inibitori tissutali delle metalloproteasi Inibitore del fattore di crescita endoteliale Vasostatina Trombospondina-1 Proteine indotte dall'IFN

Tabella: fattori che favoriscono e non il meccanismo dell'angiogenesi tumorale

Nell'ambito di questi eventi, l'attivazione delle reti di segnale intracellulare legate all'attivazione del VEGFR è essenziale. Il legame del VEGF al proprio recettore garantisce la sopravvivenza delle cellule endoteliali, ne determina la mitogenesi, la migrazione e la differenziazione; induce inoltre la mobilitazione delle cellule progenitrici endoteliali (EPCs) dal midollo osseo nel circolo periferico.

Il VEGF regola inoltre la permeabilità vascolare, favorendo in tal modo il deposito di proteine nell'interstizio e conseguentemente la formazione di nuovi vasi nel suo contesto. Tale fenomeno risulta essere associato peraltro alla fuoriuscita di acqua libera nel compartimento extracellulare interstiziale sottoforma di versamenti liberi maligni (p.e. pleurici e peritoneali). [44-45] In generale possono essere individuati due approcci terapeutici per poter privare il tumore del proprio supporto vascolare.

Il primo di questi mira a colpire la vascolatura preesistente, causando la necrosi tumorale; il secondo consiste invece, nel ridurre la produzione di neovasi (in gran parte mediata dal VEGF) ed il reclutamento midollare di precursori delle cellule endoteliali.

Questo tipo di approccio presenta alcuni indubbi vantaggi rispetto alle terapie farmacologiche standard. Prima di tutto i farmaci diretti contro di esse non devono superare alcun ostacolo per raggiungere le cellule bersaglio, essendo accessibili direttamente dal circolo senza interposte barriere fisiche (stroma fibroso, pressione interstiziale). In secondo luogo, a differenza delle cellule neoplastiche, esse sono meno eterogenee ed inoltre non sono trasformate, per cui hanno minore capacità di acquisire resistenza ai farmaci. D'altra parte esistono alcuni aspetti che rendono tale sperimentazione più difficoltosa: come è possibile colpire in modo selettivo le cellule. Fortunatamente, i vasi sanguigni tumorali non hanno la normale organizzazione in venule, arteriose e capillari, ma presentano caratteristiche tipiche di tutti e tre i tipi di

vasi ed hanno una alterata espressione di antigeni sulla superficie cellulare; mancano, inoltre della connessione con le cellule di supporto (periciti e cellule muscolari lisce), il cui numero può essere più elevato o più basso rispetto ai vasi normali.

Proprio a causa di queste anomalie di struttura il flusso ematico tende ad essere generalmente irregolare, spesso con disfunzionalità dei capillari, per cui spesso manca un supporto nutritivo ottimale per tutte le cellule e si genera facilmente ipossia. Queste differenze, che riguardano la morfologia e l'architettura cellulare, sembrano avere un corrispettivo molecolare, verso il quale si sono diretti gli ultimi studi di biologia molecolare: molecole aventi sequenza peptidica Arg-Gly-Asp sembrano legare selettivamente le cellule endoteliali tumorali. [46]

L'angiogenesi è regolata, dunque, da un fine equilibrio tra fattori locali pro-angiogenetici ed anti-angiogenetici.

Il fattore di crescita dell'epitelio vascolare (VEGF) è il più potente e specifico promotore conosciuto di tale meccanismo ed è il principale regolatore della fisiologica formazione di nuovi vasi sanguigni durante l'embriogenesi, la crescita scheletrica e le funzioni riproduttive. Il VEGF è inoltre implicato nell'angiogenesi patologica ed è associato alla crescita tumorale. Le proteine appartenenti alla famiglia del VEGF possono mediare una varietà di effetti biologici, includendo la mitogenesi e la migrazione delle cellule endoteliali, inducendo il rilascio di proteinasi ed il rimodellamento della matrice extracellulare, aumentando la permeabilità vascolare e sostenendo il mantenimento della sopravvivenza della formazione di nuovi vasi sanguigni. [47]

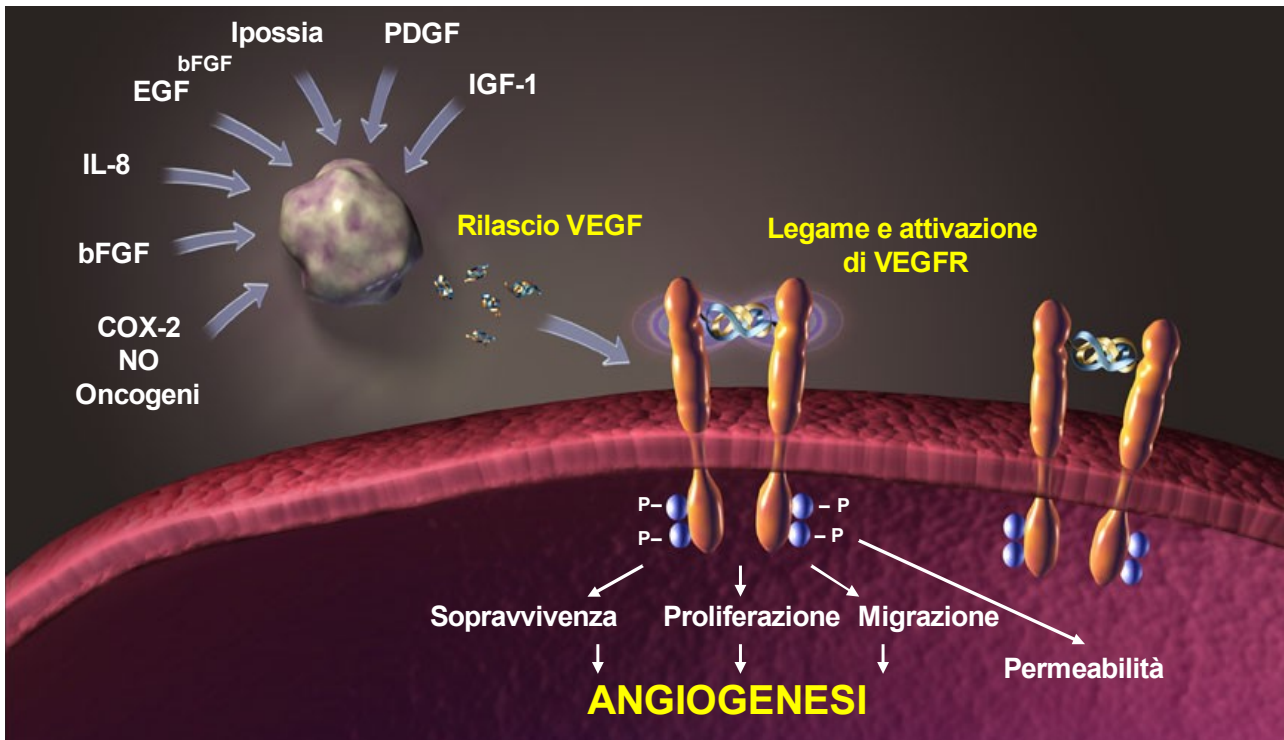


Figura: il VEGF ed il legame con il suo recettore

Il continuo rifornimento vascolare è un fondamentale requisito per lo sviluppo e la differenziazione degli organi durante l' embriogenesi, così come per la guarigione delle ferite e le funzioni riproduttive degli adulti. [39-40] L'angiogenesi è inoltre implicata nella patogenesi di una varietà di disordini: retinopatie proliferative, degenerazione maculare correlata all'età (AMD), psoriasi, artriti reumatoidi e tumori. In particolare, la neovascolarizzazione associata ai tumori, stabilendo una continuità con il sistema circolatorio, permette alle cellule tumorali di esprimere la loro critica crescita e, dunque, facilitare la diffusione metastatica. [48-49]

L'elevata espressione del VEGF è stata associata con una riduzione dell'intervallo libero da malattia e di sopravvivenza globale nelle pazienti che hanno sia linfonodi positivi sia linfonodi negativi nello stadio iniziale del carcinoma mammario. [50-52]

È stata inoltre osservata una correlazione tra la densità microvascolare in sezioni di carcinoma della mammella primitivo, metastasi linfonodali, e sopravvivenza. Queste scoperte hanno portato diversi ricercatori a concludere che il numero dei vasi nelle sezioni tumorali è un indipendente fattore predittivo di outcome nei pazienti neoplastici. [56-57]

Il lavoro effettuato da diversi laboratori in questi ultimi anni ha chiarito il ruolo centrale del VEGF nella regolazione del processo angiogenetico, evidenziando come anche la perdita di un solo allele giochi un ruolo di primaria importanza nell'alterazione del sistema vascolare. [58,59] Considerando, del resto, anche i dati preclinici a supporto di tale meccanismo numerosi ricercatori hanno dimostrato come il VEGF sembri giocare il ruolo di un potenziale target razionale per una farmacologica inibizione dell'angiogenesi tumorale. Il VEGF è un potente mitogeno (ED50 2-10pm) per le cellule endoteliali micro e macrovascolari derivate da vene, arterie e strutture linfatiche espresso in numerose forme di neoplasie. Viene secreto principalmente dalle cellule tumorali ipossiche e dai macrofagi.

La famiglia dei geni legati al VEGF comprende otto glicoproteine : [60-61]

- *VEGF-A*
- *VEGF-B*
- *VEGF-C*
- *VEGF-D*
- *VEGF-E*
- *VEGF-F*
- *PIGF-1, PIGF-2* (placenta growth factor 1 e 2)

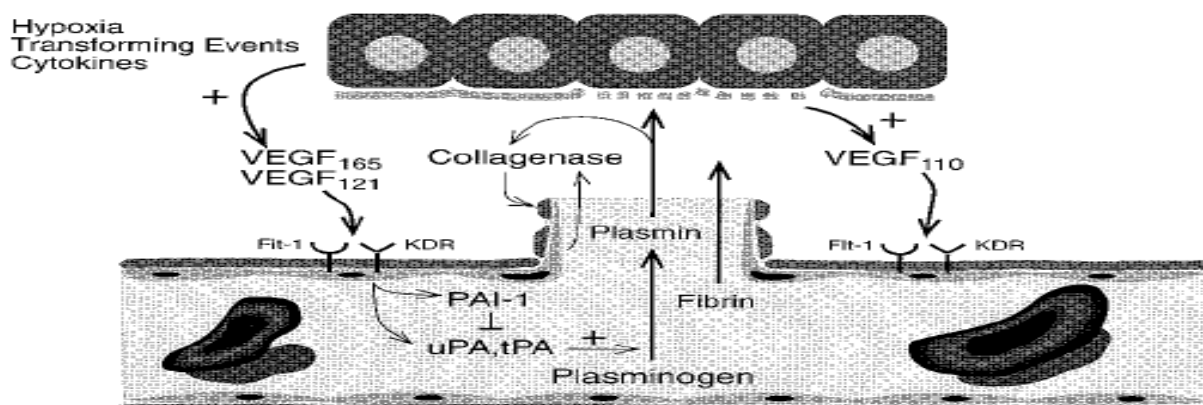


Figura: Struttura del VEGF

Esse sono implicate non solo nell'angiogenesi, ma anche (alcune di esse) nella linfoangiogenesi. Il VEGF-A, conosciuto comunemente come VEGF, fu identificato per la prima volta nel 1983 da Dvorak et al [62] e ritenuto fattore di permeabilità vascolare secreto dalle cellule tumorali.

Qualche anno più tardi Ferrara e coll. [63] isolano il VEGF-A e ne descrissero l'attività mitogena. Il VEGF-A è una glicoproteina omodimerica di 45 kDa che lega eparina e che funge da ligando dei recettori tirosinchinasi VEGFR-1 e VEGFR-2. Essa lega anche la famiglia delle Neuropiline. Il VEGF-A esiste in diverse isoforme con un numero di amminoacidi variabile da 121 a 206 (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆): la maggiore di tali isoforme VEGF₁₆₅ viene secreta liberamente, mentre la gran parte di esse sono sequestrate nella matrice extracellulare e necessitano dell'azione di alcune proteasi per essere attivate. Studi più recenti affermano che l'espressione dell'azione di alcune isoforme è tessuto-specifica, motivo per cui si può credere che queste isoforme abbiano ruoli ben definiti. [64]

Diversi stimoli possono comportare un diffuso rilascio di varie isoforme di VEGF (VEGF 165 e VEGF 121) da una varietà di cellule. Queste proteine possono determinare una complessa serie di effetti sull'endotelio vascolare, includendo la crescita cellulare, la stimolazione della collagenasi interstiziale, come l'attivatore del plasminogeno (PA) e l'inibitore del plasminogeno I-1 (PAI-1), così come la fuoriuscita vascolare di proteine plasmatiche. L'attivazione del plasminogeno risulta nella generazione di plasmina che può fendere la matrice extracellulare legata al VEGF (VEGF 189 o VEGF 206) e rilasciare un frammento proteolitico (VEGF 110). La plasmina può inoltre attivare la procollagenasi. L'attivazione dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) può costituire un effetto regolatorio negativo, attraverso l'inibizione dell'azione dell'attivatore del plasminogeno.



(figura):"illustra alcune delle attività delle isoforme del VEGF sull'endotelio vascolare ed i possibili meccanismi di regolazione"

Le cellule tumorali stimolano le cellule endoteliali quiescenti a dividersi ed a formare nuovi vasi attraverso il rilascio del VEGF, il quale si lega ad i suoi recettori situati vicino alle cellule endoteliali. Il VEGF si lega con il proprio recettore immunoglobulinico transmembrana attraverso un dominio intracellulare transmembranico tirosin chinasi. La famiglia dei recettori del VEGF (VEGFR) comprende il VEGFR-1, VEGFR-2,

VEGFR-3, la neuropilina 1 e 2. Uno di questi recettori, il VEGFR-2 è soprattutto coinvolto nell'angiogenesi dei tumori solidi.

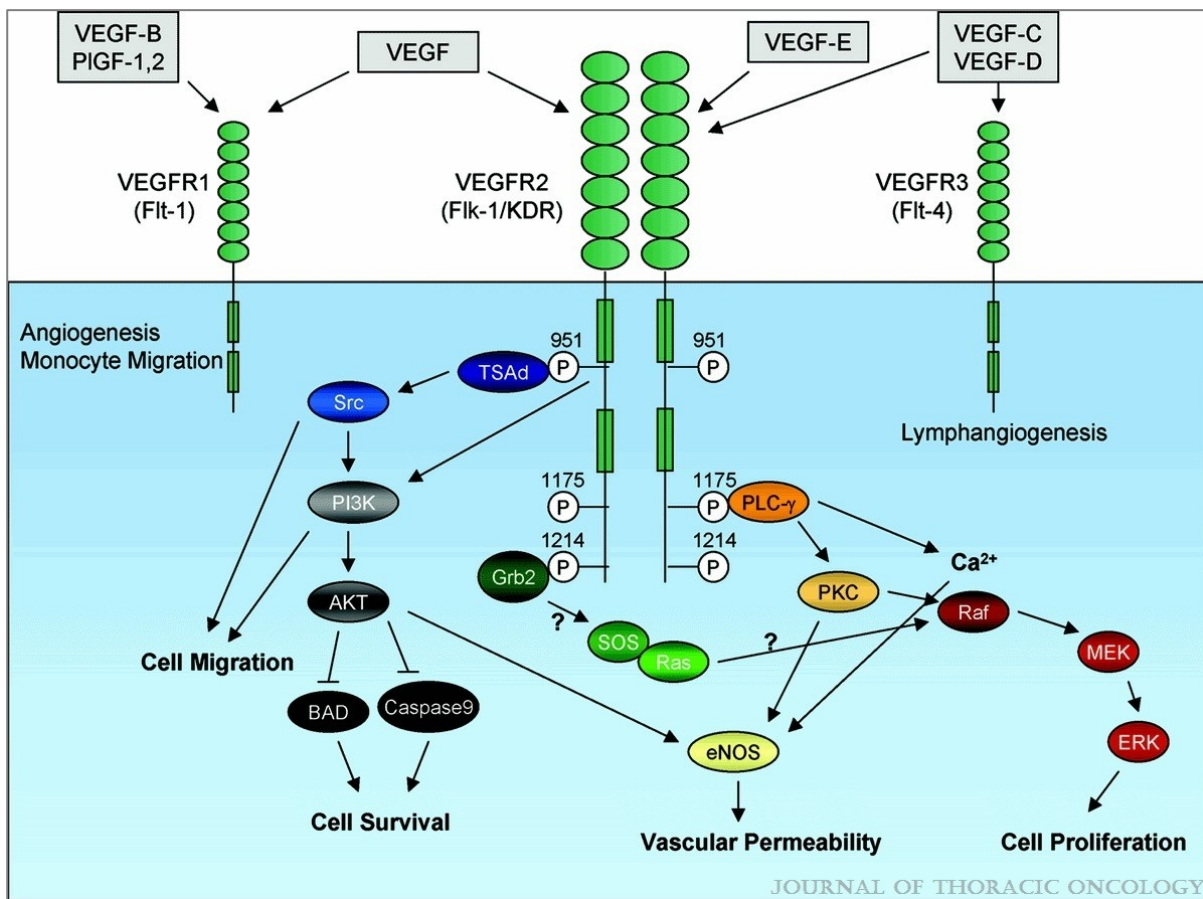


Figura: Pathway del VEGF e dei recettori

Il legame del VEGF a tale recettore conduce ad una dimerizzazione del recettore stesso, alla fosforilazione tirosin chinasi, al reclutamento di segnali molecolari intracellulari responsabili della sopravvivenza, della permeabilità vascolare, della migrazione e della proliferazione. Tale meccanismo attiva in maniera progressiva una serie di segnali a cascata che regolano gli eventi cellulari coinvolti nella formazione dei nuovi vasi dal momento che i vari fattori di crescita della famiglia del VEGF possiedono differenti specificità di legame nei confronti di questi recettori.

Le cellule endoteliali possono essere indotte attraverso tale meccanismo a dividersi così rapidamente come in circa 7-10 giorni, diversamente da quanto avviene in condizioni normali (ogni 10 anni). Questa rottura dell'equilibrio tra fattori pro-angiogenetici e fattori anti-angiogenetici conosciuto appunto con il termine di “ switch angiogenetico” è necessario affinché il tumore ottenga i necessari nutrimenti e l'ossigeno per crescere di circa 1 millimetro di volume. [47]

EFFETTI DEL VEGF SULLE CELLULE ENDOTELIALI

Permeabilità:

i vasi preesistenti si dilatano in risposta all'ossido nitrico (NO) prodotto dall'Ossido nitrico sintetasi (NOS) e divengono, dunque permeabili in seguito alla secrezione del VEGF: tale fenomeno si traduce in un aumentato deposito di proteine, principalmente costituite da fibrinogeno nello spazio extracellulare. [65] La successiva formazione di fibrina in tale compartimento ritarda il riassorbimento dell'acqua libera normalmente presente: l'edema che ne consegue trasforma lo stroma normalmente antiangiogenico in proangiogenico.

Un'ulteriore conseguenza dell'aumentata permeabilità è l'innalzamento della pressione interstiziale, che inverte i gradienti di pressione normalmente presenti nel tessuto ed in definitiva impedisce la penetrazione delle molecole, compresi gli agenti chemioterapici. L'esatto meccanismo con cui il VEGF determini un incremento della permeabilità endoteliale non è noto.

Dvorak et al hanno dimostrato che il VEGF è capace di indurre un passaggio transcellulare di macromolecole attraverso orfanelli vescica-vascolari. [65]

Secondo altri (Zebrosky e coll.) il VEGF indurrebbe delle fenestrazioni endoteliali [44], mentre altri (Zhang e coll.) sostengono che l'aumento di permeabilità sia legato

all'apertura delle giunzioni intercellulari. [66] Studi più recenti suggeriscono un'aumento di permeabilità calcio-dipendente. [67]

Inibizione dell'apoptosi:

in vitro il VEGF è capace di inibire l'apoptosi delle cellule endoteliali attraverso l'attivazione della PI3K-AKT; questo enzima è capace di indurre una up-regulation di proteine anti-apoptosi come bcl-2 ed A1. Come si è detto in precedenza, il VEGF agisce sulla via di segnale del FAK, dalla funzione anti-apoptotica.

In vivo, sia nei tessuti normali (p.e. i vasi retinici) che nello stroma tumorale, il VEGF preserva dalla distruzione i vasi immaturi privi del sostegno dei periciti; così come nella retina i vasi adulti non subiscono l'azione della molecola, similmente nel tessuto neoplastico sono solo i vasi neoformati e non quelli normali adulti a dipendere dal VEGF. Pare che il sostegno dei periciti giochi un ruolo fondamentale in questa perdita di sensibilità da parte dei vasi maturi. [61]

Proliferazione, migrazione, invasione:

il VEGF determina la crescita dell'endotelio vascolare, inducendo l'espressione di una serie di geni che codificano per molecole coinvolte in specifici momenti della vita cellulare [46]: il procoagulant tissue factor, le proteine della fibrinolisi (urikinasi, tPA, inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1, inibitore dell'urokinasi), quelle implicate nella sintesi di ossido nitrico, le integrine e diversi fitogeni cellulari. [68]

Una fase essenziale del processo angiogenetico è costituita dalla degradazione della membrana basale, in quanto senza di essa non potrebbe aversi la migrazione e l'invasione delle cellule endoteliali. Il VEGF induce una serie di enzimi importanti nel processo di degradazione, ovvero metalloproteasi, collagenasi, uPA, (urokinase-type plasminogen activator) e TTPA (tissue-type plasminogen activator).

Al momento non è dato conoscere i meccanismi intracellulari attraverso i quali il VEGF favorisce la migrazione cellulare, ma come già accennato sembra che la chinasi FAK giochi un ruolo importante nell'organizzazione dei filamenti di actina e dunque nel processo di adesione intercellulare. Anche l'ossido nitrico pare intervenire in questa fase, sinergicamente alla FAK.

Ruolo del VEGF nel reclutamento delle cellule progenitrici endoteliali:

Oltre a svolgere un ruolo importante nell'ematopoiesi e nella vasculogenesi embrionale, l'asse VEGF/VEGFR riveste grossa importanza negli stessi eventi che si verificano nel soggetto adulto. Le cellule staminali ematopoietiche (HSCs) esprimono recettori per il VEGF ed hanno la capacità di differenziarsi in cellule progenitrici endoteliali (EPCs); una volta differenziate in EPCs, esse migrano dal midollo osseo al circolo ematico, dove si ritrovano sotto forma di cellule progenitrici endoteliali circolanti (CEPs) e da qui ai siti di neoangiogenesi. [61] Nonostante le prime evidenze, negli ultimi anni diversi studi hanno messo comunque in discussione il ruolo delle EPCs nell'angiogenesi tumorale.

[62,69]

Regolatori del VEGF e della sua espressione

IPOSSIA: la trascrizione genica del VEGF è indotta dall'HIF-1, fattore indotto dall'ipossia. [70]

FATTORI DI CRESCITA E CITOCHINE: è ormai consolidato il ruolo dei recettori per EGF (epidermal growth factor) erbB1 ed erb B2 nella regolazione del VEGF e di altre tappe dell' angiogenesi in numerose neoplasie.

Recentemente è stato dimostrato un ruolo non minore del recettore per l'IGF-1 (IGF-1R), capace di indurre una up-regulation dell'espressione del VEGF, in diverse neoplasie nonché del PDGFR α e delle prostaglandine.

ONCOGENI ED ONCOSOPPRESSORI: numerosi studi hanno dimostrato la capacità di alcuni protooncogeni (c-Scr, p53, PTEN, vHL) ed oncogeni (BCR-ABL, H-ras, K-ras) di causare iperespressione del VEGF sia direttamente sia indirettamente (p.e. tramite l'HIF-1. [61]

IL BEVACIZUMAB

✓ *Meccanismo d'azione*

Sono stati creati diversi anticorpi monoclonali murini, usando come immunogeno l'isoforma amminoacidica 165 del VEGF ricombinante umano.

Tra questi l'anticorpo monoclonale anti VEGF, derivato dall'anticorpo murino A.4.6.1 si è dimostrato capace di neutralizzare in modo consistente l'attività biologica del VEGF umano, comportando una riduzione dell'attività mitogena delle cellule endoteliali, della permeabilità vascolare e delle proprietà angiogenetiche a livello della membrana del corion. [71]

Il Bevacizumab è, dunque, un anticorpo monoclonale umano anti VEGF costituito per il 93% da frammenti di IgG umane, che sono fondamentali per limitarne l'immunogenicità e per incrementarne l'emivita e, per il 7% da regioni di derivazione murina, che contengono il sito di legame per l'antigene. Il Bevacizumab ha un peso molecolare di 149 kDa e lega indifferentemente le 4 isoforme di VEGF-A, riconoscendo una sequenza di amminoacidi posizionati all'interno del B-turn dell'ansa sporgente B5-B6. Così neutralizzato, il VEGF non si lega ai suoi recettori, posizionati per lo più sulla superficie delle cellule endoteliali, e non li attiva, inibendo perciò l'angiogenesi

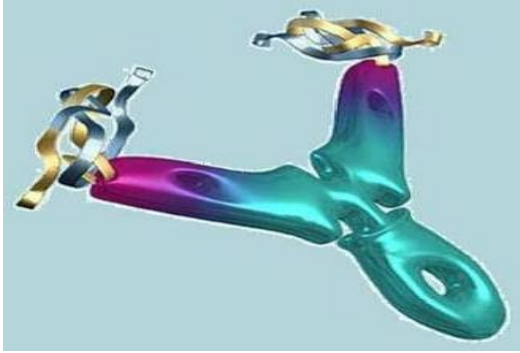


Figura: struttura del Bevacizumab

I vasi tumorali si presentano come formazioni immature delimitate da una sottile membrana basale, con un ridotto numero di giunzioni intercellulari e dotate di elevata permeabilità. Sono numerosi i vasi tortuosi e a fondo cieco.

L'effetto acuto o precoce del Bevacizumab è quello di sfrontare e far regredire i vasi tumorali più aberranti. Questo effetto si realizza anche attraverso l'apoptosi delle cellule endoteliali. Viene a mancare infatti l'effetto pro-sopravvivenza che il VEGF esercita sulle cellule endoteliali. Il farmaco, inoltre, riduce la normalizzazione dei rimanenti vasi del tumore. La vascolarizzazione risulta più ordinata e simile a quella normale. Il diametro, la densità, e la permeabilità dei vasi tumorali, infatti, si riducono e la pressione interstiziale all'interno del tumore si abbassa. Ciò può migliorare il rilascio di agenti citotossici a livello del tumore. L'utilizzo cronico prolungato porta anche all'inibizione della formazione di nuovi vasi. E' stato osservato, però, che già dopo 3 settimane dalla sospensione del trattamento anti VEGF compare la ricrescita dei vasi. Inoltre la risposta alla terapia non è correlata all'iperpressione del VEGF e non sono noti fattori predittivi di risposta. Similmente alle altre IgG, il Bevacizumab è caratterizzato da una lenta clearance (0,231l/die) che dipende dal peso corporeo, dal sesso e dalla gravità

della malattia. Questa variabilità, tuttavia, non sembra associata a differenze nell'efficacia del trattamento.

L' emivita iniziale è di 1,4 giorni e l'emivita terminale (di eliminazione) è di circa 20 giorni. Questo valore è in linea con quello delle IgG umane endogene e non sembra modificarsi in associazione con la chemioterapia. Dopo somministrazioni settimanali la concentrazione del farmaco aumenta, ma il profilo cinetico non si modifica. La distribuzione del farmaco al di fuori del circolo ematico è molto bassa.

Già nel 1992 In uno studio Kim et al.aveva dimostrato che Bevacizumab (BEVA) aveva la capacità di neutralizzare l'attività biologica del VEGF, limitando in tal modo il potere mitogeno delle cellule endoteliali vascolari e condizionando la permeabilità vasale. Lo stesso studio, inoltre, aveva dimostrato che BEVA non interagiva con gli altri fattori di crescita testati (bFGF, EGF, PDGF). [71]

Recenti studi indicano come alcune terapie angiogenetiche siano in grado di produrre una sorta di normalizzazione vascolare tumorale: nel nostro caso in esame, in particolare, il blocco del VEGF o del suo recettore (VEGFR) conduce all'apoptosi delle cellule endoteliali ed ad una riduzione del diametro vascolare, della densità e della permeabilità, che si traduce in una conseguente riduzione della pressione del fluido interstiziale e, in alcuni tumori, nell'aumento della tensione di ossigeno. [72-73]

Tuttavia l'attività antiangiogenetica di tali terapie biologiche, capaci di bloccare la crescita tumorale, può essere incrementata dall'associazione con la chemioterapia.

A lungo andare, infatti, le cellule tumorali acquisiscono resistenza al trattamento antiblastico o per fenomeni di mutazioni cellulari o a causa di modificazioni epigenetiche a carico delle cellule dell'endotelio: la terapia antiangiogenetica, potrebbe, dunque, rendere le cellule endoteliali più sensibili alla chemioterapia.

Si tratta del razionale che recenti studi hanno utilizzato per giustificare l'ormai acquisita associazione delle due tipologie di trattamento.

In diversi modelli preclinici il Bevacizumab ha dimostrato efficacia quando aggiunto alla chemioterapia in diversi tipi di neoplasie tra cui il carcinoma della mammella. [74-76]

Nel tumore della mammella, l'incremento dell'espressione del VEGF è associata ad una scarsa prognosi, comportando una riduzione della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale. Diversi trial hanno inoltre evidenziato come esista una correlazione tra i livelli di VEGF ed il grado di risposta alla radio ed alla chemioterapia. Queste osservazioni suggeriscono che l'inibizione del VEGF potrebbe essere un razionale approccio terapeutico per il trattamento del carcinoma mammario. [77]

Due studi preclinici che studiavano l'angiogenesi tumorale, usando la risonanza magnetica nucleare, hanno mostrato che un anticorpo monoclonale anti-VEGF inibiva la crescita tumorale e la permeabilità vascolare in topi in cui erano state impiantate cellule di neoplasia della mammella. [78] In particolare, in uno di questi studi, si evidenziò come la combinazione del Docetaxel con l'anticorpo anti-VEGF (in vitro) potenziasse l'effetto anti-angiogenetico. [79]

Riassumendo, i principali meccanismi d'azione del BEVA sono:

- Regressione della esistente microvascolatura tumorale [80,81]
- Normalizzazione dei vasi tumorali maturi [80-82]
- Inibizione della ricrescita vascolare e della neovascolarizzazione in seguito ad un trattamento continuativo [80-83]

✓ **Letteratura: attività del Bevacizumab nel carcinoma
mammario metastatico**

Sulla base dei soddisfacenti risultati preclinici la sperimentazione del Bevacizumab nel Carcinoma mammario metastatico è iniziata qualche anno fa con studi di fase II in donne pesantemente pretrattate. Uno di questi l'AVF0776g, ha dimostrato una certa efficacia dell'anticorpo monoclonale nel controllo della malattia con effetti collaterali attesi. [84]

Il trial AVF0776g di fase I/II valutava la somministrazione dell'anticorpo con dose escalation rispettivamente di 3, 10, o 20 mg/kg ogni due settimane in 75 donne che erano ricadute dopo una chemioterapia convenzionale per malattia metastatica.

I dati derivanti da una mediana di valutazione dei tre bracci di trattamento evidenziavano una percentuale di risposte globali pari al 6,7% (il 16% delle pazienti aveva ottenuto almeno una stabilità di malattia al 154°giorno di terapia), la durata media di risposta era stata pari a 5.6 mesi e, la sopravvivenza globale di circa 10.2 mesi. [84]

Si registrò la comparsa di cefalea, nausea e vomito in quattro pazienti trattate con una dose di 20 mg/kg, considerata, dunque dose-limitante.

Tuttavia, il Bevacizumab fu ben tollerato se si escludono alcuni eventi associati a questo agente, quali: ipertensione arteriosa (23%), sanguinamenti minori (epistassi nel 25.3%), fenomeni di tromboembolismo venoso (4%), comparsa di proteinuria senza alcuna evidenza di disfunzione renale (24%). [84]

Prendendo in considerazione i risultati relativi ai tre bracci di trattamento si stabilì che la dose di Bevacizumab pari a 10 mg/kg fosse il miglior razionale terapeutico in una

popolazione di pazienti pesantemente pretrattate (mediana di due precedenti regimi per malattia metastatica). [84]

Il Bevacizumab è stato inoltre valutato in diversi trial di fase II associato a terapie ormonali come il Letrozolo [85] o, a differenti regimi chemioterapici comprendenti il Docetaxel [86], la Vinorelbina [87], il Trastuzumab [88] e l'Erlotinib [89].

In particolare è stato pubblicato nel Maggio del 2006 un interessante studio (fase II) di Ramaswamy B. e coll. che valutava il profilo di sicurezza e l'efficacia dell'associazione dell'anticorpo monoclonale con il Docetaxel settimanale come trattamento di prima o seconda linea nel carcinoma mammario (MBC). Lo studio nasceva dalla considerazione che il taxano presenta una attività antiangiogenetica capace di incrementare l'efficacia di farmaci dotati della medesima azione antivascolare seppur con meccanismi differenti. [90,91] In vitro ed in vivo, infatti, studi preclinici dimostrano che il VEGF protegge le cellule endoteliali dagli effetti antiangiogenetici del Docetaxel e che questo effetto può essere inibito con l'ausilio dell'anticorpo anti VEGF [92]. Nello studio in questione ventisette pazienti metastatiche ricevevano 10 mg/kg Bevacizumab i giorni 1-15 in combinazione con Docetaxel 35 mg/mq i giorni 1-8-15 ogni 28 giorni. Per quanto attiene il profilo di sicurezza le più comuni tossicità di grado 4 furono le seguenti: 2 pazienti (7%) con embolia polmonare, un episodio di neutropenia febbrile e di infezione (4%); la tossicità di grado 3 comprendeva: 4 pazienti (15%) con neutropenia febbrile, altrettante con riscontro di fatigue; mentre neuropatia, artralgia e stomatiti interessavano il 7% dei casi ed infine ipertensione arteriosa solo il 4% (una paziente).

Tutte le pazienti vennero valutate su un'analisi basata sull'intent to treat. Quattordici pazienti (52%) ottennero una risposta parziale, nove (33%) una stabilità di malattia, e due andarono incontro a progressione (7%). Le risposte globali erano del 52% con una

durata media di risposta di circa 6 mesi ed una mediana di progressione libera da malattia di 7.5 mesi. La durata media del controllo di malattia (cioè della stabilità ottenuta) nelle nove pazienti era di 5.3 mesi. [93]

Response (N = 27)	
Complete response	0
Partial response*	14 (52)
Overall response (95% CI)	52 (32-71%)
Stable disease*	9 (33)
Progressive disease*	2 (7)
Nonevaluable* [†]	2 (7)
Response duration (95% CI) [‡]	6.0 mo (4.6-6.5 mo)
PFS (95% CI) [‡]	7.5 mo (6.2-8.3 mo)

*Values expressed as n (%).
[†]Two patients were eliminated from the study because of toxicity during cycle 1.
[‡]Median.

Tabella: efficacia studio di fase II (Ramaswamy et al.)

Lo studio in esame ha dimostrato come la combinazione Docetaxel e Bevacizumab sia attivo nel setting mammario metastatico registrando i principali effetti collaterali come ascrivibili al taxano (lacrimazione, moderata neutropenia, fatigue).

La maggior parte degli eventi avversi attribuibili all'anticorpo monoclonale erano minori e del tutto simili a quelli osservati in altri trial clinici. In particolare ci fu un solo caso di ipertensione arteriosa (4%) anche se tale risultato può essere in parte dovuto alla scarsa casistica dello stesso studio. Questo trial insieme a quelli precedentemente citati apportano incoraggianti risultati ed un accettabile profilo di sicurezza del Bevacizumab che, come tale è stato testato anche nella fase neoadiuvante e nelle pazienti con carcinoma mammario infiammatorio.[94,95]

✓ **Letteratura: attività del bevacizumab in studi clinici di fase III del Carcinoma mammario metastatico**

Il Bevacizumab è stato valutato in due studi clinici di fase III del carcinoma mammario metastatico: l'AVF2119g e l'E2100.

Il primo di questi trials randomizzava 462 pazienti precedentemente trattate per malattia metastatica con antracicline e taxani a ricevere capecitabina 2500mg/mq per due settimane con una di pausa, con il bevacizumab dose di 15mg/kg ogni 3 settimane verso la sola fluoropirimidina.

L'obiettivo primario dello studio era la valutazione della progressione libera da malattia (PFS); l'end point secondario le risposte obiettive, la loro durata e la sopravvivenza globale.

Si evidenziò un significativo incremento del tasso delle risposte (ORR) nel braccio trattato con capecitabina e l'anticorpo monoclonale rispetto alla sola capecitabina (19.8% vs 9.1%; p=0,001). Tuttavia lo studio non riportò differenze statisticamente significative in termini di progressione libera da malattia (PFS) e di sopravvivenza globale (OS): la combinazione della fluoropirimidina orale con il bevacizumab risultò, comunque, ben tollerata non registrando alcun incremento nella frequenza o nella severità degli eventi avversi correlati alla associazione dei due farmaci. [96]

In conclusione l'AVF2119g non riuscì a dimostrare un miglioramento in termini di PFS, obiettivo primario, nonostante le buone risposte ottenute dal regime associativo. Diverse possono essere le ragioni a tal riguardo, quali per esempio, l'ipotesi che l'inibizione del VEGF è più efficace nella malattia in una fase iniziale piuttosto che in un

setting metastatico o localmente avanzato, dove altri fattori proangiogenetici risultano overespressi. [97] Del resto, non bisogna dimenticare che le pazienti arruolate erano pesantemente pretrattate, avendo ricevuto regimi contenenti antracicline e taxani prima di essere inserite nello studio. I risultati di questo studio suggeriscono, dunque, che il tempo ottimale per iniziare una terapia antiangiogenetica dovrebbe essere anticipato in una fase più precoce della storia clinico-patologica di una paziente: con la progressione della malattia, infatti si attivano più numerose vie proangiogenetiche che rendono più labili le risposte ottenute e, di conseguenza non permette il prolungamento della PFS.

Nel secondo studio di fase III l' E2100 (gruppo ECOG) 722 pazienti non pretrattate venivano randomizzate a ricevere Paclitaxel 90 mg/mq i giorni 1-8-15 ogni 4 settimane con o senza bevacizumab alla dose di 10mg/kg in ogni due settimane. [98]

L'obiettivo primario era la progressione libera da malattia; quelli secondari la valutazione delle risposte e della sopravvivenza globale. Le pazienti inserite nello studio presentavano una malattia localmente avanzata o metastatica HER2 negative o precedentemente trattate con Herceptin in caso di positività della proteina in questione, un buon performance status e, a livello laboratoristico basale, un accettabile profilo epatorenale (erano escluse le pazienti con proteinuria > 500/mg/DL/24h) ed assenza di metastasi cerebrali. I due bracci di trattamento erano ben bilanciati per quanto riguarda i principali fattori prognostici. Lo studio era disegnato con l'intento di ottenere un miglioramento medio di due mesi in termini di PFS.

I risultati preliminari hanno dimostrato un significativo incremento nella mediana della progressione libera da malattia nelle pazienti che avevano ricevuto il Bevacizumab con il

chemioterapico rispetto al solo Paclitaxel (11.8 mesi vs 5.9 mesi $p < 0,0001$). Il dato relativo alla progressione libera da malattia era raggiunto in seguito all'89% degli eventi richiesti.

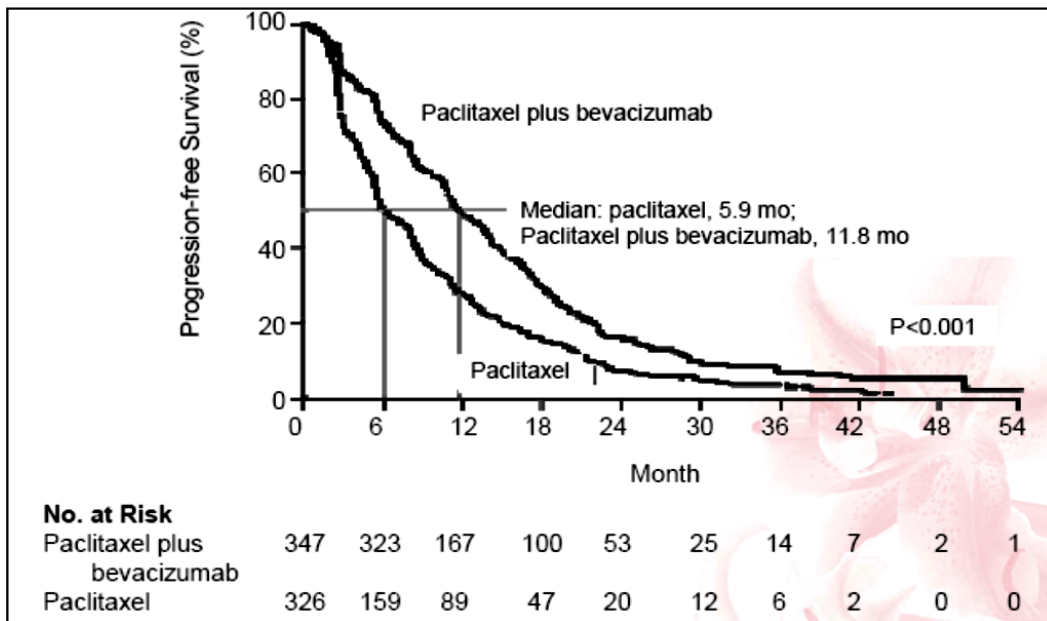


Tabella: grafico della PFS nello studio E2100 (Miller et. al)

La percentuale delle risposte obiettive per tutte le pazienti era del 36.9% nel braccio contenente l'anticorpo con il taxano, mentre era del 21.1% nel braccio trattato con il solo chemioterapico ($p < 0,001$).

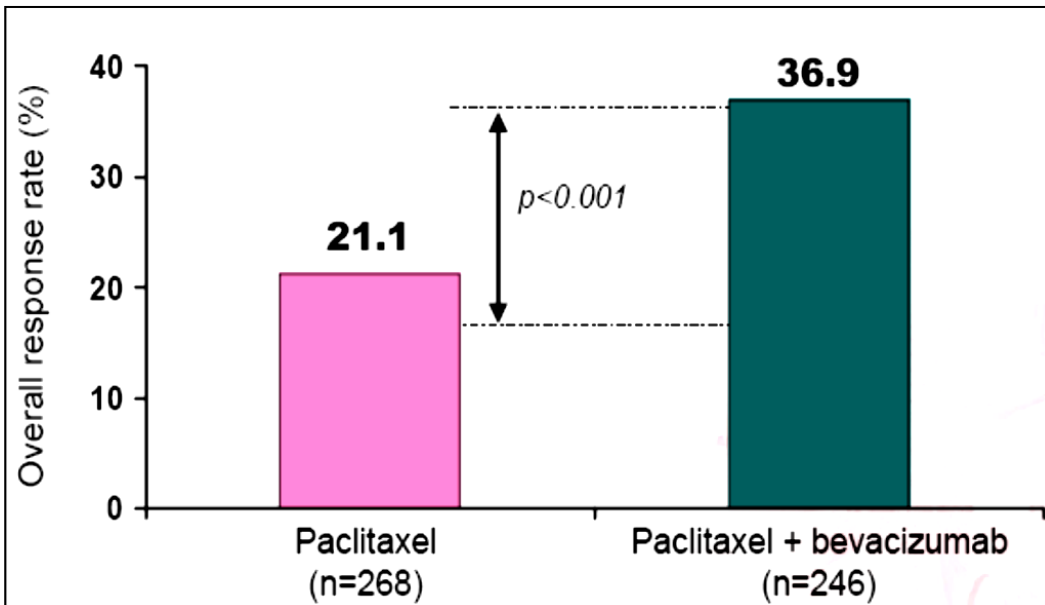


Tabella: grafico delle risposte tra i due gruppi di trattamento (studio E2100)

In particolare nelle pazienti con sola malattia misurabile, le risposte risultavano del 49.2 % nella combinazione contro il 25.2% (solo Paclitaxel).

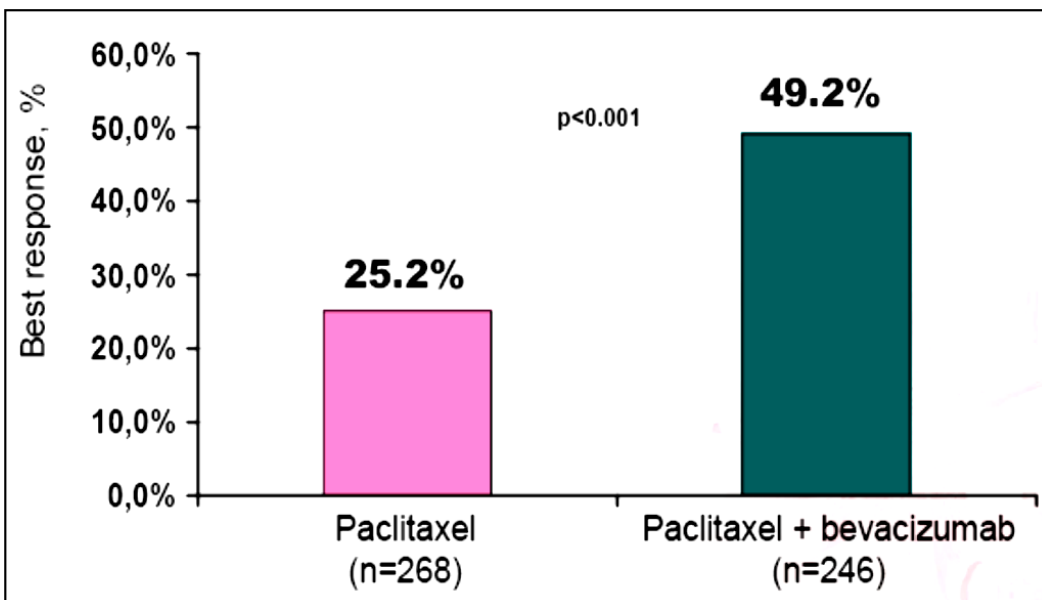


Tabella: grafico delle risposte nella malattia misurabile tra i due gruppi di trattamento (studio E2100)

L'analisi sulla sopravvivenza non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa data dall'associazione dei due farmaci, con percentuali rispettivamente di 25.2 mesi con il solo Paclitaxel verso i 26.7 mesi del braccio che presentava anche l'anticorpo.

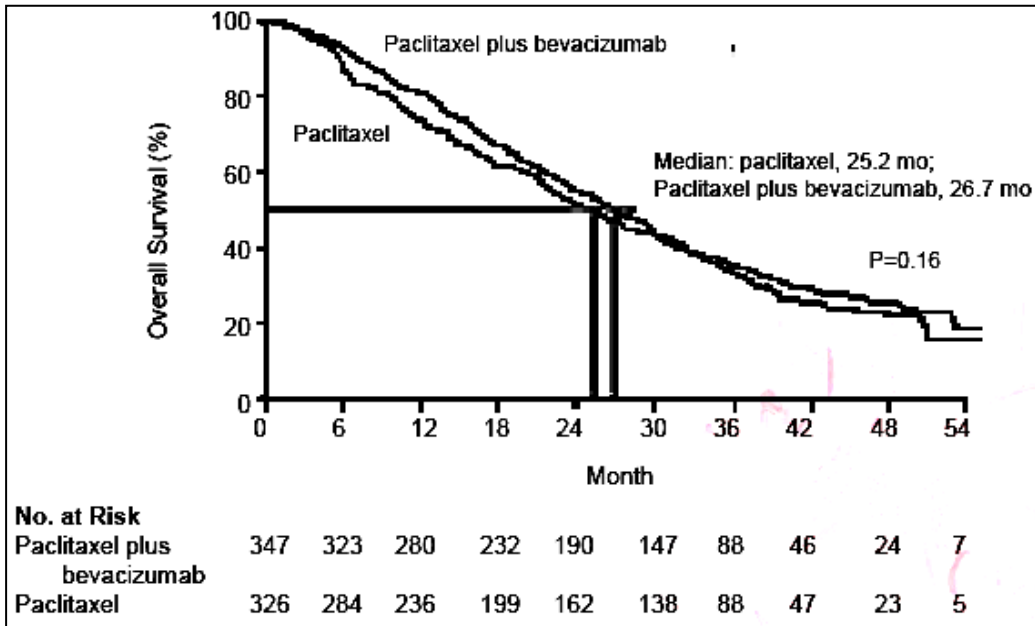


Tabella : grafico della OS nello studio E2100

Per quanto riguarda il profilo di sicurezza non si sono registrate differenze significative se si esclude il riscontro di una maggiore incidenza di eventi correlati all'ipertensione (13.5% vs 0%), alla proteinuria di grado $\frac{3}{4}$ (2.5% vs 0%) ed alla neuropatia di grado $\frac{3}{4}$ (20,2% vs 14.2%) nel braccio di combinazione.

Ora sulla base dei risultati osservati in questi due studi di fase III risulta evidente come il trial E2100 abbia raggiunto positivamente il primo end-point (PFS) oltre alle soddisfacenti risposte cliniche. Sembra naturale sottolineare come tali dati siano ascrivibili al fatto che la pazienti inserite in tale studio fossero comunque non precedentemente trattate per la metastasi (evento invece effettuato in prima linea nel trial AVF2119 tra l'altro con regimi pesanti quali antracicline e taxani) e, cosa di non minore importanza, come le pazienti in

esame presentassero dei fattori biologici prognosticamente più favorevoli (maggiore positività dell'assetto recettoriale e scarsa overespressività della proteina HER2).

Probabilmente il maggior successo dell'E2100 è da ascrivere ad una differente popolazione di pazienti arruolate nello studio. (vedi tabella seguente)

	Patients, %	
	E2100 ¹ (paclitaxel trial)	AVF2119 ² (Xeloda trial)
Prior chemotherapy for MBC	0	85
Prior chemotherapy	64	100
Prior anthracycline + taxane	Minority	100
Disease-free interval <1 year	Excluded	15
HER2-positive	4.5	25
ER-positive	61.5	46.8
Prior Herceptin	Hardly any	23

Fino ad oggi, dunque, non è stata evidenziata una maggiore tossicità nelle pazienti con tumore della mammella che non siano state riscontrate nella cure di altre neoplasie (colonretto metastatico).

Alcune delle più comuni tossicità ascritte al Bevacizumab, quali per esempio la perforazione gastrointestinale, sono state raramente sperimentate nelle donne trattate con l'antiVEGF per malattia mammaria metastatica. Similmente l'incidenza di alcune tossicità come lo scompenso cardiaco congestizio (CHF), potrebbe essere più frequente nel Carcinoma mammario per il semplice fatto che la maggior parte delle pazienti vengono trattate in adiuvante con antracicline o con radioterapia complementare quando sia richiesta, in particolare, l'irradiazione della parete toracica sinistra. Del resto l'incremento dell'incidenza del CHF dopo terapia con antracicline è stata osservata in altre forme

tumorali quali sarcomi e leucemie ove i pazienti in esame vengono sottoposti ad ampi dosaggi di tali farmaci.

Nello studio di Cobleigh di fase II (trial AVF0776g [84] come abbiamo già visto in precedenza le due pazienti che riportarono cardiotossicità erano state, in realtà, già trattate con antracicline e con radioterapia ed una di esse aveva coinvolgimento di malattia al pericardio.

Se consideriamo, a seguire, l'esperienza negli studi di fase III (AVF2119g), l'incidenza di CHF nel braccio con la capecitabina e l'anticorpo, 7 pazienti andarono incontro a tossicità cardiaca, ma, se valutiamo con più attenzione l'evento in questione, tali pazienti avevano precedentemente subito chemio e radioterapia toracica, e ben 3 di esse presentavano al basale una frazione di eiezione < 50%. Analoghi risultati di sicurezza si evincono nello studio di Miller (E2100 trial) dove il riscontro di cardiotossicità è presente seppur in modo non significativo nel sottogruppo di pazienti pretrattate con antracicline.

PARTE SPERIMENTALE

DISEGNO DELLO STUDIO

Sulla base dei risultati ottenuti negli studi fase II III precedentemente citati, è nata l'esigenza di condurre uno studio spontaneo, la cui parte sperimentale si è svolta presso l'Oncologia Medica dell'Università degli Studi di Sassari: tale ricerca si è proposta di valutare i dati di risposte al trattamento biologico e loro correlazioni con gli aspetti di tipo biomolecolare delle neoplasie mammarie attraverso l'uso dell'anticorpo antiVEGF in associazione ai taxani, regimi chemioterapici attualmente in uso nel trattamento del Carcinoma mammario metastatico

OBIETTIVI

Gli obiettivi dello studio erano valutare l'efficacia in termini di risposte obiettive (OR) e di tempo alla progressione (TTP: definito come il lasso di tempo intercorso dalla data del primo giorno di trattamento alla data di progressione di malattia) ponendo attenzione alla tollerabilità (safety profile): registrando, dunque, l'incidenza di eventi avversi correlati all'anticorpo monoclonale quali ipertensione, proteinuria, tromboembolismo artero-venoso, scompenso cardiaco congestizio, sanguinamenti a carico del sistema nervoso centrale, altri tipi di emorragie, perforazioni gastrointestinali e complicanze della guarigione delle ferite chirurgiche. Si è, inoltre, cercato di individuare eventuali correlazioni tra le risposte alla terapia ed i fattori molecolari (densità del VEGF e del VEGFR nell'ambito dei carcinomi mammari primitivi e/o delle loro metastasi)

CRITERI DI ELEGIBILITA'

I criteri di inclusione nello studio erano:

- Consenso informato e scritto
- età ≥ 18 anni

- pazienti con diagnosi istologica o citologica di adenocarcinoma mammario HER2 negativo, in pre od in post-menopausa con malattia localmente avanzata o metastatica misurabile o non misurabile, che sono candidate alla chemioterapia. La malattia localmente avanzata non doveva essere suscettibile di radioterapia o di chirurgia con intento curativo.
- performance status (ECOG) 0-2
- aspettativa di vita di almeno 3 mesi:
- era permessa una precedente radioterapia per la cura di secondarismi ossei senza che venisse irradiato più del 30% del midollo osseo e chemioterapia adiuvante
- adeguata funzione ematologia:

neutrofili $\geq 1500/\text{mmc}$, piastrine $\geq 100000/\text{mmc}$, emoglobina $\geq 9 \text{ g/dl}$

- adeguata funzione epatica:
bilirubina totale $< 1,5 \text{ X UNL}$ e AST, ALT, $< 2,5 \text{ UNL}$ nelle pazienti senza metastasi epatiche; $< 5 \text{ X UNL}$ in pazienti con metastasi epatiche.
- adeguata funzione renale:
creatinina $\leq 1,25 \text{ x UNL}$ o il valore della clearance della creatinina $\geq 50 \text{ mL/min}$ e stick per la proteinuria $< 2+$. Pazienti con proteinuria $\geq 2+$ allo stick urine basale, dovevano eseguire la raccolta delle urine delle 24 h e dimostrare di avere $\leq 1 \text{ g}$ di proteine nelle 24 ore.
- Adeguato profilo coagulativo: (INR $\leq 1,5$ e PTT $\leq 1,5 \text{ x UNL}$)
- Le donne fertili (a meno che non fossero in amenorrea negli ultimi 24 mesi) dovevano eseguire il test di gravidanza entro 28 giorni dall'inizio della terapia. Nel caso non venisse eseguito il test come sopra descritto, era necessario eseguire un

test urine entro 7 giorni prima della somministrazione della prima dose di Bevacizumab.

I criteri di esclusione nello studio erano:

- precedente chemioterapia od ormonoterapia per un carcinoma della mammella localmente avanzato o metastatico
- presenza di metastasi cerebrali (anche se precedentemente trattate); nel sospetto clinico era necessario eseguire una TAC entro 28 giorni dall'inizio del trattamento
- neuropatia periferica (NCI CTC-AE) grado > 2
- intervento chirurgico maggiore, biopsia a cielo aperto o significativo trauma nei 28 giorni precedenti il giorno di inizio della terapia od anticipazione di intervento chirurgico maggiore nel corso dello studio
- intervento chirurgico minore, compreso l'inserimento di un catetere venoso centrale, entro 24 ore precedenti la prima infusione di Bevacizumab
- trattamento con acido acetil salicilico > 325 mg/die o con altri farmaci che predisponessero al sanguinamento gastrointestinale
- concomitante o recente uso di anticoagulanti orali o agenti trombolitici (entro 10 giorni dall'inizio della prima dose di Bevacizumab): era concesso l'utilizzo di anticoagulanti in profilassi.
- storia od evidenza di diatesi emorragica o coagulopatia
- ipertensione arteriosa non controllata (sistolica > 150 mmHg e/o diastolica >100 mmHg)
- malattia cardiovascolare attiva, ovvero: accidente cerebrovascolare, infarto del miocardio, angina instabile (negli ultimi sei mesi prima di iniziare la terapia,

scompenso cardiaco NYHA \geq II° aritmia cardiaca severa che richiedesse trattamento farmacologico

- cicatrice chirurgica non consolidata, ulcera peptica in fase attiva o fratture osse
- storia di fistola addominale, perforazione gastrointestinale od ascesso intraaddominale entro 6 mesi dall'inserimento nello studio
- evidenza di un'altra malattia, dismetabolismo, reperto clinico obiettivo o dato laboratoristico che facesse sospettare la presenza di una patologia o condizione che controindica l'uso di un farmaco sperimentale.

TRATTAMENTO FARMACOLOGICO (scheda e variazione di dose)

Bevacizumab è stato somministrato alla dose di 10 mg/kg ogni 2 settimane o di 15 mg/kg ogni 3 settimane a nostra discrezione. Tale dose doveva essere ricalcolata nei cicli successivi qualora il peso della paziente fosse variato \leq al 10%. La dose del farmaco non è stata mai modificata in relazione alla tossicità in quanto in tal caso la sua somministrazione veniva temporaneamente o definitivamente sospesa.

Modalità di somministrazione

La soluzione concentrata del farmaco è stata diluita in 100 cc SF ed infusa in 90 minuti; Se l'infusione era ben tollerata, si passava ad una velocità di 60 minuti e di 30 minuti nei cicli successivi. La dose iniziale di Bevacizumab doveva essere somministrata dopo la chemioterapia, mentre nei cicli successivi prima o dopo la chemioterapia.

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA

Tutte le pazienti inserite nello studio sono state sottoposte a visita basale entro 28 giorni precedenti la prima somministrazione del Bevacizumab: in tale occasione, venivano raccolte tutte le informazioni relative all'anamnesi fisiologica e patologica delle pazienti

associata ad un' accurata valutazione dei segni vitali (peso, pressione arteriosa, ECOG performance status). Il trattamento con Bevacizumab veniva somministrato ogni 2 o 3 settimane in base allo standard di cura usato come prima linea nel carcinoma localmente avanzato o metastatico. Ad ogni somministrazione veniva controllato il performance status (ECOG Criteria), il peso corporeo, la pressione arteriosa, la proteinuria (tramite dipstick urine). Dopo circa 3- 4 mesi di trattamento le pazienti eseguivano un esame strumentale di controllo (ecografia o TC): si definivano le risposte obiettive in base ai criteri mRECIST (Modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), che prendono in considerazione una valutazione funzionale oltre che dimensionale, dal momento che le terapie biologiche antiangiogenetiche distruggono la neovascolarizzazione ed inducono necrosi spesso senza cambiamenti di volume del tumore. In particolare per risposta completa (CR) si intende la scomparsa dell'enhancement arterioso intratumorale in tutte le lesioni target. La risposta parziale (PR) è definita come una riduzione \geq al 30% della somma dei diametri delle aree vitali nelle lesioni parametro, rispetto alle dimensioni basali. La progressione di malattia (PD) è definita come un aumento \geq al 20% della somma dei diametri delle aree vitali nelle lesioni parametro, rispetto alle dimensioni basali. Infine, per stabilità di malattia, (SD) si intendono i casi non classificabili come risposte parziali o progressioni.

Veniva, inoltre valutato il tempo alla progressione (TTP), definito come il periodo di tempo dalla data della prima somministrazione dell'anticorpo sino alla evidenza della progressione. Infine, la durata della sopravvivenza, (OS) cioè il periodo che intercorre dalla data della prima dose di Bevacizumab alla morte per qualsiasi causa

Il trattamento con Bevacizumab si proseguiva sino alla comparsa di uno dei seguenti eventi:

- progressione di malattia
- tossicità inaccettabile per giudizio del medico e/o della paziente
- ritiro della paziente dallo studio
- scarsa compliance della paziente

Al termine del trattamento le pazienti sono state sottoposte a follow-up con periodici controlli clinico strumentali ogni tre mesi sino a documentata progressione di malattia.

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA'

La tossicità del Bevacizumab in combinazione con la chemioterapia come trattamento di prima linea nel carcinoma mammario metastatico era valutata secondo i criteri National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE versione 4.0) ad ogni ciclo. In particolare si doveva registrare:

- l'incidenza di tutti gli eventi avversi seri (SAEs) e non seri (non-SAEs) indipendentemente dalla loro correlazione con l'anticorpo anti VEGF od il chemioterapico
- l'incidenza di tutti gli eventi avversi seri correlati al Bevacizumab
- l'incidenza di eventi avversi seri di particolare interesse (relazione causale con il Bevacizumab) quali:
 - Ipertensione
 - Proteinuria
 - Eventi tromboembolici arteriosi o venosi
 - Scopenso cardiaco congestizio
 - Sanguinamenti a carico del sistema nervoso centrale (SNC)
 - Altri tipi di emorragie

- Complicazioni chirurgiche
- Perforazioni gastrointestinali
- Incidenza di sanguinamenti a livello del SNC nelle pazienti che sviluppano metastasi cerebrali durante il trattamento e nelle donne che non hanno eseguito TC o RMN cerebrale al basale
- Incidenza di altre tossicità causate dall'anticorpo o dalla chemioterapia evidenziate dal medico clinico

Modificazioni di somministrazione per specifici eventi

Non era concessa alcuna riduzione del Bevacizumab. In caso di tossicità di grado 3-4 correlata all'anticorpo era opportuno procedere come segue:

1. primo episodio: sospendere Beva sino al miglioramento della tossicità di grado ≤ 1
2. secondo episodio: sospendere definitivamente il trattamento.

Era inoltre necessario sospendere il Bevacizumab se si fosse verificata una delle seguenti tossicità:

1. Sindrome leucoencefalopatica posteriore reversibile (RPLS)
2. Eventi emorragici G3/4
3. Eventi tromboembolici arteriosi di qualunque grado
4. Ipertensione G4 (crisi ipertensiva)
5. Proteinuria G4 (sindrome nefrosica)
6. Disfunzione ventricolare sinistra G3/4 (CHF)
7. Perforazione gastrointestinale
8. Qualsiasi grado di ipersensibilità o reazione allergica correlata al Bevacizumab

IPERTENSIONE

Non esistono informazioni riguardo gli effetti del Bevacizumab in pazienti con ipertensione non controllata al tempo dell'inizio della terapia con l'anticorpo.

Al fine di una valutazione più accurata di questo tipo di frequente tossicità, è stata raccomandata alle pazienti la misurazione quotidiana della PA a domicilio. In caso di ipertensione G4, cioè associata a complicanze a rischio di vita, (p.e. crisi ipertensiva), il Bevacizumab andava definitivamente sospeso. Nel caso, invece di tossicità di minore entità si doveva seguire il seguente algoritmo:

G1: incremento asintomatico e transitorio (< 24 h) della PD >20 mmHg o > 150/100 mmHg

Nessun intervento

G2: incremento sintomatico o persistente (>24h) della PD > 20 mmHg o > 150/100 mmHg

Monoterapia antiipertensiva

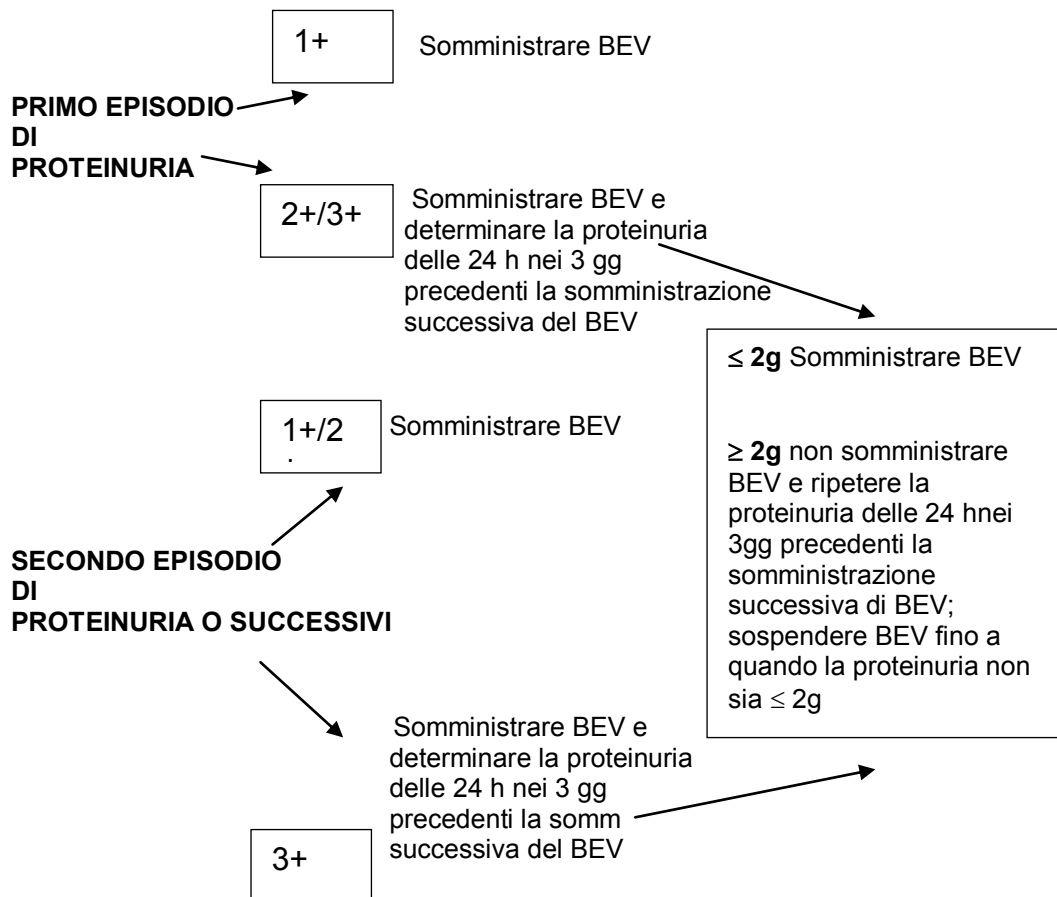
G3: ipertensione che richieda più di un antiipertensivo od un incremento della terapia già intrapresa

Eventuale sospensione del BEV se la PA non può essere controllata farmacologicamente

PROTEINURIA

Le pazienti con storia di ipertensione potevano avere un incremento del rischio di comparsa di proteinuria quando trattate con Bevacizumab. Per tale motivo era fondamentale il monitoraggio della proteinuria che è stata valutata mediante dipstick nelle 48 h precedenti la somministrazione dell'anticorpo. Esistono diversi tipi di comportamento da seguire di fronte a tale tossicità, in base al fatto che ci si trovi di

fronte ad un primo od a un secondo (o successivo) episodio (vedi tabelle). In ogni modo una proteinuria di grado 4 (sindrome nefrosica) comportava la sospensione definitiva del trattamento.



PERFORAZIONE GASTROINTESTINALE

La somministrazione dell'anticorpo anti VEGF può essere associata a diversi eventi avversi quali la perforazione gastrointestinale: le pazienti potenzialmente più a rischio sono quelle affette da ulcera gastrica, necrosi tumorale, diverticolite o colite associata alla chemioterapia.

EVENTI TROMBOEMBOLICI ARTERIOSI. Con tale termine si intendono gli accidenti cardiovascolari, gli infarti acuti del miocardio, gli eventi ischemici transitori ed altri

episodi tromboembolici arteriosi (p.e. embolie distali degli arti). La somministrazione del Bevacizumab doveva essere definitivamente sospesa qualora avvenisse uno degli eventi sopracitati. Una anamnesi positiva per un tromboembolismo arterioso, od un'età > 65 anni era associata ad un incremento del rischio di tali eventi avversi durante la sua infusione.

EVENTI TROMBOEMBOLICI VENOSI

In caso di trombosi venosa G3 il bevacizumab doveva essere interrotto e quindi era opportuno valutare l'entità della trombosi e, di riflesso, la probabile durata della terapia anticoagulante:

1. nel caso in cui la durata prevista di terapia anticoagulante a dosi terapeutiche fosse stata ≤ 2 settimane, il Bevacizumab doveva essere interrotto per l'intera durata della terapia con anticoagulanti orali,
2. nel caso in cui la durata prevista della terapia anticoagulante a dosi terapeutiche fosse stata ≥ 2 settimane, era doveroso interrompere per 2 settimane il Bevacizumab per poi riprenderlo solo se sussistevano le seguenti condizioni:
 - dose di anticoagulante stabile e, se in terapia con warfarin, INR >2 ed < 3
 - nessun evento emorragico G3/G4 dal momento dell'ingresso nello studio
 - nessuna pregressa evidenza TC di neoplasia infiltrante i vasi di grosso calibro.

Nel caso una paziente avesse presentato trombosi G4 si doveva sospendere la somministrazione dell'anticorpo con uscita della paziente medesima dallo studio.

EVENTI EMORRAGICI G3/G4

Gli eventi emorragici che sono stati finora osservati in diversi trials clinici sono costituiti in genere da emorragie associate al tumore e da emorragie mucocutanee minori

(gengivorragie, epistassi, sanguinamento vaginale).

L'emorragia associata alla neoplasia è stata osservata in studi di fase I/II: in particolare sei eventi fatali si registrarono nell'uso dell'anticorpo anti VEGF nel Carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC): si trattava di episodi di emottisi massive in pazienti con istologia squamosa o con masse tumorale localizzate in prossimità di vasi di grosso calibro. Inoltre in cinque di questi casi queste emorragie erano precedute da cavitazione e/o necrosi tumorale.

I sanguinamenti mucocutanei valutati anch'essi in svariati studi clinici appaiono dell'ordine del 20%-40%: si tratta più comunemente di epistassi G1 che non richiedono alcuna variazione della terapia in atto.

Il rischio di sanguinamenti cerebrali in pazienti con metastasi in tale sede a tutt'oggi non è stato ancora valutato, per cui la scarsa esperienza a riguardo ci ha indotto ad escludere dallo questo sottogruppo di pazienti.

SCOMPENSO CARDIACO CONGESTIZIO

Nello studio di fase III di Miller e coll. (AVF2119 trial) [96] che valutava l'aggiunta della capecitabina al Bevacizumab versus il solo anticorpo anti VEGF come trattamento di prima linea nella forma mammaria metastatica si registrarono nel braccio di associazione 7 casi (3%) di CHF e cardiomiopatia rispetto ai 2 pazienti (1%) nel gruppo di controllo.

Nonostante il riscontro di tali episodi di cardiotossicità è doveroso sottolineare come gli eventi avversi avevano interessato gruppi di pazienti già pretrattate con regimi contenenti Antracicline, farmaci dotati di un importante potenziale cardiotossico, senza dimenticare inoltre, che molte di esse erano state precedentemente irradiate a livello toracico. Da questo studio si è dedotto come l'esposizione precedente ad antracicline e, un trattamento

radioterapico sulla parete toracica, costituiscono un potenziale rischio di sviluppo di un evento avverso serio quale lo scompenso cardiaco congestizio.

Il Bevacizumab doveva essere sospeso definitivamente qualora si rilevasse una disfunzione sistolica del ventricolo sinistro di grado 3.

TRATTAMENTI CONCOMITANTI

- CHEMIOTERAPIA

Le pazienti arruolate nel nostro studio sono state sottoposte ad una terapia a base di taxani (o in monoterapia od in combinazione) non precedentemente utilizzati come trattamento di prima linea per malattia localmente avanzata o metastatica. La scelta del taxano, la sua dose, il suo utilizzo in monoterapia od in associazione ad altri chemioterapici, così come lo schema della sua somministrazione (settimanale od altro) è stato a nostra discrezione.

Le pazienti hanno ricevuto la chemioterapia più il Bevacizumab sino a progressione di malattia od inaccettabile tossicità; tuttavia se la chemioterapia veniva interrotta prima della eventuale progressione, la paziente in esame poteva continuare a ricevere l'anticorpo anti VEGF o viceversa. Inoltre, nel caso in cui la chemioterapia venisse rinviata, la stessa somministrazione del Bevacizumab andava anch'essa posticipata. Le dosi dell'anticorpo, non dovevano essere ridotte.

Se il Bevacizumab veniva definitivamente interrotto (per tossicità) la paziente usciva dallo studio ed entrava nella fase del follow-up. In caso di tossicità chiaramente legata alla chemioterapia poteva essere utilizzato, sempre a nostra discrezione, un altro regime antiproliferativo insieme all'anticorpo. Quando un ciclo di terapia veniva interrotto per tossicità, si poteva comunque riprendere il trattamento, senza comunque superare come limite di ritardo di reinizio le 3 settimane.

- FARMACI CONTROINDICATI: anticoagulanti

Non è stato permesso l'arruolamento di donne che ricevevano piene dosi di anticoagulanti; tuttavia era concesso l'uso di dosi profilattiche di anticoagulanti al basale e durante il trattamento previsto dallo studio allo scopo di mantenere pervio l'accesso venoso. L'uso precauzionale di TAO per le pazienti considerate ad alto rischio di sviluppare una trombosi venosa profonda era concessa dallo studio nel caso in cui:

le pazienti non presentavano alcuna evidenza (attraverso accurate immagini strumentali) di invasione tumorale delle maggiori strutture vascolari e nessuna evidenza di secondarismi cerebrali. Altrettanta attenzione è stata data all'uso concomitante di basse dosi di eparina o di eparina a basso peso molecolare utilizzata per la prevenzione del tromboembolismo venoso: sia la TAO che l'uso delle eparine potevano, infatti, esporre in maniera ingiustificata, a sanguinamenti anche di notevole importanza.

- CHIRURGIA

Il trattamento con il Bevacizumab può interferire con la cicatrizzazione delle ferite. Qualora la paziente dovesse essere sottoposta ad intervento chirurgico durante lo studio, bisognava attendere almeno 6-8 settimane dall'ultima dose del Bevacizumab. In caso, invece, di intervento chirurgico non programmato (p.e. urgenza), era necessario sospendere l'anticorpo appena si poneva l'indicazione alla chirurgia per essere nuovamente somministrato almeno 28 giorni dopo la chirurgia e la cicatrizzazione della ferita chirurgica.

- RADIOTERAPIA

L'esperienza clinica riportata in letteratura riguardo il trattamento contemporaneo con Bevacizumab e radioterapia è assai limitata. Comunque il suo utilizzo nell'ambito di tale studio non è stato permesso: tale limitazione deriva probabilmente, come sopraccitato,

dalla scarsa conoscenza a riguardo. Tuttavia se una paziente presentava metastasi ossee durante la fase di trattamento prevista dallo studio poteva ricevere radioterapia palliativa nei casi in cui:

- il tumore mammario non fosse andato incontro a progressione
- l'area da sottoporre a radioterapia non comprendesse una lesione secondaria che fosse sede di risposta al trattamento medico in esame.
- Non dovesse essere irradiato più del 30% del midollo osseo.

VALUTAZIONE DEI FATTORI MOLECOLARI

Si è proceduto all'analisi dei tasselli istologici dei carcinomi mammari primitivi e/o di quelli relativi ai siti metastatici parenchimali. La neoplasia veniva definita in base ai sistemi di classificazione corrente. Veniva stabilito il grado di differenziazione mediante il sistema di Elston Ellis, l'assetto biologico con la ricerca quantitativa del profilo estrogenico, dell'indice di proliferazione cellulare e di aggressività, oltre che la presenza o meno dell'amplificazione della proteina HER-2. Con metodiche immunohistochimiche veniva eseguita una valutazione semiquantitativa di VEGF e del suo recettore (VEGFR), distinguendo le tre sedi di distribuzione (membranosa, nucleare e citoplasmatica). Questa parte del lavoro è stata possibile grazie alla collaborazione con l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università degli Studi di Sassari. Le indagini immunohistochimiche sono state effettuate con l'utilizzo di specifici anticorpi policlonali per VEGF (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA) e VEGFR (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA), con diluizioni rispettivamente di 1:40 e 1:175; per entrambi gli anticorpi la reazione è stata sviluppata mediante utilizzo di sistemi commerciali polimerici ad elevata sensibilità, non-biotinilati per prevenire le false positività correlate alla presenza di biotina endogena, con la molecola

diaminobenzidina come cromogeno. Per ogni anticorpo sono stati utilizzati appositi controlli positivi. Per ogni colorazione è stata verificata la localizzazione della positività (di membrana, citoplasmica e/o nucleare) effettuando una valutazione semiquantitativa sia dell'intensità della colorazione (debole: 1+, moderata: 2+, forte: 3+), sia della percentuale di cellule neoplastiche immunoreattive (positività focale: 1-10%, moderata: 10-50%, diffusa: >50%)

RISULTATI

CARATTERISTICHE DELLE PAZIENTI

La nostra esperienza si riferisce ad un numero di 18 pazienti con malattia metastatica insorta ab inizio o dopo un periodo di remissione completa dopo la chirurgia radicale o conservativa a seguito di chemio od ormonoterapia precauzionale.

Tutte le pazienti in esame si trovavano al momento dell'arruolamento nello studio in buone condizioni cliniche generali, con un performance status 0-1 (PS ECOG 0-1).

L'età media era di 54 anni (range 27-77) e, la maggior parte delle pazienti era in postmenopausa fisiologica (13 pazienti (72%) in menopausa) e 5 (28%) in premenopausa.

16 pazienti (88%) presentavano istologicamente un Carcinoma mammario duttale infiltrante, mentre le 2 rimanenti rispettivamente una forma lobulare infiltrante. Per quanto riguarda il tempo di insorgenza della neoplasia nella forma localmente avanzata o metastatica, solo 4 delle 18 pazienti (22%) esaminate si presentavano come tali al momento della diagnosi. Inoltre la metà di esse (50%) erano state sottoposte a mastectomia radicale mentre solo 5 donne avevano beneficiato della chirurgia conservativa (28%). In seguito all'intervento, delle 14 pazienti che potevano essere sottoposte a terapia precauzionale, 10 (70%) avevano eseguito chemioterapia adiuvante

con regimi contenenti antracicline per un totale di 6 cicli (associato alla radioterapia allorché venivano sottoposte a intervento conservativo) cui seguiva mantenimento con inibitori dell'aromatasi (IA), mentre 2 (14%) pazienti avevano assunto ormonoterapia con Tamoxifene + LHRH analoghi, le rimanenti 2 (14%) invece, erano state seguite con solo follow-up strumentale, considerato l'apparente buona prognosi evidenziata dall'assetto biologico-molecolare e dalla stadiazione. (tumori con diametro inferiore a 0,5 cm ed assenza di interessamento linfonodale, presente, invece in circa il 30% delle pazienti alla diagnosi iniziale).

CARATTERISTICHE INIZIALI DELLE PAZIENTI	
Numero	18
Età mediana	54 (27-77)
Menopausa	13 (72%)
Performance status	0 12 (66%) 1 6 (34%)
RE +	14 (77%)
Pgr+	8 (44%)
Mib-1>20%	5 (28%)
Chirurgia radicale	9 (50%)
Chirurgia conservativa	5 (28%)
Diagnosi istologica:	16 (88%)
Ca duttale infiltrante	
Ca lobulare infiltrante	2 (11%)
Chemioterapia adiuvante	10 (71%)
Ormonoterapia adiuvante	2 (14%)

I parametri biologici al momento della diagnosi della neoplasia mammaria primitiva evidenziavano:

- RE+ in 14 pazienti e PgR+ in 8 pazienti (rispettivamente l'78% ed il 44%)
- Mib 1 > 20% in 5 pazienti (28%)
- HER-2 negativo in 17 pazienti arruolate (valutazione HER-2 con IHC debolmente positiva in 4 pazienti per cui si procedeva a metodiche FISH con relativo gene non amplificato); una paziente con HER-2 overexpressa alla FISH.
- Grading di differenziazione G2 in 6 pazienti valutabili su 18 (33%), G3 in 4 pazienti (22%). La valutazione del grado di differenziazione tumorale non è stato possibile in 4 pazienti a causa dell'esiguità del campione in esame.

Inoltre sulla base delle caratteristiche biologiche della malattia abbiamo suddiviso la popolazione in esame in diversi sottogruppi molecolari, vale a dire quello delle pazienti "LUMINAL A" con recettori estrogenici (ER) positivi +/- recettori progestinici (Pgr) positivi ed HER-2 negativo o FISH assente (11 pazienti sulle 18 totali, 60%); un esiguo gruppo (2 pazienti pari al 10% del totale) di LUMINAL B caratterizzato da ER debolmente positivo ed un elevato indice di proliferazione ($mib-1 \geq 20\%$) e, per finire, un piccolo gruppo di pazienti "TRIPLE NEGATIVE" (recettori ormonali negativi, HER-2 negativo o FISH assente) rappresentato da 5 pazienti (28%). Inoltre, per ogni caso inserito nello studio è stato rivalutato l'istotipo ed il grado secondo Elston, con l'esclusione delle neoplasie per le quali tale sistema non è applicabile, in particolare per 4 casi in cui si disponeva della sola "core biopsy" e di un singolo caso di quadrantectomia post-terapia neoadiuvante.

L'espressione immunoistochimica di VEGF e VEGFR è stata valutata su campioni neoplastici di 18 pazienti; specificamente, per 12 pazienti è stato possibile effettuare le indagini sulla neoplasia mammaria primitiva, mentre per le rimanenti 6 pazienti l'analisi è

stata eseguita su biopsie di localizzazioni secondarie, nell'impossibilità di reperire i materiali relativi al tumore primitivo; peraltro, per 3 pazienti si è provveduto alla valutazione dell'espressione di VEGF e VEGFR sia sul tumore primitivo che sulla recidiva per verificare eventuali variazioni immunofenotipiche. Nel nostro gruppo di pazienti in esame, la ricerca della densità del VEGF era ampiamente rappresentata sia in sede citoplasmatica che nucleare in ben 10/18 ; mentre l' intensità era debole in sola sede citoplasmatica in due casi. L'espressione del VEGFR, invece, era prevalente in sede citoplasmatica con una percentuale di cellule neoplastiche immunoreattive con positività focale diffusa.

Tabella: CARATTERISTICHE MOLECOLARI DELLE 18 PAZIENTI

GRADING	VEGF			VEGFR			Esame istologico
	intensità	%	sede	intensità	%	sede	
2	2+	60	cit	1+	60	cit	mts osso
nv(bx)	neg			1+	60	cit	mts osso+fegato
3	2+	40	cit/memb	2+	75	cit/memb	mamm
2	3+	80	cit/memb	2+	50	cit	mamm
nv	2+	30	cit	1+	60	cit	Ln peritoneo
2	2+	80	cit/memb	1+	50	cit	mamm
2	3+	80	cit/memb	2+	80	cit	polm
3	3+	90	cit/memb	2+	75	cit/memb	mamm
3	3+	90	cit/memb	3+	30	cit/memb	Ln sottocl
nv(bx)	2+	70	cit/memb	1+	70	cit	mamm
nv(bx)	1+	10	cit	1+	50	cit	mamm
2	2+	80	cit/memb	1+	75	cit	mamm
1	2+	40	cit	1+	60	cit	fegato
2	2+	85	cit/memb	2+	50	cit/memb	mamm
2	2+	60	cit/memb	1+	50	cit	mamm
2	3+	90	cit/memb	1+	65	cit	mamm
nv(bx)	neg			2+	80	cit	
3	2+	70	cit/memb	1+	60	cit	mamm
3	2+	30	cit/memb	1+	40	cit	mamm
2	1+	30	cit	3+	40	cit/memb	feagato
1	1+	30	cit	3+	40	cit/memb	fegato
nv	neg			1+	20	cit	mamm

memb: membranosa; cit: citoplasmatica; nv: non valutabile

L'intervallo libero di malattia (DFI), ossia il tempo che intercorre dalla chirurgia alla comparsa delle metastasi o, comunque, alla progressione di malattia (PD) delle 14 (su 18) pazienti osservate (4 erano metastatiche ab inizio), è stato mediamente di 5 anni (range 1, 2 mesi – 21 anni).

Tutta la popolazione in esame aveva sviluppato secondarismi ed, in particolare:

- 3 pazienti avevano metastasi ossee (17%);
- 6 pazienti metastasi epatiche (33%) ed, in questo gruppo, 2 donne con localizzazione epatica singola ;
- 6 pazienti presentavano metastasi parenchimali polmonari (33%);

inoltre, si riscontrava evidenza di linfadenopatie di natura eteroplasica in:

- 6 pazienti con interessamento linfonodale mediastinico di cui una con versamento pleurico associato (33%)
- 1 paziente con localizzazione a livello peritoneale (5%)
- 2 pazienti con malattia linfonodale sovra e sottoclaveare sinistra (10%)

<i>CARATTERISTICHE ALLA PROGRESSIONE</i>	
ILM (media in anni)	5 (1-21)
Sede di malattia:	
Fegato	6 (33%)
Ossa	3 (17%)
Polmone	6 (33%)
Linfonodi	9 (50%)

TRATTAMENTO

A partire da Maggio 2008 sino ad Luglio 2011 sono state inserite nello studio pazienti con riscontro clinico-strumentale di una malattia sistemica ottenuto mediante immagini ecografiche o TC ed, in particolare, con conferma cito-istologica della natura secondaria mediante agobiopsia in 4 pazienti sulla popolazione totale.

Lo schema di trattamento da noi utilizzato ha previsto l'infusione del Docetaxel 100 mg/mq o del Paclitaxel 175 mg/mq + Bevacizumab 15 mg/Kg con somministrazione trisettimanale; in particolare:

- 9 pazienti venivano sottoposte a chemioterapia secondo schema TAXOTERE 100 mg/mq + BEVACIZUMAB 15 mg/kg giorno 1 ogni 3 settimane;
- 9 pazienti a terapia con TAXOLO 175 mg/mq + BEVACIZUMAB 15 mg/kg anch'esse con medesima cadenza trisettimale

La durata media del trattamento è stata di circa 20 settimane.

Tutte le pazienti valutabili hanno eseguito dai 3 ai 9 cicli di trattamento. Nelle pazienti con metastasi osse si procedeva, inoltre, alla somministrazione di bifosfonati con cadenza mensile.

EFFICACIA

Nonostante la ridotta casistica è stato possibile osservare un soddisfacente tasso di risposte obiettive globali (83.3%).

Infatti in 6 pazienti sottoposte a terapia con Bevacizumab (con Docetaxel alla dose di 100 mg/mq o Paclitaxel 175 mg/mq) la rivalutazione eseguita dopo soli tre cicli ha dimostrato

una riduzione parziale (PR) (cioè una riduzione del 30% o più del diametro maggiore di ciascuna lesione) delle lesioni secondarie con ulteriore beneficio dimostrato

tramite accertamenti strumentali in seguito ad una media di altri 3 cicli di trattamento. Al momento attuale tali pazienti stanno continuando la terapia di mantenimento con l'anticorpo monoclonale con buona tollerabilità, senza il riscontro di eventi avversi ad esso associati.

La risposta al trattamento è stata così importante in due pazienti tanto che abbiamo deciso di sottoporle ad intervento di resezione delle singole metastasi epatiche (dopo aver opportunamente rispettato i 28 giorni di intervallo libero dal Bevacizumab, come previsto dallo studio), riportando in un caso una risposta completa patologica.

Tale decisione è stata presa alla luce dei positivi risultati riportati da numerosi trials clinici che hanno dimostrato la fattibilità di intervento di metastasectomia epatica in casi selezionati di pazienti affette da malattia mammaria con diffusione limitata in tale sede. [99]. Anche queste donne dopo l'intervento hanno continuato con il solo anticorpo (mediana di 30 cicli di Bevacizumab di mantenimento) e le rivalutazioni successive hanno sino ad ora confermato la risposta completa ottenuta con la resezione.

Uguale risultato (CR) hanno ottenuto altre tre pazienti le quali, pertanto, stanno continuando la somministrazione di mantenimento dell'anticorpo monoclonale, considerata la buona tollerabilità che non ne preclude il suo uso; due, invece, hanno presentato stabilità di malattia (SD) che si conservano tutt'ora come evidenziato dagli esami strumentali (TC) di rivalutazione.

Infine, tre pazienti con secondarismi diffusi a livello scheletrico, polmonare ed epatico sono andate incontro a progressione di malattia (PD) per cui intraprendevano un terapia di seconda linea palliativa, con successivo exitus. Solo due delle diciotto pazienti prese in

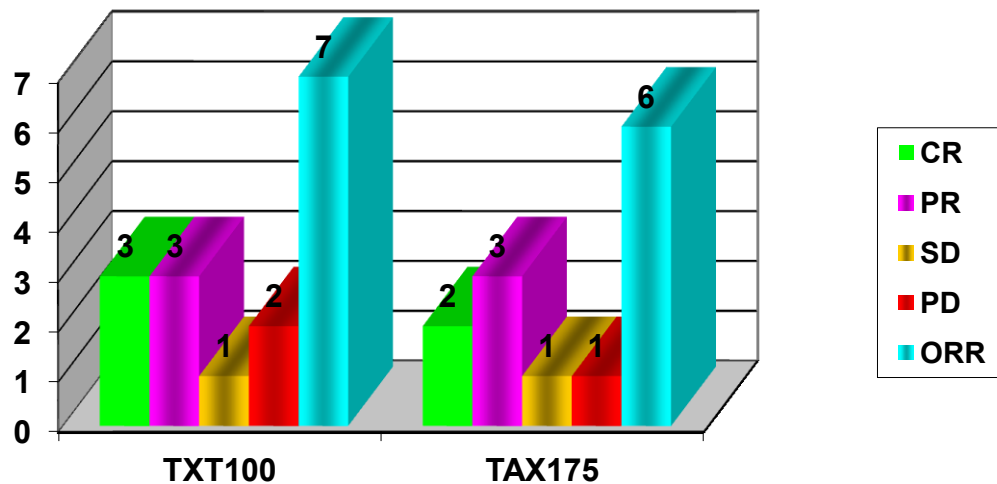
esame avevano interrotto il Bevacizumab per tossicità di grado 4 (emorragia ed epistassi), per cui le risposte e le loro correlazioni con le caratteristiche molecolari sono state possibili in sedici casi.

Il TTP di tutte pazienti che sono andate in progressione sotto la terapia è stato pari a 15,5 mesi (valore mediano).

La valutazione della sopravvivenza globale delle pazienti andate incontro all'exitus è stata pari ad 10 mesi (mediana) (vedi tabella riepilogativa e grafico)

RISPOSTE	BEVA+(TXT100)	BEVA+(TAX 175)
Complete	3	2
Parziali	3	3
Stabili	1	1
Progressioni	2	1
ORR	7 (38,8%)	6 (33,3%)
TTP totale mesi	15,5 mesi	
OSm	10 mesi	
Resezione metastasi	2	0

RISPOSTE BEVA+CT



TOSSICITA'

Globalmente il Bevacizumab è stato ben tollerato. Tuttavia, nel sottogruppo trattato con il Docetaxel 100mg/mq associato a Bevacizumab, una paziente ha dovuto rinviare la sua somministrazione per la comparsa di moderata epistassi (grado 3), per il persistere della quale si decideva di interrompere definitivamente l'uso dell'anticorpo. Un'altra donna, invece, è uscita dallo studio per la presenza di sanguinamento emorroidario di grado 4. Si è registrato, inoltre, un caso (11.1%) di ipertensione G2, che è stata trattata efficacemente con monoterapia con Ace inibitori, ed un caso di epistassi G2 (11.1%) verificatosi nella stessa paziente. L'uso dell'anticorpo antiangiogenetico ha determinato, invece, nel sottogruppo trattato con il Taxolo una maggiore percentuale di episodi di epistassi G1 (4 pazienti, cioè il 44.4%), un episodio di cefalea G1 (11.1%) e un caso di ipertensione G2 (11.1%) regredita con furosemide. In tutta la popolazione in esame non si sono registrati eventi avversi seri ascrivibili al Bevacizumab, se si escludono le due pazienti che hanno

presentato episodi di sanguinamento di grado 4. Si è comunque regolarmente proceduto non solo ad un adeguato controllo pressorio quotidiano a domicilio, reso possibile dalla compliance delle donne inserite nello studio, ma anche a scrupolose valutazioni del dipstick urine da cui non sono emersi episodi di proteinuria.

Si è, inoltre, tenuto conto degli eventi avversi legati alla terapia antitumorale.

Per quanto riguarda le 9 pazienti trattate con il Docetaxel 100mg/mq associato a Bevacizumab 5 pazienti hanno presentato leucopenia G3/G4 non febbrile che si è risolta senza l'ausilio di alcun fattore di crescita.

Gli eventi avversi di tipo non ematologico hanno, invece, evidenziato:

- anoressia G1 in una paziente (11.1%)
- nausea G1-G2 in tre pazienti (33.3%)
- stomatite G2 in due pazienti (22.2%)
- mialgia ed artralgia G2 in due pazienti (22.2%)
- alopecia G2 in tre pazienti (33.3%)
- neuropatia sensoriale G3 in una paziente (11.1%), che ha richiesto una riduzione del Docetaxel del 25 % con risoluzione della sintomatologia mediante somministrazione protratta di pregabalin 150 mg /die.
- Inoltre, una paziente (11.1%) alla quale abbiamo aggiunto allo schema sopradescritto anche la Capecitabina che ha presentato, dopo 4 cicli di trattamento, un'importante eritrodissestesie palmoplantare G3-G4 ed onicopatia G3 che hanno richiesto opportuna sospensione del farmaco.

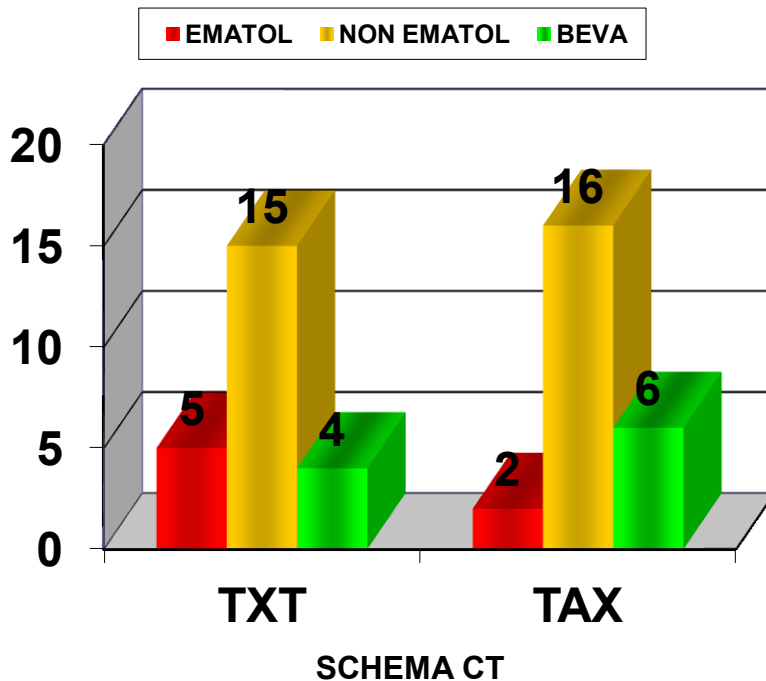
Tossicità di carattere analogo si sono riscontrate nelle 9 pazienti sottoposte allo schema chemioterapico contenente Paclitaxel 175 mg/mq somministrato ogni 3 settimane. In particolare, a livello ematologico, il taxano ha determinato la comparsa di due casi (22.2%)

di neutropenia G3 per i quali si è deciso di rinviare il trattamento di 1 settimana; a livello non ematologico si sono avute:

- astenia G2 in quattro pazienti (44.4%)
- nausea G1-G2 in una paziente (11.1%)
- stomatite G1 in quattro pazienti (44.4%)
- mialgia G2 in due casi (22.2%)
- artralgie G2 in due pazienti (22.2%)
- alopecia G1-G2 in tre casi (33.3%)

TXT100+BEVA15mg/kg					TAX175+BEVA15mg/kg				
Tossicità ematologica	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	totale
leucopenia			5(55%)				2(22%)		7(38.8%)
Tossicità non ematologica	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	totale
astenia						4(22%)			
anoressia	1								1(5.5%)
nausea		3(33%)			1(11%)				4(22.2%)
stomatite		2(22%)			4(22%)				6(33.3%)
mialgia		2(22%)				2(22%)			4(22.2%)
artralgia		2(22%)				2(22%)			4(22.2%)
alopecia		3(33%)			3(33%)				6(33.3%)
Neuropatia HFsdr			1(11%)	1(11%)					1(5.5%)
Tossicità da Bevacizumab	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	totale
ipertensione		1(11%)		1(11%)		1(11%)			2(11.1%)
sanguinamento		1(11%)	1(11%)	1(11%)	4(22%)				7(38.8%)
cefalea					1(11%)				1(5.5%)

RIASSUNTO TOSSICITA'



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 dello studio: le risposte obiettive (OR) ed il tempo alla progressione (TTP). In base alle risposte obiettive, sono stati identificati 3 sottogruppi di pazienti (delle 16 valutabili).

“well responders” (5 pazienti con risposta completa)

“intermediate responders” (6 pazienti con risposte parziali + 2 con stabilità di malattia)

“non responders” (3 pazienti con progressione di malattia)

Due pazienti non erano valutabile in quanto uscite dallo studio per tossicità severa.

Confrontando le caratteristiche dei 3 sottogruppi molecolari, non sono state rilevate differenze statisticamente significative (ved. Tabella)

GRADING	VEGF			VEGFR		
	intensità	%	sede	intensità	%	sede
WELL RESPONDERS						
3	2+	40	cit/memb	2+	75	cit/memb
2	2+	80	cit/memb	1+	50	cit
2	3+	80	cit/memb	2+	80	cit
1	2+	40	cit	1+	60	cit
2	2+	60	cit/memb	1+	50	cit
2	3+	90	cit/memb	1+	65	cit
INTERMEDIATE RESPONDERS						
nv	2+	70	cit/memb	1+	70	cit
nv	1+	10	cit	1+	50	cit
2	2+	80	cit/memb	1+	75	cit
2	2+	85	cit/memb	2+	50	cit/memb
nv	neg			2+	80	cit
nv	neg			1+	20	cit
3	2+	70	cit/memb	1+	60	cit
3	2+	30	cit/memb	1+	40	cit
2	1+	30	cit	3+	40	cit/memb
1	1+	30	cit	3+	40	cit/memb
NON RESPONDERS						
nv	neg			1+	60	cit
nv	2+	30	cit	1+	60	cit
3	3+	90	cit/memb	2+	75	cit/memb
3	3+	90	cit/memb	3+	30	cit/memb

Tabella: Correlazione tra caratteristiche molecolari e risposte al trattamento

Abbiamo, inoltre, eseguito l'analisi tra il profilo molecolare delle pazienti ed il tempo alla progressione (TTP), considerando le pazienti in due gruppi distinti: il primo rappresentato dalle "long responders" ovvero le pazienti che a distanza di almeno 12 mesi mantengono la risposta completa al trattamento con l'anticorpo antiangiogenetico, non solo ma anche

coloro le quali sono tuttora in risposta parziale od in stabilità di malattia, ed il secondo gruppo rappresentato dalle “short responders” ovvero le donne che sono andate incontro a progressione di malattia in meno di 12 mesi dall’inizio della terapia. L’analisi comparativa tra i fattori molecolari e la durata delle risposte non ha dimostrato anche in questo caso alcuna differenza statisticamente significativa.

GRADING	VEGF			VEGFR		
	intensità	%	sede	intensità	%	sede
LONG RESPONDERS						
3	2+	40	cit/memb	2+	75	cit/memb
2	2+	80	cit/memb	1+	50	cit
2	3+	80	cit/memb	2+	80	cit
1	1	2+	40	cit	1+	60
2	2+	60	cit/memb	1+	50	cit
2	3+	90	cit/memb	1+	65	cit
nv	2+	70	cit/memb	1+	70	cit
nv	1+	10	cit	1+	50	cit
2	2+	80	cit/memb	1+	75	cit
2	2+	85	cit/memb	2+	50	cit/memb
nv	neg			2+	80	cit
nv	neg			1+	20	cit
3	2+	70	cit/memb	1+	60	cit
3	2+	30	cit/memb	1+	40	cit
2	1+	30	cit	3+	40	cit/memb
1	1+	30	cit	3+	40	cit/memb
SHORT RESPONDERS						
nv	neg			1+	60	cit
nv	2+	30	cit	1+	60	cit
3	3+	90	cit/memb	2+	75	cit/memb
3	3+	90	cit/memb	3+	30	cit/memb

Tabella: Correlazione tra caratteristiche molecolari ed il TTP

DISCUSSIONE

Questa esperienza conferma l'efficacia del Bevacizumab come agente attivo nelle pazienti affette da carcinoma mammario metastatico. In particolare la sua attività è sinergica quando associata a chemioterapici inibitori del fuso mitotico.

La coorte dello studio in questione, in quanto poco estesa, non può in alcun modo essere rappresentativa di popolazioni più ampie.

Nonostante ciò nella nostra casistica si è assistito ad una buona efficacia del trattamento con una soddisfacente percentuale (72%) di risposte obiettive: infatti, su 18 pazienti, 13 hanno risposto al trattamento a fronte di una tossicità accettabile, (precisamente 5 risposte complete tra cui una risposta completa patologica, 6 risposte parziali, a cui si aggiungono 2 stabilità di malattia).

Tra l'altro, due pazienti hanno potuto beneficiare, grazie alla eccellente risposta clinica a livello delle singole metastasi epatiche, di una resezione che è risultata addirittura negativa in una paziente, indice, questo di una completa efficacia della terapia. La scelta di condurre le due pazienti all'intervento di resezione epatica, nasce da una accurata valutazione di tipo multidisciplinare con il radiologo ed il chirurgo. Recenti trials clinici hanno, infatti, sottolineato come sottoporre una paziente all'intervento di metastasectomia epatica sia un approccio fattibile ed efficace in termini di clinical benefit valutando, ovviamente lo status iniziale di malattia, cioè prendendo in considerazione solo casi selezionati di neoplasia mammaria con un favorevole assetto biologico che rappresenta ad oggi una importante modalità discriminante di una malattia a buona o cattiva prognosi.

Delle 18 pazienti in esame si sono verificate solo tre progressioni di malattia tra cui due decessi non ascrivibili al trattamento ma alla storia naturale della neoplasia.

Il piccolo campione ovviamente non consente un confronto diretto con i risultati ottenuti negli studi di fase III, dove, tra l'altro, le risposte erano valutate sulla base dei criteri RECIST e non mRECIST come invece nel nostro studio.

Tuttavia, se andiamo a confrontare i risultati pubblicati dalla Miller (E2100) il tasso delle risposte globali veniva quasi raddoppiato (49.2% verso 25.2%) con l'aggiunta del bevacizumab al chemioterapico (Paclitaxel); risultati altrettanto positivi si registrarono nello studio AVADO [100] dove il tasso di risposte nel gruppo di pazienti trattate con il Docetaxel e l'anticorpo era superiore rispetto al solo chemioterapico (vedi figura)

Tabella: tasso di risposte nello studio AVADO

	Placebo + docetaxel (n=207)	Avastin 7.5[†] + docetaxel (n=201)	Avastin 15[†] + docetaxel (n=206)
Overall response rate	44	55	63
p value (vs control)	-	0.0295	0.0001
Best response			
CR	1	3	1
PR	44	52	62
SD	39	35	25
PD	12	5	4

Nella nostra esperienza è stata effettuata la valutazione del tempo alla progressione (TTP) che è stato pari a 15.5 mesi (valore mediano), considerando questo dato abbastanza confortante dal momento che di tutta la popolazione in esame solo una percentuale esigua pari al 16,6% (3 su 18 pazienti) è andata in progressione di malattia, e non dimenticando comunque che eravamo di fronte ad un setting metastatico.

La sopravvivenza globale è stata pari a 10 mesi (valore mediano).

Complessivamente questi dati sono sostenuti dagli studi della Miller (E2100) e di Miles (AVADO).

Per quanto riguarda il profilo di sicurezza del Bevacizumab, la sua somministrazione ha comportato la comparsa in soli due casi di eventi avversi gravi o di tossicità tali da giustificare l'interruzione del trattamento.

Infatti tra tutte le pazienti inserite nella nostra analisi, due hanno interrotto il trattamento per la persistenza di epistassi G3 e la comparsa di severa emorragia G4. Per il resto degli eventi correlati all'uso dell'anticorpo, sono emersi due casi di ipertensione di grado G2 che hanno risposto alla terapia con Ace inibitori e diuretici. Non esistono informazioni riguardo gli effetti del Bevacizumab in pazienti con ipertensione non controllata al tempo dell'inizio della terapia con l'anticorpo.

Fondamentale per lo studio è stata una attenta collaborazione delle pazienti che sono state istruite sulla necessità di misurare la pressione arteriosa a domicilio, quotidianamente, riportando puntualmente prima dell'inizio della terapia i valori riscontrati e gli eventuali sintomi associati.

Inoltre, non si sono rilevati episodi di proteinuria come valutato attraverso il dipstik urine eseguito ad ogni ciclo prima della somministrazione dell'anticorpo.

Dal momento che il trattamento con l'anti VEGF prevedeva la sua associazione con la terapia antitumorale, per quanto riguarda la tollerabilità alla chemioterapia, abbiamo osservato una bassa incidenza di eventi tossici ematologici, per un totale di soli 7 eventi leucopenici sebbene di grado G3/4, che non hanno richiesto l'ausilio dei fattori di crescita; maggiore è stata la comparsa di tossicità non ematologica che è stata per lo più di grado lieve. Le pazienti eleggibili per tale trattamento dovevano, dunque, essere complianti,

capaci di dare attenzione anche ad un tipo di tossicità silente, ma per questo non potenzialmente pericolosa.

Nel nostro studio, dunque, la chemio-immunoterapia non ha comportato il riscontro di gravi tossicità, permettendo alle pazienti medesime di essere curate senza mettere in discussione la qualità della vita, che sappiamo essere una delle finalità più importanti da considerare nell'ambito di una scelta terapeutica.

Inoltre, i dati riguardanti il profilo di sicurezza derivanti dall'uso del taxano con il Bevacizumab, appaiono migliori di quelli (ben più significativi dal punto di vista statistico) osservati nello studio della Miller: nel trial E2100 si verificava una maggiore incidenza di eventi correlati all'ipertensione (13.5%), alla proteinuria di grado $\frac{3}{4}$ (2.5%) ed alla neuropatia di grado $\frac{3}{4}$ (20.2%) nel braccio di combinazione.

Del resto anche lo studio AVADO [100], ha messo in evidenza come la somministrazione del Bevacizumab 7,5 mg/kg o di 15 mg/kg associato al Docetaxel 100 mg/mq trisettimanale comporti un beneficio clinico che veniva validato da un profilo di tossicità del tutto accettabile rispetto all' uso del solo taxano.

Tabella: profilo della tossicità nello studio AVADO

Adverse events%	Placebo + docetaxel (n=233)	Avastin 7.5 [†] + docetaxel (n=250)	Avastin 15 [†] + docetaxel (n=247)
Any AE	99.6	100.0	99.6
Any grade ≥ 3 AE	67.0	74.8	74.1
AEs leading to death*	2.6	1.6	1.6
AEs leading to discontinuation [‡] of docetaxel	24.0	20.8	24.3
Avastin or placebo	11.2	8.0	11.7

Negli ultimi anni la ricerca sui nuovi farmaci antineoplastici si è concentrata 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. L'obiettivo 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.

Her-2 nel carcinoma mammario e k-ras nel tumore del colon-retto sono due esempi di bersagli molecolari ed hanno il significato di fattori predittivi di risposta.

Nonostante sia noto il meccanismo d'azione del Bevacizumab, ad oggi non esiste un bersaglio molecolare specifico che possa indirizzarci nella selezione del paziente da trattare con questo antiangiogenetico.

Nello studio in questione abbiamo cercato di riscontrare una possibile correlazione tra le caratteristiche molecolari della neoplasia primitiva e/o delle lesioni secondarie con l'andamento clinico registrato durante il trattamento e nella fase del follow-up di malattia. In particolare, l'indagine immunohistochimica del VEGF e del VEGFR che abbiamo considerato come possibili marcatori surrogati di predittività di risposta al trattamento non ha evidenziato alcuna significatività statistica: infatti, le risposte obiettive ottenute non erano associate con queste variabili così come il tempo alla progressione.

In letteratura diversi trial hanno ricercato di evidenziare dei biomarcatori di risposta come fattori predittivi di outcome clinico nelle pazienti trattate con il Bevacizumab. In un'analisi retrospettiva dello studio AVF2119g tra i diversi fattori biomolecolari presi in qualità di surrogati di risposta alla terapia, il solo VEGFA espresso dalle cellule endoteliali tumorali ha mostrato una significatività prognostica, dato, tra l'altro non validato da altri studi.

In conclusione, nonostante gli sforzi per identificare sottogruppi di pazienti che possano beneficiare al meglio del suo utilizzo, non esistono a tutt'oggi marcatori convalidati che ci indirizzino nella scelta più appropriata.

Il Bevacizumab ha dimostrato nella nostra analisi un buon profilo di tossicità ed è stata confermata la sua efficacia. La sua associazione fa aumentare l'efficacia della chemioterapia (taxani) ed è ben tollerata. Infatti, come abbiamo sopraddetto, l'anticorpo anti VEGF, confrontato con la sola terapia antitumorale, nei trials clinici, ha dimostrato ampi vantaggi, associato con regimi a base di inibitori del fuso mitotico (taxani).

Attualmente sono in corso nuovi studi che applicano il farmaco anche nella fase adiuvante (studio BEATRICE, studio E5103, studio BETH) e nella fase neo-adiuvante (studio Gepar Quinto, studio NSABP-40) verso i quali sono riposte molte aspettative dal momento che il ruolo del VEGF è importante per lo sviluppo del tumore soprattutto nelle fasi iniziali, perciò è prevedibile che questo farmaco possa esprimere la sua massima efficacia se utilizzato in una fase precoce di malattia.

Preme ricordare che nella scelta del suo utilizzo è inevitabile valutare il suo alto costo economico, e dal fatto che ad oggi non sono noti fattori predittivi di risposta a questo farmaco. Ci auguriamo che i risultati dei nuovi studi permettano di acquisire una maggiore conoscenza nel suo utilizzo ed aiutino a scoprire il perché delle diverse modalità di risposta delle pazienti, permettendoci, così, di riservarlo solo alle pazienti potenzialmente responsive.

Il Bevacizumab, frutto di numerosi studi preclinici, sta diventando, insieme ad altre terapie a bersaglio molecolare, l'icona di un nuovo approccio al trattamento dei tumori, più razionale e mirato. Ci auguriamo che l'utilizzo di questi nuovi farmaci così detti

“intelligenti”, apra nuovi orizzonti alla ricerca. Infatti sappiamo oramai che esistono numerosi fenomeni che regolano la crescita di una massa neoplastica, ma non sappiamo tuttora interpretare quali tra questi siano i più significativi. Auspichiamo che questo attuale scenario stimoli la ricerca verso la conoscenza di ulteriori vie di trasduzione dei segnali molecolari che potenzialmente potrebbero rappresentare validi bersagli di nuove ed ulteriori terapie.

BIBLIOGRAFIA

[1] Tycznsky JE, Bray F, Parkin DM. Breast cancer in europe. International Agency for Research on Cancer: European Network of Cancer Registries Cancer Fact Sheet 2002; 2

[2] Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Esteve J, Sant M, Storm H, Allemani C, Ciccolallo L, Santaquilani M, Berrino F; EUROCARE Working Group. EUROCARE –3 summary: Cancer survival in Europe at the end of the 20 th century. *Ann Oncol* 2005; 14:128-49

[3] Greena FL, Balch CM, Page DL, et al. American Joint Committee on Cancer, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. Chicago, IL: Springer- Verlag New York Inc; 2002

[4] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*.2003;3:453-8.

[5] Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*.1977;197:893-5.

[6] Engel J, Eckel R, Kerr J, Schmidt M, Furstenberger G, Richter R, Sauer H, Senn HJ, Holzel D. The process of metastasisation for breast cancer. *Eur J Cancer*. 2003;39:1794-806.

[7] Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*. 2000;342:525-33.

[8] Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 2001;19:3669-74.

[9] Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol*. 2001;19:960-71.

[10] Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:3469-78.

- [11] Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61:1890-5.
- [12] van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415:530-6.
- [13] van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347:1999-2009.
- [14] Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Janicke F, van Diest P, Brakenhoff R, Pantel K. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* 2003;63:5679-84.
- [15] Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijer-van Gelder ME, Yu J, Jatkoe T, Berns EM, Atkins D, Foekens JA. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet.* 2005;365:671-9.
- [16] Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet.* 2003;33:49-54.
- [17] Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7737-42.
- [18] Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmuller G. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet.* 2002;360:683-9.
- [19] Gray JW. Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell.* 2003;4:4-6.
- [20] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL.

- Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:10869-74.[21] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:8418-23.
- [22] Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:10393-8.
- [23] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med. 1998;4:844-7.
- [24] Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. Am J Pathol. 2001;159:2249-56.
- [25] Green JE, Hudson T. The promise of genetically engineered mice for cancer prevention studies. Nature Rev Cancer 2005;5:184-198
- [26] Clark GM, Sledge GW, Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. J Clin Oncol 1987; 5:55-61
- [27] Bernard Marty C, Cardoso F, Piccard M, Facts and controversies in systemic treatment of breast cancer. Oncologist 2003; 9:617-32
- [28] Hortobagyi GN, Piccard - Gebhart MJ: Current management of advanced breast cancer. Semin Oncol 1996; 23 (suppl 11): 1-5.
- [29] Crown J, O' Leary M, Ooi W: Docetaxel and Paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience: Oncologist 2004; 9:24-32
- [30] Chan S, Friedrichs K, Noeld et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. The 303 Study Group. J Clin Oncol 1999; 17:2341-2354

- [31] Paridaens R, Biganzoli L, Bruning P, et al. Paclitaxel versus Doxorubicin as first line single-agent for metastatic breast cancer: a European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized Study with cross-over. *J Clin Oncol* 2000; 18:724-733.
- [32] Sledge GW, Neuberg D, Bernardo P et al. Phase III trial of Doxorubicin, paclitaxel and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer: an intergroup trial (E1193). *J Clin Oncol* 2003; 21:588-592.
- [33] Nabholz JM, Senn HI, Bezwoda WR, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus mitomycin plus vinblastine in patients with metastatic breast cancer progressing despite previous anthracycline-containing chemotherapy. 304 Study Group. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1413-12 -1424
- [34] Sjostrom J, Blomqvist C, Mouridsen H et al. Docetaxel compared with sequential methotrexate and 5-fluorouracil in patients with advanced breast cancer after anthracycline failure: a randomized phase III study with cross-over on progression by the Scandinavian Breast Group. *Eur J Cancer* 1999 ; 35 :1194 -1201
- [35] Bonnetterre J, Roche H, Monnier A et al. Docetaxel vs 5-fluorouracil plus vinorelbine in metastatic breast cancer after anthracycline therapy failure. *Br J Cancer* 2002; 87:1210-1215.
- [36] Icli E, Akbulut H et al. Paclitaxel(T) vs Cisplatin +VP16 (EP) in metastatic breast cancer treated with anthracyclines: a phase III randomized study. Turkish Oncology Group. *Ann Oncol* 2002; 13 (Suppl 5):47.
- [37] Chung C, Carlson R. Goals and objectives in the management of metastatic breast cancer. *Oncologist* 2003; 8:514-20
- [38] Carlson RW, Anderson BO, Bensinger W et al. The NCCN breast cancer clinical practice guidelines in oncology. *J NCCN* 2003; 1:148-188
- [39] Coates AS, Stockler M, Wilcken N. Controversies in metastatic breast cancer ; optimal duration of chemotherapy. *ASCO Educational Handbook* 2003:119-121.
- [40] Baselga J. Herceptin Alone or in combination with chemotherapy in the treatment of HER 2 positive metastatic breast cancer: pivotal trials. *Oncology* 2001; 61: 14-21
- [41] Hanahan D, Weinberg R, : The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70,2000 A
- [42] Ji WR et al. Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *FASEB J* 1998; 12:1731-8

- [43] Rafii S, Lyden D, Benezra R, et al. Vascular and haematopoietic stem cell: Novel targets for anti-angiogenesis therapy. *Nat Rev Cancer* 2: 826-835, 2002
- [44] Zebrowski BK, Yano S, Liu W, et al: Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 5: 3364-3368, 1999
- [45] Zebrowski BK, Liu W, Ramirez K, et al: Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol* 6: 373-378, 1999
- [46] Masashi Narazaki, Giovanna Tosato Targeting Coagulation to the Tumor Microvasculature: Perspectives and Therapeutic Implications From Preclinical Studies *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 97No.10, May 18, 2005
- [47] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18:4-25
- [48] Folkman J, Klagsbrun M 1987 Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447
- [49] Folkman J, 1991 What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4-6
- [50] Gasparini G. breast cancer : molecular genetics, pathogenesis and therapeutics. In : Bowcock A editor. *Angiogenesis in breast cancer. Role in biology, tumor progression, and prognosis: Totowa (NJ): Humana Press, Inc.; p.347-71.*
- [51] Sledge GW Jr. Vascular endothelial growth factor in breast cancer: biologic and therapeutic aspects. *Semin Oncol* 2002; 29 (3 suppl11): 104-10
- [52] Konecny GE; Meng YG, Untch M et al. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10(5): 1706-16.
- [53] Weidner N, Semple JP, Welch W, Folkman J 1991 Tumor angiogenesis and metastasis. Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8
- [54] Horak ER, Leek R, Klenk N, Lejeune S, Smith K, Stuart M, Greenall M, Harris AL 1992 Quantitative angiogenesis assessed by anti-PECAM antibodies. Correlation with node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* 340: 1120-1124

- [55] Vartanian RK, Weidner N, 1994 Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 144: 1188-1194
- [56] Wakui S, Furusato M, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshito I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S, 1992 Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 168: 257-262
- [57] Smith –McCune KS, Weidner N, 1994 Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 54: 804-808.
- [58] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A, 1996 Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439
- [59] Ferrara N, Carver –Moore K, Chen H, Dowd M, Li J, O’ Shea KS, Powell- Braxton L, Hillan KJ, moore MW 1996 Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442
- [60] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985, 1983
- [61] Daniel J. Hicklin and Lee M. Ellis Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis *JCO* vol 23; 5 Febr 10 2005
- [62] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of the VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676, 2003
- [63] Ferrara et al pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:851-8
- [64] Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, et al: VEGF receptor signal transduction. *Trends Bio-chem Sci* 28:488-494, 2003
- [65] Dvorak HF, : Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor. A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20: 4368-4380, 2002

- [66] Zhang H et al. Expression of Vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 8: 994-998, 2000
- [67] Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascular Pharmacol* 39: 225- 237, 2002
- [68] Zachary I, Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of Vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1375-C1386, 2001
- [69] Rajantie I, Ilmonen M, Alminante A et al. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 104: 2084-2086, 2004
- [70] Giampietro Gasparini, Raffaele Longo, Massimo Fanelli, et al, Combination of Antiangiogenic therapy with Other Anticancer Therapies: Results, Challenges, and Open Questions *JCO VOL* 23; 6, feb 20, 2005
- [71] Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N, The vascular endothelial growth factor proteins. Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 1992; 71: 53-64
- [72] Lee CG et al. anti-VEGF treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions: *Cancer Res* 60, 5565-5570 (2000)
- [73] Hansen-Algenstaedt, N et al. Tumor oxygenation during VEGFR-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. *Cancer Res* 60, 4556-4560 (2000)
- [74] Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic growth factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56:2013-16
- [75] Heffelfinger SC, Miller MA, Yassin R, Gear R. Angiogenic growth factors in preinvasive breast cancer disease. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2867-76
- [76] Salvan P, Perhoniemi V, Tykka H, Maenpaa H; Joensuu H. Serum VEGF levels in women with benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53:161-66
- [77] Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 1992; 71:53-64
- [78] Borgstrom P, Gold DP, Hillian KJ, Ferrara N. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing antibody and doxorubicin. *Anticancer Res* 1999; 19: 4203-14
- [79] Sweeney CJ, Miller KD, Sissons SE, Nozaki S, Heilman DK; Shen J, Sledge GW Jr. The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. *Cancer Res* 2001; 61: 3369-72
- [80] Gerber H, Ferrara N, Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65:671-80

- [81] Lee CG, Heijn M, Di Tommaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, et al. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumour radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 2000; 60: 5565-70
- [82] Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumours. *Cancer Res* 2004; 64:3731-6
- [83] Hicklin DJ, Ellis LM, Role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1011-27.
- [84] Cobleigh MA, Langmuir VK, Sledge GW, Miller KD, Haney L, Novotny WF, Reimann Jd, Vassel A. A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2003; 30:117-24
- [85] Traina TA, Dickler MN, Caravelli JF, Yeh BM, Brogi E, Panageas K, Flores SA, Norton L, Park J, Hudis C, Rugo H. A phase II of letrozole in combination with bevacizumab, an anti-VEGF antibody, in patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer [abstract 2030]. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94: S 93
- [86] Ramaswamy B, Rhoades CA, Kendra K, Hauger M, Allen J, Jhaveri S, Chen H, Cagnoni P, Eckhardt GS, Elias A, Shapiro CL, CTPE-sponsored phase II trial of bevacizumab (Avastin) in combination with docetaxel (Taxotere) in metastatic breast cancer [SABCS, oral presentation]. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82:S50.
- [87] Burstein H, Parker L, Savoie J et al. Phase II trial of the anti-VEGF antibody bevacizumab in combination with vinorelbine for refractory advanced breast cancer [abstract 446]. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76: S115.
- [88] Pegram M, Yeon C, Ku NC, Gaudreault J, Slamon DJ, Phase I combined biological therapy of breast cancer using two humanized monoclonal antibodies directed against HER2 protooncogene and vascular endothelial growth factor (VEGF). *San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) Poster presentation* 2004
- [89] Rugo H, Dickler MN, Scott Jh, More Dh, Melisko M, Keh BM, Caravelli Jf, Brogi E, Hudis C, Park JW. Change in circulation endothelial cells (CEC) and tumour cells (CTC) in patients (pts) receiving bevacizumab and erlotinib for metastatic breast cancer (MBC) predicts stable disease at first evaluation [abstract 525]. *J Clin Oncol* 2005; 23:10s
- [90] Presta LG; Chen H, O'Connor SJ et al: Humanization of an antivascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders: *Cancer Res* 1997; 57: 4593-9.
- [91] NG SS; WD Figg. Sparreboom A. Taxane-mediated antiangiogenesis in vitro: influence of formulation vehicles and binding proteins. *Cancer Res* 2004; 64:821-4.
- [92] Sweeney CJ, Miller KD, Sissons SE, Nozaki S, Heilman DK; Shen J, Sledge GW Jr. The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular

endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. *Cancer Res* 2001; 61: 3369-72

[93] Ramaswamy B, Rhoades CA, Kendra K, Hauger M, Allen J, Jhaveri S, Chen H, Cagnoni P, Eckhardt GS, Elias A, Shapiro CL. CTPE-sponsored phase II trial of bevacizumab (Avastin) in combination with docetaxel (Taxotere) in metastatic breast cancer [SABCS, oral presentation]. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82:S50.

[94] Overmoyer B, Silverman P, Leeming R et al. A phase II trial of neoadjuvant docetaxel with or without bevacizumab in patients with locally advanced breast cancer [SABCS, poster presentation]. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88:S106

[95] Wedam S, Low J, Yang SX, Chow CK, Choyke P, Danforth D, Hewitt SM, Berman A, Steinberg SM, Liewehr DJ, et al. Anti-angiogenic and anti-tumour effects of bevacizumab in inflammatory and locally advanced breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:769-77

[96] Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:792-9

[97] Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL; Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acid and basic fibroblast growth factor, humour growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997; 57; 963-9

[98] Miller KD, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh MA, Perez EA; Shenkier TN, Davidson NE. A randomized phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel plus bevacizumab as first line for locally recurrent or metastatic breast cancer: a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E 2100) [abstract 3]. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94: (Suppl1): S6

[99] S.Eva Singletary, Garret Walsh, Jean-Nicholas Vauthey, Steven Curley, N. Hortobagyi: A role of curative surgery in the treatment of selected patients with metastatic breast cancer. *The Oncologist* April 2003; 8; 241-251

[100] Miles D, Chan A, Romieu G, Dirix L Y et al: Randomized, double-blind, placebo controlled, phase III study of bevacizumab with docetaxel or docetaxel with placebo as first line therapy for patients with locally recurrent or metastatic breast cancer (mBC): AVADO. *J Clin Oncol* 26:2008 (May 20 suppl: abstr LAB1011)

Ringrazio vivamente:

il Prof. Antonio Farris che ha contribuito alla mia crescita professionale,

la Prof.ssa Rosa Maria Pascale direttrice della scuola che mi ha concesso il privilegio di rinnovare il mio desiderio di ricerca

il Dr. Paolo Cossu Rocca per il supporto datomi nella rilevazione delle caratteristiche biomolecolari

Le colleghe Silvia Mura e Manuela Dettori per l'amichevole sostegno ed i preziosi consigli dati in questi tre anni di dottorato.