

Università di Pisa  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Dipartimento di Medicina Interna  
Divisione di Farmacologia e Chemioterapia



**Dottorato di Ricerca in**  
**“Fisiopatologia Medica e Farmacologia”**

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Eleuterio Ferrannini

**Attività antiangiogenica/antitumorale  
della combinazione di axitinib e  
irinotecano**

**Tutore:**

**Chiar.mo Prof. R. Danesi**

**Dottorando:**

**Bastianina Canu**

# INDICE

<b>Riassunto</b>	3
<b>Introduzione</b>	5
<b>Capitolo 1</b>	8
- Angiogenesi Tumorale	
- Fattori di crescita	
- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	
- Inibitori delle Tirosinchinasi	
- Tossicità degli inibitori delle tirosinchinasi	
- Resistenza ai farmaci	
- Strategia ottimale di trattamento: inibitori multi target e inibitori di combinazione	
- Prospettive	
<b>Capitolo 2</b>	24
- Axitinib	
- Biodisponibilità nell'uomo	
- Studi di fase II	
- Studi di fase III	
- Tossicità	
<b>Capitolo 3</b>	35
- <b>Scopo dello studio</b>	
- <b>Materiali e metodi</b>	
- Studi <i>in vitro</i>	
- Studi <i>in vivo</i>	
- Immunoistochimica	
- Analisi statistica	
<b>Capitolo 4</b>	48
- <b>Risultati</b>	
<b>Bibliografia</b>	72
<b>Ringraziamenti</b>	83

## RIASSUNTO

L'adenocarcinoma pancreatico è una delle principali cause di morte per cancro e, nonostante l'introduzione di nuovi farmaci chemioterapici come irinotecano, un inibitore della topoisomerasi I, rappresenta un problema chemioterapico importante. Axitinib, un nuovo inibitore tirosin-chinasico del recettore VEGFR-2, è stato utilizzato con successo *in vivo* per inibire la crescita tumorale. Studi di combinazione non sono ancora stati effettuati per migliorare l'attività antiangiogenica/antitumorale di questo composto nel tumore del pancreas.

**Obiettivo dello studio.** Lo scopo dello studio è dimostrare l'attività sinergica antiproliferativa e proapoptotica di irinotecano e axitinib *in vitro* e il miglioramento degli effetti *in vivo* sull'angiogenesi e nel tumore al pancreas.

**Materiali e metodi.** Gli esperimenti sulla proliferazione cellulare e il test sull'apoptosi sono stati eseguiti su cellule umane endoteliali del microcircolo del derma e su linee cellulari tumorali di pancreas (MIAPaCa-2, Capan-1) esposte a SN-38, il metabolita attivo di irinotecano, axitinib, o la loro combinazione simultanea per 72 ore. La fosforilazione di ERK1/2 e di Akt, e la concentrazione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), del recettore 2 del VEGF, e della trombospondina-1 (TSP-1) sono stati misurati con test ELISA. L'espressione genica di ATP7A e ABCG2 è stata eseguita con *real-time polymerase chain reaction* e le concentrazioni intracellulari di SN-38 sono state misurate con l'analisi di cromatografia liquida ad alte prestazioni. Gli xenotrapianti di cellule Capan-1 in topi nudi sono stati trattati con irinotecano e axitinib da soli o in combinazione simultanea.

**Risultati.** Un forte effetto sinergico sull'attività antiproliferativa e proapoptotica è stata riscontrata con la combinazione axitinib/SN-38 sulle cellule endoteliali e tumorali. La fosforilazione di ERK1/2 e di Akt è stata significativamente inibita da differenti concentrazioni dei farmaci in combinazione, in tutte le linee cellulari. Il trattamento con axitinib e SN-38 in combinazione ha determinato una forte inibizione dell'espressione genica di ATP7A e ABCG2 nelle cellule endoteliali e tumorali, aumentando la concentrazione di SN-38 intracellulare. Inoltre, la secrezione TSP-1 è

aumentata nelle cellule trattate con entrambi i farmaci, mentre i livelli di VEGFR-2 sono significativamente diminuiti. Negli esperimenti *in vivo* la somministrazione simultanea dei due farmaci in combinazione ha determinato una regressione quasi completa dei tumori e della neovascolarizzazione tumorale.

**Conclusioni.** I risultati *in vitro* mostrano le proprietà altamente sinergiche della combinazione simultanea di irinotecano e axitinib sulle cellule endoteliali e sulle cellule tumorali di pancreas, suggerendo una possibile traslazione di questo trattamento in clinica.

# INTRODUZIONE

La cancerogenesi è un processo multifasico durante il quale eventi genetici cumulativi determinano la trasformazione delle cellule da normali a maligne. Questa trasformazione si realizza, sotto il profilo istologico, attraverso una serie di modificazione morfo-patologiche che vanno dalla displasia di vario grado alla cellula francamente maligna.

Esistono meccanismi bio-molecolari di cancerogenesi comuni per differenti neoplasie e meccanismi specifici per neoplasie che condividono la medesima istogenesi. In ogni caso il risultato finale si traduce in un mancato controllo della proliferazione cellulare, nel mancato equilibrio tra sopravvivenza cellulare ed apoptosi, nella disregolazione delle comunicazioni tra cellula e cellula ed ancora tra cellula e matrice extracellulare, nella neoangiogenesi e quando la cellula risulti completamente trasformata ed abbia acquisito il fenotipo neoplastico, nella migrazione, nell'invasione e nella disseminazione metastatica (Hanahan and Weinberg 2000).

La chemioterapia classica ha rappresentato per molti anni l'unica strategia terapeutica farmacologica nelle neoplasie in fase avanzata. I farmaci citotossici, tuttavia, sono curativi solo in una minoranza di pazienti, nella maggior parte dei casi la loro efficacia è parziale e transitoria. Una migliore conoscenza degli eventi molecolari coinvolti nella progressione tumorale e delle caratteristiche biologiche delle cellule tumorali, ha consentito di identificare le cause del fallimento terapeutico della chemioterapia, attribuibile in gran parte all'acquisita resistenza farmacologica secondaria, all'instabilità genetica delle cellule neoplastiche, alla loro eterogeneità, all'elevato indice mutazionale e alla difficoltà dei chemioterapici di raggiungere la sede della lesione per la presenza di un tipo di vascolarizzazione aberrante, tortuosa ed irregolare (Ferrara 2004).

Il controllo farmacologico dell'angiogenesi potrebbe rappresentare in tal senso un nuovo approccio nel trattamento del tumore, dal momento che lo sviluppo (Kerbel and Folkman 2002) patologico dei vasi è una fase critica della crescita tumorale (Bergers and Benjamin 2003). L'inibizione dell'angiogenesi presenta infatti diversi vantaggi teorici rispetto alla chemioterapia classica: bersaglio biologico specifico, bassa tossicità sistemica e difficile comparsa di fenomeni

di resistenza farmacologica. Tuttavia come singola modalità terapeutica può essere solo parzialmente attiva in quei tumori in cui la crescita e le metastasi sono sostenute anche da altri meccanismi d'azione o in presenza di grosse masse neoplastiche. Quindi la terapia antiangiogenica può essere una promettente terapia antitumorale in particolare se associata con i trattamenti convenzionali quali: radioterapia, chirurgia, immunoterapia, ormonoterapia e chemioterapia classica.

Negli ultimi decenni sono molti gli inibitori dell'angiogenesi di cui sono state valutate in studi clinici la sicurezza e l'efficacia antitumorale (Kerbel and Folkman 2002). Tra i farmaci antiangiogenici più avanzati vi sono quelli che bloccano la funzione proangiogenica del VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004), un fattore di crescita il cui ruolo nella regolazione dell'angiogenesi fisiologica e patologica è stato oggetto di studio per oltre dieci anni (Ferrara 2002; Ferrara 2005).

È possibile inibire direttamente il VEGF, oppure il suo recettore, mediante anticorpi monoclonali che si legano alla porzione esterna o "piccole molecole" che si legano alla porzione interna (Ferrara 2005).

Negli ultimi anni i maggiori successi sono stati ottenuti con il bevacizumab (Avastin, Genentech/Roche), un anticorpo monoclonale che inibisce direttamente il VEGF, con il sunitinib (SU11248, Sutent, Pfizer) e il sorafenib (BAY43-9006, Nexavar, Bayer), due inibitori del dominio tirosin-chinasico del recettore per il VEGF.

Il bevacizumab è il primo inibitore angiogenico approvato nel 2004 dall'US Food and Drug Administration, inizialmente per il trattamento del carcinoma del colon avanzato, e recentemente anche per il carcinoma della mammella e del polmone.

Gli inibitori della tirosinchinasi, il sunitinib e il sorafenib, hanno come target il recettore del VEGF (VEGFR), principalmente VEGFR-2, e sono in grado di colpire contemporaneamente più target tumorali; inoltre, il forte razionale preclinico derivante dal meccanismo d'azione ha avuto un riscontro clinico, in recenti studi, tale da portare all'approvazione per l'utilizzo in clinica (Faivre, Demetri et al. 2007) (Wilhelm, Carter et al. 2006). Entrambi i farmaci hanno mostrato benefici in pazienti con carcinoma renale ((Motzer, Rini et al. 2006), ((Escudier, Eisen et al. 2007), e il sunitinib, inibitore selettivo delle

tirosinchinasi dei recettori di VEGF, KIT, FLT-3 e PDGF, è stato approvato per il trattamento del tumore gastrointestinale stromale (GISTs). Sorafenib è stato inizialmente ideato come inibitore della RAF chinasi, enzima chiave del *pathway* di RAS, e successivamente è emersa un'azione inibitoria anche sui recettori di VEGF e PDGF: da ciò deriva un potenziale duplice meccanismo d'azione antiproliferativo e antiangiogenico che ha portato il farmaco ad essere approvato anche per il trattamento del cancro epatocellulare (Llovet, Ricci et al. 2008).

Axitinib (AG-013.736), un nuovo inibitore multitarget della tirosina-chinasi, è stato recentemente introdotto in studi clinici, spesso in combinazione con farmaci chemioterapici (Spano, Chodkiewicz et al. 2008) come un potente farmaco orale antiangiogenico, e il target su cui agisce è principalmente il dominio tirosin-chinasico del recettore 2 del VEGF (VEGFR-2) (Hu-Lowe, Zou et al. 2008; Kelly and Rixe 2009; Solowiej, Bergqvist et al. 2009). Una serie di studi preclinici sono stati pubblicati su questo composto, mostrando *in vivo* attività antitumorale nel tumore alla mammella (Wilmes, Pallavicini et al. 2007), prostata (Fenton and Paoni 2007; Fenton and Paoni 2009; Ma and Waxman 2009), pancreas (Hu-Lowe, Zou et al. 2008) (Nakahara, Norberg et al. 2006), colon, cellule renali e tumore ovarico (Hu-Lowe, Zou et al. 2008). *In vivo* gli effetti antitumorali sono dovuti principalmente alla proprietà antiangiogeniche della molecola come dimostrato dall'immunoistochimica (IHC) (Nakahara, Norberg et al. 2006; Wilmes, Pallavicini et al. 2007) e dalle immagini della risonanza magnetica (Wilmes, Pallavicini et al. 2007; Xu, Peng et al. 2007). Alcune terapie di combinazione sono state testate *in vivo* per incrementare l'attività antitumorale del composto. Dosi standard e metronomiche di ciclofosfamide (Ma and Waxman 2008; Ma and Waxman 2009), gemcitabina, docetaxel e carboplatino (Hu-Lowe, Zou et al. 2008) sono stati utilizzati con successo *in vivo* in xenotrapianti di tumore umano al pancreas, mammella e di tumore ovarico.

Il tumore al pancreas è una delle principali cause di morte tra malattie oncologica. La sopravvivenza a 5 anni nei pazienti con una diagnosi precoce o trattati chirurgicamente varia dal 12% al 20% (O'Reilly 2009). Il carcinoma pancreatico metastatico è resistente alla chemioterapia e alla radioterapia corrente. Anche se gemcitabina è il principale farmaco utilizzato per il

trattamento sistemico del tumore al pancreas, non prolunga in modo significativo la sopravvivenza dei malati. Opzioni terapeutiche alternative sono urgentemente necessarie per migliorare la risposta tumorale e la sopravvivenza. Per queste ragioni, numerose combinazioni sono state valutate in studi preclinici, che generalmente utilizzavano gemcitabina in combinazione con farmaci diversi, quali fluvastatina (Bocci, Fioravanti et al. 2005) e gli agenti antiangiogenici (Bruns, Shinohara et al. 2000; Bocci, Danesi et al. 2004; Dineen, Sullivan et al. 2008). Irinotecan (CPT-11) è uno standard terapeutico per il trattamento del tumore del colon-retto, ma alcuni studi clinici di fase 1-2, che combinavano gemcitabina con irinotecan (Rocha Lima, Sherman et al. 2001; Mishra, Butler et al. 2005), sono stati intrapresi per il trattamento del carcinoma pancreatico; inoltre, alcuni studi preclinici sul carcinoma pancreatico sono stati recentemente eseguiti con la somministrazione del singolo farmaco (Bissery, Vrignaud et al. 1996; Rosen 1998) o la sua combinazione con GEM231, un oligonucleotide antisense di seconda generazione (Agrawal, Kandimalla et al. 2002) o con TRA-8, un anticorpo agonista del *death receptor 5* (DeRosier, Buchsbaum et al. 2007).

La resistenza cellulare ai farmaci è uno dei principali ostacoli nella terapia del carcinoma pancreatico. Le cellule tumorali possono essere intrinsecamente resistenti o acquisire la resistenza ad entrambi i farmaci citotossici e ai nuovi targets molecolari. Questa forma di *multidrug resistance* può essere espressa attraverso diversi meccanismi tra cui il trasporto attivo ATP-dipendente di farmaci fuori dalla cellula attraverso pompe di efflusso appartenenti alla famiglia dei trasportatori *ATP-binding cassette* (ABC) (Kusuhara and Sugiyama 2007). La sovraespressione di ABCG2 è stata associata a una marcata riduzione dell'accumulo intracellulare di SN-38, il metabolita attivo di irinotecan, e con il più alto livello di resistenza delle cellule tumorali di colon-retto e dell'endometrio, a conferma che ABCG2 è direttamente coinvolto nella resistenza acquisita a SN-38 (Candeil, Gourdier et al. 2004; Takara, Kitada et al. 2009). Inoltre, il trasportatore ATP7A è stato recentemente implicato nella resistenza alla chemioterapia, in quanto aumenta l'efflusso di farmaci come cisplatino, paclitaxel, doxorubicina e SN-38 (Owatari, Akune et al. 2007; Furukawa, Komatsu et al. 2008). Questi risultati suggeriscono fortemente che



l'espressione di ABCG2 e ATP7A potrebbe modulare i tassi di efflusso di SN-38 dalle cellule tumorali.

# CAPITOLO 1

## 1.1 Angiogenesi Tumorale

In circostanze fisiologiche normali, l'angiogenesi è finemente regolata da una serie di fattori endogeni pro- e anti-angiogenici in equilibrio tra loro: è favorita durante il ciclo mestruale, gravidanza, durante la cicatrizzazione delle ferite e la riparazione dei tessuti (Carmeliet 2005). In condizioni patologiche (es. angiogenesi tumorale) vi è uno squilibrio di tali fattori e i vasi sanguigni tumorali sono incapaci di diventare quiescenti, crescendo costantemente nel tessuto neoplastico.

I primi studi sull'angiogenesi iniziarono più di 30 anni fa grazie alle scoperte del ricercatore americano Judah Folkman; già nel 1971 egli infatti ipotizzò l'esistenza di fattori di crescita angiogenici secreti dalle cellule tumorali, i fattori TAF (*tumor angiogenic factor*) più tardi individuati nei fattori bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) e VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Le possibili implicazioni cliniche e terapeutiche di tali innovazioni sono state evidenziate però soltanto negli ultimi 10 anni grazie all'interesse di altri ricercatori come Cheresh, Kerbel e Ferrara. Oggi i nuovi metodi di studio *in vitro* ed *in vivo* hanno permesso la scoperta di molte altre molecole naturali e di sintesi ad attività antiangiogenica.

La trasformazione di alcune cellule tumorali quiescenti in un tumore vero e proprio dipende, in parte, dall'angiogenesi: i tumori solidi non possono crescere oltre 2 millimetri senza un proprio apporto vascolare, per tale motivo malignità e invasività neoplastica dipendono direttamente dal meccanismo angiogenico. La vascolarizzazione è essenziale quindi per la crescita, lo sviluppo e la migrazione di tutte le cellule tumorali. I vasi apportano ossigeno, nutrienti e permettono l'eliminazione dei cataboliti dannosi alle cellule; l'entità di questo fabbisogno è diversa per ogni tipo di tumore e si modifica nel corso della progressione della malattia. Appare sempre più evidente che l'elemento chiave che determina lo scatenarsi della malattia neoplastica sia l'innescò della neovascolarizzazione tumorale, detto *switch angiogenico*, che è indotto dalla sintesi e secrezione di fattori di crescita selettivi per le cellule endoteliali, prodotti dal tumore stesso o da cellule immunitarie infiltranti il tumore.

Esistono, tuttavia, altre condizioni patologiche e fisiologiche in cui tale meccanismo gioca un ruolo importante, tra cui: la psoriasi, le forme artritiche ed artrosiche, l'endometriosi, l'aterosclerosi, alcuni tipi di patologie oculari; interviene poi nello sviluppo embrionale, nelle modificazioni uterine durante la gravidanza e nei processi riparativi tissutali. Ciò che diversifica la forma patologica da quella fisiologica è il diverso equilibrio esistente tra fattori pro ed antiangiogenici. Fisiologicamente i nuovi vasi maturano velocemente e stabilizzano la loro struttura, mentre quelli tumorali perdono precocemente stabilità e controllo; ciò può essere valutato con indagini istologiche: i vasi patologici hanno forma irregolare, sono dilatati, tortuosi, a fondo cieco, non si organizzano in capillari venosi ed arteriosi, ma mantengono una configurazione caotica.

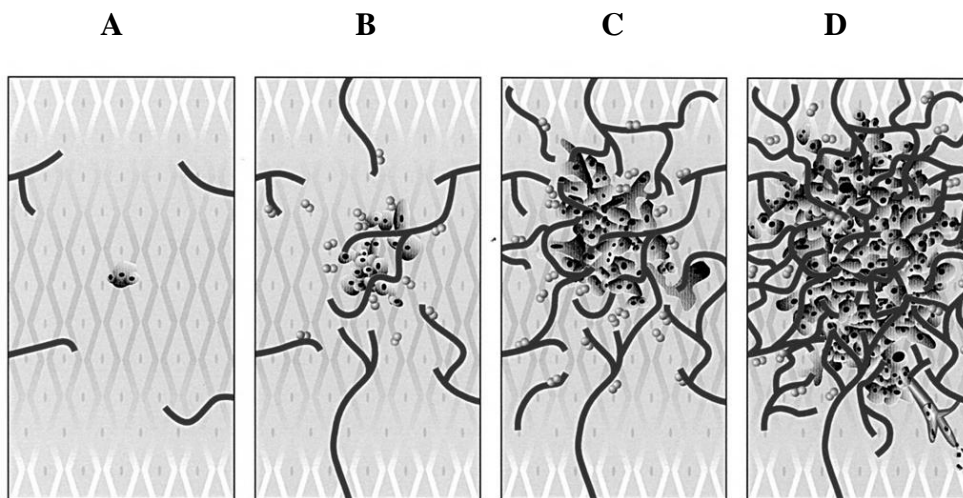
Gli eventi che portano alla formazione di nuovi vasi a partire da quelli preesistenti possono essere schematizzati come segue:

- attivazione delle cellule endoteliali e aumento della permeabilità vascolare: in questa prima fase del processo gioca un ruolo fondamentale il fattore VEGF; avviene lo stravasamento delle proteine plasmatiche che parteciperanno alla formazione di nuova matrice extracellulare e l'attivazione della migrazione delle cellule endoteliali;
- perdita della integrità della membrana basale e dei periciti. Queste cellule costituiscono gran parte della membrana basale degli endoteli e sono intimamente connesse alle cellule endoteliali;
- migrazione delle cellule endoteliali (la discontinuità della membrana basale e la degradazione della matrice extracellulare permettono la diffusione chemiotattica delle cellule endoteliali nei tessuti);
- proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali;
- nuova adesione delle cellule endoteliali e formazione di strutture incolonnate e canalizzate;
- formazione di una nuova membrana basale provvista di periciti e di cellule muscolari lisce.

Negli ultimi anni l'attenzione della ricerca si è rivolta verso i meccanismi che regolano la crescita e la diffusione tumorale, cercando nuovi target per terapie antitumorali sempre più efficaci. In particolare è stato notato che l'instabilità genetica e l'eterogeneità biologica delle neoplasie sono le cause determinanti il

fallimento delle terapie antitumorali sistemiche; pertanto, si è cercato di attaccare un punto geneticamente stabile e fondamentale per il tumore: la sua vascolarizzazione (Fidler and Ellis 2004). Nel 1971 Judah Folkman per primo presentò il concetto di trattamento antiangiogenico, proponendo che un trattamento preventivo sulla formazione di vasi sanguigni tumorali, potesse contenere lo sviluppo di una neoplasia per un lungo periodo (Kerbel 2006). È stato identificato un elevato numero di fattori in grado di promuovere o inibire l'angiogenesi. I principali regolatori proangiogenici comprendono il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) ed il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), nonché i fattori di crescita trasformanti (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), l'interleuchina-8 (IL-8), la leptina e l'angiogenina.

Fattori in grado di inibire l'angiogenesi comprendono l'angiostatina, l'endostatina, la trombospondina-1 (TSP-1), l'angiopoietina-2, l'interferone- $\alpha$  e l'interleuchina-12 (IL-12).



**Figura 1:** *Disegno schematico del processo angiogenico: A) i tumori solidi di dimensioni inferiori ai 2-3 millimetri possono sopravvivere in assenza di un proprio apporto vascolare; B) quando la crescita tumorale diventa imponente le cellule tumorali reclutano nuovi vasi a partire da quelli pre-esistenti; C) i nuovi vasi ematici contribuiscono alla crescita ed allo sviluppo della neoplasia; D) il tumore utilizza la rete vascolare per diffondere nei tessuti e dar luogo a metastasi*

## 1.2 Fattori di crescita

Lo studio del ruolo dei fattori di crescita iniziò nel 1971 quando Folkman ipotizzò l'esistenza di TAF; da allora sono stati individuati numerosi fattori diversi, denominati in base alle caratteristiche principali inizialmente rilevate. Si distinguono per funzioni biologiche e proprietà biochimiche; alcuni hanno azione mitogena esclusivamente sulle cellule endoteliali, altri invece sono in grado di stimolare anche altre linee cellulari come fibroblasti o cellule muscolari lisce. Sono piccole molecole polipeptidiche a diverso peso molecolare, rilasciate da varie specie cellulari sotto l'influenza di particolari stimoli provenienti dal microambiente e dal circolo sanguigno; agiscono sulla superficie cellulare legandosi a specifici recettori e da tale interazione originano segnali intracellulari differenti a seconda del fattore interessato.

Tra i numerosi recettori transmembrana per i fattori di crescita, molti hanno attività proteinchinasica; tra di essi ad esempio vi sono: il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR), il recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR), il recettore per l'insulina, il recettore per il fattore di crescita 1 insulino-simile (IGFR-1) ed altri ancora. Questi recettori hanno in comune un dominio extracellulare per il ligando, un dominio transmembrana idrofobo ed un dominio citoplasmatico che contiene la regione catalitica tirosinchinasica. L'unione di un ligando come EGF oppure PDGF al loro rispettivo recettore induce le molecole del recettore a combinarsi in dimeri attivati ed a fosforilarsi nel residuo aminoacidico della tirosina. Questa sequenza di eventi conduce alla combinazione di proteine di segnale intracitoplasmatico con i recettori autofosforilati, dando luogo alla fosforilazione di proteine bersaglio e all'attivazione di vie di segnale intracellulari (Auger and Cantley 1991). Nelle cellule normali, i recettori per i fattori di crescita che sono stati attivati vengono rapidamente internalizzati dalla superficie cellulare e sono soggetti a modificazioni che inibiscono la loro attività enzimatica. Questa inibizione fisica e biochimica assicura che un fattore di crescita possa indurre soltanto segnali proliferativi transitori riportando la cellula nel suo stato di riposo. Tuttavia, varie alterazioni strutturali possono bloccare i recettori in una forma attivata nella quale il dominio tirosinchinasico è continuamente attivo anche in assenza del fattore di

crescita. Le cellule che esprimono tali varianti oncogene dei recettori sono soggette a segnali proliferativi che possono condurre alla crescita neoplastica.

I fattori di crescita angiogenici più conosciuti sono:

- *VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)*
- *FGF (Fibroblast Growth Factor)*
- *EGF (Epidermal Growth Factor)*
- *TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ )*
- *TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ )*
- *PDGF (Platelet Derived Growth Factor)*
- *TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ )*
- *HGF / SF (Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor)*
- *G-CSF e GM-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor e Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)*
- *IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1)*

Il *vascular endothelial growth factor* (VEGF) è il maggior induttore di angiogenesi (Kerbel 2008), perciò, si deve prestare particolare attenzione all'inibizione del suo recettore tirosinchinasico per bloccare la formazione di nuovi vasi sanguigni che andranno a sostenere la crescita della massa tumorale (Folkman 2007).

### **1.3 VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)**

È l'unico fattore ad attività mitogena specifica per le cellule endoteliali capace di agire sui vasi sia del macro che del microcircolo. Viene indicato anche come fattore di permeabilità vascolare (VPF) in quanto aumenta la permeabilità degli endoteli ematici e linfatici; ha inoltre importanti funzioni anti-apoptotiche. Sono molte le specie cellulari (cellule tumorali ed infiammatorie, piastrine, cheratinociti, osteoblasti, cellule endoteliali, cellule murali) capaci di rilasciare VEGF sotto l'azione di stimoli specifici, tra i quali l'ipossia (uno dei più potenti), ma anche alcune interleuchine, oncogeni (*ras*) ed altri fattori di crescita (EGF, TGF $\gamma$ ).

Alla famiglia di VEGF appartengono diversi membri (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e il *placental growth factor*) dei quali il più importante e il più conosciuto è VEGF-A.

VEGF-A è una glicoproteina con peso molecolare di circa 45 kDA della quale esistono quattro diverse isoforme: VEGF121, VEGF165, VEGF189; VEGF206 rispettivamente costituite da 121, 165, 189 e 206 aminoacidi; la isoforma più stabile e quella più rappresentativa è il VEGF 165. Il VEGF121 esiste in forma solubile, mentre il VEGF165 esiste in forma in parte legata ed in parte solubile. Le altre isoforme sono tenute saldamente legate alla matrice extracellulare dall'elevata affinità per la proteina. Sono, quindi, due i meccanismi che rendono disponibile VEGF per le cellule endoteliali: la secrezione di isoforme solubili e il clivaggio proteolitico delle forme legate (Houck, Leung et al. 1992) (Park, Keller et al. 1993).

VEGF svolge quattro principali attività biologiche, tutte correlate con l'induzione dell'angiogenesi:

- 1) crescita e proliferazione delle cellule dell'endotelio vascolare;
- 2) migrazione delle cellule dell'endotelio vascolare;
- 3) sopravvivenza delle cellule endoteliali immature attraverso la prevenzione dell'apoptosi;
- 4) aumento della permeabilità vascolare dei capillari (Ferrara 2000); (Neufeld, Kessler et al. 2001).

Lo splicing differenziale ed il clivaggio proteolitico delle forme più grandi di VEGF potrebbero contribuire al controllo dell'attività di VEGF, ma i principali mezzi di regolazione sembrano basarsi sull'induzione o sulla soppressione del suo gene nonché sulla stabilità del suo RNA. L'espressione del gene è regolata da diversi elementi: ipossia, pH, fattori di crescita, trasformazione cellulare, ormoni, oncogeni.

Il fattore meglio conosciuto è l'ipossia, nella quale i fattori di trascrizione HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  sono stabilizzati e portati nel nucleo dove interagiscono con HIF-1 $\beta$ . Il complesso si lega, quindi, ad una specifica sequenza del gene VEGF, definito elemento di risposta all'ipossia (HRE), stimolandone la trascrizione (Ikeda, Achen et al. 1995); (Ferrara 2001). La regolazione dell'espressione di VEGF ad opera della tensione di ossigeno potrebbe coinvolgere anche un soppressore tumorale, la proteina VHL, all'apparenza in grado di ridurre l'espressione di VEGF in condizioni di normossia.

Diversi fattori di crescita, citochine e ormoni hanno evidenziato la capacità di indurre l'espressione dell'mRNA di VEGF e/o la produzione della proteina

VEGF *in vitro*; ricordiamo velocemente: EGF, TGF- $\beta$ , IGF-1, IL-1 $\alpha$ , IL-6, la prostaglandina E2, il TSH, l'angiotensina II e l'ACTH (Ferrara 2001). L'effetto biologico di VEGF si esplica attraverso il suo legame con specifici recettori tirosinchinasici; ne sono stati individuati tre: VEGFR-1 (Flt-1; fms-like tyrosin kinase-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR; fetal liver kinase-1) e VEGFR-3 (Flt-4). Vi sono, inoltre, recettori di VEGF privi di attività tirosin-chinasica: la neuropilina-1 e la neuropilina-2.

VEGFR-1 e VEGFR-2 si trovano espressi quasi esclusivamente sulla superficie delle cellule endoteliali, VEGFR-3 invece sugli endoteli dei vasi linfatici, mentre le neuropiline sono state considerate originariamente come regolatrici degli assoni delle cellule nervose e agiscono come cofattori dei recettori di VEGF. VEGF-A è in grado di legarsi sia a VEGFR-1 che a VEGFR-2; VEGF-C e VEGF-D si legano invece a VEGFR-2 e a VEGFR-3, mentre VEGF-B soltanto a VEGFR-2. Nell'età adulta, il ruolo di VEGF è limitato, ma è stato dimostrato il suo coinvolgimento in condizioni patologiche quali l'infiammazione, l'artrite reumatoide e l'edema cerebrale. La patologia in cui il ruolo di VEGF è stato meglio studiato e compreso è senza dubbio il tumore, per il quale VEGF è essenziale ai fini dello sviluppo. Nell'uomo numerosi studi hanno evidenziato l'elevata espressione di VEGF nei tessuti e nel sistema circolatorio tumorale di molte neoplasie solide. In questi studi, l'espressione aumenta con il progredire della neoplasia verso forme più maligne e correla con l'estensione del sistema vascolare del tumore. È stata anche evidenziata la concomitante sovraespressione del VEGFR sulle cellule endoteliali dei vasi sanguigni più vicini al tumore. In molti studi, l'incremento di VEGF non riguardava solo i livelli tumorali, ma anche quelli plasmatici, per i quali è stata evidenziata un'associazione significativa con la stadiazione della malattia e con la progressione metastatica. In un tumore, oltre all'azione dell'ipossia, diversi oncogeni e alcuni soppressori tumorali promuovono la produzione di VEGF. Tra questi si ricordino: ras src, erbB2/HER2, c-myc, p53, p16, VHL. Nell'insieme, la tendenza dei tumori a diventare ipossici a causa della rapida crescita e l'effetto positivo dell'attivazione degli oncogeni tumorali sull'espressione di VEGF creano a livello locale un ambiente favorevole all'angiogenesi.



Molti studi in diversi tumori hanno evidenziato una forte correlazione tra aumento dei livelli di VEGF e prognosi favorevole. Studi genetici hanno dimostrato che tale fattore di crescita è essenziale per lo sviluppo fetale: topi privi dei recettori 1 e 2 non sopravvivevano all'ottavo-nono giorno di gestazione; topi privati del solo recettore Flk-1 presentavano invece anomalie endoteliali a livello delle cellule ematopoietiche, mentre quelli senza recettore Flt-1 mostravano una aumentata crescita degli endoteli ed una struttura vascolare disorganizzata. Ciò dimostra che i due tipi di recettori hanno funzioni biologiche diverse e utilizzano vie differenti di traduzione del segnale per esprimere le loro attività.

Il legame tra VEGF e il suo recettore determina l'attivazione dello stesso mediante reazioni di fosforilazione enzimatica e la formazione di secondi messaggeri intracellulari come il *messenger-producing enzymes phospholipase* Cy (PLCy), la protein chinasi mitogena (MAPK), le tirosin-fosfatasi *SHP1* e *SHP2* che infine trasmettono il segnale alla catena di sintesi proteica della cellula.

A livello endoteliale VEGF utilizza segnali di trasduzione intracellulari non accessibili ad altri fattori di crescita; EGF e bFGF infatti hanno anch'essi funzione mitogena per gli endoteli vasali, ma attivano le protein chinasi MAPK in modo differente e meno specifico rispetto a VEGF.

Malignità ed invasività metastatica di un tumore dipendono quindi in gran parte dalla sua capacità di esprimere VEGF: molte specie tumorali (tra cui adenocarcinoma mammario, carcinoma polmonare, sarcoma uterino, carcinoma colon-rettale, angiosarcoma) secernono, infatti, questo importante fattore di crescita.

Le molteplici funzioni di VEGF sono così riassunte:

- attività mitogena per le cellule endoteliali e, con poche eccezioni, su altri tipi cellulari (monociti);
- attivazione e aumento della secrezione degli enzimi che degradano la matrice extracellulare;
- inibizione dell'apoptosi delle cellule endoteliali per aumento dell'espressione di geni con funzione anti-apoptotica (ad esempio il bcl-2);
- stimolazione alla migrazione delle cellule endoteliali;

- inibizione della differenziazione dei periciti.

#### **1.4 Inibitori delle Tirosin-chinasi**

Le proteino-chinasi sono divise in tre classi a seconda del sito di fosforilazione: le tirosino-chinasi (TK), le serino/treonino-chinasi (TSK) e le chinasi, in grado di fosforilare sia residui di tirosina che di serina/treonina. Il genoma umano codifica per 518 proteino-chinasi, le quali presentano un dominio catalitico conservato anche se differiscono nelle modalità di regolazione della catalisi. Molte patologie e, tra queste, le neoplasie sono caratterizzate da alterazioni della catena di trasmissione del segnale mediata dalle proteino-chinasi. Queste sono state, dunque, considerate bersagli selettivi per nuove terapie antineoplastiche. Le proteino-chinasi posseggono un dominio enzimatico con struttura bilobare, costituito da un lobo NH<sub>2</sub> terminale che lega l'ATP (adenosintrifosfato, il donatore di fosfato) ed un lobo COOH-terminale. Nel solco tra i 2 lobi si lega il substrato e si verifica la reazione di fosforilazione. Le proteino-chinasi possono essere localizzate a livello della membrana cellulare e funzionare da recettori per fattori di crescita (*Receptor Tyrosine Kinase*, RTK) oppure possono essere localizzate nel citosol o nel nucleo.

Oltre l'80% degli oncogeni conosciuti finora codifica per TK. Le RTK hanno 2 domini: uno extracellulare, che lega lo specifico fattore di crescita, ed uno intracellulare, provvisto di attività tirosinchinasica. Il legame del fattore di crescita causa un cambio conformazionale della proteina, che ne comporta l'attivazione. L'autofosforilazione della RTK e la successiva fosforilazione di substrati intracellulari attivano la trasduzione del segnale, la quale, alla fine, si traduce in risposte biologiche, quali proliferazione cellulare, resistenza all'apoptosi e motilità cellulare.

Come già su accennato nelle neoplasia molte proteino-chinasi sono iperespresse o dis-regolate e costituiscono un target promettente di inibitori farmacologici selettivi. Lo studio delle TK ha portato al disegno di farmaci che interagiscono con tutti i passaggi della trasmissione del segnale: dal recettore di membrana, al sito catalitico, ai secondi messaggeri alle chinasi che regolano il ciclo cellulare. Gli inibitori delle tirosin-chinasi (ITK) sono delle piccole molecole e in contrasto con gli anticorpi monoclonali sono capaci di superare la membrana cellulare; gli anticorpi monoclonali infatti agiscono solo sulle

molecole espresse nella superficie cellulare o sulle molecole secrete dalla cellula, i ITK invece sono delle piccole molecole altamente idrofobiche e possono facilmente entrare nella cellula e interagire con i domini intracellulari dei recettori o molecole segnale intracellulari.

Per quanto riguarda le modalità di legame con i recettori, la maggior parte degli inibitori scoperti finora competono con l'ATP. L'ATP è formata da un anello di adenina, da uno zucchero (ribosio) e da tre gruppi fosfati. Il legame dell'ATP alla chinasi è caratterizzato dalla formazione di legami idrogeno tra l'anello di adenina e il sito di aggancio dell'ATP alla chinasi. Nonostante la struttura dell'ATP e quella delle molecole inibitrici sia fundamentalmente diversa, alcuni elementi dei composti sono simili. Per esempio, l'anello di adenina dell'ATP, che forma legami idrogeno con la chinasi, è più o meno simile a quello osservato in pazopanib, vatalanib ed axitinib.

Gli inibitori delle tirosin-chinasi possono essere suddivisi in diverse categorie: inibitori di tipo I, II e III (Gotink and Verheul).

Gli inibitori di tipo I riconoscono la conformazione attiva della chinasi e si legano al sito di legame dell'ATP con dei legami idrogeno che mimano quelli che normalmente forma l'ATP. Un esempio di inibitore di tipo I è il sunitinib. E' stato dimostrato che sunitinib compete con l'ATP per l'inibizione del recettore VEGFR-2 (Flk-1) e del recettore PDGFR- $\beta$  (Mendel, Laird et al. 2003). Sunitinib è inoltre un ben noto inibitore di VEGFR-1 e 3, PDGFR- $\alpha$ , KIT, FLT-3, CSF-1R e RET ((Faivre, Demetri et al. 2007).

A differenza degli inibitori chinasi di tipo I, gli inibitori chinasi di tipo II riconoscono la conformazione inattiva di una chinasi. Gli inibitori di tipo II sono in competizione indiretta con l'ATP occupando la tasca idrofobica accanto al sito di legame dell'ATP, modulando l'attività della chinasi attraverso una via allosterica. Alcuni inibitori di tipo II sono in grado di formare un legame idrogeno direttamente sul sito di legame dell'ATP, nonostante questo non sia necessario per il suo funzionamento (Liu and Gray 2006). Sorafenib è un inibitore di chinasi di tipo II (Wan, Garnett et al. 2004) e blocca la fosforilazione di VEGFR, PDGFR, Raf, e Kit, legandosi ad una tasca idrofobica per competere (indirettamente) con ATP.

Una terza classe di inibitori delle chinasi è nota come inibitori "covalenti". Si è scoperto che questi inibitori si legano in modo covalente alle cisteine, che sono

dei siti specifici della chinasi. Lo zolfo (S), presente nel residuo di cisteina, è un atomo ricco di elettroni, che reagisce con un gruppo elettrofilo dell'inibitore. Quindi l'inibitore e il residuo di cisteina si legano irreversibilmente. Ciò permette all'inibitore di bloccare il legame dell'ATP alla chinasi e ostacolare l'attivazione della chinasi stessa (Kwak, Sordella et al. 2005). Esempi di inibitori covalenti tirosin-chinasici sono gli inibitori basati sulla chinazolina (Wissner, Fraser et al. 2007) come vandetanib (ZD6474, Zactima, AstraZeneca), che oltre al VEGFR inibisce anche l'EGFR (Morabito, Piccirillo et al. 2009). Vandetanib è un derivato dell'anilino-chinazolina e inibisce l'attivazione di chinasi tramite legami covalenti al gruppo cisteinico della stessa.

Molti di questi farmaci sono in fase di avanzata ricerca clinica e alcuni fanno già parte dell'armamentario terapeutico corrente. L'introduzione in clinica di questi farmaci ha consentito di acquisire nozioni fondamentali per il trattamento delle neoplasie. In particolare, l'utilizzo di farmaci come i TKI, in grado di inibire specifiche protein-chinasi, ha dimostrato che è possibile ottenere risultati clinici importanti in assenza delle gravi tossicità associate solitamente all'uso dei farmaci citotossici.

Tra le piccole molecole (inibitori tirosinchinasi), 3 agenti sono ad oggi approvati per il trattamento di tumori solidi: imatinib, gefitinib, erlotinib.

- **Imatinib**, inibitore delle proteinchinasi BCR-ABL, PDGFR e KIT, è approvato per il trattamento della leucemia mieloide cronica e dei tumori stromali gastrointestinali (GIST). Nello studio STIB2222, condotto negli Stati Uniti e in Finlandia su 147 pazienti affetti da GIST in fase avanzata, il farmaco ha determinato una risposta parziale nel 66,7% dei casi e un beneficio terapeutico in più dell'80% dei casi, con una sopravvivenza mediana libera da progressione di circa 18 mesi, modificando significativamente la storia naturale della malattia. Due successivi studi di fase III hanno confermato tale efficacia, evidenziando una sopravvivenza globale a 2 anni pari al 69-78%, nettamente superiore rispetto ai controlli storici dei pazienti sottoposti a chemioterapia. Sulla base della straordinaria efficacia dimostrata, sono stati avviati studi sull'impiego del farmaco come trattamento adiuvante e neoadiuvante dei GIST, di cui si attendono a breve i risultati.

- **Gefitinib** è un antagonista del recettore erbB1, il cui meccanismo d'azione consiste nell'inibizione, per competizione con l'ATP, dell'attività catalitica tirosinchinasica del recettore. Questa piccola molecola è stata approvata per il trattamento di II linea del tumore polmonare non a piccole cellule, avendo pari efficacia e minor tossicità rispetto al trattamento chemioterapico standard con taxotere. Due studi multicentrici randomizzati di fase III placebo controllati (INTACT 1 e 2) hanno fallito nel dimostrare un vantaggio della combinazione polichemioterapia + gefitinib vs polichemioterapia + placebo nel trattamento di I linea della malattia metastatica: non è stata, infatti, registrata alcuna differenza statisticamente significativa in termini di sopravvivenza globale, tempo alla progressione e remissioni di malattia.
- **Erlotinib**, altro antagonista del dominio tirosinchinasico dell'EGFR, ha dimostrato di essere efficace in monoterapia nel trattamento di II-III linea del tumore polmonare non a piccole cellule metastatico. Da uno studio randomizzato di fase III è, infatti, emerso un tasso di risposta obiettiva nell'8,9% dei pazienti e una significativa superiore sopravvivenza globale (6,7 vs 4,7 mesi) rispetto al placebo. Anche nel caso di erlotinib, 2 studi di combinazione con polichemioterapia nel trattamento di I linea del tumore polmonare non a piccole cellule metastatico non hanno mostrato i vantaggi attesi, rispetto alla sola chemioterapia. Il farmaco ha dato risultati interessanti, nel trattamento di I linea del carcinoma pancreatico, in uno studio multicentrico internazionale di fase III in doppio cieco di confronto tra gemcitabina + erlotinib e gemcitabina + placebo su 569 pazienti con malattia avanzata. I risultati presentati nel 2005 al congresso della Società Americana di Oncologia hanno dimostrato una superiorità in sopravvivenza globale (6,37 vs 5,91 mesi,  $p \leq 0,025$ ) nel braccio con erlotinib.

### **1.5 Tossicità degli inibitori delle tirosinchinasi**

Molti inibitori anti-angiogenici di tirosin-chinasi sono inibitori chinasi multi-target. Questi agenti hanno come target un certo numero di chinasi, che sono coinvolte in diverse vie di trasduzione del segnale. È ragionevole aspettarsi che gli inibitori di molteplici chinasi abbiano un'efficacia più ampia rispetto a un inibitore mono-target. Ad esempio, la pathway del VEGF e quella PDGF hanno entrambe un ruolo importante per l'angiogenesi. Per l'inibizione

dell'angiogenesi ci si aspetta che un inibitore multi-target, che blocca sia la pathway del VEGF che quella del PDGF, sia più efficace di un inibitore che ha come target solo una di queste vie. Inoltre, essendo gli inibitori altamente selettivi, le tossicità indotte dal trattamento dovrebbero essere ridotte (Eskens and Verweij 2006). Le tossicità osservate nel trattamento con gli inibitori di tirosin-chinasi sono diverse e le più comuni sono: ipertensione, emorragia, fatica, diarrea, nausea e/o vomito, sindrome hand foot e mielosoppressione ridotte (Eskens and Verweij 2006; Bhojani, Jeldres et al. 2008). La sindrome hand foot, in particolare, ovvero la comparsa di arrossamento nella pianta del piede e nel palmo delle mani (arrossamento che può essere accompagnato da vescicole, screpolature e tagli), è uno degli effetti collaterali che può diventare invalidante nei pazienti che assumono questi farmaci.

Altre tossicità con bassa frequenza includono l'ipotiroidismo, funzione compromessa del rene e la sindrome reversibile di leucoencefalopatia superiore e, durante il trattamento con sunitinib, i livelli di emoglobina e il numero di eritrociti aumentano in modo transitorio (van der Veldt, Boven et al. 2009)

### **1.6 Resistenza ai farmaci**

I PKI sono composti generalmente ben tollerati, con effetti collaterali abbastanza modesti rispetto agli agenti chemioterapici tradizionali. Un problema importante, emerso nel corso del loro utilizzo, è rappresentato dallo sviluppo di resistenza. Bisogna distinguere una *resistenza primaria*, o refrattarietà, che si manifesta sin dall'inizio del trattamento, ed una *resistenza secondaria*, che si sviluppa nel corso del trattamento.

Spesso la resistenza primaria è mediata da difetti di assorbimento, di distribuzione oppure di escrezione del farmaco. Per esempio, è stato recentemente osservato che l'assorbimento e la distribuzione tissutale di molti PKI sono mediati da proteine di membrana appartenenti alla famiglia dei trasportatori ABC. Questi trasportatori sono implicati nella resistenza a chemioterapici tradizionali, definita *multidrug resistance*. Naturalmente, la mancata risposta primaria può essere anche dovuta ad un'erronea scelta del bersaglio molecolare. Infatti, tumori la cui crescita non dipende dalla proteina-chinasi bersaglio del PKI traggono, ragionevolmente, scarso vantaggio dal suo utilizzo. Il gefitinib, per esempio, si è dimostrato efficace nei carcinomi

polmonari che presentano mutazioni dell'EGFR, mentre ha effetti modesti nei tumori che esprimono il recettore normale. Infine, la resistenza primaria può essere mediata dalla presenza di mutazioni che rendono la chinasi insensibile all'inibizione da parte dello specifico PKI. Per esempio, alcuni mutanti di c-KIT e PDGFR riscontrati nei GIST, soprattutto i mutanti del dominio chinasi, sono scarsamente sensibili all'imatinib. La resistenza secondaria è un fenomeno piuttosto frequente nell'utilizzo dei PKI. Molti dei pazienti affetti da CML, nei quali si osserva iniziale remissione in seguito al trattamento con l'imatinib, cessano di rispondere al farmaco dopo mesi o anni di trattamento. Nella maggioranza dei casi, questa resistenza è causata dalla selezione di cellule neoplastiche che hanno sviluppato mutazioni del dominio tirosin-chinasi di BCRABL. Queste mutazioni impediscono il legame con il farmaco e rendono, dunque, la chinasi resistente. Lo stesso tipo di resistenza è stato riscontrato nei pazienti con GIST trattati con imatinib o nei pazienti con carcinoma polmonare trattati con gefitinib. Uno specifico residuo aminoacidico, localizzato nel sito di legame all'ATP delle varie chinasi, è spesso il bersaglio delle mutazioni che causano resistenza. Resistenza secondaria è stata riscontrata anche in trattamenti con gefitinib ed erlotinib. Questi due farmaci hanno come target il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e sono utilizzati per trattamenti in pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule e in altri tipi di tumore. Mutazioni somatiche attivanti nel recettore EGFR sono state associate alla sensibilità a questi due farmaci (Pao, Miller et al. 2004). Nonostante le risposte cliniche a questi due inibitori, molti pazienti acquisiscono resistenza durante il trattamento. Un meccanismo di resistenza acquisita è una specifica mutazione secondaria nell'EGFR. In presenza di questa seconda mutazione, gli inibitori chinasi non sono capaci di inibire la fosforilazione della chinasi target.

L'identificazione di composti che possano superare questi meccanismi di resistenza è, pertanto, la nuova frontiera delle terapie molecolari basate sull'utilizzo di PKI.

Un altro possibile meccanismo coinvolto nella resistenza al trattamento può essere l'eccesso di vie di trasduzione del segnale che sono coinvolte nell'angiogenesi. Sebbene il segnale mediato dal VEGF sia il promotore principale dell'angiogenesi, vi sono altri meccanismi angiogenici che

sostengono la crescita del tumore. L'attivazione di queste vie può ovviare alla eventuale inibizione da parte degli inibitori anti-angiogenici tirosin-chinasici. Per esempio, i recettori Tie, insieme con i loro due maggiori ligandi angiopoietina-1 (Ang-1) e Angiopoietina-2 (Ang-2) sono vie alternative per indurre risposte biologiche coinvolte nell'angiogenesi, come la maturazione dei vasi (Augustin, Koh et al. 2009). La pathway del PI3K/Akt è un esempio di pathway del segnale di VEGFR, che può anche essere attivata dal segnale angiopoietina-Tie2 (Shibuya 2008). L'inibizione delle vie di trasduzione del segnale mediate da VEGFR può non essere sufficiente a inibire completamente le vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'angiogenesi, e di conseguenza, i tumori possono crescere e progredire nonostante l'inibizione della via del VEGF. Perciò, un'acquisita resistenza può anche essere una conseguenza di segnali alternativi di cellule tumorali, tra cui la produzione di fattori alternativi di crescita angiogenica.

### **1.7 Strategia ottimale di trattamento: inibitori multi target e inibitori di combinazione**

Lo sviluppo di nuove molecole, quali gli inibitori di chinasi e gli anticorpi monoclonali, ha aperto una nuova era per il trattamento dei tumori. Proprio grazie alla loro selettività, le terapie molecolari dovranno essere "personalizzate", ossia basate sulla conoscenza dello specifico difetto molecolare presente nel paziente. Tali trattamenti hanno l'enorme vantaggio di poter essere somministrati per via sistemica. Esistono, tuttavia, ancora molti problemi irrisolti nell'impiego di queste strategie terapeutiche. I tumori sono eterogenei e sono composti da cellule che, spesso, hanno diverse alterazioni genetiche. Di conseguenza, è improbabile che l'inibizione farmacologica di una sola proteina possa bloccare completamente la crescita cancerosa. L'uso combinato di più farmaci "molecolari" diretti contro più proteine bersaglio oppure la combinazione di approcci molecolari con chemioterapia o radioterapia potrà ovviare a questo problema. L'uso contemporaneo di più farmaci potrà anche ridurre lo sviluppo di resistenza, in quanto è poco probabile che una cellula tumorale sviluppi contemporaneamente mutazioni in più proteine bersaglio di diversi farmaci.



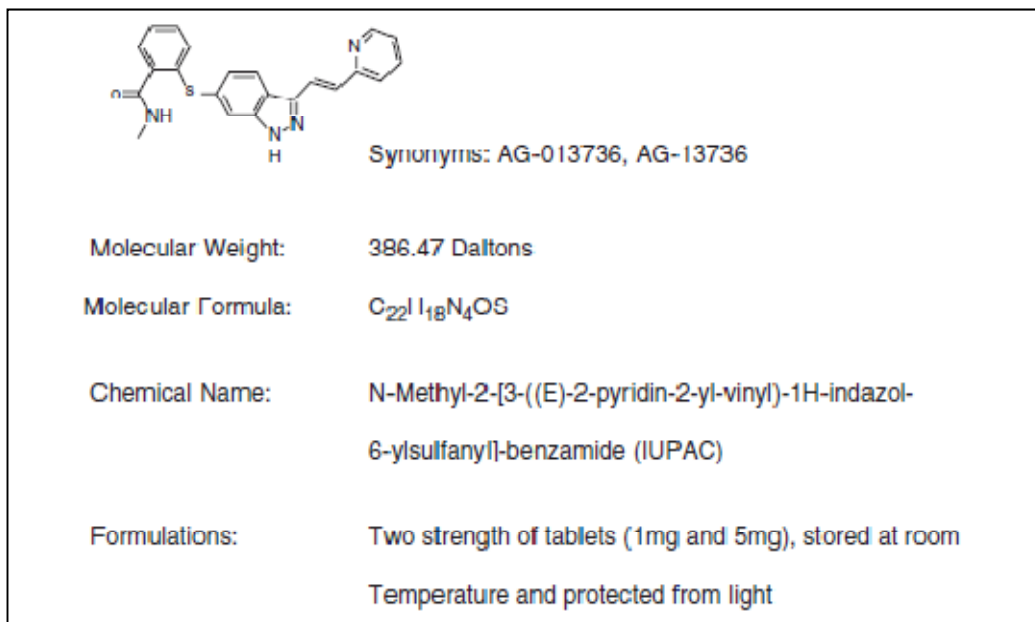
Gli antiangiogenici inibitori delle tirosin-chinasi possono essere combinati in modo diverso. In primis, gli inibitori antiangiogenici delle tirosinchinasi potrebbero essere combinati con altri farmaci antiangiogenici oppure una seconda strategia potrebbe essere quella di combinare gli agenti antiangiogenici con altre terapie antitumorali, ad esempio la terapia convenzionale citotossica (Jain 2001). La chemioterapia e la terapia di radiazioni danneggiando direttamente le cellule endoteliali può migliorare gli effetti antiangiogenici (Hicklin and Ellis 2005) (Jain 2005). Inoltre, combinare gli agenti antiangiogenici con la chemioterapia ritarda potenzialmente lo sviluppo della resistenza alle sostanze antiangiogeniche e alla chemioterapia (Jain 2001; Kerbel 2006).

### **1.9 Prospettive**

L'angiogenesi come bersaglio per la lotta contro il cancro è stato sviluppato come una nuova strategia di trattamento antitumorale qualche decennio fa. Le terapie anti-angiogeniche mostrano un'efficacia clinica in diversi tipi di tumore. Poiché nell'angiogenesi sono coinvolte differenti fattori di regolazione e vie di trasduzione del segnale, le terapie antiangiogeniche potrebbero causare tossicità e resistenza ai farmaci. Gli inibitori selettivi tirosin-chinasi hanno il vantaggio di minimizzare la comparsa di effetti tossici. Daltronde, i TKI multi-target, o una combinazione tali farmaci, possono avere come bersaglio le vie angiogeniche addizionali e possono avere ampia efficacia evitando fenomeni di resistenza.

## CAPITOLO 2

### 2.1 Axitinib



Axitinib è un potente inibitore (ATP competitivo) della tirosin-chinasi del recettore VEGFR1, 2, e 3 e anche un debole inibitore del PDGFR-b. Axitinib non è un potente inibitore delle chinasi strettamente connesse con FGFR-1, Flt-3, o Tie-2. Axitinib blocca l'adesione delle cellule endoteliali mediata dal VEGF e la migrazione delle proteine nella matrice extracellulare e induce l'apoptosi endoteliale nelle colture cellulari già dopo 6 ore dopo il trattamento. E' stato anche dimostrato che axitinib produce una rapida e potente inibizione di eNOS, Akt, e la fosforilazione di ERK1/2, a concentrazioni che correlano con la sua potente azione su VEGFRs (Hu-Lowe, Zou et al. 2008).

In vitro, axitinib limita in maniera diretta l'attività di VEGFR, PDGFR-b, e KIT. Studi *in vivo* di DCE-MRI hanno mostrato che il trattamento con axitinib determina una diminuzione complessiva del flusso sanguigno tumorale e della permeabilità vascolare già 2 giorni dopo l'inizio del trattamento, con una riduzione massima di  $K^{trans}$  (costante di trasferimento del volume endoteliale) osservata dopo il 7 giorno di assunzione. Gli studi hanno inoltre mostrato che i cambiamenti nella  $K^{trans}$  vascolari sono correlati con una diminuzione della densità dei microvasi, vitalità cellulare e crescita tumorale (Wilmes, Pallavicini

et al. 2007). L'attività antiangiogenica di axitinib è stato anche valutata attraverso la misurazione della densità dei microvasi tumorali (MVD, misurata attraverso colorazione CD-31) dopo trattamento acuto o prolungato in modelli tumorali di xenotrapianto. Un ulteriore studio ha dimostrato che la neoangiogenesi si è verificata sin dal 1 giorno dopo la sospensione del trattamento, che i tumori sono stati completamente rivascolarizzati entro 7 giorni, e che ancora si ha una risposta al secondo ciclo di axitinib. Sulla base di questa osservazione, una somministrazione giornaliera continua di axitinib sarebbe ottimale per l'attività antiangiogenica (Hu-Lowe, Zou et al. 2008). Axitinib ha dimostrato attività antitumorale additiva o sinergica con docetaxel in modelli murini di tumore al polmone e tumore alla mammella umano, con carboplatino in un modello di tumore ovarico, e con gemcitabina in un modello di tumore al pancreas umano, determinando quindi un aumento del potere antitumorale (Rugo, Herbst et al. 2005). Studi su animali hanno dimostrato che sia dosaggi p.o., due volte al giorno (10 e 30 mg/kg), sia continue infusioni sottocutanee di axitinib (3, 10 e 30 mg/mL) hanno determinato un'esposizione al farmaco simile (stimata con AUCs), e che i livelli di Cmax realizzati nel gruppo di dosaggio p.o. non sono stati raggiunti in nessuno dei gruppi di infusione; inoltre una maggiore e/o massima TGI (inibizione della crescita tumorale) è stato raggiunta per via di infusioni continue del composto (Hu-Lowe, Zou et al. 2008).

Un ulteriore studio è stato condotto per valutare se, dopo un trattamento iniziale con axitinib seguita da un periodo prolungato di interruzione del dosaggio, i tumori sarebbero divenuti refrattari a axitinib e avrebbero cominciato a sviluppare una resistenza. I risultati hanno indicato che i tumori ricresciuti dopo circa 11 giorni di sospensione della somministrazione continuano a rispondere al trattamento con axitinib. Tuttavia, facendo un confronto con i continui dosaggi quotidiani (due volte al giorno), l'interruzione del trattamento con axitinib per 11 giorni compromette significativamente l'entità complessiva del TGI alla fine. Il continuo dosaggio giornaliero di axitinib sembra essere necessario per un'efficacia antitumorale ottimale.

Studi *in vitro* sul metabolismo dimostrano che il metabolismo di axitinib nel fegato è mediato principalmente dal CYP3A4, e in misura minore dal CYP1A2. La farmacocinetica di axitinib può essere influenzata quindi dagli

inibitori e induttori di CYP3A4. L'esposizione sistemica di axitinib può essere influenzata da farmaci che sono substrati o inibitori della glicoproteina-P.

Gli studi *in vivo* sul metabolismo mostrano che la via di biotrasformazione include ossigenazione, glucuronidazione, glucosilazione, e l'ossigenazione seguita da glucuronidazione o glucosilazione. Axitinib ha due principali metaboliti del plasma umano, un solfossido e un N-glucuronide.

## **2.2 Biodisponibilità nell'uomo**

Fin dagli inizi del 2007, 21 studi hanno valutato la sicurezza, l'efficacia e la PK di axitinib. In questi studi erano inclusi sette studi di fase I con soggetti sani e 14 studi con soggetti malati di cancro. Axitinib nella fase di nutrimento è assorbito rapidamente, con concentrazioni plasmatiche di picco entro 2-6 ore dopo la somministrazione. La velocità e l'entità dell'assorbimento del farmaco è stata maggiore a digiuno durante la notte, con un picco di concentrazione dopo 1-2 ore dalla somministrazione, indicando un significativo effetto del cibo (Rugo, Herbst et al. 2005). Tuttavia, ulteriori studi hanno confermato che il digiuno notturno non è richiesto e studi in corso raccomandano l'assunzione del farmaco con il cibo. L'emivita del farmaco, e quindi l'eliminazione dal plasma varia dalle 2 alle 5 h. La media di biodisponibilità assoluta di axitinib orale è stata del 58%. Questa stima indica che circa il 58% della dose somministrata di axitinib raggiunge la circolazione sistemica dopo somministrazione orale (Rugo, Herbst et al. 2005). Gli studi hanno dimostrato che l'effetto del pH sull'assorbimento di axitinib non è stato considerato clinicamente significativo, ma nei pazienti che assumono axitinib, antiacidi o IPP dovrebbero essere somministrati almeno 2 h prima e 2 h dopo il dosaggio del farmaco (Rugo, Herbst et al. 2005).

## **2.3 Studi clinici**

### **2.3.1 Axitinib nel carcinoma cellulare renale**

Negli ultimi anni, nuovi promettenti trattamenti e farmaci sperimentali che inibiscono l'angiogenesi sono stati valutati nel RCC. Nei pazienti con carcinoma renale metastatico refrattario alle citochine, la mediana della sopravvivenza libera da progressione è di 4,8 mesi nei pazienti trattati con alte dosi di bevacizumab e 5,5 mesi quelli trattati con sorafenib (Escudier, Eisen et

al. 2007), con risposte obiettive del 10% per entrambi i farmaci. Sunitinib ha mostrato un'oggettiva velocità di risposta del 40% nei pazienti che hanno fallito il trattamento con citochine (Motzer, Michaelson et al. 2006), una elevata risposta oggettiva (31%) e una più lunga sopravvivenza libera da progressione rispetto all'interferone alfa in pazienti non trattati in precedenza (Motzer, Hutson et al. 2007). Sunitinib e Sorafenib hanno un ampio approccio multi target e contemporaneamente inibiscono numerosi recettori tirosin-chinasici, tra cui il recettore del VEGF, il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine, e la tirosin chinasi c-KIT e FLT3. È stato osservato che la specificità e l'elevata potenza di quantità picomolari di axitinib, contro recettori del VEGF-1, -2, e -3, che svolgono un ruolo importante nella patogenesi del carcinoma cellulare renale, spiegherebbe la significativa attività antitumorale del farmaco.

Axitinib è uno dei primi inibitori delle tirosin-chinasi sviluppato nel carcinoma renale metastatico, e risultati preliminari sono stati segnalati nel 2005 al congresso dell' ASCO da Rixe et al. L'efficacia di axitinib (5 mg due volte al giorno) in pazienti (n = 52) con RCC metastatico, la cui malattia era refrattaria al trattamento delle citochine, è stata dimostrata in uno studio clinico non randomizzato di fase II (Rixe, Bukowski et al. 2007). I pazienti sono stati trattati in cicli di 28 giorni di trattamento fin quando non si è avuta una progressione della malattia o una tossicità inaccettabile. L'analisi dei risultati mostrano due risposte complete e 21 parziali, per un ORR (*objective response rate*) del 44,2% (95% CI 30,5-58,7). La durata media delle risposte è stata di 23,0 mesi. Ventidue pazienti hanno mostrato una stabilizzazione della malattia per più di 8 settimane, inclusi 13 pazienti con malattia stabile per almeno 24 settimane. Stabilità di malattia è stata osservata solo nel paziente con istologia papillare, che al giorno 71 ha avuto un calo del 27,3% del diametro del tumore (come definito da RECIST). La mediana del tempo di progressione è stato di 15,7 mesi e la mediana della sopravvivenza globale è stata di 29,9 mesi. In studi secondari in 13 pazienti (7 responders e 6 pazienti non responders), è stato osservato una diminuzione della perfusione del tumore nei pazienti che rispondevano al trattamento. La diminuita perfusione è correlata con una migliore risposta in 4 su 6 pazienti con malattia stabile o progressiva (Rixe, Bukowski et al. 2007). I risultati ottenuti da questo studio di fase II indicano

che Axitinib è un potente agente per il trattamento del carcinoma renale metastatico.

Uno studio clinico di fase II ha valutato axitinib (5 p.o. mg, due volte al giorno) in pazienti (n = 62) con RCC avanzato e refrattario inutilmente trattato in precedenza con sorafenib (Rini 2005). Una risposta parziale è stato osservata in 13 pazienti (21%), malattia stabile in 21 pazienti (34%), e la progressione della malattia in 16 pazienti (26%). Una riduzione della massa tumorale è stato osservato nel 57% dei pazienti. Un'analisi preliminare, dopo una mediana di follow-up di 8,1 mesi ha mostrato una mediana della progressione totale, libera da sopravvivenza, di 7,4 mesi. Questi risultati preliminari suggeriscono l'assenza di resistenza incrociata tra axitinib e sorafenib per un limitato ma significativo sottogruppo di pazienti.

### ***2.3.2 Axitinib nel tumore al pancreas***

Il VEGF promuove la crescita tumorale nell'adenocarcinoma pancreatico duttale (KORC 2003). Un'alta espressione di VEGF è associata con un'aumentata densità dei microvasi, ed è un fattore predittivo di recidività del tumore precoce dopo resezione con scarsi risultati (Niedergethmann, Hildenbrand et al. 2002). L'aggiunta di bevacizumab alla gemcitabina non è riuscito a dimostrare un vantaggio di sopravvivenza se confrontato con gemcitabina da sola nel carcinoma pancreatico avanzato (Kindler 2007). Questo studio suggerisce l'uso di inibitori del VEGF, nell'adenocarcinoma pancreatico, con un meccanismo d'azione diverso rispetto al bevacizumab.

Uno studio clinico di fase II, randomizzato, è stato condotto per determinare la percentuale di sopravvivenza relativa in pazienti (n = 103) con tumore al pancreas metastatico trattati o con la combinazione di axitinib e gemcitabina o con gemcitabina da sola (Spano, Chodkiewicz et al. 2008). I pazienti sono stati trattati con gemcitabina (1.000 mg/m<sup>2</sup> nei giorni 1, 8 e 15) e axitinib (5 mg due volte al giorno) con cicli di 28 giorni, o solo con gemcitabina 1.000 mg/m<sup>2</sup> nei giorni 1, 8, e 15. Il fine primario era la sopravvivenza globale. La mediana della sopravvivenza globale con il trattamento di combinazione è stata di 6,9 mesi, rispetto ai 5,6 mesi con la sola gemcitabina. I risultati sulla sopravvivenza libera da progressione sono coerenti con quelli della sopravvivenza assoluta. La mediana della sopravvivenza libera da progressione

con axitinib più gemcitabina è stata di 4,2 mesi (95% CI 3.6- 10.2), rispetto al 3,7 mesi (2,2-6,7) con la sola gemcitabina. La confermata ORR (objective response rate) è stata del 7% per il gruppo gemcitabina più axitinib rispetto al 3% per il gruppo con la sola gemcitabina. Questi miglioramenti non sono risultati statisticamente significativi (hazard ratio 0,71, IC 95% 0,44-1,13 per la sopravvivenza globale; HR 0,79, CI, 0,43-1,45 per la sopravvivenza libera da progressione). In un sottogruppo di analisi, i pazienti con malattia locale avanzata e trattati con gemcitabina più axitinib hanno avuto un vantaggio di sopravvivenza generale maggiore dei pazienti con malattia metastatica (HR 0,54, 95% CI 0,26-1,12 vs HR 0,96 CI 0,52-1,77).

Questo risultato sulla sopravvivenza globale, non statisticamente significativo, è attualmente oggetto di valutazione in uno studio randomizzato di fase III con un disegno simile. Questo studio consente di variare la dose di axitinib dalla dose iniziale di 5 mg due volte al giorno ad un massimo di 10 mg due volte al giorno.

### ***2.3.3 Axitinib nel tumore metastatico alla mammella***

Uno studio di fase II ha studiato axitinib somministrato in combinazione con docetaxel vs docetaxel da solo, in soggetti affetti da carcinoma mammario metastatico che non sono stati precedentemente sottoposti a chemioterapia (n = 168). I pazienti potevano essere ammessi solo se erano trascorsi 12 mesi dalla chemioterapia adiuvante, se il tumore era misurabile, ECOG PS 0-2, e se non erano presenti metastasi cerebrali incontrollate (Rugo et al. 2005). Le dosi iniziali erano di 80 mg/m<sup>2</sup> di docetaxel (IV, una volta ogni 3 settimane) e 5 mg due volte al giorno di axitinib (o placebo-equivalenti). L'endpoint primario dello studio era il tempo di progressione.

Una media di sette cicli sono stati somministrati in ogni braccio dello studio. Il tempo mediano per la progressione è risultata di 8,2 mesi per la terapia di combinazione, rispetto ai 7 mesi per il placebo (p = 0,05) (Rugo 2007). Nel braccio di axitinib, il tasso di risposta globale è stata del 40% e per il braccio trattato con placebo il tasso di risposta è stato del 23% (p = 0,038). Un'analisi dei sottogruppi ha rivelato che il tempo mediano per la progressione della malattia in pazienti che avevano precedentemente ricevuto un trattamento con antracicline era 9,0 mesi per il braccio trattato con axitinib e 6,3 mesi per il

braccio trattato con il placebo, con un hazard ratio di 0,54 ( $p = 0,012$ ). All'interno di questo sottogruppo, la percentuale di risposta è stata del 45 e 13% per i trattati con axitinib e placebo, rispettivamente ( $p = 0,003$ ) (Rugo 2007).

#### **2.3.4 Axitinib nel tumore alla tiroide**

La prognosi per il cancro alla tiroide è in genere favorevole quando vengono applicati i procolli standard. Il tumore refrattario allo iodio radioattivo (RAI), ricorrente, o la malattia metastatica è terapeuticamente impegnativa, e la morte entro i 3 anni per tumore alla tiroide, in queste circostanze, non è rara. Il carcinoma anaplastico della tiroide è relativamente raro, generalmente non-resecabile al momento della diagnosi ed è resistente allo iodio radioattivo e alla chemioterapia. Il tumore midollare della tiroide deriva da cellule C parafollicolari. Lo iodio radioattivo non ha un ruolo nella gestione del tumore midollare della tiroide che ha una prognosi peggiore rispetto al più comune tumore papillare della tiroide (Cupisti, Wolf et al. 2007). Molti tumori avanzati della tiroide possono eventualmente sviluppare un mancato assorbimento di iodio, rendendo la chemioterapia l'unica opzione possibile per il trattamento sistemico. La doxorubicina è un farmaco approvato per insanabili tumori alla tiroide con percentuali di risposta del 10-37% (Gottlieb and Hill 1974); (Shimaoka, Schoenfeld et al. 1985). Un elemento comune dei tumori della tiroide è la loro intricata vascolarizzazione, con livelli di VEGF elevati rispetto al tessuto tiroideo papillare normale (Kilicarslan, Ogus et al. 2003). In campioni di tumore della tiroide umani, i livelli di VEGF sono correlati con lo stadio della malattia, le dimensioni del tumore, l'invasione extratiroidea e le metastasi distanti. Queste osservazioni supportano l'uso di axitinib in questa malattia. In uno studio clinico multicentrico di fase II in pazienti ( $n = 60$ ) con tumore alla tiroide metastatico misurabile o avanzato, localmente non resecabile, che è refrattario o inadatto al trattamento con lo iodio, i pazienti hanno ricevuto una dose orale 5 mg di axitinib due volte al giorno (Cohen, Rosen et al. 2008). Risposte parziali sono state osservate in 18 pazienti, ottenendo un ORR del 30% (95% CI, 18,9-43,2). Stabilità di malattia dopo circa 16 settimane è stata segnalata in altri 23 pazienti (38%). Le risposte obiettive sono state osservate in tutti i sottotipi istologici. La mediana della



PFS è stata di 18,1 mesi (95% CI, da 12,1 non stimabile). Axitinib è stato generalmente ben tollerato nonostante i più comuni eventi avversi (AE) di grado 3 correlati al trattamento come l'ipertensione (n = 7; 12%). Otto pazienti (13%) hanno interrotto il trattamento a causa di AES. Axitinib ha ridotto in maniera selettiva le concentrazioni plasmatiche di sVEGFR-2 e sVEGFR-3 vs skit, dimostrando la sua azione sul recettore VEGFR.

### **2.3.5 Axitinib in altri tumori solidi**

Uno studio clinico fase II con axitinib è stato condotto in pazienti (n = 32) con NSCLC metastatico o NSCLC avanzato con versamento pleurico maligno (Herbst, Davies et al. 2007). Nei pazienti axitinib è stato somministrato per via orale (5 mg due volte al giorno), con dosi consentite fino ai 10 mg, fino a quando la tossicità è diventata inaccettabile e la malattia ha iniziato a progredire. Tre risposte sono state confermate, con una durata media della risposta di 9,4 mesi. I pazienti con malattia stabile sono stati 10 e 9 quelli con malattia progressiva. La mediana di sopravvivenza e la sopravvivenza libera da progressione sono state di 12,5 e 5,8 mesi, rispettivamente. Il trattamento è stato interrotto per 26 pazienti per lo più a causa della mancanza di efficacia. Uno studio clinico di fase II in pazienti (n = 32) con melanoma metastatico è stato presentato da Fruehauf et al. all'ASCO 2008. L'obiettivo primario di questo studio è ORR da RECIST. La relazione di un investigator mostra un ORR del 19% (95% CI: 7-36%) che include una CR durevole. La durata media della risposta è stata 7,9 mesi, la mediana di PFS è stata di 2,3 mesi (95% CI 1,8-5,7), e la mediana OS per tutti i pazienti è stata 6,8 mesi (95% CI 5,2-10,4). Questi risultati reggono il paragone con altri farmaci sviluppati per la stessa malattia, e supporta ulteriori valutazioni. Due studi clinici di fase II, multicentrici, non randomizzati, per studiare gli effetti della combinazione di axitinib con bevacizumab e regimi chemioterapici standard, sono stati avviati in pazienti con carcinoma colonrettale metastatico. Nel primo studio, 123 pazienti ricevono FOLFOX, axitinib (5 mg due volte al giorno), bevacizumab (5 mg/kg ogni 2 settimane), o axitinib (5 mg due volte al giorno) più bevacizumab (2 mg/kg ogni 2 settimane) (studio di fase II con AG-013.736 combinato con un chemioterapico e bevacizumab nei pazienti con carcinoma coloretale metastatico. Clinicaltrials.gov 2008). Questo studio è attualmente in

corso. In un secondo studio in corso, ai pazienti, sottoposti precedentemente a un trattamento non riuscito con irinotecan o oxaliplatino, sono stati somministrati axitinib insieme con FOLFOX o FOLFIRI o bevacizumab con FOLFIRI o FOLFOX. (Uno studio di combinazione di FOLFOX o FOLFIRI con AG-013736 o avastin in pazienti con carcinoma metastatico colon-rettale dopo fallimento di una prima linea di regime. Clinicaltrials.gov 2008).

#### **2.4 Studi di fase III**

Uno studio clinico di fase III è stata avviato per confrontare il trattamento axitinib più gemcitabina con gemcitabina più placebo, in pazienti (n = 596) con carcinoma pancreatico avanzato. I pazienti ricevono gemcitabina (1.000 mg/m<sup>2</sup> i.v.) nei giorni 1, 8, e 15 ogni 4 settimane, con o senza axitinib (5 mg due volte al giorno), fino a progressione della malattia o fino a tossicità inaccettabile. L'endpoint primario in questo studio è la sopravvivenza globale (studio randomizzato di gemcitabina plus AG-013.736 vs gemcitabina per carcinoma pancreatico avanzato. Clinicaltrials. Gov 2007).

#### **2.5 Tossicità**

Gli eventi avversi riportati negli studi clinici con axitinib sono considerati gestibili, generalmente reversibili e previsti per questa classe di farmaci. Per quanto riguarda axitinib come singolo agente, i più comuni eventi avversi riportati sono l'ipertensione, la fatica e la tossicità gastrointestinale. Negli studi di fase I, la tossicità dose-limitante (DLT) è stata l'ipertensione, trattabile con i farmaci ed reversibile con la sospensione del farmaco. Nessuno dei pazienti trattati con 5 mg (due volte al giorno) aveva ipertensione che non poteva essere gestita con farmaci antipertensivi standard. In programmi clinici in corso, i soggetti ricevono una dose di partenza di 5 mg, con monitoraggio domiciliare della pressione sanguigna (prima di ogni dose) e monitoraggio in clinica al momento della visita. I soggetti che tollerano axitinib e che non presentano per 2 settimane consecutive eventi avversi maggiori del grado 2 CTCAE, aumentano la loro dose graduale a 7 mg (due volte al giorno) e poi a 10 mg (due volte al giorno), a meno che la pressione sanguigna sia > 150/90 mmHg o il soggetto sia trattato con farmaci antipertensivi. Emorragie che si sono verificati in studi di Fase I hanno incluso un caso fatale di emottisi in soggetti

con adenocarcinoma polmonare, epistassi, emorragia nella mammella, ematochezia, emorragia rettale e emorragia vaginale. Negli studi iniziali è stata osservata proteinuria asintomatica e, di conseguenza, il protocollo di fase I è stato modificato per escludere i soggetti con proteinuria al basale ( $> 500$  mg/24 h) e per modificare il dosaggio di axitinib sulla base della proteinuria. La massima dose tollerata è stata valutata 5 mg due volte al giorno per il dosaggio iniziale. Nello studio di fase II condotto in RCC metastatico (Rixe, Bukowski et al. 2007), axitinib somministrato da solo ha presentato le seguenti tossicità: il trattamento più comunemente riportato presenta eventi avversi di grado 3 o la gravità più elevata è data da ipertensione (14%), affaticamento (10%), diarrea (4%), sindrome ritroadestesia plantare palmare (3%), ipertensione aggravata (2%) e stomatite (2%). Le anomalie riscontrate nei soggetti con tumori solidi che hanno ricevuto axitinib come singolo agente erano iperglicemia di grado 3/4 nel 5,5%, l'iponatriemia o elevazione della creatinina nel 4,6%, AST in aumento nel 4,0%, e proteinuria nell' 0,8%. Le alterazioni ematologiche riscontrate erano di grado 3 o 4, neutropenia nel 0,8% e trombocitopenia nel 1,0%. Nel 19% è stata riportata linfopenia di grado 3/4. L'ipertensione è comunemente osservata durante trattamento con axitinib e altri inibitori del VEGFR. L'aumento della pressione arteriosa è stata quindi proposta come un indicatore di efficacia per gli inibitori del VEGF e dopo ciò, in due studi di fase II con axitinib in mRCC sono state eseguite analisi combinate dei dati per esplorare la possibile associazione tra la pressione diastolica  $\geq 90$  mmHg e l'endpoint di efficacia (Rixe et al. 2008). I due studi includevano 111 pazienti (59 e 52 con sorafenib e citochine in mRCC refrattario, rispettivamente) nei quali sono state valutate le modifiche della pressione sanguigna diastolica. Settanta pazienti (63,1%) avevano più di 1 misurazione della pressione arteriosa diastolica  $\geq 90$  mmHg. La ORR è stata del 48,4% per i pazienti con misurazione della pressione arteriosa diastolica  $\geq 90$  mmHg vs 12,2% per gli altri. La mediana della sopravvivenza totale OS (30,0 vs 9,8 mesi,  $p < 0.0001$ ) e PFS (17,6 vs 7,1 mesi;  $p < 0.0001$ ) erano maggiori nei pazienti con pressione sanguigna diastolica  $\geq 90$  mmHg. Le frequenze degli eventi avversi più comunemente riportati sono stati maggiori nei pazienti con pressione arteriosa diastolica  $\geq 90$  mmHg, compreso affaticamento (80,0 vs 41,5%), diarrea (72,9 vs 41,5%), ipertensione riportata come un AE (67,1 vs 24,4%), nausea (52,9 vs

43,9%) e anoressia (51,4 vs 34,1%). Ulteriori studi sono stati necessari per convalidare la pressione sanguigna diastolica  $\geq 90$  mmHg come biomarker dell'attività di axitinib. In uno studio di fase II sul pancreas un'analisi esplorativa (Spano, Chodkiewicz et al. 2008) ha anche mostrato un miglioramento della sopravvivenza globale in pazienti con almeno una pressione arteriosa diastolica di 90 mmHg o più, durante il trattamento. Negli studi sul pancreas, la dose-escalation adattata al livello di pressione sanguigna, è promettente, ma resta da validare. Prove preliminari suggeriscono che axitinib è sicuro e ha un profilo, riguardo gli effetti collaterali, vantaggioso rispetto agli altri farmaci antiangiogenici. La somministrazione continua e le dosi costanti sembrano essere sicure e compatibili con somministrazioni a lungo termine. In uno studio di fase II sul RCC, i pazienti hanno ricevuto axitinib per più di 3 anni, con l'assenza di tossicità cumulativa (Rixe, Bukowski et al. 2007).

## CAPITOLO 3

### SCOPO DELLO STUDIO

Il nostro interesse a riguardo delle terapie di combinazione dei farmaci nel tumore al pancreas, coinvolge sia irinotecano che axitinib; tali combinazioni sono necessarie per migliorare la risposta alla terapia tumorale.

Lo scopo del nostro studio è stato innanzitutto quello di dimostrare l'interazione sinergica *in vitro* tra SN-38 e axitinib, sia nelle cellule endoteliali che in quelle tumorali di pancreas, e il miglioramento dell'attività antitumorale *in vivo* con la combinazione simultanea di irinotecan e axitinib. Inoltre, abbiamo cercato di spiegare i meccanismi molecolari dell'attività antiproliferativa e proapoptotica che può essere causata dai due farmaci in trattamenti di combinazione

### MATERIALI E METODI

#### 3.1 Studi *in vitro*

##### 3.1.1 Materiali, farmaci e linee cellulari.

Le cellule utilizzate per gli studi sono state le seguenti: cellule tumorali di adenocarcinoma pancreatico MIAPaCa-2 e Capan-1 ottenute da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, USA) e cellule endoteliali umane del microcircolo HMVEC-d, (Clonetics, San Diego, CA, USA).

Le linee cellulari tumorale MIAPaCa-2 e Capan-1 sono state mantenute in DMEM (Gibco) supplementato con 10% FBS, penicillina (50 IU/ml) streptomina (50 µg/ml), L-Glutamina (2 mM), 2,5% e nel DMEM è stato aggiunto anche il siero di cavallo (HS). La linea cellulare endoteliale microvascolare HMVEC-d è stata mantenuta in MCDB 131 (JRH Biosciences) supplementata con 10% FBS scomplementato, L-Glutamina (2 mM), eparina (10 unità/ml; Wyeth Ayerst), fattore di crescita endoteliale rh-EGF (10 ng/ml) e fattore di crescita fibroblastico basico rh-bFGF (5 ng/ml). Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare, ricombinante umano (rhVEGF) e epidermico ricombinante umano (rhEGF) sono stati acquistati da PeproTechEC Ltd (Londra, Regno Unito).

Le cellule endoteliali umane sono state fatte crescere in fiasche per colture cellulari (Costar, Cambridge, USA) trattate con gelatina di tipo A (Sigma, USA) all'1%, mentre la linea tumorale pancreatica in fiasche per colture cellulari in monostrato. Tutte le linee cellulari sono state mantenute in un incubatore Heraeus mod. B5061EK/CO<sub>2</sub> (Hanau, Germania) per colture cellulari alla temperatura di 37 °C in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state staccate dalle piastre di coltura al momento della loro fase di crescita logaritmica lavandole con PBS e utilizzando una soluzione allo 0,25% di tripsina-EDTA e infine nuovamente piastrate.

Axitinib e irinotecano e il suo metabolita attivo SN-38 sono stati gentilmente forniti dalla Pfizer (Groton, MD). Per gli esperimenti *in vitro*, i farmaci sono stati sciolti in DMSO e diluiti secondo le necessità; per gli studi *in vivo*, l'irinotecano è stato diluito in soluzione fisiologica e somministrato per via intraperitoneale (i.p.), mentre axitinib è stato formulato in 0,5% carboxymethylcellulose/H<sub>2</sub>O HCl (g/v, pH 2-3) e dosato come una sospensione a 5 ml/kg per via orale due volte al giorno (Hu-Lowe, Zou et al. 2008).

### **3.1.2 Saggio di proliferazione cellulare.**

La prova di chemiosensibilità *in vitro* è stata eseguita sia sulle linee di adenocarcinoma pancreatico (MIAPaCa-2 e Capan-1) che sulla linea cellulare endoteliale umana (HMVEC-d), seminate in numero di 2x10<sup>4</sup>/pozzetto e 6x10<sup>4</sup>/pozzetto, rispettivamente, in piastre sterili di 24 pozzetti; nel caso delle linee endoteliali ogni pozzetto è stato precedentemente ricoperto di gelatina all'1%. Ventiquattro ore dopo la semina cellulare il mezzo di coltura è stato cambiato e le cellule sono state trattate.

Le cellule endoteliali sono state trattate con axitinib (0.01- 1000 nM) e SN-38 (0.001-1000 nM) o con i loro veicoli in continuo per 72 ore in 1 ml di terreno. Le linee cellulari tumorali sono state trattate con axitinib (0,001-100 µM) e SN-38 (0,001-100 µM) o con i loro veicoli per 72 ore. I trattamenti con i farmaci sono stati eseguiti ogni 24 h per 6 giorni. Alla fine dell'esperimento le cellule sono state lavate con PBS e staccate con una soluzione di tripsina-EDTA allo 0,25% e contate al microscopio ottico in camera di conta emocromocitometrica di Burker.

La sopravvivenza delle cellule trattate è stata espressa come media  $\pm$  errore standard e i risultati sono stati analizzati con una regressione non lineare. E' stata infine calcolata la concentrazione che ha ridotto la sopravvivenza cellulare del 50% (IC<sub>50</sub>) rispetto ai controlli.

### ***3.1.3 Valutazione in vitro del sinergismo tra axitinib e SN-38 nelle cellule endoteliali e tumorali.***

La combinazione di SN-38 e axitinib è stata studiata utilizzando uno schema di trattamento che prevedeva la simultanea esposizione delle diverse cellule ai due farmaci per 72 ore, con un rapporto fisso di concentrazione molare di 1:1 per le cellule HMVEC-d e MIAPaCa-2 e 1:10 per le Capan-1. Per valutare il livello di interazione (sinergico, additivo o antagonista) tra SN-38 e axitinib, è stato seguito il metodo proposto da Chou (Chou 2006). Brevemente, il sinergismo o antagonismo per axitinib con SN-38 è stato calcolato sulla base della "multiple drug-effect equation" e quantificato mediante l'indice di combinazione (CI), dove CI <1, CI = 1, e CI > 1 indicano sinergia, effetto additivo e antagonismo, rispettivamente. Sulla base dell'isobologramma classico il valore di CI è stato calcolato come segue:

$$CI = [(D_1) / (D_x)_1] + [(D_2) / (D_x)_2]$$

Come da esempio, al livello di inibizione del 50%, (D<sub>x</sub>)<sub>1</sub> e (D<sub>x</sub>)<sub>2</sub> sono rispettivamente le concentrazioni di axitinib e SN-38, che inducono una inibizione della crescita cellulare del 50%; anche (D<sub>1</sub>) e (D<sub>2</sub>) che sono le concentrazioni di axitinib e SN-38 in combinazione, inibiscono la crescita cellulare del 50% (l'effetto è lo stesso che viene prodotto dai singoli farmaci da soli). L'indice di riduzione della dose (DRI) indica il grado di riduzione della dose dei due farmaci in combinazione che è possibile per ottenere gli stessi effetti che si otterrebbero utilizzando i due farmaci singolarmente:

$$(DRI)_1 = (D_x)_1 / (D_1) \text{ and } (DRI)_2 = (D_x)_2 / (D_2)$$

Gli indici CI e DRI sono stati calcolati con il programma software CalcuSyn v.2.0 (Biosoft, Cambridge, UK).

### **3.1.4 Test ELISA per la valutazione dell'apoptosi**

Le cellule endoteliali e tumorali sono state trattate per 72 ore con axitinib (0.01-1000 nM), SN-38 (0,01-1000 nM), la simultanea combinazione axitinib/SN-38 e con il solo veicolo. Alla fine dell'esperimento, le cellule sono state raccolte ed è stato utilizzato il Cell Death Detection ELISA kit Plus (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basilea, Svizzera).

I saggi ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays*) permettono la rilevazione e la quantificazione rapida e specifica di sostanze come peptidi, proteine, anticorpi e ormoni. Brevemente, nella metodica ELISA l'antigene da quantificare deve essere immobilizzato su una superficie solida. Questo viene quindi legato con un anticorpo associato ad un enzima (gli enzimi di uso più comune sono le perossidasi). La rilevazione per il saggio ELISA è stata ottenuta incubando questo complesso enzimatico con un substrato che produce un prodotto colorato rilevabile mediante la misurazione dell'assorbanza del composto colorato. Nel saggio ELISA l'assorbanza è direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione. L'elemento fondamentale della strategia di rilevazione è l'altissima specificità dell'interazione tra anticorpo e antigene. Il saggio ELISA è stato eseguito in micropiastre da 96 pozzetti e la lettura dell'assorbanza è stata effettuata mediante il lettore Thermo Labsystems Multiskan Spectrum (M-Medical, MI). Tutte i valori di assorbanza sono state tracciati come percentuale di apoptosi rispetto alle cellule di controllo (solo veicolo), etichettata come 100%. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuto tre volte con almeno tre repliche per ogni campione.

### **3.1.5 Test ELISA per la determinazione di ERK1/2 (pTpY185/187) e Akt (pThr<sup>308</sup>).**

Per rilevare la fosforilazione di ERK1/2 e Akt nelle cellule endoteliali e tumorali dopo 72 ore di trattamento farmacologico, le cellule sono state esposte a axitinib, SN-38, e la loro combinazione simultanea (con un rapporto 1:1 e 1:10, rispettivamente, a concentrazione molare fissa) a concentrazioni corrispondenti all' IC<sub>50</sub> sperimentale della proliferazione cellulare o con il solo veicolo per 72 ore. Per misurare pERK1/2 e pAkt, alla fine dell'esperimento le



cellule sono state raccolte e immediatamente congelate in azoto liquido. Le cellule sono state lisate secondo le istruzioni del produttore. Ogni campione è stato poi saggiato per la fosforilazione di ERK1/2 e Akt umani con il PhosphoDetect ERK1/2 (pThr185/pTyr187) ELISA Kit e PhosphoDetect Akt (pThr308) ELISA Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germania) e normalizzato per la concentrazione delle proteine totali di ERK1/2 e Akt, rispettivamente. La densità ottica è stata determinata utilizzando il lettore di micropiastra Multiskan Spectrum (Thermo Labsystems, Milano, Italia) settata a 450 nm. I risultati sono stati espressi come percentuale del pERK1/2 e pAKT rispetto ai controlli. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti, in modo indipendente, sei volte con almeno nove campioni per ogni concentrazione.

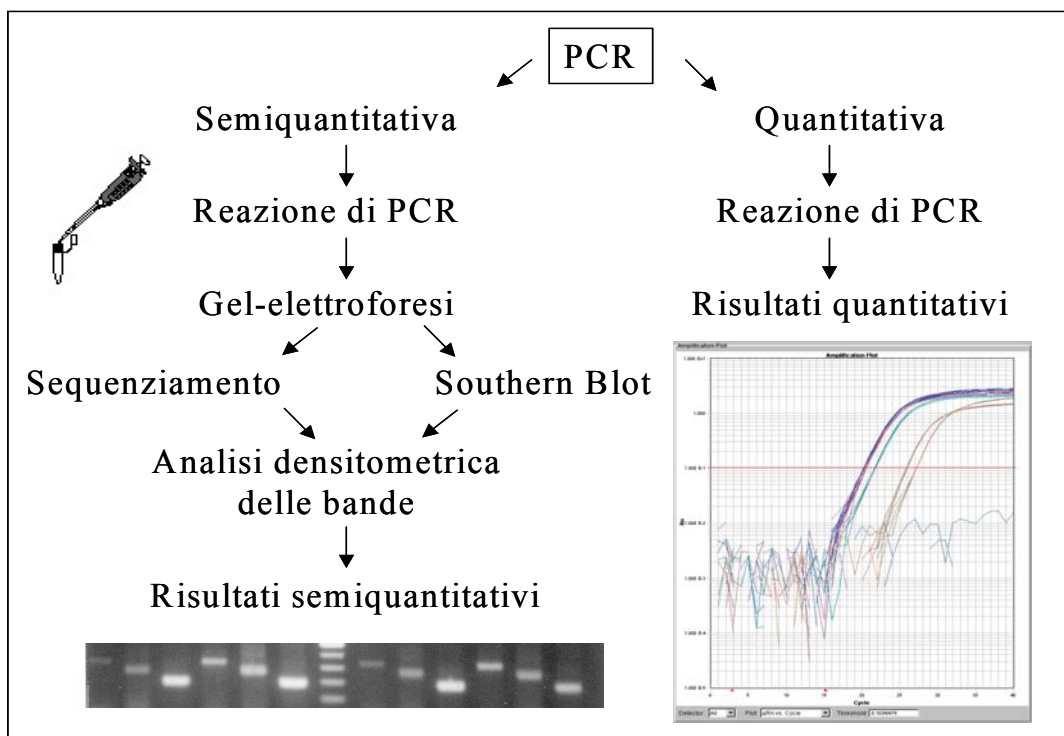
### ***3.1.6 Analisi Real-time PCR per la valutazione dell'espressione genica di ATP7A e ABCG2 nelle cellule tumorali ed endoteliali.***

La PCR quantitativa è un'analisi dotata di grande sensibilità e flessibilità poiché permette lo studio contemporaneo di diverse sequenze geniche trascritte nei rispettivi mRNA provenienti da campioni tissutali. La PCR permette l'amplificazione di un segmento specifico di DNA o RNA a partire da piccolissime quantità di materiale genetico, come quelle presenti in un'unica cellula. Le basi teoriche di questo metodo sono estremamente semplici: una sequenza di acido nucleico, dopo denaturazione al calore, viene ibridizzata a specifiche sequenze oligonucleotidiche (*primers*), che legano i filamenti opposti del DNA e sono orientati con le loro estremità 3' una di fronte all'altra, in modo che, per mezzo di una DNA polimerasi termostabile, avvenga la sintesi di una catena di DNA complementare lungo il filamento fra loro interposto. I prodotti di questa reazione diventano i substrati di successivi cicli di denaturazione, ibridazione dei *primers* ed estensione, in un processo a catena che dà origine ad un'amplificazione esponenziale della sequenza di DNA inizialmente presente nel campione.

Per valutare l'espressione dei geni umani ATP7A e ABCG2,  $6 \times 10^4$  cellule HMVEC-d e  $2 \times 10^4$  cellule MIAPaCa-2 e Capan-1 sono state coltivate nei loro rispettivi mezzi di coltura e trattate con axitinib e SN-38 singolarmente e in combinazione a una concentrazione corrispondente all'IC<sub>50</sub> sperimentale della

combinazione simultanea, a dosi superiori e inferiori all'IC<sub>50</sub> e con il solo veicolo, per 72 ore.

In sintesi, l'RNA (1 µg) è stato retro-trascritto come precedentemente descritto (Bocci, Falcone et al. 2008), e il risultante DNA complementare è stato diluito (2:3) e poi amplificato *attraverso reverse transcription-polymerase chain reaction* con sistema di rilevamento di sequenza (7900HT, Applied Biosystems, Carlsbad, CA). I primers di ATP7A e ABCG2 sono stati acquistati dalla Applied Biosystems (Assay ID Hs00921967\_m1 and Hs01053796\_m1, rispettivamente). Per le condizioni dei cicli termici della *Polymerase Chain Reaction* e l'ottimizzazione delle concentrazioni dei primers, sono state seguite le istruzioni del produttore. Le amplificazioni sono stati normalizzate per la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), e la quantificazione dell'espressione genica è stata effettuata utilizzando il calcolo  $\Delta\Delta C_t$ , dove  $C_t$  è la soglia di ciclo; la quantità di target, normalizzata per il controllo endogeno e relativo al calibratore (cellule di controllo trattate con il solo veicolo), è dato da  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti, in modo indipendente, tre volte con almeno nove campioni per ogni concentrazione.



**Figura 2** Rappresentazione schematica delle procedure sperimentali nella PCR semiquantitativa e quantitativa

### ***3.1.7 Analisi di cromatografia liquida ad alte prestazioni della concentrazione di SN-38 nelle cellule endoteliali.***

L'analisi quantitativa di irinotecano, il principale metabolita dell'SN-38, nelle cellule, è stata effettuata come descritto in precedenza (Allegrini, Falcone et al. 2008), con lievi modifiche. Le cellule endoteliali sono state trattate con il solo veicolo, SN-38 (1 $\mu$ M), axitinib (1 $\mu$ M), o una combinazione dei due farmaci (SN-38 1 $\mu$ M + axitinib 1 $\mu$ M) per 72 ore. Alla fine dell'esperimento, le cellule sono state raccolte, contaminate per ottenere lo stesso numero di cellule presenti in ogni campione (10<sup>5</sup> cellule), e centrifugate. Le cellule sono state congelate e scongelate per tre volte consecutive. Brevemente, le concentrazioni di SN-38 sono state valutate dopo l'estrazione con metanolo contenente 0,1% di HCl 10 N. I campioni sono stati poi centrifugati e successivamente evaporati a secco sotto flusso di azoto in un bagno termostato a 45 °C. Il pellet risultante è stato ricostituito in metanolo acidificato con 0.1% di HCl 10 N ed eluito attraverso la fase stazionaria  $\mu$ Bondapak C18 (300  $\times$  3,9mm, 10 $\mu$ m; Waters, Milford, MA) con una fase mobile composta da KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M/acetone nitrile (60:40, vol/vol, pH 6.0) contenente sodio eptansulfonato 3mM. Il sistema cromatografico LC Modulo I Plus (Waters) era fornito di un rivelatore a scansione di fluorescenza Modello 474 con eccitazione ed emissione di lunghezze d'onda settate a 375 e 525 nm, rispettivamente. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software Millennium 2,1 (Waters). Le curve standard di calibrazione sono state ottenute con l'aggiunta di SN-38 a 1 ml di PBS, con conseguenti concentrazioni finali che andavano da 2500 a 0,16 ng/ml. Il range di linearità dell'analisi di cromatografia liquida ad alte prestazioni è stato 2500-0,16 ng/ml.

### ***3.1.8 Test ELISA per la rilevazione, nei mezzi condizionati e nelle cellule lisate, di VEGF, TSP-1, VEGFR-2***

Le cellule HMVEC-d, Capan-1, e MIAPaCa-2 sono state coltivate nei loro rispettivi mezzi di coltura e trattati con SN-38 e axitinib a una concentrazione corrispondente all'IC<sub>50</sub> sperimentale della proliferazione cellulare, a concentrazioni superiori e inferiori all'IC<sub>50</sub> e mediante un trattamento di combinazione simultaneo. Per misurare la secrezione di VEGF e trombospondina-1 (TSP-1), alla fine dell'esperimento, il mezzo di ogni pozzetto è stato scartato e sostituito con il mezzo senza siero per 4 ore. Per

analizzare in ogni campione la concentrazione di VEGF e TSP-1 umani sono stati utilizzati Kit ELISA Quantikine del VEGF e TSP-1 (R & D System, Minneapolis, MN), rispettivamente, e tale concentrazione è stata poi normalizzata per la concentrazione di proteine totali. Il Kit ELISA Quantikine (R & D Systems) del sVEGFR-2 è stato utilizzato per misurare la concentrazione della proteina VEGFR-2 nel lisato delle cellule endoteliali; anche in questo caso i risultati sono stati normalizzati per il numero delle cellule. La densità ottica è stata determinata utilizzando il lettore di micropiastre Multiskan Spectrum setata a 450 nm (con una lunghezza d'onda di correzione di 540 nm). Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti, indipendentemente, tre volte con almeno nove campioni per ogni concentrazione.

## **3.2 Studi *in vivo***

### **3.2.1 *Animali e trattamenti.***

La stabulazione e l'utilizzo degli animali di questo studio sono conformi alle raccomandazioni dell'Unione Europea sulla sperimentazione animale.

I topi di sesso maschile nu/nu CD (25 g di peso corporeo) utilizzati in questi esperimenti sono stati acquistati presso la ditta Charles River (Milano, Italia). I topi atimici sono stati scelti per l'inoculo di cellule tumorali pancreatiche umane Capan-1 perché a causa dell'assenza dell'immunità cellulo-mediata, essi rappresentano un modello sperimentale suscettibile alla crescita di cellule xenogeniche.

Gli animali sono stati alloggiati in gabbie con accesso illimitato al cibo sterile e all'acqua autoclavata. L'alloggiamento e tutte le procedure che coinvolgono gli animali sono stati eseguiti secondo il protocollo approvato (approvazione no. 2.741) da parte del *Comitato di Ateneo per la sperimentazione animale* (Comitato Accademico per la sperimentazione animale) dell'Università degli Studi di Pisa, in conformità con la Direttiva 86-609 del Consiglio della Comunità europea sul benessere degli animali, riconosciuta dal governo italiano. Ogni esperimento ha utilizzato il numero minimo di topi necessari per ottenere risultati statisticamente significativi.

L'impianto è consistito nell'inoculo di  $2 \times 10^6 \pm 5\%$  cellule tumorali in 0,2 ml di mezzo di coltura privo di FBS, e la sede di impianto è stata il sottocute nella

regione intrascapolare in ogni singolo topo, utilizzando una siringa da insulina con un ago di 25G x 5/8" (0,5 x 16 mm).

Particolare cura è stata posta al fine di evitare la precipitazione delle cellule agitando scrupolosamente sia le provette che la siringa al momento dell'inoculo. La suddivisione in gruppi degli animali è avvenuta casualmente ed una volta inoculate le cellule tumorali Capan-1, i topi sono stati nuovamente randomizzati per il successivo trattamento.

Gli animali sono stati controllati fino alla comparsa del tumore sottocutaneo, misurato in due direzioni perpendicolari, tre volte la settimana usando un calibro millimetrato.

Il volume del tumore ( $\text{mm}^3$ ) è stato definito come segue:

$$V = [(w_1 \times w_1 \times w_2) \times (\pi / 6)]$$

dove  $w_1$  e  $w_2$  sono il valore più grande e più piccolo del diametro (mm) del tumore, rispettivamente.

Dopo circa 8-10 giorni dall'inoculo delle cellule, quando il tumore ha raggiunto un volume di  $\sim 100 \text{ mm}^3$ , i topi sono stati sottoposti a trattamento. Axitinib, irinotecano, e la loro combinazione simultanea è stata somministrata nel modo seguente:

- axitinib 25 mg/kg per os (PO) due volte al giorno per 31 giorni
- irinotecano 100 mg/kg alla settimana per 4 settimane,
- la combinazione simultanea di axitinib e irinotecano alle dosi sopra indicate.
- ai topi del gruppo di controllo sono state iniettate i.p. soluzione salina e p.o. il solo veicolo.

I trattamenti sono iniziati simultaneamente ed hanno avuto la durata di 31 giorni, durante tale periodo gli animali sono stati esaminati giornalmente per evidenziare segni di tossicità indotta dai farmaci e registrarne la mortalità.

Il periodo di sperimentazione si è conclusa al 7° giorno dopo l'ultima somministrazione di axitinib. I topi sono stati sacrificati con un'overdose di anestetico, i tumori asportati, misurati e campionati per IHC. L'efficacia del farmaco si basava sulla percentuale del volume medio dei tumori trattati diviso per la media dei volumi dei tumori di controllo trattati con il solo veicolo

(%T/C) (Bocci, Falcone et al. 2008).

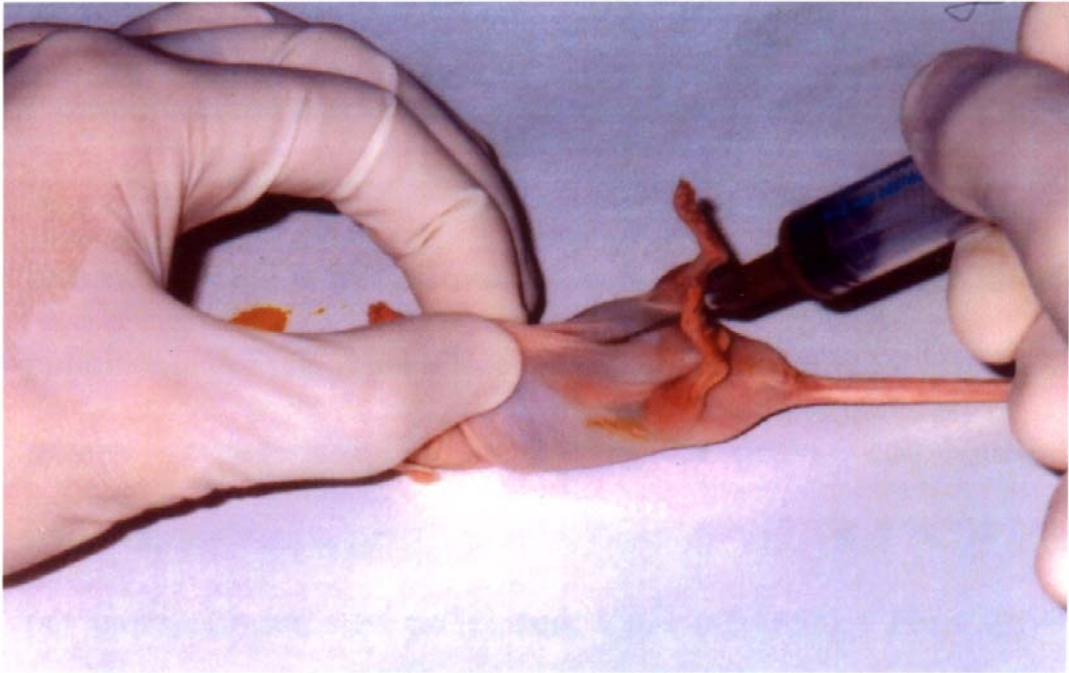


**Figura 3** Iniezione di cellule tumorali Capan-1 per via sottocutanea nel topo atimico



**Figura 4** Misurazione della massa tumorale con calibro





**Figura 5** Somministrazione del trattamento farmacologico tramite iniezione intraperitoneale



**Figura 6** Tumore espantato e misurato con calibro

### **3.2.2 *Immunoistochimica.***

Brevemente, i campioni di tessuto tumorale dei diversi gruppi di trattamento sono stati fissati in formalina al 10% neutral-buffered da 12 a 24 ore e inclusi in paraffina per l'istologia e IHC. Le sezioni del tumore (5µm di spessore) sono state colorate con ematossilina ed eosina. Colorazioni sono state eseguite da una immunocoloratore Benchmark (Ventana, Tucson, AZ) utilizzando il metodo del complesso avidina-biotina-perossidasi (ABC), e contrastati con ematossilina. I controlli negativi sono stati effettuati omettendo gli anticorpi primari. L'IHC è stata valutata indipendentemente da due sperimentatori. La conta microvascolare è stata determinata utilizzando l'anticorpo policlonale anti-FVIII (Ventana Medical System). Ogni singolo microvaso è stato definito come una cellula endoteliale colorata separato dai microvasi adiacenti, dalle cellule tumorali, e da altri elementi del tessuto connettivo. I campioni sono stati esaminati da ciascun sperimentatore, che hanno identificato l'area con la vascolarizzazione più intensa (hot spot) in condizioni di bassa potenza del microscopico ( $\times 100$ ). Una regione di 0,74 mm<sup>2</sup>/field è stata poi esaminata al microscopio con ingrandimento  $\times 250$ . Sono stati analizzati cinque campi, e per ciascuno di essi, è stata fatta una conta dei vasi sanguigni in evidenza. Per singoli tumori, la conta microvascolare è stato ottenuta dalla media dei cinque campo contati. I vasi di grandi dimensioni con le pareti muscolare di un certo spessore sono stati esclusi dai conteggi. La presenza di un lume non era un requisito necessario per il conteggio dei microvasi.

Il rilevamento IHC di una proteina correlata all'apoptosi è stata effettuata utilizzando anticorpo policlonale di coniglio per attivare la caspasi-3 (diluito 1:2000; Abcam, Cambridge, UK), che riconosce in maniera specifica il frammento grande (17 kDa) della proteina attiva, ma non la caspasi-3 full-length. L'anticorpo colora in modo selettivo solo il citoplasma delle cellule apoptotiche. L'indice apoptotico (AI) è stato ottenuto con l'esame delle sezioni colorate utilizzando IHC e tutte le cellule identificabili che si mostravano colorate sono state contate. Le cellule apoptotiche, che erano presenti nelle zone necrotiche, sono state escluse dall'analisi. L'AI è stato calcolato come percentuale di cellule apoptotiche rispetto al numero totale delle cellule esaminate (Simon, McDunn et al. 2009) (Bressenot, Marchal et al. 2009).



### **3.2.3 Analisi statistica.**

I risultati ottenuti (media dei valori  $\pm$  ES) della proliferazione e migrazione cellulare o della concentrazione dei fattori di crescita sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA, seguiti dal test di Student-Newman-Keuls, usando il software GraphPad Prism (versione 4.0; GraphPad Prism Software Inc.). Il livello di significatività dei dati è stato fissato per valori di  $P < 0.05$ .

Per l'analisi dei dati dei saggi immunoenzimatici, le letture delle assorbanze sono state calcolate attraverso una curva standard costruita usando il *software* Curve Expert v.1.3 (Software Inc.) per l'analisi di VEGF e il *software* GraphPad Prism (versione 4.0; GraphPad Prism Software Inc.) per l'analisi di TSP-1.

## CAPITOLO 4

### Risultati

#### 4.1 Inibizione *in vitro* della proliferazione delle cellule endoteliali e tumorali con axitinib e SN-38

*In vitro* axitinib e SN-38 hanno determinato un effetto antiproliferativo dose-dipendente crescente nelle cellule endoteliali HMVEC-d e nelle linee cellulari di tumore pancreatico Capan-1 e MIAPaCa-2, (Figura 7); l'esposizione con Axitinib per 72 ore ha determinato un'inibizione della proliferazione delle cellule HMVEC-d con un  $IC_{50}$  di  $30.5 \pm 12.9$  nM (Figura 7A), risultati questi significativamente differenti da quelli osservati nelle cellule Capan-1 e MIAPaCa-2 ( $0.84 \pm 0.34$  e  $0.80 \pm 0.35$   $\mu$ M, rispettivamente; Figura 7B e C). Al contrario, nei trattamenti con SN-38 è stato osservato un effetto antiproliferativo maggiore nelle cellule Capan-1 e MIAPaCa-2, come dimostrato dai valori di  $IC_{50}$  ( $0.040 \pm 0.032$  e  $0.29 \pm 0.023$   $\mu$ M, rispettivamente; Figura 7B e C). Nella proliferazione delle cellule HMVEC-D l'attività citotossica di SN-38 è simile a quella osservata con axitinib ( $IC_{50}$ ,  $13.3 \pm 4.7$  nM; Figura 7A).

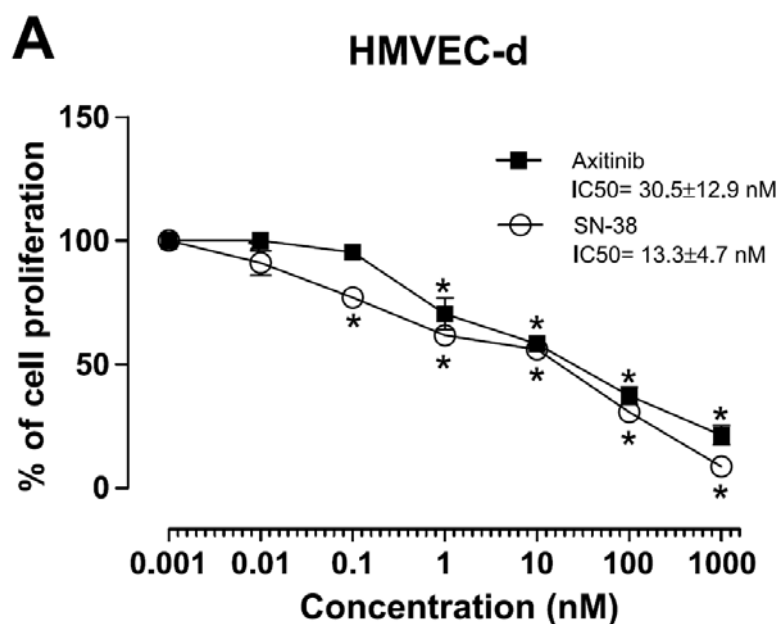


Figura 7A

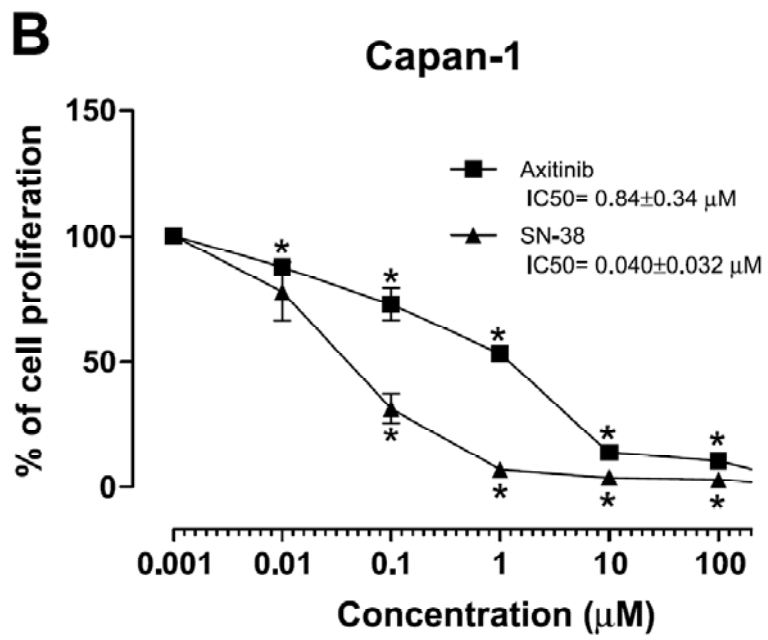


Figura 7B

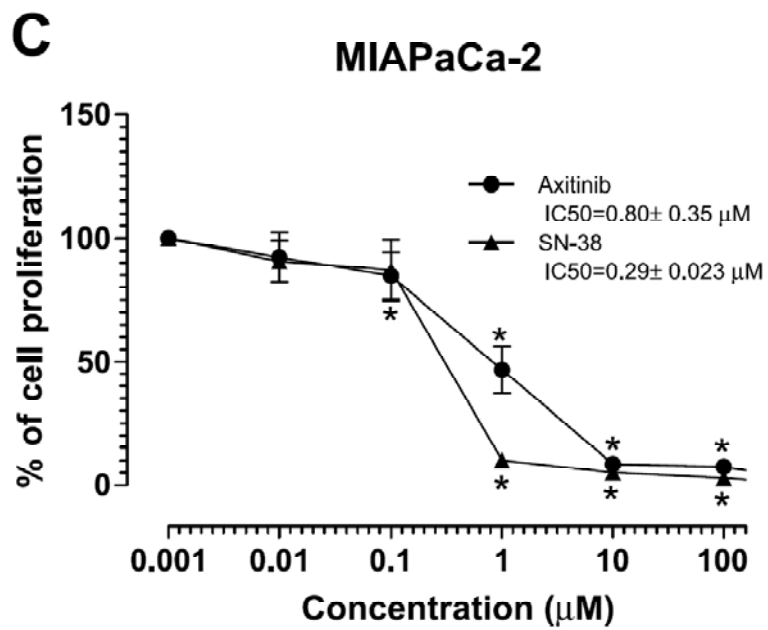


Figura 7C

#### 4.2 Effetto sinergico di axitinib e SN-38 nella proliferazione cellulare in HMVEC-d, Capan-1 e MIAPaCa-2

La simultanea e continua esposizione delle cellule HMVEC-d, MIAPaCa-2 e Capan-1, a concentrazioni diverse di SN-38 e axitinib per 72 ore, ha mostrato un forte sinergismo ( $CI < 1$  e  $DRI > 1$ , tabella 1). Il sinergismo corrispondente a  $CI < 1$  è confermato anche da un favorevole  $DRI > 1$  per entrambi i farmaci (Tabella 1). I valori di CI e DRI a  $IC_{25}$ ,  $IC_{50}$ , e  $IC_{75}$  sono riportati nella tabella 1. La figura 8A mostra un rappresentativo isobologramma delle cellule HMVEC-d esposte ad axitinib e SN-38 per 72 ore con uno schema di trattamento simultaneo. I trattamenti simultanei di axitinib e SN-38 per 72 ore sono stati sinergicamente attivi sulla proliferazione delle cellule pancreatiche Capan-1 e MIAPaCa-2, come dimostra l'isobologramma rappresentato nella figura 1B e C, rispettivamente. La posizione dei data points a sinistra della linea che collega i valori di  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  di axitinib e SN-38 indica sinergismo per le schede di trattamento (figura 8A-C).

**Table 1.** Combination index (CI) and dose-reduction index (DRI) values for the drug combinations at 25%, 50% and 75% level of inhibition of HMVEC-d, Capan-1 and MIAPaCa-2 cell proliferation

Cells	CI values					
	25%		50%		75%	
	<i>(Axitinib +SN-38)</i>		<i>(Axitinib+ SN-38)</i>		<i>(Axitinib + SN-38)</i>	
HMVEC-d	0.008		0.082		0.877	
Capan-1	1.074		0.711		0.473	
MIAPaCa-2	0.219		0.173		0.173	
Cells	DRI values					
	25%		50%		75%	
	<i>Axitinib</i>	<i>SN-38</i>	<i>Axitinib</i>	<i>SN-38</i>	<i>Axitinib</i>	<i>SN-38</i>
HMVEC-d	>500	144.228	75.497	14.447	5.368	1.447
Capan-1	2.891	1.373	4.898	1.974	8.298	2.837
MIAPaCa-2	4.930	62.436	7.283	27.887	10.760	12.456

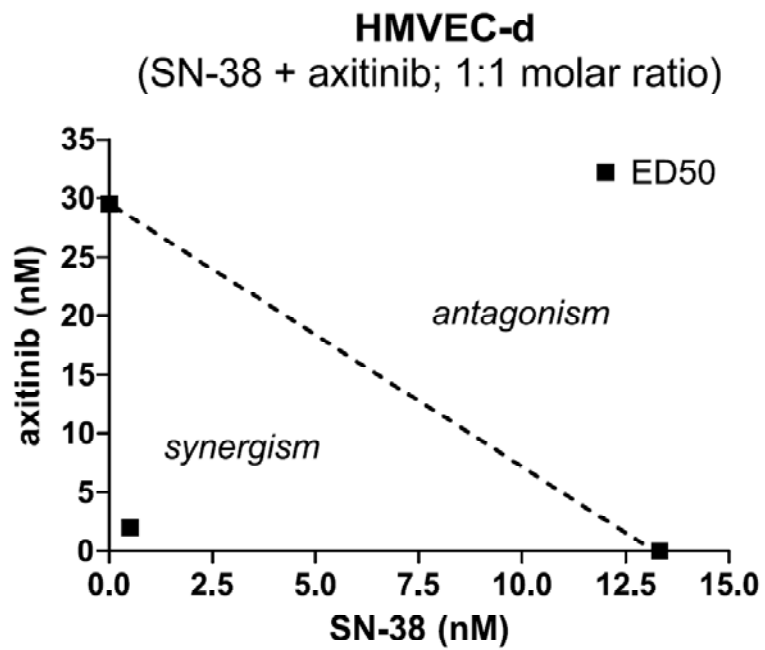


Figura 8A

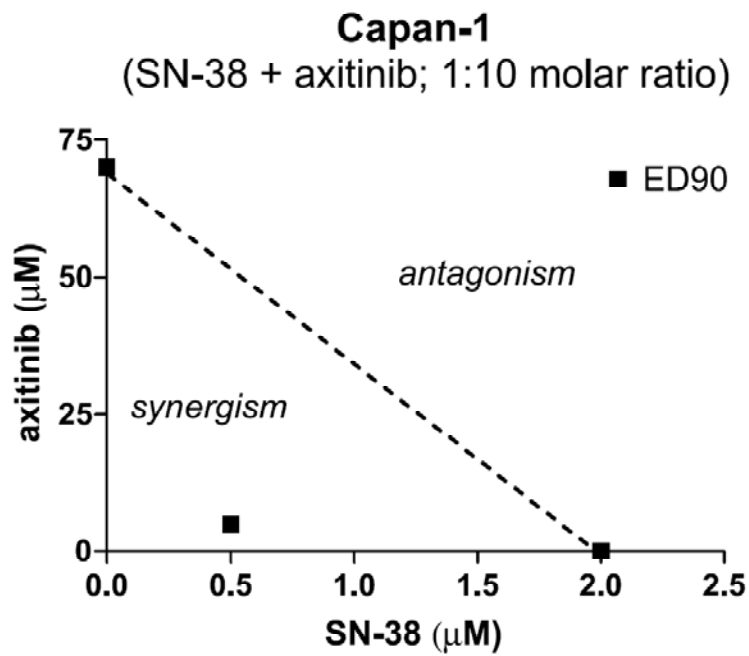
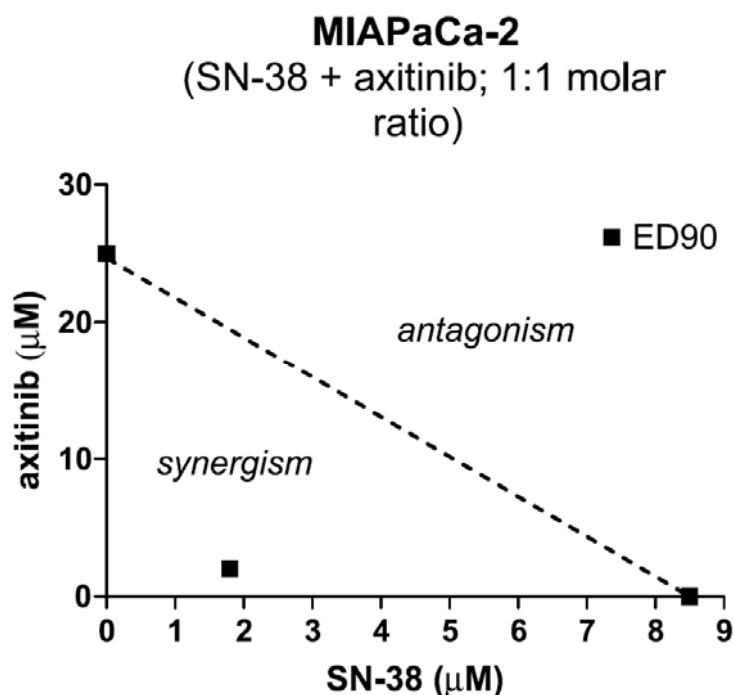


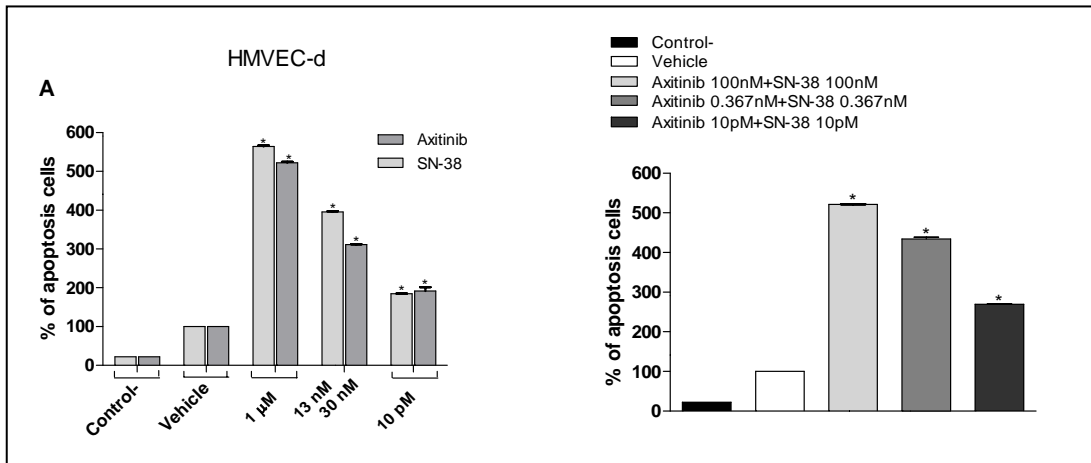
Figura 8B



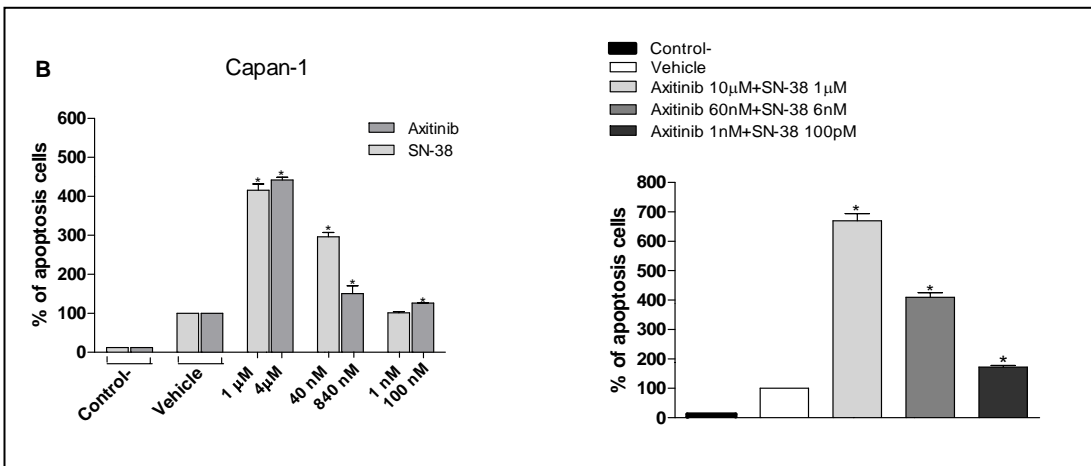
**Figura 8C**

#### **4.3 Induzione dell'apoptosi da parte di axitinib, SN-38 e della combinazione dei due farmaci**

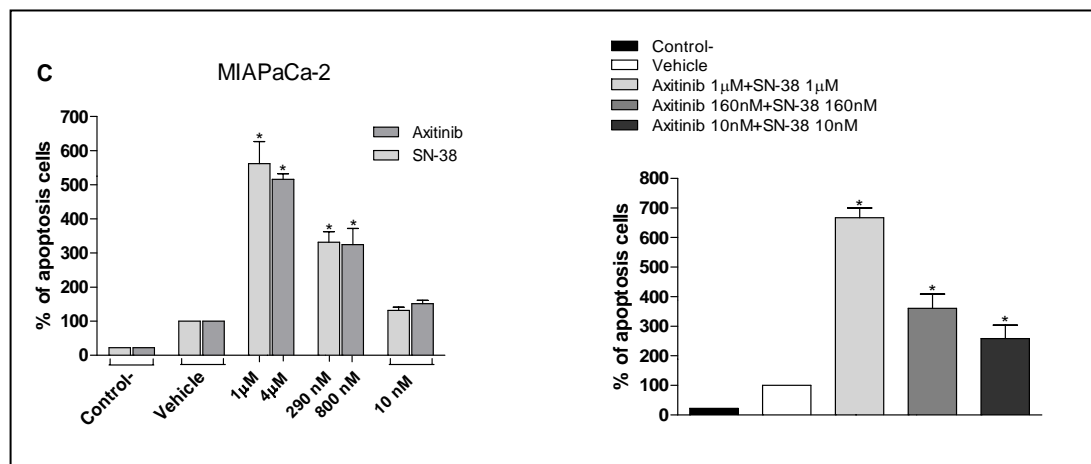
Nell'analisi dell'apoptosi il grado di frammentazione del DNA è dipeso dalla concentrazione di entrambi i farmaci. In particolare, la presenza di frammenti di cromatina era chiaramente rilevabile dopo 72 ore per dosi crescenti di axitinib e SN-38, da soli e in combinazione simultanea (Figura 9). Come mostrato nella figura 9A, dopo 72 ore di trattamento con axitinib e SN-38, nei campioni trattati si è ottenuto, rispetto ai controlli, una percentuale significativa di cellule endoteliali apoptotiche. Queste percentuali sono simili a quelle ottenute quando le cellule sono state trattate a concentrazioni molto più basse con la combinazione simultanea axitinib/SN-38 (Figura 9A, figura a destra). Inoltre, gli stessi effetti proapoptotici di axitinib e SN-38, da soli e in combinazione sono stati osservati in entrambe le linee cellulari tumorali Capan-1 e MIAPaCa-2 (Figura 9, B e C rispettivamente).



**Figura 9A**



**Figura 9B**



**Figura 9C**

#### 4.4 Inibizione della fosforilazione di ERK1/2 e di Akt nelle cellule endoteliali e tumorali ad opera di axitinib e irinotecano in combinazione

L'esposizione delle cellule HMVEC-d a SN-38, axitinib, e la loro combinazione simultanea, alla concentrazione corrispondente all'IC<sub>50</sub> sperimentale della proliferazione cellulare, ha determinato una riduzione della quantità della forma fosforilata di ERK1/2 e Akt (Figura 10A). Il rapporto tra le proteine ERK1/2 e Akt fosforilate e non fosforilate, nelle cellule trattate, sembrava notevolmente diminuito anche nelle cellule Capan-1 e MIAPaCa-2 (Figura 10, B e C). È interessante notare come la combinazione dei due farmaci abbia aumentato sinergicamente l'inibizione della fosforilazione di entrambe le proteine, ERK1/2 e Akt, in tutte le linee cellulari testate: infatti, a concentrazioni più basse con i farmaci in combinazione si è ottenuto un effetto inibitore simile a quello ottenuto con i trattamenti con i singoli farmaci.

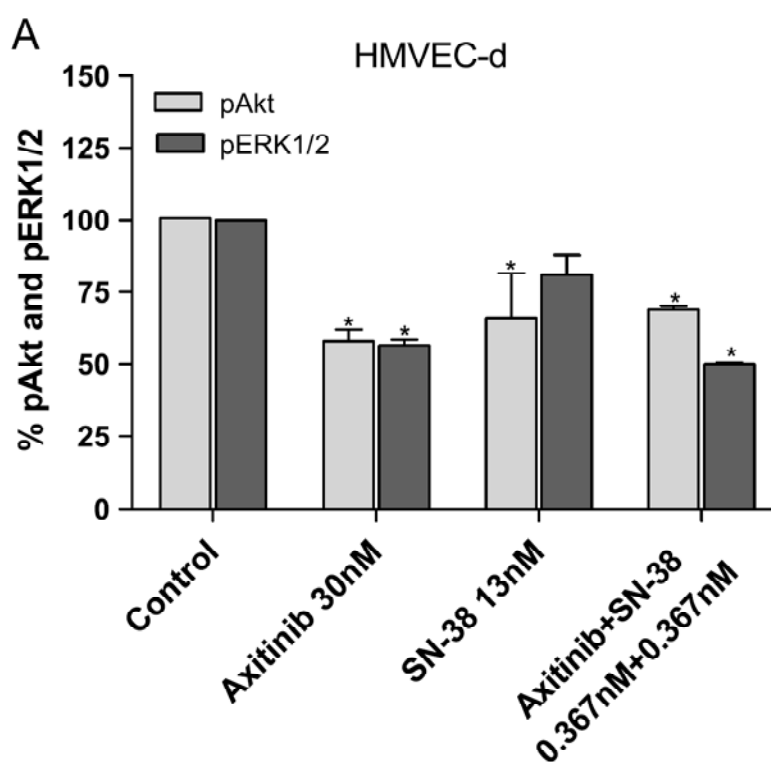


Figura 10A



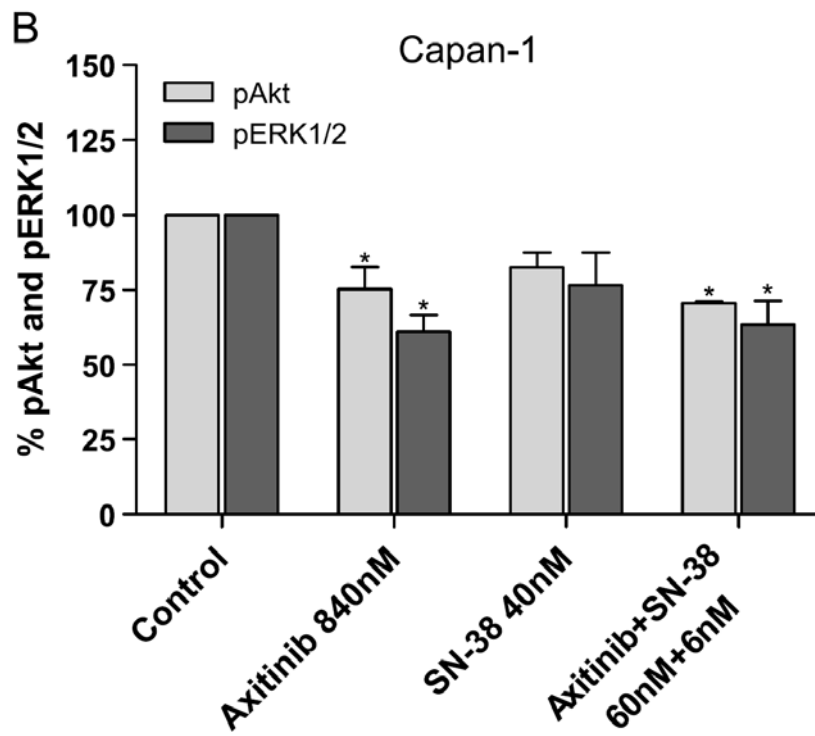


Figura 10B

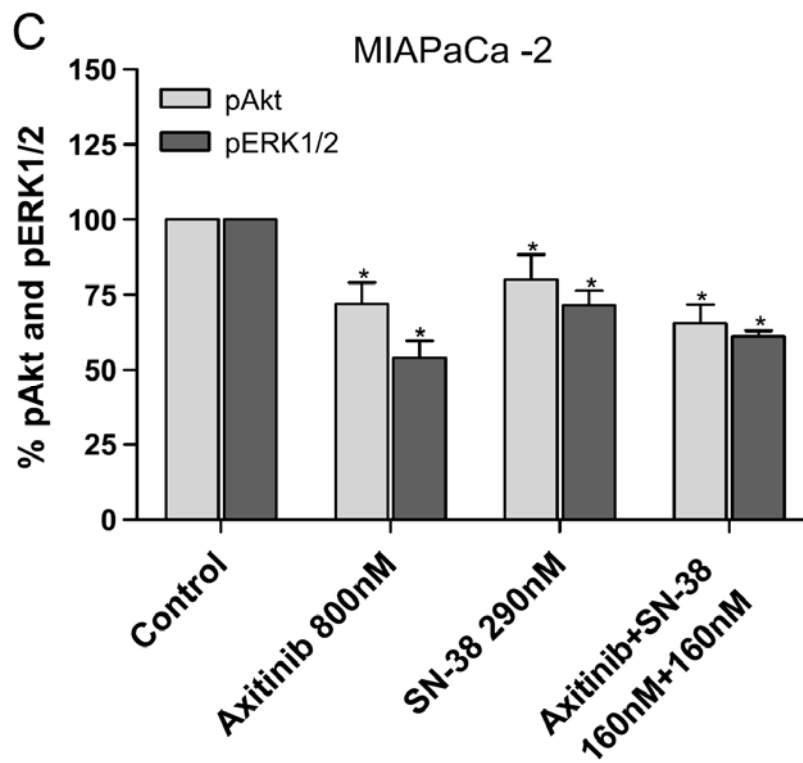


Figura 10C

#### 4.5 La combinazione di axitinib e SN-38 inibisce l'espressione genica di ABCG2 e ATP7A nelle cellule endoteliali e tumorali

Per studiare l'effetto del trattamento di combinazione sulla variazione d'espressione di ATP7A e ABCG2, è stata quantificata l'espressione genica di questi trasportatori in tutte e tre linee cellulari esposte a diverse concentrazioni dei farmaci. La Figura 11, A e B, mostra come axitinib, SN-38, e la loro combinazione simultanea determini un'inibizione significativa, a diverse concentrazioni, dell'espressione genica di ATP7A e ABCG2 nelle cellule Capan-1 e MIAPaCa-2, rispettivamente. Inoltre, nelle cellule HMVEC-d, la combinazione dei due farmaci ha determinato una significativa diminuzione dell'espressione di ATP7A e ABCG2 a concentrazioni molto più basse dei due farmaci da soli (Figura 11C).

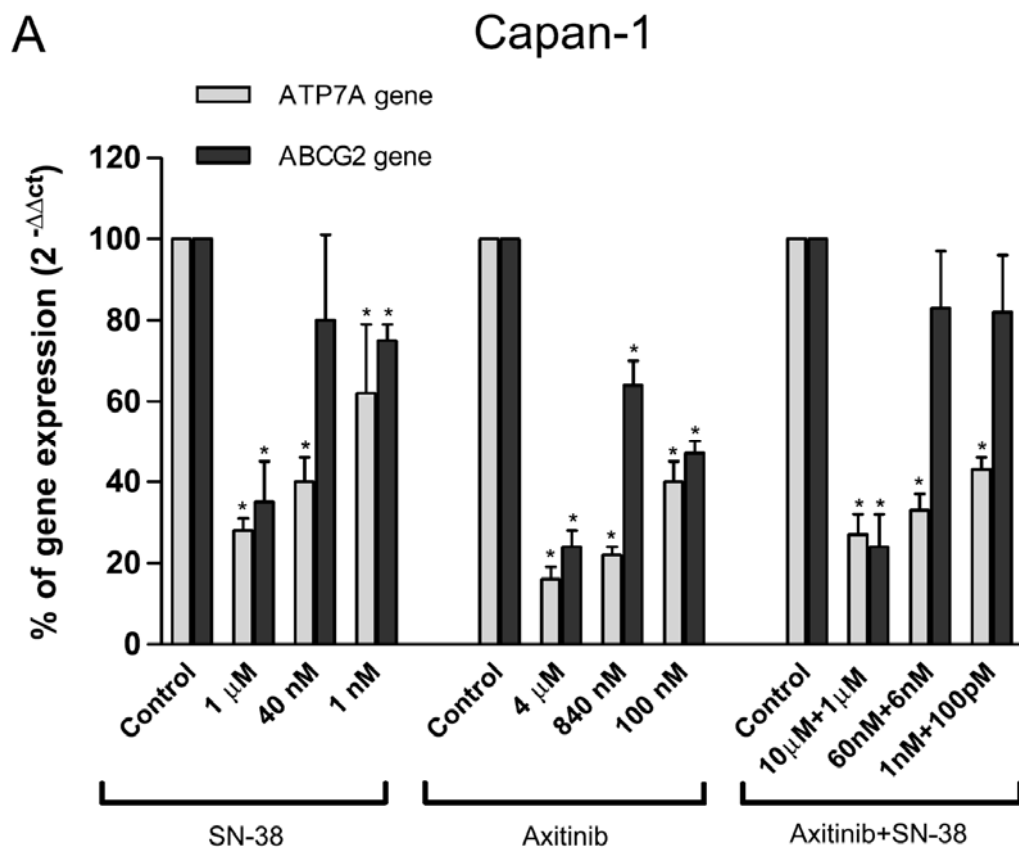


Figura 11A

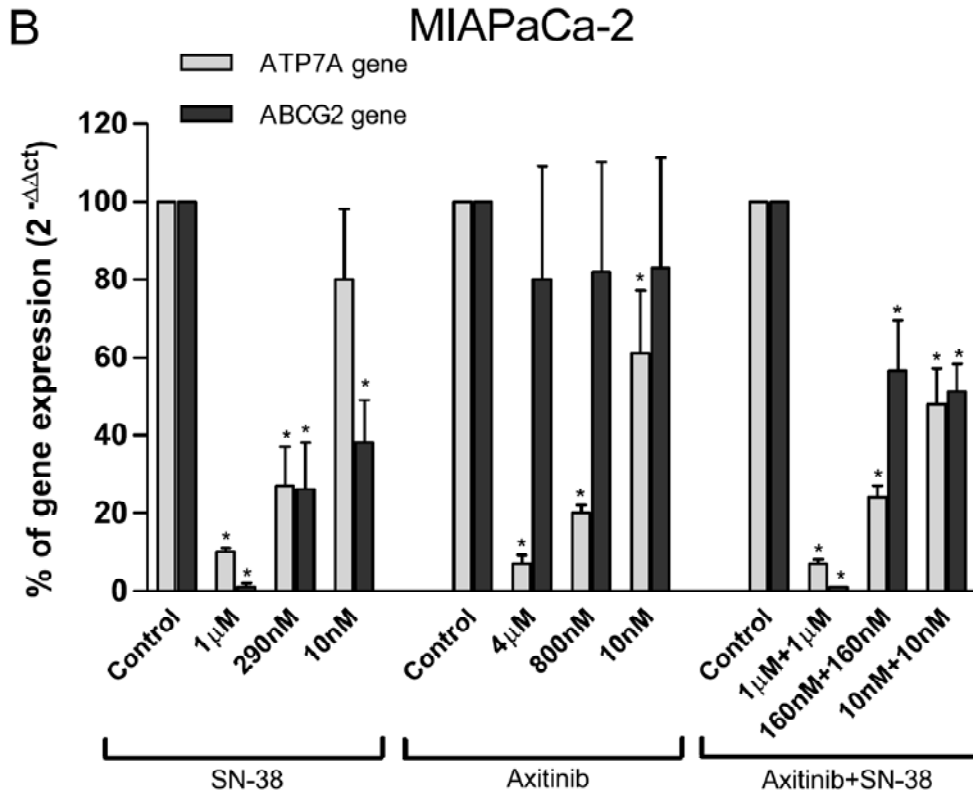


Figura 11B

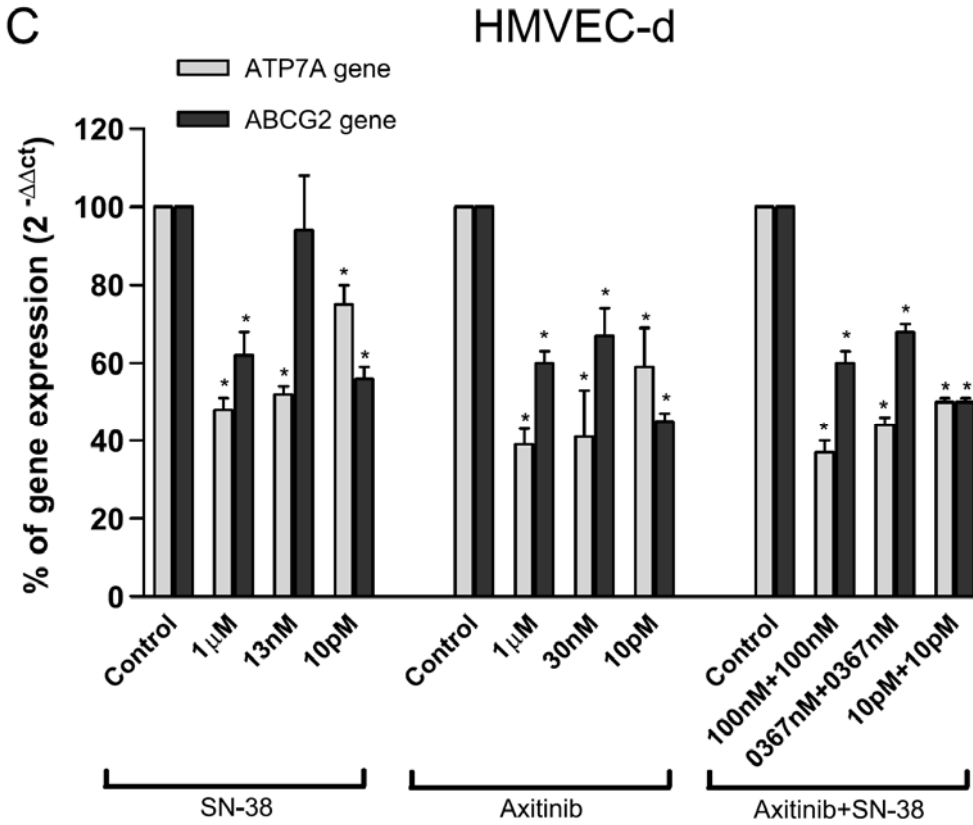
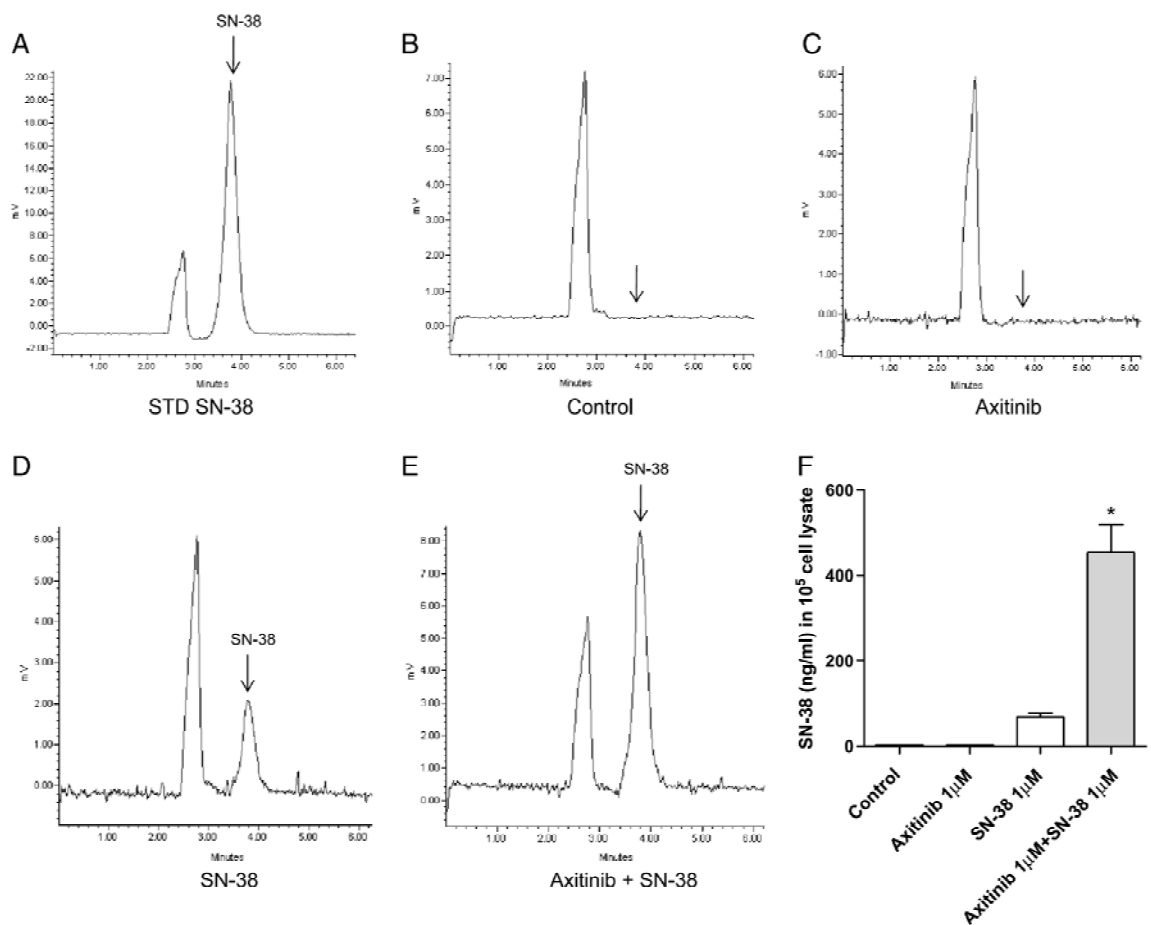


Figura 11C

Sulla base di questi risultati, abbiamo misurato la concentrazione intracellulare di SN-38 nelle cellule trattate. Nelle cellule endoteliali esposte al trattamento dei due farmaci in combinazione le concentrazioni di SN-38 trovate sono maggiori se confrontate con i trattamenti con i farmaci in singolo, come dimostrato dall'area sotto il picco dei cromatogrammi (Figura 12, A-E). La figura 12F mostra invece l'aumento significativo intracellulare della concentrazione di SN-38 normalizzato per  $10^5$  cellule.



**Figura 12**

#### 4.6 La combinazione di SN-38 e di axitinib determina un aumento della secrezione di TSP-1 nei mezzi condizionati e una diminuzione di VEGFR-2 nelle cellule endoteliali

L'esposizione delle cellule endoteliali ad axitinib e SN-38 per 72 ore, a concentrazioni che hanno determinato una inibizione del 50% della proliferazione cellulare, ha prodotto un significativo incremento della secrezione di TSP-1 e una diminuzione della secrezione di VEGF (Figura 13A). In particolare, la stessa percentuale di aumento di TSP-1 è stata ottenuta nella esposizione simultanea con axitinib e SN-38 a concentrazioni molto più basse. Inoltre, la combinazione dei due farmaci, a concentrazioni crescenti, riduce sensibilmente il livello della proteina VEGFR-2 nei lisati delle cellule endoteliali (Figura 13B), anche a concentrazioni molto basse.

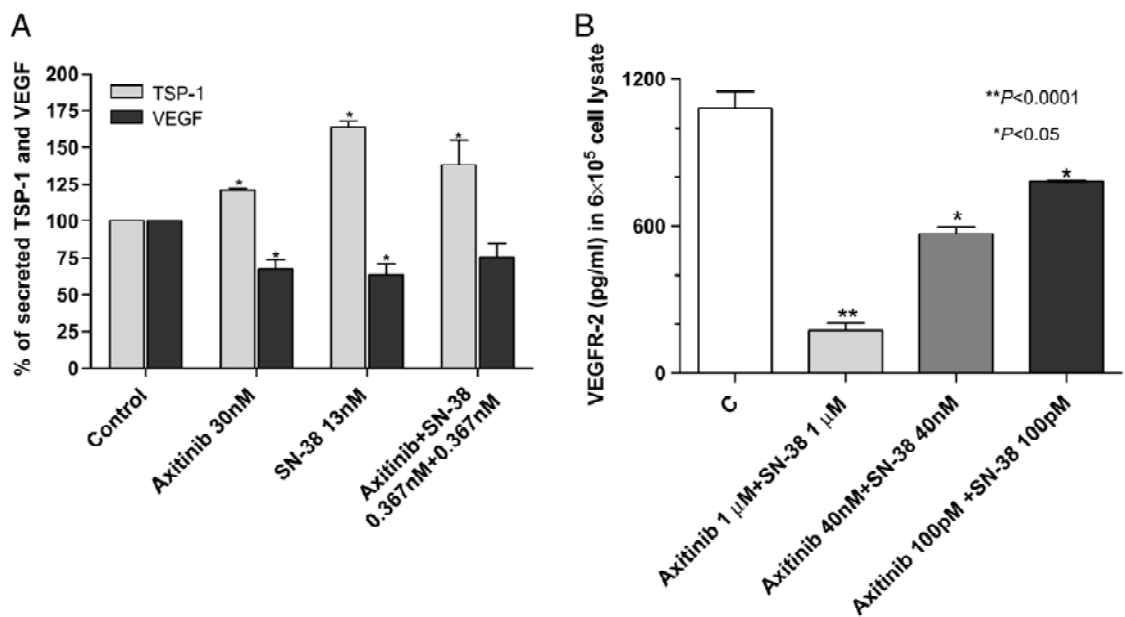


Figura 13

#### **4.7 In Vivo axitinib migliora l'attività antitumorale di irinotecano**

Le cellule Capan-1 iniettate per via sottocutanea (s.c.) in topi CD nu/nu sono cresciute molto rapidamente, e le masse tumorali sono diventate evidenti dopo circa 8, 10 giorni dallo xenotrapianto. I tumori negli animali di controllo hanno mostrato un aumento delle loro dimensioni esponenziale. Sia axitinib che CPT-11, singolarmente o in combinazione, sono stati in grado di inibire la crescita tumorale, anche se in misura diversa (figure 14 e 15A). Durante i 31 giorni di trattamento, axitinib è stato significativamente efficace nell'inibire la crescita tumorale (ad esempio, al giorno 31, 136,8 vs 1389 mm<sup>3</sup> dei controlli, P <.05) in misura maggiore rispetto al CPT-11 (476,2 mm<sup>3</sup>). Nel gruppo di animali che hanno ricevuto il trattamento di axitinib e CPT-11 in combinazione, la regressione dei tumori è stata quasi completa (per esempio, al giorno 31, 67,9 mm<sup>3</sup>), ed è stata sempre significativa rispetto al CPT-11 e rispetto ad axitinib, al giorno 14 e 17 (Figure 14 e 15B ). Il profilo di tossicità è stato favorevole per axitinib, senza perdita di peso durante tutto il corso dell'esperimento (Figura 16). Come previsto, i topi trattati con CPT-11 hanno mostrato un 15% di perdita di peso rispetto ai controlli, mentre il trattamento di combinazione ha provocato una perdita di peso massimo del 30% (Figura 16). Il peso dei topi è stato recuperato con successo con l'assistenza di un veterinario e con una precisa terapia (0,9% soluzione fisiologica, 40-80 ml/kg s.c. ogni 24 ore), come raccomandato dalle guide-linee del comitato accademico per la sperimentazione animale (Workman, Aboagye et al. 2010). Durante i trattamenti non si è verificato nessun decesso legato alla tossicità dei farmaci.

L'iniezione sottocutanea delle cellule tumorali Capan-1 ha causato la comparsa dei tumori e le immagini istologiche sono compatibili con il tumore al pancreas. Come mostrato nella Figura 17, il trattamento con la combinazione simultanea di axitinib e CPT-11 ha ridotto significativamente il numero dei microvasi nella massa tumorale rispetto ai controlli. Le immagini A e B della figura 18 sono immagini microscopiche rappresentative della riduzione del numero dei microvasi nel controllo e nei tumori trattati con la combinazione dei due farmaci.

Come mostrato nella Figura 19, i tumori trattati con la combinazione hanno determinato un aumento significativo dell'apoptosi tumorale, come dimostrato da una maggiore attivazione della caspasi-3, se confrontati con i campioni di

controlli e quelli trattati con i farmaci singolarmente. Le immagini A ed B della figura 20 sono immagini microscopiche rappresentative dell' incremento della caspasi-3 nel controllo e nei tumori trattati con la combinazione dei due farmaci.

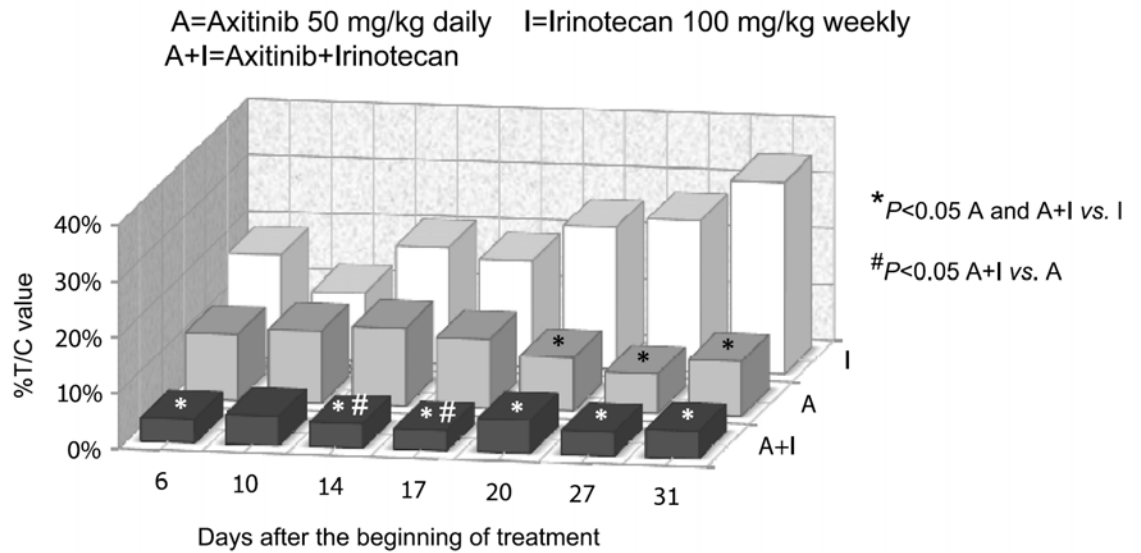


Figura 14

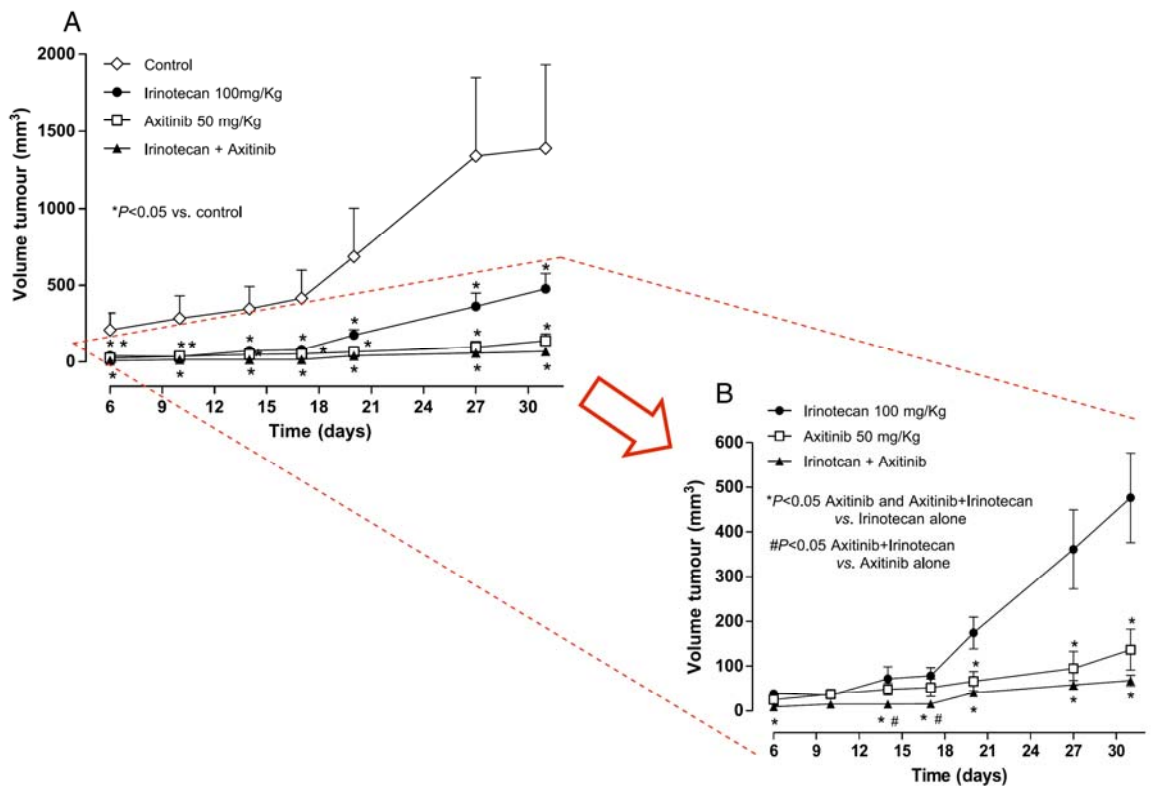


Figura 15

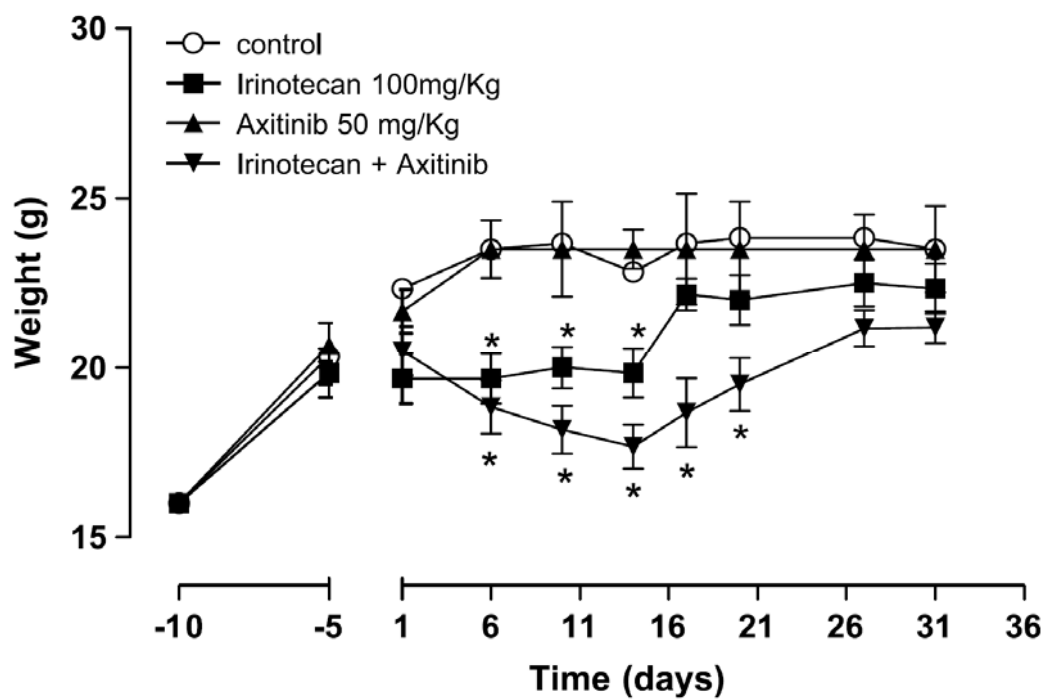
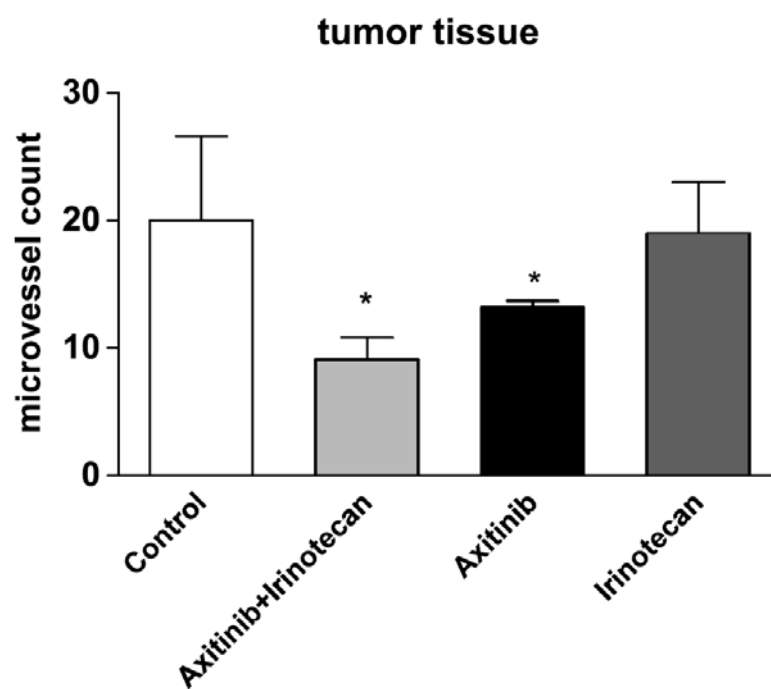
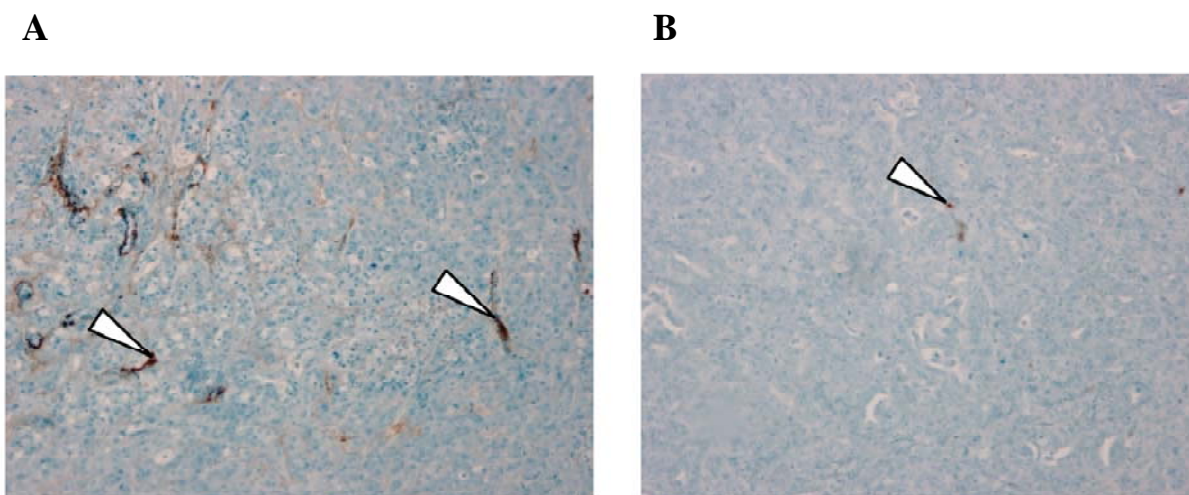


Figura 16

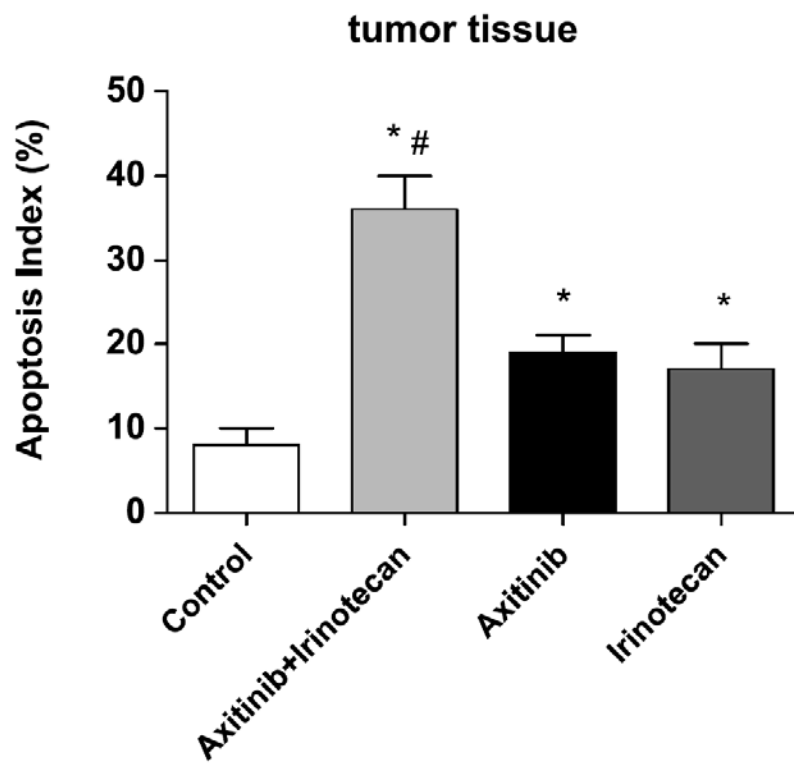




**Figura 17**

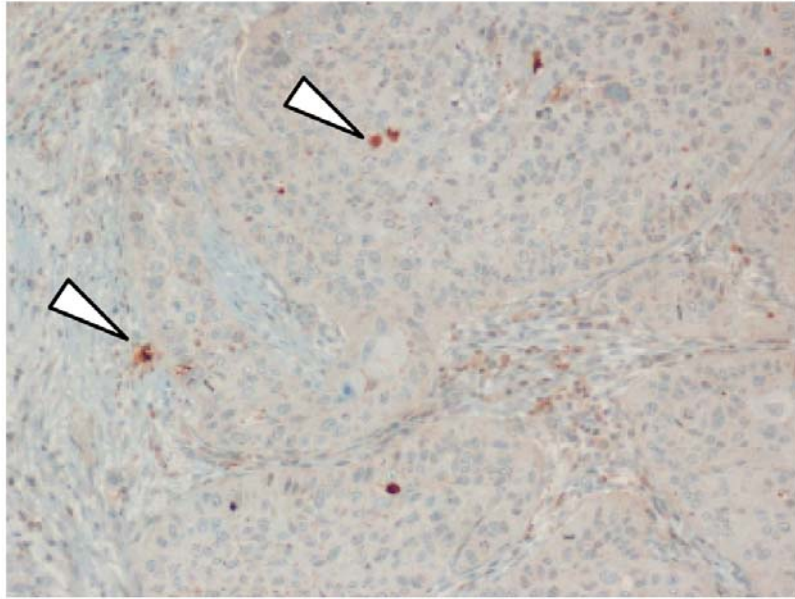


**Figura 18**

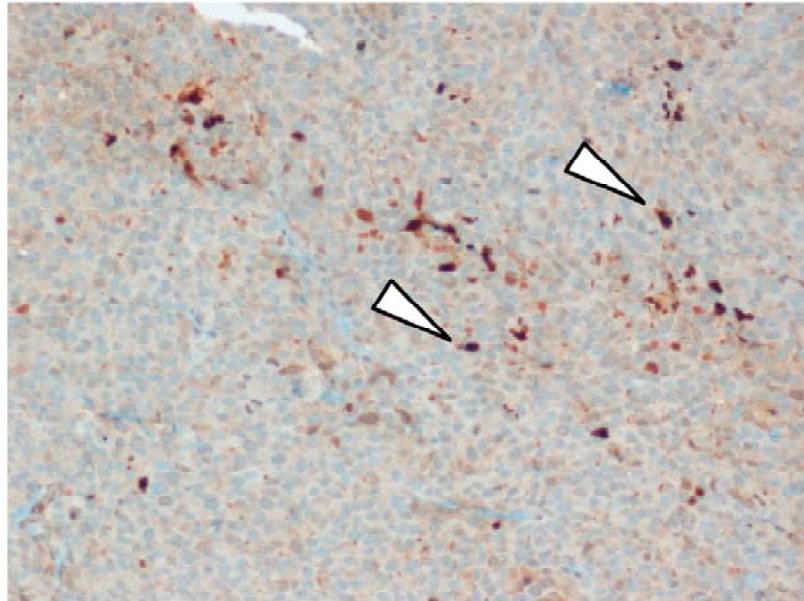


**Figure 19**

**A**



**B**



**Figura 20**

## DISCUSSIONE

Vi è un crescente interesse per lo sviluppo clinico di axitinib, un inibitore orale dei recettori del VEGF-1, -2, -3, che ha dimostrato avere un discreto effetto antiangiogenico (Hu-Lowe, Zou et al. 2008). Infatti, il farmaco ha mostrato una vasta gamma di attività contro vari tipi di tumori in fase II di studio, compresi il tumore alla tiroide (Cohen, Rosen et al. 2008), tumore ai polmoni non a piccole cellule avanzato, carcinoma cellulare renale metastatico (Schiller, Larson et al. 2009) (Rini, Wilding et al. 2009) e il tumore al pancreas, (Spano, Chodkiewicz et al. 2008). Recentemente, nuove combinazioni di chemioterapici sono stati segnalati nel corso di uno studio di fase I sul tumore del colon-retto metastatico e di altri tumori solidi, compresi axitinib in associazione con FOLFIRI (irinotecan, 5-fluorouracile, LV), o FOLFOX (oxaliplatino, 5-fluorouracile, LV) e con o senza bevacizumab (Sharma, Abhyankar et al. 2010). In realtà, axitinib, somministrato alla dose iniziale di 5 mg due volte al giorno in combinazione con FOLFOX o FOLFIRI, è stato ben tollerato e non si è osservata alcuna tossicità dose-limitante (Sharma, Abhyankar et al. 2010). Inoltre, questa combinazione è attualmente testata in maniera continua in uno studio clinico multicentrico di fase II (NCT00615056), che illustra l'interesse clinico di axitinib in schede di trattamento che includono irinotecano. Il nostro studio ha chiaramente dimostrato, per la prima volta, che la combinazione di axitinib con irinotecano è altamente sinergica *in vitro*, sia nelle cellule endoteliali che nelle cellule tumorali di pancreas. Questo è di notevole interesse non solo per gli studi in corso sul tumore al colon-retto ma anche per la pianificazione di nuovi trattamenti futuri per il carcinoma pancreatico. A tal proposito, è stato clinicamente dimostrato che questo tipo di tumore ha una significativa resistenza ai farmaci chemioterapici e ai trattamenti anti-VEGF (Ferrara 2010): quindi sulla base di questi nuovi risultati è necessario un nuovo approccio sinergico basato su un nuovo meccanismo d'azione. I precedenti dati preclinici su axitinib sono quasi tutti legati alla inibizione *in vivo* sia della crescita tumorale che dell'angiogenesi (Hu-Lowe, Zou et al. 2008), (Ma and Waxman 2009), (Ma and Waxman 2008), mentre non sono disponibili dati sul grado

antiproliferativo e l'effetto proapoptotico *in vitro*, nelle cellule endoteliale e tumorali, sia del farmaco da solo che in combinazione con farmaci chemioterapici. È interessante notare come in questo studio si dimostri che gli effetti antiproliferativi e proapoptotici siano significativi anche quando axitinib venga testato da solo sulle cellule tumorali (anche se a concentrazioni più elevate rispetto alle endoteliali): tali risultati sono probabilmente legati all'inibizione di diverse tirosin-chinasi (ad esempio, FGFR-1, platelet-derived growth factor receptor), di proteine chinasi come Abl e Aurora-2 (Hu-Lowe, Zou et al. 2008), e anche con l'azione sinergica della combinazione simultanea con SN-38. Axitinib ha dimostrato di inibire *in vitro* sia la fosforilazione ERK1/2 e di Akt nelle cellule endoteliali vascolari ombelicali umane e la fosforilazione di ERK1/2 nelle cellule tumorali (Hu-Lowe, Zou et al. 2008). I nostri risultati confermano questi dati nelle cellule endoteliali e suggeriscono che le cellule tumorali possano essere direttamente colpite nella proliferazione/apoptosi da axitinib attraverso l'inibizione della fosforilazione di ERK1/2 e di Akt. Inoltre, questi effetti sono amplificati con la combinazione simultanea di SN-38 e axitinib, a concentrazioni molto inferiori rispetto ai singoli farmaci da soli, sia nelle cellule endoteliali che tumorali, indicando che è possibile ottenere la stessa inibizione del segnale di trasduzione intracellulare riducendo sensibilmente le dosi di entrambi i farmaci, come anche chiaramente suggerisce il DRI sperimentale. Alla base della significativa attività sinergica di SN-38/irinotecano con axitinib potrebbe esserci l'aumento della concentrazione intracellulare di SN-38 osservato dopo l'esposizione simultanea ai due farmaci. L'inibizione dell'espressione genica, attraverso la combinazione simultanea dei due farmaci, dei due trasportatori di SN-38, ATP7A e ABCG2, entrambi coinvolti nella resistenza a irinotecano e altri farmaci chemioterapici (Candeil, Gourdier et al. 2004), (Owatari, Akune et al. 2007), (Bates, Medina-Perez et al. 2004) pone in luce il possibile meccanismo attraverso il quale i livelli intracellulari del metabolita attivo di irinotecano sono significativamente aumentati. Infatti, vi è un'evidenza crescente per quanto riguarda la capacità di inibire direttamente i trasportatori ABC da parte di farmaci simili, come sunitinib (Dai, Liang et al. 2009) (Shukla, Robey et al. 2009) o di ridurre l'espressione di ABCG2 sulla superficie delle cellule tumorali da parte di inibitori di tirosina-chinasi come imatinib, nilotinib, e dasatinib (Dohse,

Scharenberg et al. 2010). Pertanto, è concepibile che la somministrazione simultanea di axitinib e SN-38 possa inibire l'espressione di ATP7A e ABCG2 sia a livello dell'mRNA sia a livello delle proteine e la loro attività funzionale. Un altro risultato interessante del nostro studio riguarda la significativa diminuzione, concentrazione-dipendente, della proteina VEGFR-2 nei lisati delle cellule endoteliali dopo trattamento con i farmaci in combinazione.

Questa scoperta potrebbe spiegare la necessità di dosi più basse del farmaco inibitore del VEGFR-2 per ottenere un'analogia inibizione del meccanismo di trasduzione intracellulare e gli stessi effetti sul blocco della proliferazione cellulare e promuovere il processo di apoptosi. Inoltre, in uno studio Lee et al. (Lee, Chen et al. 2007) hanno dimostrato che il segnale autonomo intracellulare VEGF/VEGFR-2 ha un ruolo indispensabile nell'omeostasi vascolare e nella sopravvivenza delle cellule endoteliale e che nelle cellule endoteliali l'attivazione intracellulare di VEGFR-2 è stata soppressa da piccole molecole antagonisti del VEGFR. Quindi, è possibile che la combinazione di farmaci possa diminuire in maniera incisiva entrambe le proteine VEGFR-2 transmembrana e intracellulari, mantenendo anche a dosi più basse l'inibizione, nelle cellule endoteliali, della fosforilazione di VEGFR-2 e l'autofosforilazione mediata da VEGF esogeno (Lee, Chen et al. 2007), determinando in definitiva l'apoptosi nelle cellule endoteliali. Inoltre, numerosi studi hanno riportato una significativa diminuzione di VEGFR-2 solubile nel plasma, durante e dopo il trattamento con inibitori tirosin-chinasici di VEGFR-2, come sorafenib e sunitinib, sia in animali trattati (Ebos, Lee et al. 2007) che nei pazienti (Motzer, Michaelson et al. 2006; Deprimo, Bello et al. 2007) (Pena, Lathia et al. 2010) (Norden-Zfoni, Desai et al. 2007), suggerendo un possibile utilizzo di questo recettore come biomarker di questi inibitori. Recentemente, Mukohara et al. (Mukohara, Nakajima et al. 2010) hanno descritto in uno studio clinico di fase I la diminuzione significativa di sVEGFR-2 da parte axitinib in pazienti giapponesi, con una correlazione significativa tra questi cambiamenti e l'area sotto la curva del farmaco ( $P < .0001$ ). A questo proposito, i nostri risultati *in vitro* potrebbe rappresentare una possibile spiegazione di questi dati clinici riportati in precedenza.

È importante notare come l'aumento di TSP-1, un inibitore endogeno dell'angiogenesi, e la diminuita secrezione di VEGF nei mezzi condizionati

delle cellule endoteliali, a concentrazioni efficaci del due farmaci combinati, sono ulteriori meccanismi che possono spiegare l'efficacia della combinazione dei due farmaci. Il nostro gruppo ha già in precedenza dimostrato che SN-38 causa un aumento significativo di TSP-1 nei mezzi condizionati di cellule endoteliali dopo 72 ore di trattamento (Bocci, Falcone et al. 2008). Questo aumento di TSP-1 è stato mantenuto e addirittura incrementato nel trattamento di combinazione, ma a dosi più basse. Questa osservazione può essere legato all'inibizione della fosforilazione di Akt come dimostrato da Bussolati et al. (Bussolati, Assenzio et al. 2006), che ha descritto il ruolo di modulatore di Akt nella sintesi TSP-1 nelle cellule tumorali endoteliali. Infatti, l'inibizione della attivazione di Akt attraverso somministrazione di inibitori di PI3K ha notevolmente stimolato la sintesi e il rilascio di TSP-1 nelle cellule endoteliali e tumorali (Bussolati, Assenzio et al. 2006), in accordo con i dati precedenti di Niu e coll. (Niu, Perruzzi et al. 2004), che hanno dimostrato che la perdita di segnale di Akt era legato a un graduale aumento dei livelli di TSP-1 nelle cellule endoteliali.

Per procedere con lo sviluppo della combinazione simultanea di CPT-11 e axitinib, il secondo passo è stato quello di valutare *in vivo* l'attività antitumorale e antiangiogenica di questa scheda di trattamento. Sulla base della nostra esperienza precedente (Bocci, Falcone et al. 2008) e dai dati di studi precedentemente pubblicati (Hu-Lowe, Zou et al. 2008), abbiamo deciso di trattare gli animali con la massima dose tollerata (MTD) di CPT-11 (100 mg/kg settimanali), con una dose ottimale di axitinib (25 mg/kg p.o. due volte al giorno), e con la combinazione simultanea di questi due regimi. Il trattamento con axitinib è stato ben tollerato, come previsto sulla base di esperienze in altri modelli tumorali già pubblicati (Hu-Lowe, Zou et al. 2008), se confrontato con il regime MTD di CPT-11. Inoltre, i risultati hanno mostrato un'aumentata efficacia del trattamento di combinazione (almeno per alcuni punti), con un profilo di tossicità significativa ma ancora accettabile; questa maggiore attività è dovuta alla combinazione di un effetto diretto di irinotecano MTD su entrambe le cellule tumorali farmaco-sensibili ed endoteliali proliferanti (Ji, Hayashi et al. 2007), (Kamiyama, Takano et al. 2005), e ad un prolungato effetto antitumorale e antiangiogenico di axitinib *in vivo* (Hu-Lowe, Zou et al. 2008). Infatti, la somministrazione continua dell'inibitore tirosin-

chinasico di VEGFR-2 da solo o in combinazione con CPT-11, è stata estremamente importante perché ha causato la regressione quasi completa del tumore, evitando la rapida (ri)crescita del tumore osservata dopo sospensione della terapia con inibitori di tirosina chinasi (Ebos, Lee et al. 2007), (Ebos, Lee et al. 2009).

Non ci sono dati preclinici attualmente disponibili su irinotecano e axitinib in combinazione, tuttavia, uno studio di fase I con axitinib e irinotecano in combinazione con 5-fluorouracile e LV, in pazienti con tumore avanzato del colon-retto, è stato recentemente pubblicato e descrive un profilo di tossicità accettabile (Sharma, Abhyankar et al. 2010). I nostri dati sperimentali supportano il beneficio preclinico dell'associazione di axitinib, somministrato continuamente, e CPT-11, MTD, nel tumore al pancreas e possono aumentare rapidamente la possibilità di tradurre questa terapia di combinazione nella clinica su solide basi, per rafforzare gli effetti antitumorali e ridurre la tossicità. Infatti, i nostri dati suggeriscono chiaramente la possibilità di ridurre le dosi di entrambi i farmaci, mantenendo gli stessi effetti antiangiogenici e antitumorale. In conclusione, sembra possibile lo sviluppo clinico di una promettente scheda di trattamento irinotecano/axitinib. L'importanza dei nostri risultati è lo sviluppo di una razionale e di una strategia meno empirica per la combinazione di irinotecano e axitinib. Infatti, il nostro studio si concentra sui possibili nuovi approcci, su come affrontare le grandi questioni relative alla applicazione in clinica di trattamenti combinati tra farmaci chemioterapici e inibitori di VEGFR che mettono in relazione l'attività antiangiogenica/antitumorale della combinazione scelta, i livelli di dosaggio, la frequenza della somministrazione, i possibile markers farmacodinamici che possono essere utilizzati per monitorare la terapia (per esempio, espressione genica di ATP7A e ABCG2, concentrazione delle proteine VEGFR-2 e TSP-1). Infatti, sulla base di nostri dati sperimentali, si potrebbe suggerire l'avvio di uno studio clinico pilota di fase II con almeno le seguenti caratteristiche:

- 1) una combinazione simultanea di irinotecan e axitinib (giornaliera) senza eventuali interruzioni nei pazienti con tumore al pancreas (inclusi i pazienti con tumori che sono resistenti a irinotecano, ma che possono rispondere di nuovo per l'inibizione dei trasportatori ATP7A e ABCG2),



- 2) le dosi di irinotecano e axitinib devono essere ridotte rispetto alla loro massima dose tollerata o dose biologica ottimale
- 3) l'attività antitumorale/antiangiogenica valutata con parametri farmacodinamici come, ad esempio, l'espressione genica di ATP7A e ABCG2 nelle cellule mononucleate del sangue periferico, o i livelli plasmatici VEGFR-2 e TSP-1.

## BIBLIOGRAFIA

Agrawal, S., E. R. Kandimalla, et al. (2002). "GEM 231, a second-generation antisense agent complementary to protein kinase A RIalpha subunit, potentiates antitumor activity of irinotecan in human colon, pancreas, prostate and lung cancer xenografts." Int J Oncol **21**(1): 65-72.

Allegrini, G., A. Falcone, et al. (2008). "A pharmacokinetic and pharmacodynamic study on metronomic irinotecan in metastatic colorectal cancer patients." Br J Cancer **98**(8): 1312-9.

Auger, K. R. and L. C. Cantley (1991). "Novel polyphosphoinositides in cell growth and activation." Cancer Cells **3**(7): 263-70.

Augustin, H. G., G. Y. Koh, et al. (2009). "Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(3): 165-77.

Bates, S. E., W. Y. Medina-Perez, et al. (2004). "ABCG2 mediates differential resistance to SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) and homocamptothecins." J Pharmacol Exp Ther **310**(2): 836-42.

Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3**(6): 401-10.

Bhojani, N., C. Jeldres, et al. (2008). "Toxicities associated with the administration of sorafenib, sunitinib, and temsirolimus and their management in patients with metastatic renal cell carcinoma." Eur Urol **53**(5): 917-30.

Bissery, M. C., P. Vrignaud, et al. (1996). "Experimental antitumor activity and pharmacokinetics of the camptothecin analog irinotecan (CPT-11) in mice." Anticancer Drugs **7**(4): 437-60.

Bocci, G., R. Danesi, et al. (2004). "Antiangiogenic versus cytotoxic therapeutic approaches to human pancreas cancer: an experimental study with a vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor and gemcitabine." Eur J Pharmacol **498**(1-3): 9-18.

Bocci, G., A. Falcone, et al. (2008). "Antiangiogenic and anticolorectal cancer effects of metronomic irinotecan chemotherapy alone and in combination with semaxinib." Br J Cancer **98**(10): 1619-29.

Bocci, G., A. Fioravanti, et al. (2005). "Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MIAPaCa-2 cells." Br J Cancer **93**(3): 319-30.

Bressenot, A., S. Marchal, et al. (2009). "Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP

in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma." J Histochem Cytochem **57**(4): 289-300.

Bruns, C. J., H. Shinohara, et al. (2000). "Therapy of human pancreatic carcinoma implants by irinotecan and the oral immunomodulator JBT 3002 is associated with enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in tumor-infiltrating macrophages." Cancer Res **60**(1): 2-7.

Bussolati, B., B. Assenzio, et al. (2006). "The proangiogenic phenotype of human tumor-derived endothelial cells depends on thrombospondin-1 downregulation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." J Mol Med **84**(10): 852-63.

Candeil, L., I. Gourdier, et al. (2004). "ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases." Int J Cancer **109**(6): 848-54.

Carmeliet, P. (2005). "VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer." Oncology **69 Suppl 3**: 4-10.

Chou, T. C. (2006). "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies." Pharmacol Rev **58**(3): 621-81.

Cohen, E. E., L. S. Rosen, et al. (2008). "Axitinib is an active treatment for all histologic subtypes of advanced thyroid cancer: results from a phase II study." J Clin Oncol **26**(29): 4708-13.

Dai, C. L., Y. J. Liang, et al. (2009). "Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2." Cancer Lett **279**(1): 74-83.

Deprimo, S. E., C. L. Bello, et al. (2007). "Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: modulation of VEGF and VEGF-related proteins." J Transl Med **5**: 32.

DeRosier, L. C., D. J. Buchsbaum, et al. (2007). "Combination treatment with TRA-8 anti death receptor 5 antibody and CPT-11 induces tumor regression in an orthotopic model of pancreatic cancer." Clin Cancer Res **13**(18 Pt 2): 5535s-5543s.

Dineen, S. P., L. A. Sullivan, et al. (2008). "The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumor burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer." BMC Cancer **8**: 352.

Dohse, M., C. Scharenberg, et al. (2010). "Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib." Drug Metab Dispos **38**(8): 1371-80.

Ebos, J. M., C. R. Lee, et al. (2007). "Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 17069-74.

Ebos, J. M., C. R. Lee, et al. (2009). "Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis." Cancer Cell **15**(3): 232-9.

Escudier, B., T. Eisen, et al. (2007). "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma." N Engl J Med **356**(2): 125-34.

Eskens, F. A. and J. Verweij (2006). "The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) targeting angiogenesis inhibitors; a review." Eur J Cancer **42**(18): 3127-39.

Faivre, S., G. Demetri, et al. (2007). "Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development." Nat Rev Drug Discov **6**(9): 734-45.

Fenton, B. M. and S. F. Paoni (2007). "The addition of AG-013736 to fractionated radiation improves tumor response without functionally normalizing the tumor vasculature." Cancer Res **67**(20): 9921-8.

Fenton, B. M. and S. F. Paoni (2009). "Alterations in daily sequencing of axitinib and fractionated radiotherapy do not affect tumor growth inhibition or pathophysiological response." Radiat Res **171**(5): 606-14.

Ferrara, N. (2000). "Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis." Recent Prog Horm Res **55**: 15-35; discussion 35-6.

Ferrara, N. (2001). "Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1358-66.

Ferrara, N. (2002). "VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors." Nat Rev Cancer **2**(10): 795-803.

Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy." Oncologist **9 Suppl 1**: 2-10.

Ferrara, N. (2005). "VEGF as a therapeutic target in cancer." Oncology **69 Suppl 3**: 11-6.

Ferrara, N. (2010). "Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **21**(1): 21-6.

Fidler, I. J. and L. M. Ellis (2004). "Neoplastic angiogenesis--not all blood vessels are created equal." N Engl J Med **351**(3): 215-6.

Folkman, J. (2007). "Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?" Nat Rev Drug Discov **6**(4): 273-86.

Furukawa, T., M. Komatsu, et al. (2008). "Copper transport systems are involved in multidrug resistance and drug transport." Curr Med Chem **15**(30): 3268-78.

Gotink, K. J. and H. M. Verheul "Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?" Angiogenesis **13**(1): 1-14.

Gottlieb, J. A. and C. S. Hill, Jr. (1974). "Chemotherapy of thyroid cancer with adriamycin. Experience with 30 patients." N Engl J Med **290**(4): 193-7.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Herbst, R. S., A. M. Davies, et al. (2007). "Efficacy and safety of single-agent pertuzumab, a human epidermal receptor dimerization inhibitor, in patients with non small cell lung cancer." Clin Cancer Res **13**(20): 6175-81.

Hicklin, D. J. and L. M. Ellis (2005). "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis." J Clin Oncol **23**(5): 1011-27.

Houck, K. A., D. W. Leung, et al. (1992). "Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms." J Biol Chem **267**(36): 26031-7.

Hu-Lowe, D. D., H. Y. Zou, et al. (2008). "Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3." Clin Cancer Res **14**(22): 7272-83.

Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **350**(23): 2335-42.

Ikeda, E., M. G. Achen, et al. (1995). "Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells." J Biol Chem **270**(34): 19761-6.

Jain, R. K. (2001). "Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy." Nat Med **7**(9): 987-9.

Jain, R. K. (2005). "Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts." Oncology (Williston Park) **19**(4 Suppl 3): 7-16.

Ji, Y., K. Hayashi, et al. (2007). "The camptothecin derivative CPT-11 inhibits angiogenesis in a dual-color imageable orthotopic metastatic nude mouse model of human colon cancer." Anticancer Res **27**(2): 713-8.

Kamiyama, H., S. Takano, et al. (2005). "Anti-angiogenic effects of SN38 (active metabolite of irinotecan): inhibition of hypoxia-inducible factor 1 alpha

(HIF-1 $\alpha$ )/vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of glioma and growth of endothelial cells." J Cancer Res Clin Oncol **131**(4): 205-13.

Kelly, R. J. and O. Rixe (2009). "Axitinib--a selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor." Target Oncol **4**(4): 297-305.

Kerbel, R. and J. Folkman (2002). "Clinical translation of angiogenesis inhibitors." Nat Rev Cancer **2**(10): 727-39.

Kerbel, R. S. (2006). "Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer?" Science **312**(5777): 1171-5.

Kerbel, R. S. (2008). "Tumor angiogenesis." N Engl J Med **358**(19): 2039-49.

Kilicarslan, A. B., M. Ogus, et al. (2003). "Clinical importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) for papillary thyroid carcinomas." APMIS **111**(3): 439-43.

Kindler, H. L. (2007). "Pancreatic cancer: an update." Curr Oncol Rep **9**(3): 170-6.

Kusuhara, H. and Y. Sugiyama (2007). "ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family)." Pflugers Arch **453**(5): 735-44.

Kwak, E. L., R. Sordella, et al. (2005). "Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(21): 7665-70.

Lee, S., T. T. Chen, et al. (2007). "Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis." Cell **130**(4): 691-703.

Liu, Y. and N. S. Gray (2006). "Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations." Nat Chem Biol **2**(7): 358-64.

Llovet, J. M., S. Ricci, et al. (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." N Engl J Med **359**(4): 378-90.

Ma, J. and D. J. Waxman (2008). "Modulation of the antitumor activity of metronomic cyclophosphamide by the angiogenesis inhibitor axitinib." Mol Cancer Ther **7**(1): 79-89.

Ma, J. and D. J. Waxman (2009). "Dominant effect of antiangiogenesis in combination therapy involving cyclophosphamide and axitinib." Clin Cancer Res **15**(2): 578-88.

Mendel, D. B., A. D. Laird, et al. (2003). "In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship." Clin Cancer Res **9**(1): 327-37.

Mishra, G., J. Butler, et al. (2005). "Phase II trial of induction gemcitabine/CPT-11 followed by a twice-weekly infusion of gemcitabine and concurrent external beam radiation for the treatment of locally advanced pancreatic cancer." Am J Clin Oncol **28**(4): 345-50.

Morabito, A., M. C. Piccirillo, et al. (2009). "Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions." Oncologist **14**(4): 378-90.

Motzer, R. J., T. E. Hutson, et al. (2007). "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma." N Engl J Med **356**(2): 115-24.

Motzer, R. J., M. D. Michaelson, et al. (2006). "Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma." J Clin Oncol **24**(1): 16-24.

Motzer, R. J., B. I. Rini, et al. (2006). "Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma." JAMA **295**(21): 2516-24.

Mukohara, T., H. Nakajima, et al. (2010). "Effect of axitinib (AG-013736) on fatigue, thyroid-stimulating hormone, and biomarkers: a phase I study in Japanese patients." Cancer Sci **101**(4): 963-8.

Nakahara, T., S. M. Norberg, et al. (2006). "Effect of inhibition of vascular endothelial growth factor signaling on distribution of extravasated antibodies in tumors." Cancer Res **66**(3): 1434-45.

Neufeld, G., O. Kessler, et al. (2001). "The contribution of proangiogenic factors to the progression of malignant disease: role of vascular endothelial growth factor and its receptors." Surg Oncol Clin N Am **10**(2): 339-56, ix.

Niedergethmann, M., R. Hildenbrand, et al. (2002). "High expression of vascular endothelial growth factor predicts early recurrence and poor prognosis after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas." Pancreas **25**(2): 122-9.

Niu, Q., C. Perruzzi, et al. (2004). "Inhibition of Tie-2 signaling induces endothelial cell apoptosis, decreases Akt signaling, and induces endothelial cell expression of the endogenous anti-angiogenic molecule, thrombospondin-1." Cancer Biol Ther **3**(4): 402-5.

Norden-Zfoni, A., J. Desai, et al. (2007). "Blood-based biomarkers of SU11248 activity and clinical outcome in patients with metastatic imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor." Clin Cancer Res **13**(9): 2643-50.

O'Reilly, E. M. (2009). "Pancreatic adenocarcinoma: new strategies for success." Gastrointest Cancer Res **3**(2 Suppl): S11-5.

Owatari, S., S. Akune, et al. (2007). "Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer." Cancer Res **67**(10): 4860-8.

Pao, W., V. Miller, et al. (2004). "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13306-11.

Park, J. E., G. A. Keller, et al. (1993). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF." Mol Biol Cell **4**(12): 1317-26.

Pena, C., C. Lathia, et al. (2010). "Biomarkers predicting outcome in patients with advanced renal cell carcinoma: Results from sorafenib phase III Treatment Approaches in Renal Cancer Global Evaluation Trial." Clin Cancer Res **16**(19): 4853-63.

Rini, B. I., G. Wilding, et al. (2009). "Phase II study of axitinib in sorafenib-refractory metastatic renal cell carcinoma." J Clin Oncol **27**(27): 4462-8.

Rixe, O., R. M. Bukowski, et al. (2007). "Axitinib treatment in patients with cytokine-refractory metastatic renal-cell cancer: a phase II study." Lancet Oncol **8**(11): 975-84.

Rocha Lima, C. M., C. A. Sherman, et al. (2001). "Irinotecan/gemcitabine combination chemotherapy in pancreatic cancer." Oncology (Williston Park) **15**(3 Suppl 5): 46-51.

Rosen, L. S. (1998). "Irinotecan in lymphoma, leukemia, and breast, pancreatic, ovarian, and small-cell lung cancers." Oncology (Williston Park) **12**(8 Suppl 6): 103-9.

Rugo, H. S., R. S. Herbst, et al. (2005). "Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results." J Clin Oncol **23**(24): 5474-83.

Schiller, J. H., T. Larson, et al. (2009). "Efficacy and safety of axitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: results from a phase II study." J Clin Oncol **27**(23): 3836-41.

Sharma, S., V. Abhyankar, et al. (2010). "A phase I study of axitinib (AG-013736) in combination with bevacizumab plus chemotherapy or chemotherapy alone in patients with metastatic colorectal cancer and other solid tumors." Ann Oncol **21**(2): 297-304.

Shibuya, M. (2008). "Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis." BMB Rep **41**(4): 278-86.



Shimaoka, K., D. A. Schoenfeld, et al. (1985). "A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patients with advanced thyroid carcinoma." Cancer **56**(9): 2155-60.

Shukla, S., R. W. Robey, et al. (2009). "Sunitinib (Sutent, SU11248), a small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks function of the ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2." Drug Metab Dispos **37**(2): 359-65.

Simon, P. O., Jr., J. E. McDunn, et al. (2009). "Targeting AKT with the proapoptotic peptide, TAT-CTMP: a novel strategy for the treatment of human pancreatic adenocarcinoma." Int J Cancer **125**(4): 942-51.

Solowiej, J., S. Bergqvist, et al. (2009). "Characterizing the effects of the juxtamembrane domain on vascular endothelial growth factor receptor-2 enzymatic activity, autophosphorylation, and inhibition by axitinib." Biochemistry **48**(29): 7019-31.

Spano, J. P., C. Chodkiewicz, et al. (2008). "Efficacy of gemcitabine plus axitinib compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: an open-label randomised phase II study." Lancet **371**(9630): 2101-8.

Takara, K., N. Kitada, et al. (2009). "Molecular changes to HeLa cells on continuous exposure to SN-38, an active metabolite of irinotecan hydrochloride." Cancer Lett **278**(1): 88-96.

van der Veldt, A. A., E. Boven, et al. (2009). "Sunitinib-induced hemoglobin changes are related to the dosing schedule." J Clin Oncol **27**(8): 1339-40; author reply 1340-2.

Wan, P. T., M. J. Garnett, et al. (2004). "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF." Cell **116**(6): 855-67.

Wilhelm, S., C. Carter, et al. (2006). "Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer." Nat Rev Drug Discov **5**(10): 835-44.

Wilmes, L. J., M. G. Pallavicini, et al. (2007). "AG-013736, a novel inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinases, inhibits breast cancer growth and decreases vascular permeability as detected by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging." Magn Reson Imaging **25**(3): 319-27.

Wissner, A., H. L. Fraser, et al. (2007). "Dual irreversible kinase inhibitors: quinazoline-based inhibitors incorporating two independent reactive centers with each targeting different cysteine residues in the kinase domains of EGFR and VEGFR-2." Bioorg Med Chem **15**(11): 3635-48.

Workman, P., E. O. Aboagye, et al. (2010). "Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research." Br J Cancer **102**(11): 1555-77.

Xu, J., H. Peng, et al. (2007). "Human multidrug transporter ABCG2, a target for sensitizing drug resistance in cancer chemotherapy." Curr Med Chem **14**(6): 689-701.

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare le persone che hanno collaborato alla progettazione e realizzazione dello studio illustrato in questa tesi: la dott.ssa Anna Fioravanti, la dott.ssa Paola Orlandi, la dott.ssa Teresa Di Desidero e la dott.ssa Greta Ali. Ringrazio il Prof. Romano Danesi, direttore della Divisione di Farmacologia e Chemioterapia dell'Università di Pisa e in particolare il Dott. Guido Bocci per i preziosi insegnamenti e il continuo sostegno durante tutto il corso dello studio.

Un ringraziamento speciale a tutta la mia famiglia.