

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA
Facoltà di Medicina e Chirurgia



TESI DI SPECIALIZZAZIONE

Ruolo dei determinanti molecolari nel predire la resistenza al Trastuzumab nelle pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella metastatico con iperespressione di HER-2

RELATORE

Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone

CANDIDATO

Dott. Irene Stasi

Anno Accademico 2010-2011

INDICE DEI CONTENUTI

1. INTRODUZIONE.....	pag. 4
1.1 Epidemiologia del carcinoma mammario.....	pag. 4
1.2 Ruolo prognostico dell'iperpressione di HER-2.....	pag. 5
2. TRATTAMENTO MEDICO DELLE PAZIENTI CON DIAGNOSI DI CARCINOMA MAMMARIO DELLA MAMMELLA METASTATICO CON HER-2 IPERESPRESSO.....	pag.7
2.1 Ruolo di Trastuzumab.....	pag. 7
2.2 Ruolo di Lapatinib.....	pag. 15
3. RESISTENZA AL TRASTUZUMAB.....	pag. 22
3.1 Potenziale ruolo di P95HER2.....	pag. 22
3.2 Potenziale ruolo di PTEN/PI3KCA.....	pag. 27
4. OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	pag. 33
5. PAZIENTI E METODI.....	pag. 34
5.1 Criteri di inclusione	pag. 34
5.2 Metodologia di laboratorio.....	pag. 34

6. RISULTATI.....	pag. 36
6.1 Caratteristiche dei pazienti.....	pag. 36
6.2 Caratteristiche molecolari.....	pag. 39
6.3 Correlazione tra le caratteristiche molecolari e l'outcome clinico.....	pag. 41
7. DISCUSSIONE.....	pag. 47
8. BIBLIOGRAFIA	pag. 51

INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia del carcinoma mammario

Il carcinoma della mammella è la neoplasia maligna del sesso femminile a più elevata incidenza nei paesi industrializzati e rappresenta la principale causa di morte nelle donne tra i 40 e i 50 anni. Ogni anno in Italia si registrano circa 35.000 nuovi casi ed 11.000 decessi, in Toscana sono state stimate nel 2010 circa 4100 nuove diagnosi di tumore della mammella ed 850 decessi. L'incidenza di malattia presenta un netto gradiente tra Nord, Centro e Sud con rischi superiori del 40% a Nord. Nel recente quinquennio l'incidenza ha mostrato un aumento variabile dal 2% al 17%.[1], a fronte di una netta diminuzione in mortalità, grazie agli avanzamenti ottenuti nella diagnosi precoce e nella strategia terapeutica adiuvante. Tuttavia circa il 20-30 % delle pazienti con linfonodi negativi e il 50% di quelle con linfonodi positivi alla diagnosi svilupperà metastasi a distanza, mentre il 7-10 % presenta uno stadio avanzato di malattia già al momento della diagnosi. Ad eccezione di casi sporadici (2-3%) in cui è stata osservata una sopravvivenza di lunga durata, il tumore mammario metastatico rimane ad oggi una malattia non guaribile, con una sopravvivenza mediana nelle pazienti non precedentemente trattate di 18-24 mesi variabile in base all'aggressività biologica, alla sede ed all'estensione della malattia (2). Tuttavia studi recenti descrivono un crescente guadagno, in termini di sopravvivenza globale pari a 12,5 mesi, grazie all' introduzione di nuovi agenti terapeutici.(3)

Gli obiettivi principali della terapia medica della malattia avanzata rimangono quindi il prolungamento della sopravvivenza libera da progressione e globale, il controllo degli eventuali sintomi ed il miglioramento della qualità di vita. Contestualmente risulta essenziale limitare o prevenire le possibili tossicità del trattamento, che deve pertanto essere individualizzato e conforme alle caratteristiche proprie della paziente (età, performance status, comorbidità, precedenti trattamenti effettuati, disponibilità delle terapie ed accessibilità alle stesse, desideri ed aspettative della paziente) e della neoplasia (assetto recettoriale sia del tumore primitivo che delle metastasi, livello di espressione di HER-2, sede ed estensione, aggressività biologica, intervallo libero da malattia). L'iperespressione della proteina HER-2 (Human Epidermal growth factor Receptor – 2;

erbB2/neu) si verifica in circa il 25-30% dei carcinomi mammari, determinando conseguenti implicazioni prognostiche e terapeutiche.

1.2 Ruolo prognostico dell'iperespressione di HER-2

Le pazienti i cui tumori presentano una iperespressione di HER-2 hanno generalmente una prognosi peggiore ed un andamento maggiormente aggressivo della malattia rispetto alle pazienti i cui tumori non esprimono tale proteina di membrana. L'utilizzo nella pratica clinica di Trastuzumab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il dominio IV della porzione extracellulare di HER-2 (il cui meccanismo d'azione verrà successivamente descritto), ha significativamente modificato la storia naturale dei carcinomi mammari iperesprimenti HER2, migliorando la prognosi di queste pazienti. Recentemente Dawood et al. hanno condotto uno studio osservazionale monoistituzionale volto a confrontare le differenze in sopravvivenza tra 2091 donne con diagnosi di carcinoma mammario metastatico diagnosticato tra il 1991 e il 2007, sulla base dello stato di HER-2 e del trattamento con trastuzumab. Lo stato tumorale di HER-2 è stato determinato utilizzando sia una metodica immunohistochimica (IHC) che una metodica di amplificazione genica utilizzando la tecnica dell'ibridazione fluorescente in situ (FISH); i tumori sono stati classificati come HER-2 positivi con una colorazione all' IHC di tipo 3+ e/o nel caso di amplificazione genica evidente alla FISH. I risultati hanno dimostrato come il tasso di sopravvivenza ad 1 anno delle pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico HER-2 negativo, HER-2 positivo trattato in prima linea con trastuzumab ed HER-2 positivo non trattato con trastuzumab, fosse rispettivamente pari a 75.1% (95% CI, 72.9% - 77.2%), 86.6% (95% CI, 80.8% - 90.8%) e 70.2% (95% CI, 60.3% - 78.1%) con differenze tra i tre gruppi statisticamente significative ($p=0.028$). Le pazienti con tumore mammario HER-2 positivo trattate con trastuzumab mostrano in questa analisi un incremento assoluto dell'11.5% e del 16.4% del tasso di sopravvivenza ad 1 anno rispetto alle pazienti con diagnosi di carcinoma mammario HER-2 negativo e HER-2 positivo non trattate con trastuzumab, rispettivamente. Questi risultati sembrano suggerire come le pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella HER-2 positivo abbiano comunque una prognosi peggiore rispetto alla popolazione di pazienti HER-2 negativo e solo quando si utilizzi una target therapy come il trastuzumab la prognosi

delle pazienti HER-2 positive migliori notevolmente simile o anche superiore rispetto alle pazienti HER-2 negative (4).

TRATTAMENTO MEDICO DELLE PAZIENTI CON DIAGNOSI DI CARCINOMA MAMMARIO DELLA MAMMELLA METASTATICO CON HER-2 IPERESPRESSO

2.1 Ruolo di Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin®) è un anticorpo monoclonale umanizzato ricombinante (mAb) diretto contro il dominio extracellulare della proteina HER-2 (5). Sebbene il meccanismo d'azione non sia completamente conosciuto, diversi effetti molecolari e cellulari sono stati osservati in sperimentazioni con modelli in vivo e in vitro.

Legandosi al dominio extracellulare, trastuzumab previene il clivaggio del dominio stesso così come la dimerizzazione di HER-2, inibendo l'attivazione recettoriale e la successiva trasmissione del segnale a valle coinvolgente molteplici vie intracellulari, quali le vie delle fosfatidil inositolo 3,4,5 trifosfato chinasi (PI3K) e delle MAP chinasi (MAPK).

La riduzione del segnale può condurre ad una internalizzazione recettoriale con successiva degradazione (6,7). Tale evento resta tuttavia controverso in seguito alla evidenza della immodificazione dei livelli recettoriali in risposta al trattamento con trastuzumab (8).

Trastuzumab, oltre a tali meccanismi d'azioni citostatici, esplica anche un'azione citotossica mediando l'attivazione della citotossicità cellulo-mediata dall'anticorpo (ADCC, antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity) (9).

La dose attualmente utilizzata e la schedula di somministrazione sono state stabilite da studi prospettici randomizzati, tra cui quello condotto da Vogel e coll. (10) nel quale 114 pazienti non pretrattate per la malattia metastatica hanno ricevuto trastuzumab in monoterapia alla dose d'attacco di 4 mg/kg con somministrazione endovenosa (ev) seguita da 2 mg/kg ev alla settimana o il doppio della dose, in assenza di un miglioramento della risposta, risultata pari al 35% in entrambi i bracci. Tali risultati sono stati successivamente confermati nello stesso setting di pazienti da Baselga e coll. (11) in uno studio di fase II, nel quale trastuzumab veniva somministrato in monoterapia alla dose di

attacco di 8mg/kg ev seguito da 6 mg/kg ev ogni tre settimane, dimostrando come i livelli sierici siano sovrapponibili a quelli ottenuti con le somministrazioni settimanali.

In virtù del sinergismo tra trastuzumab e vari chemioterapici precedentemente testato in vitro (12), molteplici studi clinici hanno valutato tale associazione sia in pazienti affette da carcinoma mammario metastatico non pretrattate che pluritrattate, dimostrando incrementi significativi sia del tasso di risposte globale (ORR), che di parametri di efficacia quali il tempo alla progressione di malattia (TTP), la sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS).

I primi risultati in merito, derivano dallo studio condotto da Slamon e coll.(13), nel quale l'aggiunta di trastuzumab ad un trattamento chemioterapico standard di prima linea in pazienti affette da carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo, ha dimostrato un miglioramento significativo del TTP, della ORR, della durata della risposta e della OS. La HER-2 positività è stata definita sulla base della iperespressione di grado 2+/3+ diagnosticata mediante immunistochemica. Le 496 pazienti arruolate, sono state randomizzate a ricevere un trattamento chemioterapico in combinazione (235 casi) o meno (234 casi) con trastuzumab; il trattamento chemioterapico comprendeva doxorubicina alla dose di 60 mg/mq ev o epirubicina alla dose di 75 mg/mq ev in associazione a ciclofosfamide alla dose di 600 mg/mq ev somministrati ogni 3 settimane per 6 cicli nelle pazienti che non avevano ricevuto una precedente terapia a base di antracicline (281 casi), oppure paclitaxel alla dose di 175 mg/mq ev trisettimanale per 6 cicli nelle pazienti trattate con antraciclina in fase adiuvante (188 casi). Il trattamento con trastuzumab, somministrato con dose di carico pari a 4 mg/kg ev seguita dal dosaggio di 2 mg/kg ev alla settimana, è stato proseguito fino alla progressione di malattia. Alla progressione, a discrezione del clinico, è stato permesso alle pazienti trattate con solo chemioterapia di ricevere trastuzumab ed alle pazienti già trattate di proseguirlo, opzioni complessivamente scelte per il 66% delle pazienti randomizzate. L'obiettivo primario dello studio, rappresentato da un incremento del 50% del TTP, è stato raggiunto, essendosi registrato un aumento da 4.6 mesi nelle pazienti sottoposte alla sola chemioterapia a 7.4 mesi nelle pazienti trattate con la combinazione ($p < 0.001$). Tale vantaggio è stato dimostrato sia nella coorte delle pazienti trattate con polichemioterapia contenente antracicline che nella coorte trattata con paclitaxel. La terapia di

combinazione con trastuzumab è stata inoltre associata ad un incremento nella percentuale di ORR (50% vs 32%, $p < 0.001$) e ad una maggiore durata della risposta (mediana, 9.1 vs 6.1 mesi; $p < 0.001$), nuovamente indipendentemente dal trattamento chemioterapico associato. Infine, il trattamento di combinazione con trastuzumab ha determinato una riduzione significativa della percentuale di mortalità ad un anno (22% vs 33%, $p = 0.008$) con un incremento della sopravvivenza mediana (25.1 vs 20.3 mesi; $p = 0.046$) ed una riduzione del rischio di morte pari al 20%. Come sottolineano gli autori, tali risultati includono anche l'analisi delle pazienti trattate con trastuzumab dopo la prima progressione di malattia.

Per quanto riguarda il profilo di tollerabilità, tale studio ha evidenziato una significativa associazione tra la riduzione della frazione di eiezione ventricolare sinistra e terapia con trastuzumab: il 27% delle pazienti trattate con trastuzumab e antracicline, 13% delle pazienti trattate con trastuzumab e paclitaxel e 5% di quelle trattate con solo trastuzumab hanno manifestato tossicità cardiaca. L'assenza di rilevanti modelli animali e la scarsità di biopsie cardiache delle pazienti con tossicità cardiologia ha limitato la comprensione del meccanismo della cardiotoxicità di trastuzumab (14); alcuni studi suggeriscono un ruolo di HER2 nell'embriogenesi e nella prevenzione della cardiomiopatia dilatativa (15), inoltre la via di segnale attivata da HER2 sembra importante per la riparazione del danno sui miociti indotto dalle antracicline (16). Sebbene non ci sia un approccio univoco per monitorare l'insufficienza cardiaca, la maggior parte dei successivi studi clinici randomizzati coinvolgenti pazienti con malattia metastatica hanno incluso uno studio di base della funzione ventricolare seguito da monitoraggio periodico ogni 8-16 settimane.

Successivamente, uno studio clinico di fase II randomizzato condotto da Marty e coll. su 186 pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico con iperespressione di HER-2 ha valutato un trattamento chemioterapico di prima linea con docetaxel associato o meno a trastuzumab (17). Le pazienti sono state randomizzate a ricevere sei cicli di docetaxel 100 mg/m^2 ev ogni tre settimane da solo o in combinazione con trastuzumab alla dose di carico di 4 mg/kg ev e poi 2 mg/kg ev alla settimana fino a progressione della malattia. Le pazienti dovevano presentare iperespressione HER-2 di grado 3+ diagnosticato mediante immunistochimica e/o amplificazione del gene HER2

individuata mediante ibridazione in situ tramite fluorescenza (FISH). End point primario dello studio è stata la percentuale di risposte complessive, in particolare la risposta veniva misurata ogni tre settimane tramite raggi X, tomografia computerizzata, risonanza magnetica ed esame clinico secondo i criteri WHO; sono stati valutati come end point secondari il profilo di sicurezza, la durata della risposta, il tempo alla progressione della malattia, il tempo al fallimento del trattamento e la sopravvivenza complessiva. Il 64% delle pazienti del gruppo trattato con l'associazione e il 55% del gruppo in monoterapia erano state precedentemente trattate con antracicline in terapia adiuvante.

Secondo l'analisi "intention to treat" la risposta complessiva è stata del 61% nel gruppo associazione e del 34% nel gruppo monoterapia ($p = 0.0002$). La significatività è stata raggiunta anche per la durata della risposta (mediana 11.7 mesi vs 5.7 mesi $p=0.009$), per il tempo alla progressione (11.7 mesi vs 6.1 mesi $p=0.0001$), per il tempo di fallimento del trattamento (9.8 vs 5.3 mesi; $p=0.0001$) e per la sopravvivenza complessiva (31.2 mesi vs 22.7 mesi, $p=0.0325$). Una risposta completa si è avuta in 6 casi nel gruppo con l'associazione e in 2 casi nel gruppo in monoterapia. Dopo 24 mesi dall'arruolamento dell'ultima paziente la sopravvivenza era del 41% nel gruppo trattato con l'associazione e del 37% nel gruppo in monoterapia. Come previsto dal protocollo, la pazienti inizialmente randomizzate a ricevere il solo trattamento chemioterapico, sono state successivamente trattate con trastuzumab: 30 pazienti per progressione della malattia, 10 pazienti a causa dell'interruzione della terapia con docetaxel per tossicità e 13 pazienti per altre ragioni: in questo sottogruppo di pazienti la sopravvivenza mediana complessiva è stata di 30.3 mesi, indicando il significativo impatto del trattamento con trastuzumab, sebbene inserito nella strategia terapeutica oltre il trattamento di prima linea. I risultati degli studi clinici descritti hanno validato l'utilizzo, nell'ambito della comune pratica clinica, dell'associazione di trastuzumab e taxano (paclitaxel o docetaxel) come regime terapeutico di riferimento per il trattamento chemioterapico di prima linea per le pazienti affette da carcinoma mammario HER-2 positivo.

Ulteriore studio clinico di fase II condotto da Burstein e coll. nel medesimo setting di pazienti, ha valutato un trattamento chemioterapico di prima linea con vinorelbina associato a trastuzumab (18). Le 54 pazienti arruolate sono state trattate con vinorelbina 25 mg/m² ev ogni settimana in

combinazione a trastuzumab alla dose di carico di 4 mg/kg ev e poi 2 mg/kg ev alla settimana fino a progressione della malattia. Le pazienti dovevano presentare iperespressione HER-2 di grado 3+ diagnosticato mediante immunistochimica e/o amplificazione del gene HER2 individuata mediante ibridazione in situ tramite fluorescenza. Il tasso di risposte obiettive, obiettivo primario dello studio, è risultato pari al 68%; in particolare l'ORR non è risultato dipendente dalla metodica di valutazione dello stato di HER-2 (IHC verso FISH) né dall'eventuale trattamento chemioterapico adiuvante ricevuto (verificatosi nel 63% delle pazienti arruolate). Il tempo di fallimento del trattamento è stato pari a 5.6 mesi ed il 38% delle pazienti è risultato libero da progressione ad 1 anno. Gli ottimi risultati evidenziati, a fronte di una maneggevole tolleranza, hanno condotto gli autori a pianificare uno studio di fase III (19), purtroppo chiuso precocemente a causa di uno scarso accrual, nel quale la associazione sopradescritta è stata confrontata ad un trattamento contenente trastuzumab e taxano (paclitaxel o docetaxel in base alla scelta dello sperimentatore). I risultati pubblicati, ottenuti su 41 pazienti randomizzate all'associazione con vinorelbina e 40 pazienti con taxano, evidenziano una equiattività (51% verso 40% rispettivamente, $p=0.37$) a fronte di un incremento, sebbene non significativo, in termini di TTP (8.5 mesi verso 6.0; $p=0.09$).

Recentemente, è stato pubblicato dal gruppo danese di Andersson e coll. (20) uno studio di fase III condotto su 284 pazienti affette da carcinoma mammario HER-2 positivo metastatico non pretrattate, randomizzate a ricevere un trattamento chemioterapico con vinorelbina alla dose di 30-35 mg/mq ev al giorno 1 e 8 ogni 3 settimane o docetaxel 100 mg/mq ev ogni 3 settimane, associati a trastuzumab alla dose di carico di 8 mg/kg ev e poi 6 mg/kg ev ogni 3 settimane fino a progressione della malattia. Le pazienti dovevano presentare iperespressione HER-2 di grado 3+ diagnosticato mediante immunistochimica e/o amplificazione del gene HER2 individuata mediante ibridazione in situ tramite fluorescenza (FISH). I risultati hanno evidenziato una sostanziale equiefficacia dei due regimi, con un TTP pari a 12.4 mesi e 15.3 mesi per il regime contenente docetaxel e vinorelbina rispettivamente ($HR=0.94$; $p=0.67$), una OS pari a 35.7 mesi e 38.8 mesi ($HR=1.01$; $p=0.98$) ed una percentuale di sopravvissuti ad 1 anno pari all'88% per entrambi i regimi. Analoghi risultati per quanto concerne l'attività, con una percentuale di ORR del 59,3% con ambedue le associazioni. Tale studio evidenzia quindi come non esista un unico e definito standard terapeutico per il trattamento di

prima linea delle pazienti affette da carcinoma mammario HER-2 positivo, ma come, fortunatamente, le opzioni terapeutiche per il clinico così come le chance per le pazienti siano multiple ed equiparabili.

Altro scenario clinico non infrequente è rappresentato dalla paziente affetta da carcinoma mammario metastatico con coespressione dei recettori ormonali (HR) estrogenici e progestinici e HER-2, eventualità che si verifica in circa metà delle neoplasie mammarie HER-2 positive. Nonostante la positività per i HR sia predittiva dell'efficacia degli agenti endocrini, dati preclinici e clinici suggeriscono fortemente come la coespressione di HER-2 conferisca resistenza intrinseca al trattamento ormonale (21,22). In considerazione del noto ruolo prognostico di HER-2, neoplasie mammarie HR/HER-2 positive risultano potenzialmente troppo aggressive per

trarre beneficio da un trattamento ormonale esclusivo. Queste osservazioni hanno fornito un robusto razionale per esplorare terapie d'associazione anti-HR e anti-HER-2, supportati da dati preclinici, che hanno evidenziato la capacità di trattamenti anti HER-2 di revertire la resistenza endocrina nel carcinoma mammario HR/HER-2 positivo (23).

Kaufman e coll. (24) hanno per primi valutato i benefici dell'aggiunta di trastuzumab ad anastrozolo, randomizzando 208 donne in post menopausa, affette da carcinoma mammario metastatico HR/HER-2 positivo non pretrattate, ad un trattamento di prima linea con anastrozolo in monoterapia (104 casi) o con anastrozolo più trastuzumab (103 casi). L'endpoint primario, rappresentato dalla sopravvivenza libera da progressione, è stato raggiunto essendo stata pari a 4,8 mesi per il gruppo dell'associazione versus 2,4 mesi per quello dell'anastrozolo in monoterapia ($p= 0.0016$). In un'analisi di sottogruppo pianificata condotta sulle pazienti arruolate con la positività di HR confermata centralmente, la mediana della PFS è stata più lunga in entrambi i bracci (5,6 vs 3,8 mesi; $p= 0.06$). Gli altri end point secondari, quali il tasso di risposte, il tasso di beneficio clinico (definito come tasso di risposta completa, parziale e di stabilità di malattia della durata di almeno 6 mesi) sono risultati significativamente superiori nelle pazienti del braccio dell'associazione. Per quanto concerne la sopravvivenza globale, benché superiore nel braccio di associazione (28,5 mesi vs 23,9 mesi; $p= 0.325$), non è stato osservato un vantaggio statisticamente significativo, ascrivibile

all cross-over di 73 pazienti (70%) dal braccio di ionoterapia alla progressione di malattia. Ulteriore studio, che verrà successivamente descritto (25), ha confermato tali risultati nel medesimo setting di pazienti con la associazione di lapatinib e letrozolo.

I risultati di tali studi forniscono evidenze aggiuntive della centralità della terapia anti HER-2 nel trattamento del carcinoma mammario HER-2 positivo. In merito a quale tipo di trattamento associare, chemioterapico od ormonoterapico, mancano ad oggi studi clinici randomizzati di confronto, nonostante il trattamento chemioterapico risulti preferibile nelle situazioni ove sia necessaria una risposta rapida o vi sia una celere progressione tumorale. Dagli studi citati, emerge tuttavia come anche l' associazione del trattamento ormonale ed anti HER-2 rappresenti una valida opzione, da valutare in particolari casi quali le pazienti "fragili" o con un decorso clinico di malattia meno aggressivo. Sarà auspicabile in futuro, basare tale scelta anche sulla base di eventuali caratteristiche molecolari identificanti le pazienti che potrebbero trarre un maggiore beneficio dalla associazione della terapia ormonale e anti HER-2.

In merito al trattamento delle pazienti affette carcinoma della mammella metastatico HER-2 positivo progredite dopo una prima linea contenente trastuzumab, la prosecuzione del trastuzumab stesso, cambiando il chemioterapico associato, è una pratica clinica piuttosto diffusa, pur in assenza di dati conclusivi, tale da essere riportata come standard terapeutico nelle linee guida delle società scientifiche internazionali (ESMO Ann Onc 2010, NCCN 2011).

Dati preclinici hanno effettivamente dimostrato l'importanza della presenza continua del trastuzumab per mantenere l'inibizione della crescita di cellule tumorali mammarie nei topi nudi e su modelli in vitro indicando un effetto antitumorale sinergico tra trastuzumab e vari agenti chemioterapici (12,,26).

Dati clinici sono tuttavia scarsi e provenienti prevalentemente da studi retrospettivi condotti su piccole casistiche e da studi prospettici non controllati (27).

Ad oggi è stato pubblicato nel 2009 un solo studio randomizzato di fase III condotto da Von Minckwitz e coll. (28) condotto in pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo progredite durante un trattamento di prima linea con trastuzumab (ultima somministrazione di trastuzumab entro 6 settimane dalla progressione di malattia). Lo studio, volto al confronto tra un trattamento di associazione con trastuzumab e capecitabina verso la sola capecitabina, prevedeva l'arruolamento di 482 pazienti è stato chiuso prematuramente per un lento accrual e l'avvenuta approvazione dell'utilizzo di lapatinib in combinazione con la capecitabina nei casi in progressione dopo trastuzumab. I risultati ottenuti sulle 156 pazienti arruolate, dimostrano come il trattamento di associazione determini un aumento statisticamente significativo sia del tempo alla progressione di malattia mediano (5.6 mesi vs 8.2 mesi; $p=0.0338$) che delle ORR (27% vs 48.1%; $p=0.0115$) rispetto alla sola capecitabina, con un trend positivo anche in termini di OS (mediana 20.4 vs 25.5 mesi; $p=0.257$).

Lo studio, gravato dalla assenza di un potere statistico adeguato, presenta ulteriori limiti quali la mancanza di una valutazione delle risposte da parte di ricercatori indipendenti, un timing della valutazione delle risposte non ben precisato e uno sbilanciamento dell'età delle pazienti tra i due bracci (quelle nel braccio della sola chemioterapia avevano un'età mediana di 6,5 anni superiore). Nonostante tali limitazioni lo studio ha "legittimato retrospettivamente" il largo uso nella comune pratica clinica del trastuzumab dopo progressione.

Un recente editoriale (29) sottolinea la mancanza di valide prove scientifiche a sostegno di questa indicazione, a fronte dell'impegno dimostrato anche da parte di importanti gruppi cooperativi internazionali e nazionali che hanno iniziato studi controllati a riguardo, poi interrotti prematuramente per lento accrual (studio SWOG, studio del Grupo Espanol de

Investigacion en Cancer de Mama, studio AIFA). Gli autori, ritenendo ad oggi non realistica la conduzione di ulteriori studi, indicano come solo la ricerca traslazionale, individuando i meccanismi molecolari predittivi di risposta e resistenza al trastuzumab ed alle nuove molecole in sviluppo, possa quindi orientare il clinico nel definire la migliore strategia terapeutica per la paziente affetta da carcinoma mammario HER-2 positivo nelle varie linee di trattamento.

2.2 Ruolo di Lapatinib

Lapatinib è una piccola molecola, inibitore reversibile sia di HER-2 che di EGFR, risultata in studi preclinici non cross-resistente nei confronti del trastuzumab (30). Lapatinib inibisce la tirosin-chinasi intracellulare recettoriale, bloccando la fosforilazione e la successiva attivazione del recettore stesso e determinando a valle un blocco delle vie di trasmissione del segnale che portano alla proliferazione cellulare (31). Tali caratteristiche (doppio blocco intracellulare) rappresentano due potenziali vantaggi nei confronti di trastuzumab, con particolare riferimento ai casi di recettori eterodimeri HER-2/EGFR o con la forma HER-2 tronca. Lapatinib è metabolizzato a livello epatico prevalentemente ad opera degli enzimi CYP3A4 e CYP3A5 e in misura inferiore da CYP2C19, per cui è possibile osservare un'interazione farmacologica se somministrato in associazione a farmaci in grado di modulare tali enzimi. Inoltre Lapatinib è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e di essere pertanto attivo nel trattamento delle metastasi cerebrali. In studi di fase I (32) condotti su pazienti affette da tumore, lapatinib è stato somministrato alla dose di 175 - 1800 mg una volta al dì o alla dose di 500- 900 mg due volte al dì, dimostrandosi privo di significativa tossicità. La dose massima tollerata è stata valutata dallo studio EGF10003 (33) che ha arruolato 81 pazienti non selezionati sulla base di EGFR/HER-2 affetti da neoplasia metastatica pretrattata, trattati con lapatinib alla dose di 175- 1800 mg una volta al dì o alla dose di 500-750 e 900 mg due volte al dì. Nei primi 64 pazienti valutabili non è stata osservata nessuna tossicità di grado 4 né dose-limitante; la maggior parte della tossicità è stata di grado 1 o 2 con due casi di diarrea di grado 3 nel gruppo di

pazienti trattati con 900 mg due volte al dì. Rash, diarrea, nausea e astenia sono stati gli eventi avversi più frequenti. Gli studi di farmacocinetica hanno dimostrato che alla dose di 1200 mg assunti una volta al dì la concentrazione sierica di lapatinib sia superiore alla concentrazione inibitoria il 90% osservabile in vitro e che nel range di dosi utilizzate fino ai 1800 mg la farmacocinetica sia di tipo lineare.

Il successivo studio di fase Ib EGF10004 (34) ha valutato il trattamento con lapatinib in pazienti affetti da carcinoma metastatico pretrattato EGFR e/o HER-2 positivo, con dosi fino a 1600 mg una volta al dì. Il trattamento è stato ben tollerato fino alla dose citata e una certa attività clinica è stata evidenziata nel range compreso tra i 650 e 1600 mg. Ben 4 pazienti affette da carcinoma mammario resistente ad antracicline, taxani e trastuzumab hanno ottenuto una risposta parziale con il trattamento con lapatinib, individuando così uno dei principali scenari nel quale lapatinib è stato in seguito studiato.

Successivi dati di attività sono stati pubblicati da Blackwell e coll. (35) su 78 donne con iperespressione di HER-2, pretrattate con trastuzumab, sottoposte a trattamento con lapatinib alla dose di 1500 mg una volta al giorno continuativamente osservando un tasso di beneficio clinico (definito come tasso di risposta completa, parziale e di stabilità di malattia della durata di almeno 6 mesi) pari al 22%. Un secondo studio pubblicato da Kaplan e coll.(36) ha selezionato due coorti, la prima delle quali includeva 140 pazienti con carcinoma mammario metastatico HER-2 positive resistenti al trastuzumab ed la seconda 89 pazienti con carcinoma mammario metastatico HER-2 negative non pretrattate con Trastuzumab. Entrambe le coorti sono state sottoposte a terapia con lapatinib al dosaggio di 1500 mg al giorno continuativamente evidenziando un tasso di beneficio clinico pari al 14% nella prima coorte mentre nessuna risposta è stata evidenziata nella seconda coorte. In seguito a questi studi, che hanno dimostrato l'attività di lapatinib in monoterapia nel setting delle pazienti affette da carcinoma mammario metastatico iperesprimenti HER-2, pretrattate con regimi chemioterapici contenenti, per la maggior parte, antracicline, taxani e trastuzumab, è stata valutata l'opportunità di utilizzare lapatinib in combinazione alla capecitabina in linee successive

alla prima, sulla base di precedenti studi (37) che avevano dimostrato un ottimo profilo di tollerabilità ed un buon livello di attività.

Sulla base di tali risultati, è stato successivamente condotto da Geyer e coll (38) lo studio registrativo di fase III, che confrontato l'efficacia di lapatinib in associazione a capecitabina al trattamento monochemioterapico con capecitabina, in pazienti affette da carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo, progredite dopo regimi terapeutici comprendenti antracicline, taxani e trastuzumab con l'obiettivo primario di dimostrare un aumento del 50% del TTP (definito come il periodo di tempo intercorrente tra la randomizzazione e la progressione di malattia o la morte causata dalla neoplasia). Gli autori hanno arruolato 324 pazienti affette da carcinoma mammario localmente avanzato (4%) o metastatico (96%) HER-2 positivo, definito tale sulla base della iperespressione mediante metodica immunohistochimica, con eventuale conferma mediante FISH. Lo studio permetteva l'arruolamento di donne con metastasi cerebrali, purchè clinicamente stabili per 3 mesi dopo l'interruzione della terapia con corticosteroidi ed anticonvulsivanti. Le 324 pazienti arruolate sono state randomizzate a ricevere un trattamento con lapatinib alla dose di 1250 mg/die per os continuativamente e capecitabina alla dose di 2000 mg/mq/die per os dal giorno 1 al giorno 14 per cicli di 21 giorni (164 pazienti totali) o un trattamento con capecitabina alla dose di 2500 mg/mq/die dal giorno 1 al giorno 14 per cicli di 21 giorni (161 pazienti totali) da proseguire fino alla progressione di malattia. I risultati dalla analisi ad interim pianificata, condotta sugli eventi di progressione o morte dalla data del reclutamento al cut-off clinico del 15 novembre 2005, evidenziano un significativo prolungamento del TTP risultato pari a 8.4 mesi per il braccio sperimentale e pari a 4.4 mesi nel braccio con capecitabina in monoterapia, con una riduzione del rischio di progressione pari al 51% (hazard ratio, 0.49; 95% CI, 0.34 a 0.71; $p < 0.001$). La terapia di combinazione è stata inoltre associata ad un incremento di ORR (22% vs 14%; $p = 0.09$) e ad una minima azione a livello cerebrale (11 pazienti in monoterapia hanno sviluppato metastasi cerebrali rispetto a solo 4 pazienti nel gruppo in combinazione), sebbene non statisticamente significativa ($p = 0.10$). Sulla base di questi dati ed in particolar modo della dimostrazione del vantaggio offerto dalla terapia in associazione in termini di TTP, il Comitato di Revisione Indipendente ha raccomandato la chiusura dell'arruolamento ed è stata offerta la possibilità del cross-over alle pazienti nel braccio di

monoterapia. Quando l'arruolamento è cessato, nell'aprile del 2006, 399 pazienti erano state reclutate e randomizzate, mentre altre nove non avevano ancora cominciato alcun trattamento e sono state inserite nel braccio di trattamento sperimentale (207 pazienti totali). Alla data del 1 ottobre 2008 nel braccio di trattamento di combinazione sono state registrate 168 morti su 207 pazienti mentre nel braccio di monoterapia i decessi sono stati 172 su 201 pazienti. Un recente aggiornamento pubblicato da Cameron e coll. (39) riporta i risultati in termini di OS, valutata su tale casistica, riportando una OS mediana pari a 75 settimane per le pazienti che hanno ricevuto la terapia di combinazione e pari a 64.7 settimane per le altre, con una HR di 0.87. E' necessario puntualizzare alcuni limiti in merito a questa analisi quali la precoce chiusura del protocollo con conseguente non raggiungimento del numero di reclutamenti previsti, il cross-over e non ultimo il passaggio al trattamento sperimentale dopo la chiusura dello studio di ben 36 pazienti. Nonostante tali considerazioni questo aggiornamento dei dati conferma una tendenza positiva in termini di vantaggio di sopravvivenza nel braccio della terapia in combinazione. Per quanto riguarda il profilo di tollerabilità, gli effetti collaterali più comuni sono stati di pertinenza gastrointestinale (diarrea, nausea, vomito) e cutaneo (hand-foot syndrome e rash), in assenza di un aumento di eventi avversi nel braccio sperimentale. Nessuna differenza nemmeno per quanto riguarda la tossicità cardiaca, non essendo stati registrati in alcuno dei due bracci né riduzione della frazione di eiezione ventricolare sinistra né insufficienza d'organo.

Per quanto concerne la relazione tra il numero di regimi chemioterapici contenenti trastuzumab utilizzati prima della terapia con lapatinib e l'outcome clinico è stato evidenziato che il TTP mediano delle pazienti che avevano ricevuto un solo regime chemioterapico contenente trastuzumab è risultato pari a 31.3 settimane per il braccio in combinazione e pari a 18.6 settimane per quello in monoterapia (HR 0.50; $p < 0.001$), con una OS mediana pari a 71.4 e 56.6 settimane rispettivamente (hazard ratio 0.79; 95% CI, 0.60-1.03; $p = 0.077$). Un trend leggermente peggiore è stato osservato nelle pazienti trattate con più di un regime chemioterapico contenente trastuzumab con un TTP mediano di 24.4 e di 19.7 rispettivamente nel gruppo di combinazione e di monoterapia, (hazard ratio 0.64; 95%CI, 0.38-1.07; $p = 0.09$), in assenza di differenze significative per quanto riguarda la OS. Tale analisi, oltre a confermare il beneficio clinico del trattamento comprendente lapatinib e

capecitabina, suggerisce come tale associazione potrebbe essere più efficace nei soggetti pretrattati con una sola linea di trattamento con trastuzumab, probabilmente perché l'uso per un tempo inferiore dell'anticorpo riduce le probabilità di sviluppo dei meccanismi di resistenza a valle di HER-2 che potrebbero influire anche sull'azione di lapatinib.

Oltre al ruolo ormai definito nel trattamento delle pazienti affette da carcinoma mammario metastatico pretrattate con trastuzumab, il potenziale ruolo di lapatinib è stato indagato anche nel trattamento di prima linea.

Uno studio (40) ha valutato l'efficacia e la tollerabilità della somministrazione di lapatinib come monoterapia di prima linea in donne affette da carcinoma mammario localmente avanzato o metastatico con HER-2 positività valutata mediante FISH. Le 138 pazienti arruolate sono state randomizzate a ricevere due diversi regimi di somministrazione: 1500 mg una volta al giorno o 500 mg due volte al giorno. Le pazienti, trattate per un tempo mediano di 17.6 settimane, hanno presentato un tasso di risposta pari al 24% con entrambi i dosaggi, comparabile quindi con i tassi evidenziati con il trastuzumab in monoterapia nel medesimo setting, ed un beneficio clinico (definito dalla somma delle CR, PR o malattia stabile per 24 o più settimane) pari al 31%. Il tempo di risposta mediano è stato di 7.9 settimane e i tassi di sopravvivenza libera da progressione a 4 e 6 mesi sono stati del 63% e del 43% rispettivamente. Come sottolineano gli autori, nessuna paziente arruolata era stata precedentemente esposta a trattamento con trastuzumab e solo il 51% delle pazienti aveva ricevuto un trattamento chemioterapico adiuvante o neoadiuvante, trattandosi quindi di una popolazione estremamente selezionata; purtroppo la attività ed efficacia di lapatinib in una popolazione maggiormente rappresentativa è ad oggi non noto.

Altre esperienze pubblicate hanno inoltre valutato l'associazione di lapatinib ad un trattamento chemioterapico od ormonoterapico nel trattamento di prima linea.

Di Leo e coll. (41) hanno condotto uno studio clinico di fase III in pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella metastatico con status di HER-2 negativo o non determinato, valutando un trattamento di prima linea con paclitaxel alla dose di 175 mg/m² e.v. trisettimanale associato o

meno a lapatinib 1500 mg una volta al giorno, sulla base di precedenti dati evidenzianti un particolare sinergismo di tale combinazione (42). I risultati, ottenuti randomizzando 579 pazienti, dimostrano come nella intent-to-treat population non ci siano differenze statisticamente significative in termini di TTP, ORR, OS tra i due bracci di trattamento. I campioni tumorali delle pazienti arruolate sono stati sottoposti ad un'analisi pianificata, retrospettiva e centralizzata dello stato di espressione di HER-2, tramite IHC ed eventuale successiva FISH. Nelle 86 pazienti (circa il 15%) risultate HER-2 positive è stato osservato come l'aggiunta di lapatinib a paclitaxel migliori in modo statisticamente significativo il TTP (mediano 36.4 vs 25.1 settimane; $p=0.005$) e l'ORR (63.3% vs 37.8% $p=0.023$), con un trend positivo anche in termini di OS rispetto alle pazienti HER-2 positive trattate unicamente con paclitaxel.

E' attualmente in corso uno studio multicentrico di fase III randomizzato, condotto in 43 centri asiatici, che confronta l'associazione sopradescritta in pazienti affette da carcinoma HER-2 positivo. I risultati ottenuti su 444 pazienti randomizzate e presentati in ambito congressuale evidenziano un vantaggio statisticamente significativo per il trattamento con paclitaxel e lapatinib sia in termini di efficacia che di attività, con risultati al momento comparabili a quelli dello studio prima citato.

Per quanto riguarda il trattamento della paziente affetta da carcinoma mammario metastatico con coespressione dei recettori ormonali (HR) estrogenici e progestinici e HER-2, eventualità che si verifica in circa metà delle neoplasie mammarie HER-2 positive, è stato condotto uno studio di fase III randomizzato che ha confrontato l'associazione di lapatinib alla dose di 1500 mg una volta al giorno e letrozolo alla sola ormonoterapia. Come precedentemente detto, nonostante la presenza dei HR, predittiva dell'efficacia degli agenti endocrini, dati preclinici e clinici suggeriscono fortemente come la coespressione di HER-2 conferisca resistenza intrinseca al trattamento ormonale (21,22), costituendo un valido razionale per lo studio di terapie d'associazione anti-HR e anti-HER-2, supportati inoltre da dati preclinici, che hanno evidenziato la capacità dei trattamenti anti-HER-2 di revertire la resistenza endocrina nel carcinoma mammario HR/HER-2 positivo (23). Lo studio condotto da Johnston e coll. (43) ha arruolato 1286 pazienti affette da carcinoma mammario con HR espressi, non trattate per la malattia metastatica ma che potevano aver ricevuto trattamento

neoadiuvante/adiuvante ormonale e con trastuzumab purchè terminato da almeno 12 mesi. Il periodo di arruolamento nello studio (Dicembre 2003 – Dicembre 2006) ha preceduto l'indicazione di trastuzumab in associazione ad un inibitore dell'aromatasi come terapia adiuvante, ed effettivamente la percentuale di pazienti pretrattate con trastuzumab è risultato pari circa all'1% in entrambi i bracci. La revisione interna, centralizzata dello stato di espressione di HER-2 ha evidenziato come circa il 17% in entrambi i bracci di trattamento risultasse HER-2 positivo. In tale popolazione (219 casi), dopo un follow up mediano di 1.8 anni, la associazione di lapatinib e letrozolo ha dimostrato un vantaggio significativo rispetto alla sola ormonoterapia in termini di PFS mediano (8.2 vs 3.0 mesi; $p=0.019$) e di CBR (48% vs 29%), pur in assenza di un vantaggio in termini di sopravvivenza globale, benché meno del 50% degli eventi fosse accaduto. Gli autori evidenziano inoltre come, nella popolazione arruolata HER-2 negativa progredita entro i 6 mesi dal termine del trattamento adiuvante con tamoxifene, sia evidenziato un prolungamento non significativo del PFS nel braccio di associazione ($HR=0.78$; $p=0.117$), indicando quindi come il blocco di EGFR/HER-2 possa aggiungere un vantaggio nella popolazione maggiormente ormonoresistente e sottolineando il ruolo prominente di tale via di trasduzione del segnale in questo setting di pazienti.

Sulla base di tali risultati lapatinib è attualmente registrato a livello europeo e nazionale anche in associazione con un inibitore dell'aromatasi, nelle donne in post-menopausa con malattia metastatica positiva per HR, per le quali al momento non è indicato un trattamento chemioterapico, sottolineando come nello studio registrativo non fossero state trattate in precedenza con trastuzumab o con un inibitore dell'aromatasi.

RESISTENZA AL TRASTUZUMAB

Sebbene il trastuzumab sia considerato il trattamento standard di prima linea nelle pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella HER-2 positivo, un numero significativo di pazienti (circa il 40%) con diagnosi di tumore mammario HER-2 positivo non beneficia di questa terapia perché ha sviluppato una resistenza primaria o secondaria al farmaco (44). In questo setting di pazienti l'identificazione dei meccanismi alla base della resistenza al trastuzumab è fondamentale per riuscire a sviluppare una corretta selezione delle pazienti e nuove strategie terapeutiche. Ad oggi sono stati individuati diversi determinanti molecolari che sembrerebbero implicati nei meccanismi di resistenza al trastuzumab, sebbene nessuno di questi sia ancora stato validato nella pratica clinica.

3.1 Potenziale ruolo di P95HER2

Alcuni studi hanno identificato la presenza, sulla membrana delle cellule tumorali di donne affette da carcinoma mammario HER-2 positivo, di forme troncate del recettore, alcune delle quali costitutivamente attive, collettivamente chiamate p95HER-2. Tali forme, prive del dominio extracellulare contenente il sito di legame per il Trastuzumab, possono ragionevolmente rappresentare un potenziale meccanismo di resistenza alla terapia con questo anticorpo oltre ad essere correlate, se presenti, ad una peggiore prognosi.

Analisi eseguite su linee cellulari ed in vivo hanno evidenziato l'esistenza di vari frammenti di p95HER-2, ciascuno avente un differente peso molecolare. Sono stati identificati almeno due diversi meccanismi che condurrebbero alla loro formazione: proteolisi del dominio extracellulare del recettore integro e alterazioni nella traduzione dell'RNA messaggero codificante per HER-2.

Il clivaggio del dominio extracellulare di HER-2 ad opera di metalloproteasi origina un frammento del peso molecolare di 95 kDa, che rimane ancorato alla membrana (45); la alterazione traduzionale dell'RNA messaggero genera due forme di p95 da 100-115 kDa e 90-95 kD, identificate con la sigla 611 CTF e 687 CTF (46) rispettivamente localizzate a livello della membrana plasmatica e del citoplasma (proteina solubile). Pedersen K. e coll. (47), analizzando la funzionalità di questi frammenti, hanno evidenziato come che il breve dominio extracellulare di 611 CTF contenga 5

cisteine, alcune delle quali stabiliscono tra loro legami del tipo ponti disolfuro, inducendo una costitutiva omodimerizzazione del recettore stesso, risultando quindi sempre attivo. Inoltre 611 CTF regola un set di geni (ANGPTL4, MET, CD44, PLAUR, EPHA4, IL-11, ECC...), non attivati invece dalla forma integra di HER-2, che sono coinvolti nella progressione metastatica. E' stato inoltre dimostrato che la forma di 100-115 kDa induce la migrazione cellulare più efficientemente della full-length HER-2 attraverso la fosforilazione della cortactina, una proteina che lega il citoscheletro, ad ulteriore conferma che le cellule tumorali esprimenti 611 CTF sono biologicamente più aggressive. Il frammento solubile (687 CTF), sebbene dotato di un dominio avente attività chinasi, non è attivo (47). Al contrario il p95 generato per clivaggio ha mostrato di avere una certa attività, anche se ridotta rispetto a quella del 611 CTF (48).

Il potenziale ruolo prognostico di p95 è stato studiato da Molina e coll. (49) in una casistica di 337 tumori primitivi, correlando l'espressione di p95 e p185HER-2 con la presenza di metastasi linfonodali. I risultati hanno dimostrato la presenza di p95 nel 20.9% dei tumori con linfonodi negativi, nel 29.1% dei pazienti con 1-3 metastasi linfonodali e nel 36.7% di soggetti con 4 o più metastasi linfonodali. Inoltre l'espressione della forma troncata di HER-2 risultava essere aumentata nel tessuto metastatico linfonodale rispetto al tumore primitivo, mentre i livelli di p185HER-2 erano simili nei due casi. Questi dati suggeriscono l'esistenza di una correlazione tra l'espressione di p95 e l'estensione della malattia ai linfonodi.

Un'altra analisi retrospettiva condotta dallo stesso gruppo (50) ha indagato, su 483 tessuti mammari neoplastici provenienti da pazienti operate, l'associazione tra l'espressione di p95 ed i fattori di rischio clinico-biologici, evidenziando come alti livelli di p95 nel tumore primitivo siano correlati ad una riduzione della sopravvivenza globale e di quelle libera da malattia. La presenza di p95 identifica quindi un sottogruppo particolarmente meritevole di un trattamento preventivo postoperatorio.

Il potenziale ruolo predittivo di resistenza a trattamento con trastuzumab è stato in primis studiato da Scaltriti e coll. (44), sia in vitro che in vivo. Linee cellulari di carcinoma mammario (MCF-7 e T47D), precedentemente transfettate con vettori contenenti la forma integra o quella troncata di

HER2, sono state studiate sia prima che dopo esposizione a trastuzumab o lapatinib. I risultati hanno messo in evidenza che il trattamento con lapatinib inibisce la fosforilazione di entrambe le forme di HER2 e delle chinasi a valle (Akt e MAPKs); contrariamente trastuzumab non ha dimostrato avere alcun effetto sulle cellule che esprimevano p95HER2. Per confermare tali risultati in vivo la linea cellulare MCF-7, transfettata con le due forme del recettore HER2, è stata iniettata su cavie atimiche, successivamente divise in tre gruppi ed esposti a Trastuzumab, Lapatinib o placebo rispettivamente. Le cavie il cui tumore esprimeva la full-length HER2 hanno risposto sia a trastuzumab che a lapatinib mentre quelle che presentavano la p95HER2 sono risultate resistenti a trastuzumab e sensibili a Lapatinib. Infine gli autori hanno valutato l'espressione di p95HER2 tramite immunofluorescenza su 46 tumori HER2 positivi di donne affette da carcinoma mammario metastatico trattate con trastuzumab in monoterapia o associato ad un regime terapeutico chemioterapico od ormonale. La presenza di p95HER2 è stata storicamente rilevata attraverso la metodica del Western blotting, condotta su tessuto fresco congelato, raramente disponibile; il gruppo di Scaltriti ha introdotto l'utilizzo dell'immunofluorescenza come nuova tecnica di deteazione partendo dall'osservazione che p95HER2, ma non la forma integra di HER2, è localizzata sia nel citoplasma che sulla membrana plasmatica. Lo score di positività per p95 è rappresentato dalla individuazione del segnale (in più del 50% delle cellule osservate) dell'anticorpo anti-HER2 sia sulla membrana che nel citosol. La presenza dell'anticorpo anti-HER2 nel citosol è dimostrata dalla colocalizzazione, in questa sede, dell'anti-HER2 e dell'anticorpo anti-citocheratina citoplasmatica (comparsa di una colorazione gialla al microscopio confocale, risultato della sommazione della fluorescenza rossa e verde data dagli anticorpi anti HER2 ed anti-citocheratina rispettivamente). Delle 46 pazienti prese in considerazione nello studio retrospettivo, 24 delle quali trattate con trastuzumab in monoterapia, le restanti con trastuzumab associato a chemioterapia o terapia ormonale (11 a vinorelbina, 9 a taxano, e 2 a terapia ormonale), 9 esprimevano p95 (detezione tramite immunofluorescenza descritta sopra) e le rimanenti 37 la forma integra di HER2 (la percentuale di soggetti risultati p95 positivi nella popolazione in esame è del 19,5 %, in accordo con i dati riportati in letteratura). Una sola delle nove pazienti positive per p95 ha risposto (in maniera parziale) al trattamento con trastuzumab (11.1%), mentre 19 delle 37 pazienti (51.4%) HER2 full

length positive hanno mostrato una risposta completa (n=5) o parziale (n=14), con un tasso di risposte globale pari a 11% vs 51.4% (p=0.29). Questi risultati confermano le osservazioni emerse dagli studi in vitro ed in vivo, indicando che i tumori esprimenti p95HER2 sono resistenti alla terapia con Trastuzumab. Tali evidenze inducono a cercare strategie terapeutiche alternative che riescano a superare tale resistenza, quali l'utilizzo di lapatinib, risultata in studi preclinici non cross-resistente nei confronti di trastuzumab (30).

In merito a tali osservazioni, un ulteriore studio effettuato dal gruppo di Scaltriti e pubblicato nel 2010 (51) ha fornito altri interessanti spunti sull'argomento analizzando la responsività al Lapatinib, sia su modelli animali che clinici, di tumori mammari HER2 positivi e coesprimenti p95HER2. Sono state condotte due diverse indagini su cavie atimiche. Nel primo esperimento gli autori hanno cercato di comprendere se Lapatinib avesse un'attività di inibizione sulla crescita di cellule appartenenti alla linea MMV-HER2-Fo 5, derivata da tumori refrattari al trattamento con Trastuzumab e coesprimente sia la forma integra che quella troncata di HER2. Per fare questo hanno impiantato frammenti tumorali di dimensioni 2x2x2 mm² nelle cavie che, successivamente, sono state divise in due gruppi e trattate, rispettivamente, con Lapatinib o placebo. Da tale indagine è emerso che Lapatinib è attivo su queste cellule, ne riduce marcatamente la crescita e, a livello molecolare, inibisce l'autofosforilazione di entrambe le forme del recettore cui segue la downregulation del segnale trasmesso lungo le vie di trasduzione mediate da Akt e MAPKs. In seguito si è voluto dimostrare che Lapatinib era in grado di inibire selettivamente la crescita di tumori il cui sviluppo è totalmente dipendente da p95HER2. A questo scopo gli autori hanno transfettato fibroblasti embrionali murini con il frammento più attivo di p95HER2 (611 CTF) ed iniettato le cellule così ottenute di questa nuova linea (MEFs-3T3 tet-off) in cavie poi divise in due gruppi e sottoposte a trattamenti differenti: Trastuzumab o Lapatinib. In accordo con i risultati aspettati, i tumori si sono dimostrati refrattari al trattamento con Trastuzumab ma molto responsivi a Lapatinib.

Inoltre gli stessi autori hanno eseguito un'analisi clinica retrospettiva su campioni di tumore mammario ottenuto da pazienti che avevano partecipato a due differenti studi: EGF20009 e EGF100151. Nello studio EGF20009 (40) 138 donne con carcinoma mammario metastatico, HER2

positive (valutato con FISH) erano state randomizzate a ricevere in I linea un trattamento orale con Lapatinib 1500 mg una volta/die o 500mg due volte/die. Nello studio EGF100151 (38), 399 con carcinoma mammario avanzato, HER2 positivo (valutato con metodica immunohistochimica 3+ e/o con FISH), trattate in precedenza con antracicline, taxani e Trastuzumab, sono state randomizzate a ricevere 2500 mg/m² o 2000 mg/m² di capecitabina + lapatinib (1250 mg una volta al giorno continuativamente). Sono state incluse nell'analisi le pazienti di cui era disponibile un sufficiente quantitativo di tessuto tumorale sul quale è stata effettuata la valutazione dell'espressione di p95HER2 tramite la tecnica di immunofluorescenza descritta in precedenza. Dello studio EGF20009 sono state prese in considerazione 68 su 138 pazienti, mentre per il EGF100151, 156 SU 399. Nel primo il 20.5% (14 su 68) delle donne era positiva per p95HER2 mentre il 79.5% (54 su 68) negativa. Nel secondo studio le pazienti positive erano il 28.5% (45 su 156) mentre il resto erano negative (71.5%: 111 su 156). Complessivamente, sul campione considerato, il 26% delle pazienti iperesprimenti HER2 erano risultate positive per p95HER2, un'incidenza leggermente superiore a quella stimata in letteratura (circa il 20%). Per determinare la correlazione tra l'espressione di p95HER2 ed il outcome clinico è stato analizzato il PFS in relazione allo stato di espressione di p95HER2. Nelle pazienti che avevano ricevuto Lapatinib come trattamento in I linea non sono state osservate differenze significative nel PFS tra le p95HER2 negative e quelle positive (HR, 1.35; 95% CI; p=0.417). Similmente il PFS nelle pazienti trattate con capecitabina + Lapatinib non era significativamente differente tra i due gruppi (HR: 1.30; 95% CI; p=0.471). È stata anche condotta una analisi volta a determinare se la presenza di p95HER2 potesse avere un effetto sul CBR o sulla ORR e quindi sulla prognosi durante un trattamento basato su Lapatinib. I risultati sono stati i seguenti: nei pazienti trattati in monoterapia con Lapatinib il CBR per il gruppo p95HER-2 positivo è stato del 29% vs il 43% per il gruppo p95HER-2 negativo. Nei pazienti trattati con Lapatinib + capecitabina è stato osservato un CBR del 38% vs 40% nei gruppi p95HER-2 positivi e negativi rispettivamente. Per quanto riguarda ORR non vi sono state differenze significative tra i due gruppi. Ciò che è possibile dedurre da questo studio è che Lapatinib usato in monoterapia od in combinazione è ugualmente efficace sia in pazienti che esprimono p95HER-2, sia in quelli che sono p95HER-2 negativi ma iperesprimenti p185HER-2. Dal momento che i tumori che presentano

p95HER-2 sono resistenti al Trastuzumab (44), tali risultati suggeriscono che, in questi casi, il Lapatinib potrebbe rappresentare una migliore opzione terapeutica. Rimangono tuttavia aperti degli interrogativi a cui al momento non siamo ancora in grado di rispondere. Non sappiamo se la resistenza al Trastuzumab sia primitiva oppure acquisita e derivante, in questo ultimo caso, da un processo di selezione di cloni cellulari tumorali trattati con l'anticorpo per un periodo di tempo prolungato. Se la resistenza fosse secondaria un trattamento ab initio con Trastuzumab e Lapatinib in associazione potrebbe ritardare la sua comparsa. Inoltre l'espressione di p95HER2 potrebbe coesistere con altri potenziali meccanismi di resistenza al Trastuzumab, quali mutazioni attivanti PI3K o la perdita di funzione di PTEN. Rimane quindi la necessità di classificare biologicamente i carcinomi mammari al fine di personalizzare la terapia e migliorare la prognosi delle pazienti.

Sono in atto due studi prospettici (ALTO e NeoALTO) che mirano a comprendere l'eventuale ruolo della presenza di p95HER2 in adiuvante ed in neoadiuvante, rispettivamente, comparando il beneficio clinico ottenuto dalla somministrazione di Trastuzumab o Lapatinib o dei due agenti dati in combinazione.

3.2 Potenziale ruolo di PTEN/ PI3KCA

Un altro potenziale meccanismo di resistenza al trastuzumab sembra essere l'upregulation delle vie di trasmissione del segnale intracellulare innescate da HER2; in particolare i risultati di studi preclinici hanno dimostrato come la perdita della funzione di PTEN (phosphatase and tensin homolog) e la mutazione PI3K (phosphatidil-inositol kinase) attivino costitutivamente la via di trasduzione del segnale mediata da PI3K/Akt. La perdita della funzione di PTEN risulta conseguenza di vari meccanismi, tra cui alterazioni mutazionali del gene *PTEN*, aploinsufficienza (condizione in cui la quantità di proteina prodotta dalla singola copia del gene non è sufficiente per assicurare la normale funzione) derivante dalla perdita di eterozigosi nel locus di PTEN ed infine alterazioni epigenetiche (52).

Nel 2004 Nagata e coll. (53) dimostrarono, mediante studi su linee cellulari mammarie HER2 positive trattate con trastuzumab, come il legame di tale anticorpo a livello del recettore di membrana determinasse un rapido aumento della attività chinasi di PTEN ed una successiva rapida defosforilazione di Akt, precedente alla downregolazione del recettore stesso e della inibizione di PI3K, evidenziando quindi la centralità del ruolo di PTEN nella trasmissione del segnale intracellulare. Gli stessi autori dimostrarono quindi come linee cellulari mammarie HER2 positive (SKBr3 e BT474) transfettate con oligonucleotidi antisenso riducenti l'espressione endogena di PTEN, risultassero resistenti all'azione antiproliferativa di trastuzumab e come tale resistenza potesse essere superata utilizzando inibitori di PI3K. Iniettando successivamente la linea cellulare transfettata BT474 su cavia atimica, confermarono in vivo come la riduzione della funzione di PTEN conferisse resistenza al trattamento con trastuzumab. Infine, gli stessi autori valutarono con dosaggio immunohistochimico l'espressione di PTEN in 47 tumori primitivi HER2 positivi di donne affette da carcinoma mammario metastatico trattate con taxano (docetaxel o paclitaxel) e trastuzumab ed in 37 tumori primitivi HER2 negativi di donne affette da carcinoma mammario metastatico trattate con taxano. La quantificazione dell'espressione di PTEN venne eseguita utilizzando uno score (IRS, immunoreactive scores) con range da 0 a 12, derivante dalla doppia valutazione della percentuale di cellule positive (range 0-4) e dalla loro intensità (range 1-3). Definendo la PTEN negatività con $IRS < 9$, il 36.2% (17/47) ed il 43.2% (16/37) dei tumori esaminati risultarono PTEN negativi, in linea con i precedenti dati della letteratura (ref Li et al 1997). Tra le 47 pazienti trattate con trastuzumab, gli autori evidenziarono un tasso di risposte complessive (RC+RP) pari al 35.7% nei casi con $IRS \leq 6$ e pari al 66.7% nei casi con $IRS > 7$ ($p < 0.05$); abbassando il cut-off di definizione di PTEN negatività, tale differenza aumenta: nei casi con $IRS < 4$ il tasso di risposte risultava pari a 11.1% verso il 65.8% nei casi con $IRS \geq 4$ ($p < 0.01$), ipotizzando quindi una diminuzione della risposta al trastuzumab proporzionale al decrescere dell'espressione di PTEN ($p < 0.01$). Tra le 37 pazienti HER2 negative trattate con taxano, gli autori evidenziarono una simile risposta al trattamento chemioterapico indipendentemente dall'espressione di PTEN ed indipendentemente dal cut-off di definizione. Il potenziale ruolo di fattore predittivo negativo di PTEN è stato successivamente confermato da Fujita e coll. (54). Gli autori hanno inizialmente valutato la crescita cellulare della

linea cellulare mammaria SKBr3 transfettata con oligonucleotidi antisenso riducendo l'espressione endogena di PTEN, trattata con trastuzumab e paclitaxel confermando i dati precedentemente riportati da Nagata e coll. Successivamente gli autori hanno valutato la correlazione tra il tasso di risposte obiettive e l'espressione immunohistochimica di PTEN, valutata secondo lo score precedentemente descritto, in 17 pazienti affette da carcinoma mammario HER2 positivo trattate con trastuzumab e paclitaxel: nelle pazienti con IRS compreso tra 0-6, il tasso di risposte è stato pari al 12.5% rispetto al 88.9% ($p=0.00337$) nelle pazienti con $IRS>7$. Nel 2007 Berns e coll. (55) hanno analizzato l'attività antiproliferativa di trastuzumab sulle linea cellulare mammaria BT474, precedentemente transfettata con siRNA in grado di inibire l'espressione di PTEN, evidenziando una significativa riduzione della sensibilità al trattamento; analoga riduzione di sensibilità a trastuzumab è stata identificata nella stessa linea cellulare, trattata con trasduzione retrovirale del gene PIK3 mutato. Mutazioni attive (*PIK3CA*) a livello del gene codificante la subunità catalitica della chinasi PI3K sono state identificate il circa il 25% dei tumori mammari primitivi, principalmente a livello dell'esone 9 e 20, determinando un aumento costitutivo della trasmissione intracellulare del segnale mediato dalla chinasi stessa (56). Gli stessi autori hanno quindi valutato il ruolo della perdita di espressione di PTEN e della presenza delle mutazioni attivanti *PIK3CA* in una serie di 55 pazienti affette da carcinoma mammario HER2 positivo, trattate con trastuzumab in monoterapia (6 casi) o trastuzumab in associazione al trattamento chemioterapico (49 casi). La perdita di espressione di PTEN, valutata con metodica immunohistochimica utilizzando lo score precedentemente descritto e definendo la PTEN negatività con $IRS<3$, è stata identificata nel 22% dei casi e non è risultata significativamente associata ad una peggior prognosi delle pazienti, in termini di tempo alla progressione. Le mutazioni *PIK3CA*, valutate con sequenziamento diretto, sono state identificate nel 25% dei casi (in particolare sono state identificate 10 mutazioni a livello dell'esone 20 e 4 a livello dell'esone 9) anche in questo caso non risultando significativamente associate ad una peggior prognosi. Gli autori sottolineano come 10 delle 14 mutazioni complessive, siano state identificate in casi definiti PTEN positivi ($IRS>3$), in accordo con precedenti dati della letteratura per i quali tali alterazioni del medesimo pathway raramente coesistono (57). Valutando simultaneamente il ruolo prognostico della perdita di espressione di PTEN e delle mutazioni *PIK3CA*, gli autori evidenziano

una differenza statisticamente significativa in tempo alla progressione ($p=0.007$) tra la popolazione definita con “pathway PI3K attivo” (perdita di espressione di PTEN/ *PIK3CA* mutato) e la popolazione definita con “pathway PI3K non attivo” (alta espressione di PTEN/ *PIK3CA* non mutato). Recentemente è stata pubblicata l’esperienza del gruppo italiano di Fabi e coll.(ref), condotta su 73 pazienti, prospetticamente selezionate, affette da carcinoma mammario HER2 positivo e trattate in prima o seconda linea di trattamento con trastuzumab e chemioterapia con taxano, vinorelbina o capecitabina (rispettivamente nel 46.5%-35.5%-18% dei casi). Gli autori hanno valutato la perdita di espressione di PTEN, con la metodica immunohistochimica già descritta e definendo la PTEN negatività con IRS<7, la presenza della chinasi Akt fosforilata (pAkt) e della chinasi PI3K con dosaggio immunohistochimico. Dati preclinici evidenziano che la chinasi Akt risulta frequentemente fosforilata in linee cellulari di carcinoma mammario HER2 positive conferendo resistenza all’azione di vari chemioterapici (58) e che trastuzumab determina una sua rapida defosforilazione (53); non esistono attualmente score validati per la valutazione immunohistochimica di pAkt e di PI3K. Nella casistica sopra descritta, gli autori hanno evidenziato percentuali di positività immunohistochimica di PTEN, pAkt e PI3K nel 48%, 71% e 46,5% dei casi rispettivamente non evidenziando alcuna correlazione significativa con l’outcome delle pazienti. Tuttavia i casi co-espressanti PTEN e pAkt presentano una sopravvivenza libera da progressione significativamente superiore rispetto ai casi PTEN e/o pAkt negativi, identificando quindi un subset di pazienti particolarmente sensibile all’azione del trastuzumab in virtù dello stato attivo del pathway di HER2 stesso. Ultimamente è stato infine pubblicato il lavoro condotto da Dave e coll. (59) condotto sia su linee cellulari che su pazienti affette da carcinoma mammario HER2 positivo trattate con regimi neoadiuvanti comprendenti trastuzumab o lapatinib. Numerose esperienze precliniche hanno evidenziato come l’attività di lapatinib risulti indipendente dallo stato di attivazione del pathway PTEN/pAkt (60,61); la casistica pubblicata da O’Brien e coll. comprende lo studio di ben 17 linee cellulari HER2 positive trattate con trastuzumab o lapatinib, con valutazione bi- e tri-dimensionale della risposta al trattamento. I risultati evidenziano una risposta al trastuzumab dipendente dai livelli di PTEN, pAkt e dallo stato mutazionale di PI3K a differenza di quanto avvenga per la risposta a lapatinib. Gli autori hanno inoltre evidenziato una buona risposta al trattamento con lapatinib della

linea cellulare BT474, resa trastuzumab-resistente in seguito ad una esposizione a trastuzumab protratta per 9 mesi. Tali dati indicano quindi lapatinib risulta attivo in linee cellulari con resistenza primaria ed acquisita a trastuzumab, ponendo un forte razionale preclinico per un utilizzo precoce e combinato di entrambe le due molecole. Dave e coll., dopo aver trattato le linee cellulari SKBR3 e BT474 con trastuzumab e lapatinib, in monoterapia ed in associazione, confermando i risultati sopracitati, hanno valutato 2 distinte casistiche di pazienti affette da carcinoma localmente avanzato trattate con trastuzumab per 3 settimane o lapatinib per 6 settimane, seguiti da un trattamento con trastuzumab e docetaxel per 12 settimane e successivo trattamento chirurgico. Nella casistica (35 casi) trattata inizialmente con trastuzumab è stata evidenziata una percentuale di risposte patologiche complete (pCR) pari al 34.4% mentre nella popolazione (49 casi) trattata inizialmente con lapatinib e successivamente trastuzumab la percentuale è stata pari al 63.1%. La percentuale di pCR è stata quindi correlata con il livello di espressione di PTEN e lo stato mutazionale di PI3K. Nella prima casistica, la ridotta espressione di PTEN è risultata associata ad una riduzione del tasso di pCR (15.4% verso 44.4% nelle pazienti con basso/alto livello di PTEN rispettivamente), così come la presenza di mutazioni *PIK3CA* (20% verso 38.1% nelle pazienti con/senza mutazioni rispettivamente). Valutando entrambi i determinanti molecolari, la pazienti con bassa espressione di PTEN e presenza di mutazioni *PIK3CA* hanno presentato il 18.2% di pCR rispetto al 66.7% delle pazienti con alta espressione ed assenza di mutazioni ($p=0.015$), avvalorando la criticità del ruolo del “PI3K pathway attivo” nel determinare resistenza al trattamento con trastuzumab, come già evidenziato nelle casistiche condotte su pazienti affette da carcinoma mammario metastatico. Nella seconda casistica invece, ben il 92.3% delle pazienti con ridotta espressione di PTEN hanno ottenuto una pCR rispetto al 42.2% delle pazienti normo-esprimenti; considerando le pazienti con bassa espressione e presenza di mutazioni *PIK3CA* tale percentuale è risultata pari al 81.3%, confrontato al 41.7% delle pazienti con alta espressione e assenza di mutazioni ($p=0.05$). In tale casistica trattata inizialmente con lapatinib, la bassa espressione di PTEN non sembra quindi essere statisticamente correlata con la percentuale di risposta patologica. Tale studio, condotto in una popolazione estremamente selezionata e caratteristicamente non pretrattata in alcun modo per la malattia

oncologica, sembra indicare come il pathway PI3K abbia un ruolo centrale nel predire la resistenza a trattamenti contenenti trastuzumab ma non in quelli contenenti lapatinib.

Se nel setting neoadiuvante la correlazione tra il PI3K pathway e la resistenza al trattamento con trastuzumab sembra essere chiara, benché siano ovviamente necessari i risultati degli studi in corso prospettici, randomizzati per una definitiva validazione, nel setting metastatico l'eventuale ruolo predittivo o prognostico del pathway PI3K risulta attualmente non definito.

Il più recente lavoro, pubblicato nell'ottobre del 2010, condotto da Esteva e coll (62) su 137 pazienti affette da carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo trattate con trastuzumab in monoterapia o associato a regimi chemioterapici, ha valutato la correlazione tra la perdita di espressione di PTEN, lo stato mutazionale di PI3K e l'iperespressione di p-AKT e p-p70S6K con la risposta al trattamento e l'outcome clinico.

I risultati hanno evidenziato come non vi sia alcuna correlazione tra lo stato dei quattro determinanti e la risposta al trattamento o l'outcome clinico quando ciascun determinante è stato valutato individualmente. Valutando invece lo stato di attivazione del pathway PI3K, definito come presenza della perdita di espressione di PTEN/presenza di alterazione mutazionale a livello di PI3K, veniva osservata una correlazione statisticamente significativa sia per quanto riguarda la risposta al trattamento ($p=0.047$) che la sopravvivenza globale ($p=0.015$).

Tale studio evidenzia quindi come nel setting metastatico, comprendente pazienti spesso pretrattate in fase adiuvante e in alta percentuale di casi anche per la malattia metastatica, la valutazione del pathway più che il singolo determinante molecolare possa evidenziare una associazione tra il trattamento antiHER-2 utilizzato e i parametri di attività ed efficacia.

OBIETTIVI

Il presente studio si propone di analizzare lo stato di alcuni determinanti molecolari predittivi di resistenza al trastuzumab quali la forma recettoriale di HER-2 tronca (p95HER-2) e lo stato mutazionale di PI3K su un'ampia casistica di pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico trattate con trastuzumab e correlare i risultati ottenuti con l'outcome clinico di queste pazienti.

In particolare la valutazione dei determinanti molecolari è stata correlata con la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da progressione.

L'utilizzo nella pratica clinica di questi markers, se confermati successivamente in modo prospettico, permetterebbe di poter scegliere un trattamento alternativo al trastuzumab nelle pazienti HER-2 positive che presentano positività a questi determinanti molecolari. Questo comporterebbe l'ottimizzazione di questi trattamenti con importanti risvolti clinici ed economici.

PAZIENTI E METODI

5.1 Criteri di inclusione

Sono stati inclusi nello studio pazienti con diagnosi istologica di carcinoma mammario metastatico con iperespressione di HER-2 trattate con trastuzumab negli ultimi 11 anni presso l' U.O. di Oncologia Medica – Azienda Ospedaliero Universitaria “S.Chiara” di Pisa e presso l' U.O di Oncologia Medica - Ospedale “F.Lotti” di Pontedera e di cui fosse disponibile il preparato istologico con il campione tumorale.

5.2 Metodologia di laboratorio

L'analisi dei determinanti molecolari predittivi di resistenza a trastuzumab è stata svolta presso i laboratori di Anatomia Patologica I della Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana (Direttore: Prof. Bevilacqua) e condotta su campioni di tessuto tumorale di pazienti sottoposte a trattamento con trastuzumab per la malattia metastatica a partire dal 1999 nella U.O. di Oncologia Medica della Az-USL5 di Pisa e dell' Azienda Ospedaliera-Universitaria di Pisa.

Sezioni di 3 µm ottenute da campioni di tumore fissato in formalina ed incluso in paraffina sono state colorate con procedura di immunohistochimica usando i seguenti anticorpi: HER2 dominio interno (clone 4B5, Ventana Medical Systems), HER2 dominio esterno (clone TAB250; Invitrogen), L'anticorpo anti HER2 dominio extracellulare (clone TAB250) è stato diluito 1:100 mentre l'anticorpo anti HER2 dominio intracellulare (clone 4B5) è stato utilizzato tal quale. Per ogni set di analisi la qualità e la specificità dei singoli anticorpi è stata verificata utilizzando controlli positivi e negativi dei singoli marcatori. In particolare tumori mammari che esprimono le proteine in analisi sono stati utilizzati come controlli positivi mentre i controlli negativi sono stati ottenuti omettendo i relativi anticorpi primari. La reazione antigene-anticorpo è stata evidenziata mediante tecnica immunoperoxidasica utilizzando il complesso avidin-biotin-perossidasi associato al sistema di colorazione Benchmark-XT, Ventana Medical Systems. In breve dopo aver deparaffinato e idratato le sezioni utilizzando passaggi in xilolo seguiti da passaggi in scala decrescente di alcool in acqua, si è proceduto a collocare le sezioni nell'immunocoloratore che, seguendo specifici e dettagliati

programmi di analisi, ha bloccato bloccare le perossidasi endogene per il recupero dei siti antigenici; la reazione antigene/anticorpo è stata successivamente evidenziata utilizzando l'Ultra VIEW Detection Kit e alla controcolorazione con ematossilina.. La valutazione dei preparati è stata eseguita utilizzando un microscopio ottico munito di sistema di analisi di immagini, VIAS-Ventana.

RISULTATI

6.1 Caratteristiche dei pazienti

Dal 1999 al 2010 sono state arruolate 107 pazienti affette da carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo, trattate c/o la U.O di Oncologia Medica di Pisa e la U.O di Oncologia Medica di Pontedera.

La totalità della popolazione era di sesso femminile e presentava una età media alla diagnosi della malattia metastatica pari a 54 anni, con range 25-79. Il Performance Status (PS) alla diagnosi di malattia metastatica era nella massima parte dei casi ottimo, con PS pari a 0 in circa il 60% (60/107).

Circa il 18% delle pazienti (20/107) avevano un quadro di esordio della malattia in IV stadio: tra queste, 6 pazienti non erano state effettivamente sottoposte ad alcun trattamento chirurgico mammario eccetto la valutazione bioptica, le restanti 14 pazienti erano state invece trattate chirurgicamente con evidenza di localizzazioni secondarie di malattia nel corso della rivalutazione peri-post operatoria.

Circa l'82% delle pazienti (87/107) erano state sottoposte ad intervento chirurgico radicale mammario, eventualmente associato al trattamento chirurgico a livello ascellare. In particolare 24 pazienti presentavano uno stadio III di malattia, 48 pazienti uno stadio II ed infine 15 pazienti uno stadio I di malattia.

Per quanto concerne le caratteristiche istologiche della neoplasia mammaria primitiva circa il 90% dei casi (96/107) presentava un carcinoma duttale infiltrante, mentre un carcinoma lobulare infiltrante era stato riscontrato in circa il 3% dei casi (3/107). Nei restanti casi erano stati evidenziati istotipi meno frequenti, quali un caso di carcinoma midollare, un caso di comedocarcinoma infiltrante oppure carcinoma infiltrante non meglio specificato.

In merito al livello di espressione immunoistochimica ormonale della neoplasia mammaria primitiva, circa il 60% (65/107) ed il 49% (52/107) dei casi erano risultati rispettivamente positivi per i

recettori estrogenici e progestinici. Per entrambi i dosaggi in circa il 3% dei casi non era stata eseguita la determinazione immunoistochimica, né è stato possibile rivalutarli successivamente.

Per quanto riguarda la valutazione del grado di differenziazione delle cellule tumorali, in circa il 68% dei casi (73/107) erano state evidenziate cellule neoplastiche scarsamente differenziate (G3), nel 14% (15/107) e nel 1,8% (2/107) circa erano state invece descritte cellule neoplastiche rispettivamente moderatamente (G2) e ben (G1) differenziate. Anche per tale caratteristica, in circa il 16% dei casi (17/107) non era stata eseguita alcuna valutazione, né possibile rivalutarla.

In merito al grado di proliferazione delle cellule neoplastiche, il dato è risultato disponibile su 77 casi totali. Tra questi, utilizzando come valore cut-off il un grado di proliferazione pari al 14%, il 74% dei casi (57/77) presentava un alto gradi di proliferazione mentre i restanti casi (20/77) un basso grado.

Infine, per quanto concerne la valutazione dello stato di HER-2 una valutazione immunoistochimica positiva, con un valore cioè pari a +3, era stato evidenziato nell'84% dei casi (90/107). Nel restante 16% dei casi (17/107) risultati +2 al dosaggio immunoistochimico, era stata eseguita una conferma tramite metodica di amplificazione genica con la tecnica dell'ibridazione fluorescente in situ (FISH) risultata positiva.

La valutazione dello stato di HER-2 era stata condotta in circa il 90% dei casi (96/107) sul campione tumorale primitivo. Nei restanti casi invece tale determinazione era stata eseguita sul campione tumorale metastatico, in seguito al re-biopsy eseguito sulla lesione metastatica stessa.

In merito ai trattamenti ricevuti prima del trattamento per la malattia metastatica, 25 pazienti avevano ricevuto un trattamento chemioterapico preoperatorio e 67 pazienti avevano ricevuto un trattamento adiuvante post-operatorio.

In particolare tra le 25 pazienti che avevano ricevuto un trattamento chemioterapico preoperatorio, tale indicazione era stata posta in seguito all'evidenza clinica di uno stadio I di malattia in un solo caso, in seguito all'evidenza clinica di uno stadio II e III di malattia in 6 casi e 10 casi rispettivamente. Le restanti 8 pazienti avevano ricevuto un trattamento neoadiuvante con successivo

riscontro di lesioni secondarie alla rivalutazione peri-post operatoria. Escludendo queste ultime pazienti, per le quali in seguito all'intervento chirurgico era stato iniziato un trattamento per la malattia metastatica, nei casi radicalmente operati un trattamento preventivo post-operatorio chemio e/o ormonoterapico era stato eseguito nella maggior parte dei casi (14/17).

Per quanto riguarda le 67 pazienti che avevano ricevuto un trattamento adiuvante post-operatorio, questo era risultato esclusivamente chemioterapico in 28 casi, chemio-ormonoterapico in 30 casi ed esclusivamente ormonoterapico nei restanti 9 casi. In soli 6 casi il trattamento adiuvante aveva previsto l'associazione dell'anticorpo monoclonale trastuzumab; tale dato deve tuttavia essere contestualizzato, considerando che la maggior parte delle pazienti arruolate aveva ricevuto il trattamento adiuvante prima che il trastuzumab ricevesse l'approvazione per il trattamento del carcinoma mammario HER-2 positivo, avvenuta in Italia nel 2005.

Per quanto riguarda il trattamento per la malattia metastatica, le 107 pazienti complessivamente arruolate presentavano un numero variabile di siti metastatici coinvolti, con un range da 1 a 5 siti di malattia. Circa il 57% delle pazienti presentava un'unica sede di malattia secondaria, in quasi un terzo dei casi rappresentato dall'impegno scheletrico e secondariamente da quello epatico o polmonare; circa il 30% dei casi presentava invece due siti di malattia secondaria, nuovamente con una alta percentuale di interessamento scheletrico e viscerale, rappresentato più frequentemente da fegato, polmone, pleura e linfonodi. Nel restante 13% dei casi erano invece coinvolti almeno 3 siti di malattia extramammaria.

Oltre la metà della popolazione arruolata, in particolare il 57% (61/107) delle pazienti erano state trattate in prima linea con un trattamento di combinazione con trastuzumab. Nello specifico, il trattamento con trastuzumab era stato associato ad un trattamento chemioterapico in circa l'80% dei casi (49/61), ad un trattamento ormonoterapico in circa il 10% dei casi (6/61) e somministrato in monoterapia nei restanti 6 casi. Il trattamento chemioterapico, effettuato come sopra riportato in 49 casi, risultava un regime contenente taxani in ben 43 casi, in 6 dei quali associato a carboplatino o epirubicina, mentre risultava non contenente taxani nei restanti 6 casi, comprendendo un trattamento con vinorelbina in 5 casi e con capecitabina in un solo caso.

Tra le 61 pazienti trattate per la prima linea metastatica con un trattamento di combinazione, 27 pazienti avevano proseguito il trattamento con trastuzumab anche in seconda linea, oltre quindi la progressione del quadro di malattia. In tale setting, 23 pazienti erano state trattate con un farmaco chemioterapico non cross resistente con quello utilizzato nella prima linea di trattamento, mentre in 4 casi era stata associato a trastuzumab un trattamento ormonoterapico.

Il 27% della popolazione complessivamente arruolata (29/107) era stata trattata per la prima volta con trastuzumab per il trattamento della malattia metastatica progredita ad una prima linea. In particolare, il trattamento con trastuzumab era stato associato ad un trattamento chemioterapico in 23 casi, ad un trattamento ormonoterapico in 3 casi e somministrato in monoterapia nei restanti 3 casi. Nello specifico il trattamento chemioterapico, eseguito come sopra riportato in 23 casi, comprendeva un taxano in 14 casi o un trattamento con vinorelbina nei restanti 9 casi.

Il restante 16% delle pazienti arruolate (17/107), avevano ricevuto per la prima volta un trattamento di combinazione con trastuzumab oltre la seconda linea di trattamento per la malattia metastatica; in particolare, in 13 casi durante la terza linea di trattamento, in 2 casi durante la quarta linea ed infine in 2 casi durante la quinta linea di trattamento. Nella maggior parte dei casi (11/17) il trattamento con trastuzumab era stato associato ad un trattamento chemioterapico; in 2 casi associato ad un trattamento ormonoterapico; nei restanti 4 casi trastuzumab era stato somministrato in monoterapia.

6.2 Caratteristiche molecolari

Presso la Divisione di Anatomia Patologica I dell'Azienda Ospedaliera Pisana sono state condotte le analisi immunoistochimiche per la valutazione della forma recettoriale di HER-2 e le analisi mutazionali del gene *PIK3CA*.

Per quanto concerne le analisi immunoistochimiche, come precedentemente descritto, il recettore HER-2 è stato considerato tronco in presenza di una positività della immureattività del dominio

interno di HER-2 (clone 4B5, Ventana Medical Systems) e di una positività del dominio esterno di HER-2 (clone TAB250; Invitrogen) pari a +1 oppure di una negatività. La forma recettoriale è stata invece considerata integra in presenza di una positività della immureattività del dominio interno di HER-2 (clone 4B5, Ventana Medical Systems) e di una positività del dominio esterno di HER-2 (clone TAB250; Invitrogen) pari a +2 e +3.

Tale analisi combinata è stata eseguita su un totale di 63 casi complessivi. La forma recettoriale tronca è stata evidenziata in 26 casi, pari al 42%, mentre la forma recettoriale integra è stata evidenziata nei restanti 37 casi, pari al 58%. Nella casistica sopra riportata, la percentuale della forma recettoriale tronca risulta superiore a quella generalmente descritta nella relativa letteratura, seppur limitata. Da sottolineare, a tal proposito, la difficile comparazione eseguibile tra le diverse metodiche utilizzate: la presenza della forma recettoriale tronca è stata infatti storicamente rilevata attraverso la metodica del Western blotting, condotta su tessuto fresco congelato e raramente disponibile; più recentemente il gruppo di Scaltriti ha introdotto l'utilizzo dell'immunofluorescenza; partendo dall'osservazione che la forma recettoriale tronca, ma non la forma integra di HER-2, è localizzata sia nel citoplasma che sulla membrana plasmatica, lo score di positività prevede una individuazione del segnale in più del 50% delle cellule osservate dell'anticorpo anti-HER2 sia sulla membrana che nel citosol. La presenza dell'anticorpo anti-HER2 nel citosol è dimostrata dalla co-localizzazione, in questa sede, dell'anti-HER2 e dell'anticorpo anti-citocheratina citoplasmatica (comparsa di una colorazione gialla al microscopio confocale, risultato della sommazione della fluorescenza rossa e verde data dagli anticorpi anti HER2 ed anti-citocheratina rispettivamente). Con entrambe le metodiche sopradette, la percentuale di forme recettoriali è pari a circa il 20-30%.

Per quanto concerne le analisi delle mutazioni attivanti (*PIK3CA*) a livello dell'esone 20 e dell'esone 9 del gene codificante la subunità catalitica della chinasi PI3K, condotte con sequenziamento diretto come precedentemente descritto, complessivamente sono stati analizzati 70 casi.

In particolare, per quanto riguarda la valutazione dell'esone 9 sono state evidenziati 15 casi con presenza di mutazione, pari al 22%, e 55 casi wild-type, pari al 78%. Per quanto riguarda la valutazione dell'esone 20 sono state nuovamente evidenziati 15 casi con presenza di mutazione, pari

al 22%, e 55 casi wild-type, pari al 78%. Valutando la presenza simultanea di una mutazione a livello dell'esone 9 o dell'esone 20, il numero di casi mutati è risultato pari a 25 (35%), mentre nei restanti 45 casi sia l'esone 9 che l'esone 20 sono risultati wild-type.

Le frequenze di mutazioni sopra riportate risultano in linea con i dati riportati dalla letteratura, indicanti una percentuale di mutazioni *PIK3CA*, valutate con sequenziamento diretto, pari a circa il 25%.

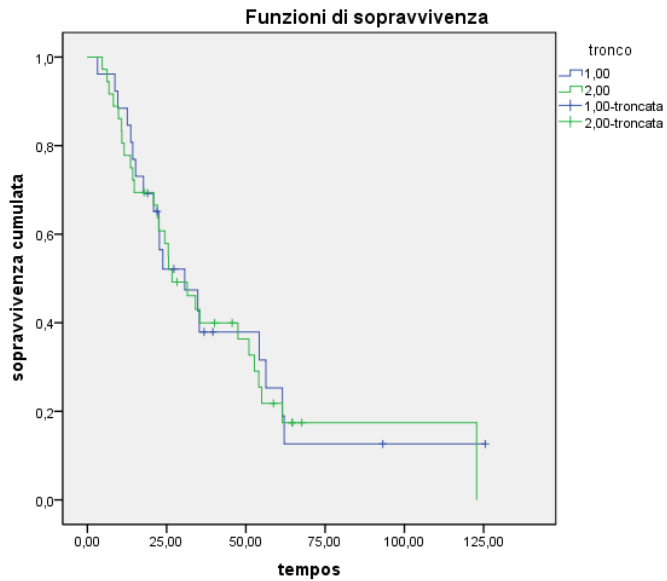
6.3 Correlazione tra le caratteristiche molecolari e l'outcome clinico

I determinanti molecolari sopradescritti sono stati correlati con l'outcome clinico delle pazienti affette da carcinoma metastatico HER-2 positive trattate con trastuzumab.

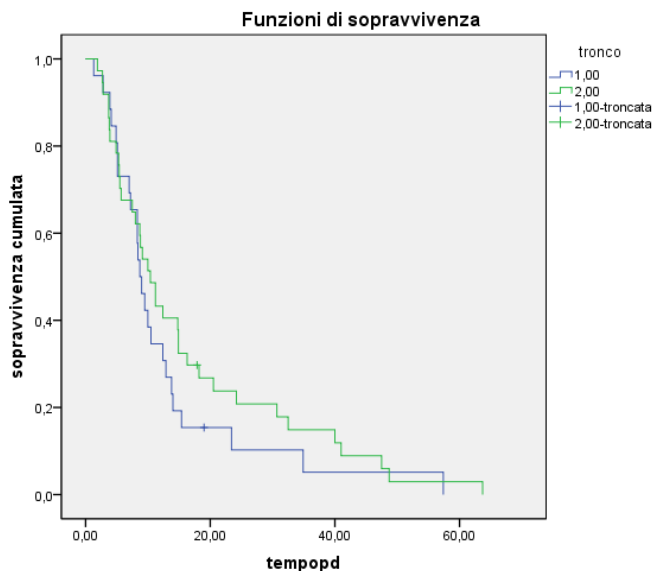
In particolare la correlazione è stata eseguita con la sopravvivenza globale (OS), definita come il tempo intercorso dall'inizio del trattamento con trastuzumab e la data di decesso della paziente avvenuto per qualsiasi causa e con la sopravvivenza libera da progressione (PFS), definita come il tempo intercorso dall'inizio del trattamento con trastuzumab e l'evidenza di progressione di malattia. Le curve del tempo alla progressione e della sopravvivenza sono state disegnate secondo il metodo Kaplan- Meier.

Il confronto tra le curve del tempo alla progressione e della sopravvivenza è stato effettuato secondo il Log-Rank test. E' stata considerata significativa una $P \leq 0,05$.

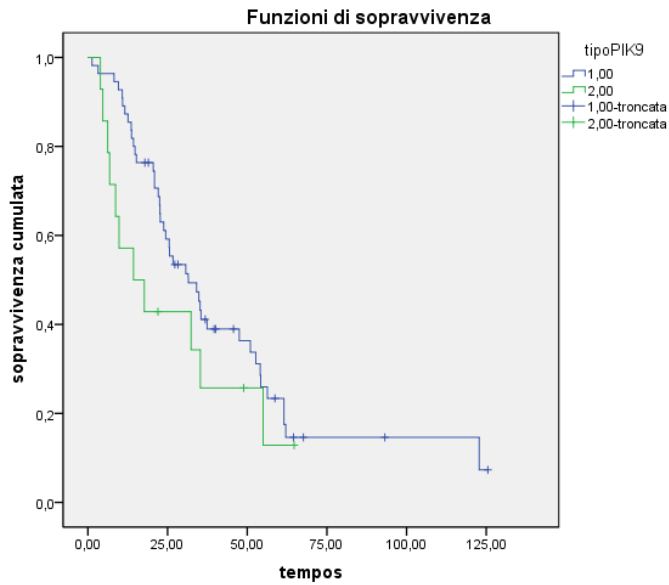
In particolare, in merito alla correlazione con la forma recettoriale di HER-2 e la OS, valutabile su 62 casi dei quali 36 con forma recettoriale integra e 26 con forma recettoriale tronca, non è stata osservata una associazione statisticamente significativa, come osservabile dalla curve sotto riportata ($p=0,856$)



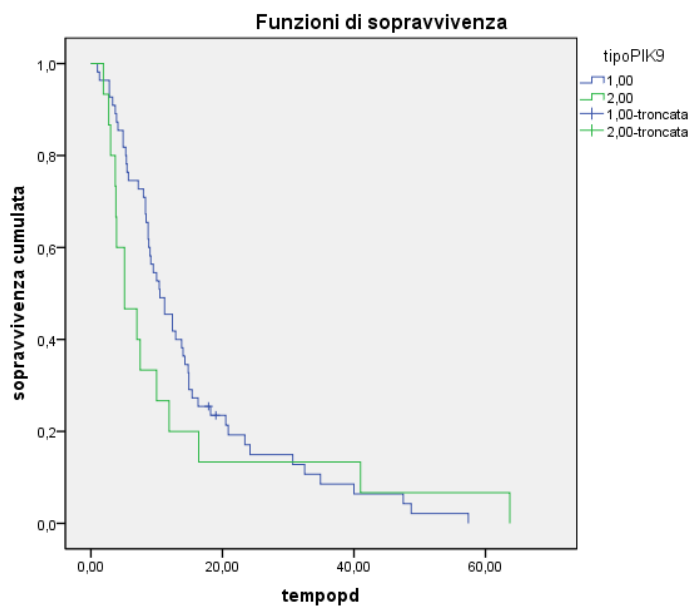
Anche per quanto concerne la correlazione tra la forma recettoriale di HER-2 e la PFS, valutabile su 63 casi dei quali 37 con forma recettoriale integra e 26 con forma recettoriale tronca, non è stata osservata una associazione statisticamente significativa, come osservabile dalla curve sotto riportata ($p=0,323$).



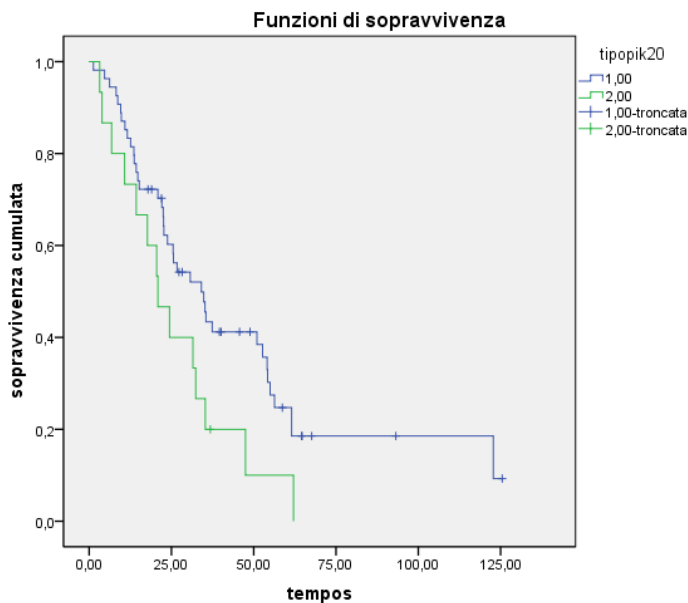
In merito alla correlazione tra la presenza di una mutazione a livello dell'esone 9 e la OS, valutabile su 69 casi dei quali 55 wild-type e 14 mutati, non è stata osservata una associazione statisticamente significativa, come osservabile dalla curve sotto riportata ($p=0,189$).



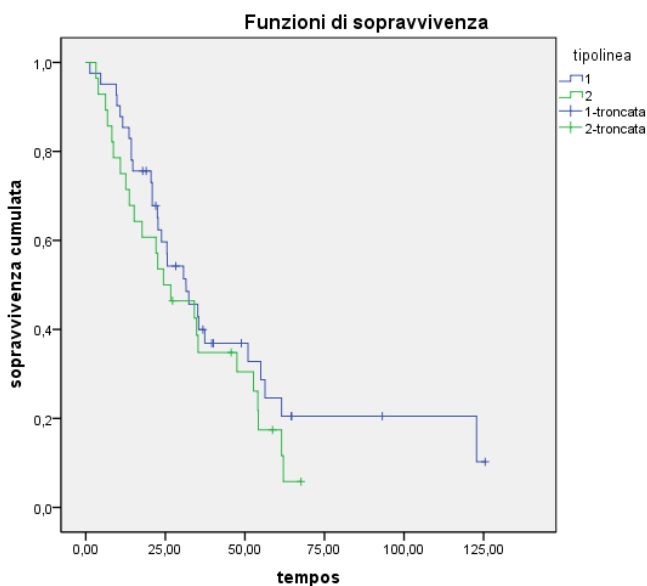
Per quanto riguarda la correlazione tra la presenza di una mutazione a livello dell'esone 9 e la PFS, valutabile su 70 casi dei quali 55 wild-type e 15 mutati, non è stata osservata una associazione statisticamente significativa, come osservabile dalla curve sotto riportata ($p=0,415$)



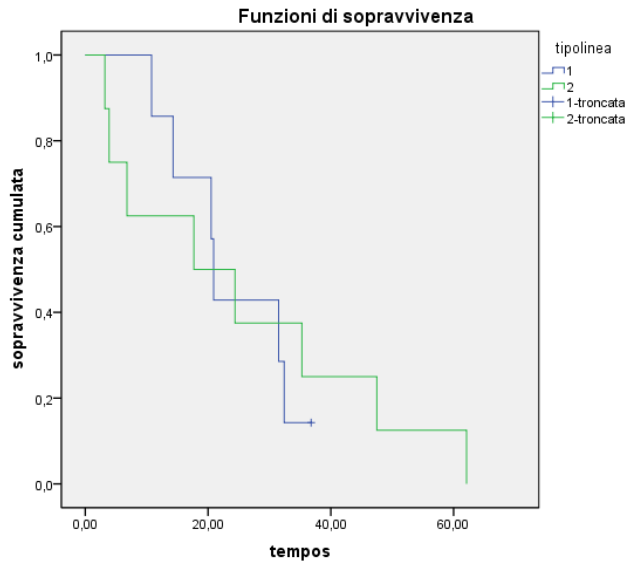
Per quanto riguarda la correlazione tra la presenza di una mutazione a livello dell'esone 20 e la OS, valutabile su 69 casi, dei quali 54 wild-type e 15 mutati, è stata invece osservata una associazione statisticamente significativa, come osservabile dalla curve sotto riportata ($p=0,046$)



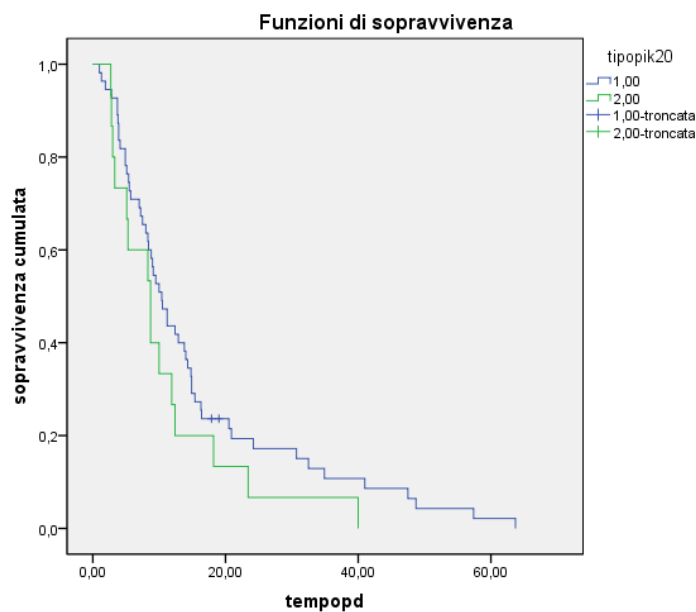
Eseguendo inoltre, su tali 69 casi, un'analisi in merito ai diversi tempi di sopravvivenza globale in base alla linea di trattamento nella quale hanno ricevuto trastuzumab, non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i 41 pazienti trattati in prima linea con trastuzumab ed i restanti 28 pazienti trattati con trastuzumab nelle linee successive ($p=0,261$)



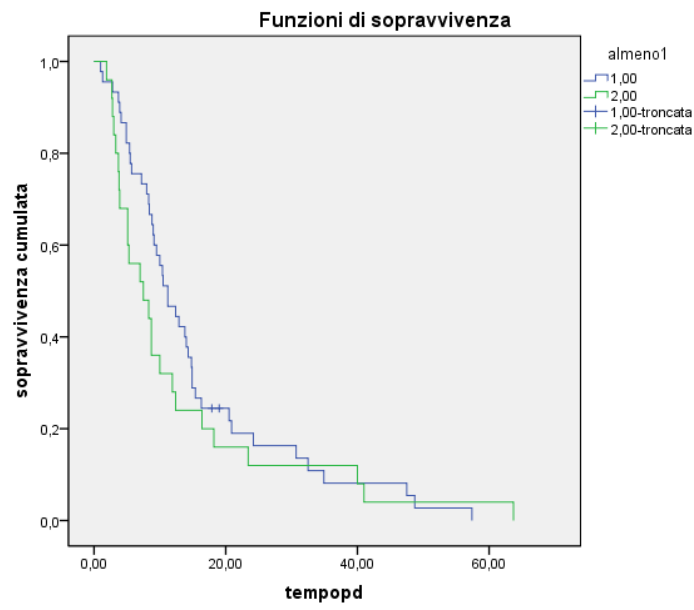
Anche tra i 15 casi mutati, su i 69 complessivamente valutabili, inoltre non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra la OS dei 7 pazienti trattati in prima linea con trastuzumab ed la OS dei restanti 8 pazienti trattati con trastuzumab nelle linee successive ($p=0,892$)



Per quanto concerne la correlazione tra la presenza di una mutazione a livello dell'esone 20 e la PFS, valutabile su 70 casi dei quali 55 wild-type e 15 mutati, non è stata osservata una associazione statisticamente significativa, come osservabile dalla curve sotto riportata ($p=0,172$)



Valutando la correlazione tra la presenza simultanea di una mutazione a livello dell'esone 9 o dell'esone 20, risultata positiva in 25 casi su 70 casi complessivamente valutati, e la PFS non è stata evidenziata una associazione statisticamente significativa ($p=0,328$).



DISCUSSIONE

Le pazienti affette da carcinoma mammario HER-2 positivo hanno generalmente una prognosi peggiore ed un andamento maggiormente aggressivo della malattia rispetto alle pazienti i cui tumori non esprimono tale proteina di membrana. L'utilizzo nella pratica clinica di trastuzumab in tale setting ne ha significativamente modificato la storia naturale, con un significativo miglioramento, come evidenziato da numerosi studi clinici randomizzati, in termini di tasso di risposte globale, di tempo a progressione di malattia e di sopravvivenza globale. Attualmente, infatti il trastuzumab in associazione alla chemioterapia, rappresenta il trattamento standard di prima linea nelle pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico con iperespressione di HER-2.

Tuttavia circa il 40% delle pazienti con diagnosi di tumore mammario metastatico HER-2 positivo trattate con trastuzumab non beneficia di questa terapia perché ha sviluppato una resistenza primaria o secondaria al farmaco. In tale setting, lapatinib in associazione alla capecitabina rappresenta attualmente una valida opzione terapeutica, come evidenziato da uno studio clinico randomizzato di fase III.

Ad oggi sono stati individuati diversi determinanti molecolari che sembrano implicati nei meccanismi di resistenza al trastuzumab, sebbene nessuno sia stato ancora validato nella pratica clinica. Molteplici esperienze precliniche e analisi retrospettive condotte in pazienti trattati con trastuzumab hanno dimostrato come la forma recettoriale di HER-2 tronca, la perdita di espressione di PTEN e lo stato mutazionale di PI3K/Akt risultino associate ad una resistenza al trattamento con trastuzumab. Questi risultati suggeriscono inoltre come lapatinib potrebbe rappresentare una migliore opzione terapeutica. Tuttavia non è al momento possibile discriminare se la resistenza al trastuzumab sia primitiva oppure acquisita e derivante, in questo ultimo caso, da un processo di selezione di cloni cellulari tumorali trattati con l'anticorpo per un periodo di tempo prolungato.

Rimane quindi la necessità di classificare biologicamente i carcinomi mammari al fine di personalizzare la terapia e migliorare la prognosi delle pazienti.

Sulla base di queste considerazioni, in questo studio è stata effettuata un'analisi della correlazione tra vari determinanti molecolari, quali lo stato del recettore HER-2 e lo stato mutazionale di PI3K, e l'outcome clinico di 107 pazienti con diagnosi istologica di carcinoma mammario metastatico con iperespressione di HER-2 trattate con trastuzumab negli ultimi 11 anni presso l' U.O. di Oncologia Medica – Azienda Ospedaliero Universitaria “S.Chiara” di Pisa e presso l' U.O di Oncologia Medica - Ospedale “F.Lotti” di Pontedera e di cui fosse disponibile il preparato istologico con il campione tumorale.

Per quanto riguarda l'analisi della forma recettoriale di HER-2 eseguita tramite valutazione immunoistochimica, i risultati della presente analisi, eseguita su un totale di 63 casi, il 42% dei quali ha presentato la forma recettoriale tronca ed il restante 58% la forma integra, non ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa né con la PFS ($p=0,323$) né con la OS ($p=0,856$). Tale risultato non risulta quindi in linea con precedenti analisi condotte su ampie casistiche retrospettive di pazienti radicalmente operate per carcinoma mammario HER-2 positivo, nelle quali veniva evidenziata una significativa correlazione con la presenza di metastasi linfonodali ed una significativa correlazione con una riduzione della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale, indicando quindi un potenziale ruolo prognostico.

Nella nostra casistica inoltre, la percentuale della forma recettoriale tronca risulta superiore a quella generalmente descritta nella relativa letteratura, seppur limitata, indicante una percentuale circa pari al 25%. Da sottolineare, a tal proposito, la difficile comparazione eseguibile tra le diverse metodiche utilizzate: la presenza della forma recettoriale tronca è stata infatti storicamente rilevata attraverso la metodica del Western blotting, condotta su tessuto fresco congelato e raramente disponibile e più recentemente tramite

l'immunofluorescenza, utilizzando appositi score introdotti dal gruppo di Scaltriti. Il basso numero di pazienti analizzati e la diversa metodologia di laboratorio utilizzata non consentono quindi di tracciare conclusioni definitive riguardo la correlazione tra la forma recettoriale tronca e l'outcome clinico delle pazienti.

Le analisi delle mutazioni attivanti (*PIK3CA*) a livello dell'esone 20 e dell'esone 9 del gene codificante la subunità catalitica della chinasi PI3K, sono state invece condotte con sequenziamento diretto su 70 casi complessivamente. Le percentuali di casi mutati, pari al 22% sia per quanto riguarda l'esone 9 che l'esone 20, risultano in linea con i dati riportati dalla letteratura, indicanti una percentuale di mutazioni *PIK3CA*, valutate sempre con sequenziamento diretto, pari a circa il 25%. Se per quanto concerne la correlazione tra la mutazione a livello dell'esone 9 non è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa né con la PFS ($p=0,415$) né con la OS ($p=0,189$), per quanto riguarda la correlazione tra la presenza di una mutazione a livello dell'esone 20 e la OS, valutabile su 69 casi, dei quali 54 wild-type e 15 mutati, è stata invece osservata una associazione statisticamente significativa, ($p=0,046$). Eseguendo inoltre, su tali 69 casi, un confronto tra le sopravvivenze globali in base alla linea di trattamento nella quale hanno ricevuto trastuzumab, non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i 41 pazienti trattati in prima linea con trastuzumab ed i restanti 28 pazienti trattati con trastuzumab nelle linee successive ($p=0,261$) né una differenza in tal senso è stata evidenziata tra i 15 casi mutati, 7 dei quali trattati in prima linea con trastuzumab ed i restanti 8 pazienti trattati con trastuzumab nelle linee successive ($p=0,892$). Questi dati indicano, seppur limitati dalla bassa rappresentatività campionaria, un potenziale ruolo prognostico della mutazione a livello dell'esone 20. Una correlazione non significativa è stata invece evidenziata per quanto concerne la PFS ($p=0.172$).

I nostri risultati sono in parte in linea con precedenti analisi, per lo più retrospettive, indicanti un ruolo prognostico e predittivo di resistenza al trastuzumab delle mutazioni di PI3K. Tuttavia, come evidenziato dal più rappresentativo e recente lavoro, pubblicato nell'ottobre del 2010, condotto dal

gruppo di Esteva su 137 pazienti affette da carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo trattate con trastuzumab, la valutazione del pathway di PI3K più che il singolo determinante molecolare può evidenziare una associazione tra il trattamento antiHER-2 utilizzato e i parametri di attività ed efficacia. In tale studio infatti, che ha valutato la correlazione tra la perdita di espressione di PTEN, lo stato mutazionale di PI3K e l'iperespressione di p-AKT e p-p70S6K con la risposta al trattamento e l'outcome clinico, non è stata evidenziata alcuna correlazione valutando il singolo determinante molecolare mentre valutando lo stato di attivazione del pathway PI3K, definito come presenza della perdita di espressione di PTEN/presenza di alterazione mutazionale a livello di PI3K, veniva osservata una correlazione statisticamente significativa sia per quanto riguarda la risposta al trattamento ($p=0.047$) che la sopravvivenza globale ($p=0.015$).

Alla luce di tali dati, i nostri risultati ci inducono ad ampliare la casistica analizzata e soprattutto ad ampliare il numero dei determinanti molecolari studiati, con particolare interesse alla valutazione di ulteriori determinanti appartenenti al pathway di PI3K.

Oltre ai risultati ottenuti, il nostro studio enfatizza l'importanza della ricerca traslazionale nel perseguire miglioramenti in ambito oncologico, con l'obiettivo di poter successivamente utilizzare nella pratica clinica quotidiana tali marcatori, guidando il clinico nella scelta di un trattamento sempre più "appropriato",ottimizzando le risorse disponibili e soprattutto offrendo alle pazienti un trattamento sempre più "personalizzato".

BIBLIOGRAFIA

- 1) <http://www.aiom.it/Attivit%20Scientifica/Linee+guida/Neoplasie+della+mammella>
- 2) Cnossen JA, Heinemann V, Laessig D, et al. Long term survival with metastatic breast cancer (MBC): results of a retrospective, single-centre analysis from 2000- 2005. *JCO* 2008; 26 (Suppl.): 1128.
- 3) Mauri D, Polyzos NP, Salanti G, et al. Multiple-treatments meta-analysis of chemotherapy and targeted therapies in advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100 (24): p. 1780-91.
- 4) Dawood S. et al.; Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER-2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review *JCO* 2010;28:92-98
- 5) Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L. et al Humanization of an anti-p185her2 antibody for human cancer therapy, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289, 1992
- 6) Baselga, J., Albanell, J., Molina, M.A., Arribas, J. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update, *Semin. Oncol.* 28: 4-11, 2001
- 7) Sliwkowsky, M.X., Lofgren, J.A., Lewis, G.D. Hotaling, T.E., Fendly, B.M., Fox, J.A. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin), *Semin. Oncol.* 26: 60-70, 1999
- 8) Le, X.F., Claret, F.X., Lammayot, A., Tian, L., Deshpande, D., Lapushin, R. et al The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition, *J. Biol. Chem.* 278: 23441-23450, 2003

- 9) Gennari, R., Menare, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2, *Clin. Cancer Res.* 10: 5650-5655, 2004
- 10) Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., et al. Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 21: 719-26, 2002
- 11) Baselga, J., Carbonell, X., Castaneda Soto, N.J., et al. Phase II study of efficacy, safety and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on 3-weekly schedule. *J. Clin. Oncol* 23: 2162-71, 2005
- 12) Pegram, M.D., Konecny, G.E., O'Callaghan, C., Beryt, M., Pietras, R., Slamon, D.J., Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer, *J. Natl Cancer Inst.* 96: 739-749, 2004
- 13) Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against Her2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344: 783-92, 2001
- 14) Klein, P.M., Dybdal, N., Trastuzumab and cardiac dysfunction: update on preclinical studies. *Semin. Oncol.*30: Suppl16: 49-53, 2003
- 15) Negro.A.,Brar, B.K., Lee, K.F. Essential roles of Her2/erb2 in cardiac development and function. *Recent Prog. Horm. Res.* 59: 1-12, 2004
- 16) Crone, S.A., Zhao, Y.Y., Fan, L., et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 8: 459-65, 2002
- 17) Marty, M., Cognetti, F., Maraninchi, D., et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of Trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer

- administered as first line treatment: the M77001 Study Group. *J. Clin. Oncol* 23: 4265-74, 2002
- 18) Burstein, H.J., Harris, L.N., Marcom, P.K., et al. Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors and cardiac surveillance algorithm. *J. Clin. Oncol.* 21: 2889-95, 2003
- 19) Burstein HJ, Keshaviah A, Baron AD et al. Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study. *Cancer.* 2007 Sep 1;110(5):965-72.
- 20) Andersson M, Lidbrink E, Bjerre K et al. Phase III randomized study comparing docetaxel plus trastuzumab with vinorelbine plus trastuzumab as first-line therapy of metastatic or locally advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: the HERNATA study. *J Clin Oncol.* 2011 Jan 20;29(3):264-71.
- 21) Benz CC, Scott GK, Sarup JC, et al: Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 24:85-95, 1992
- 22) Pietras R, Arboleda J, Reese D, et al: HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 10:2435-2446, 1995
- 23) Prat A, Baselga J: The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat Clin Pract Oncol* 5:531-542, 2008

- 24) Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, et al: Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: Results from the randomized phase III TAnDEM Study. *J Clin Oncol* 27:5529-5537, 2009
- 25) Johnston S, Pippin J Jr, Pivot X, et al: Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27:5538-5546, 2009
- 26) Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, et al: Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 17: 2235-2249, 1998
- 27) Mannocci A, De Feo E, de Waure C, et al, Use of trastuzumab in HER2-positive metastatic breast cancer beyond disease progression: a systematic review of published studies. *Tumori*. 2010 May-Jun;96(3):385-91.
- 28) von Minckwitz G, du Bois A, Schmidt M et al. Trastuzumab beyond progression in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: a German Breast Group 26/Breast International Group 03-05 Study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1999–2006.
- 29) Santoro A and Gullo G. Trastuzumab beyond progression: a challenge to translational oncology? *Ann Onc* 2010; 21 (11): 2131-4.
- 30) Konecny GE et al.; Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib against HER-2 overexpressing and trastuzumab treated breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:1630-1639
- 31) Spector NL, Xia W, Bums III H, et al. Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and

- survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2005;23:2502–12.
- 32) Zhou Y, Brattain A. Novel Strategy of colon cancer therapy: targeting both EGFR and ErbB2 receptors. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2003;1267. Abs 5529
- 33) Versola M, Burris HA, Jones S, et al. Clinical activity of GW572016 in EGF10003 in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 2004;22(14s): Abstr. 3047.
- 34) Burris HA III, Hurwitz HI, Dees EC, et al. Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *J Clin Oncol* 2005;23:5305–13.
- 35) Blackwell KL, Kaplan EH, Franco SX, et al. A phase II, open-label, multicenter study of GW572016 in patients with trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(14s): Abstr. 3006.
- 36) Kaplan EH, Jones CM, Berger MS. A phase II, open-label, multicenter study of GW572016 in patients with trastuzumab refractory metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22: Abstr. 981.
- 37) Chu QS, Schwartz G, de Bono J. Phase I and pharmacokinetic study of lapatinib in combination with capecitabine in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 20;25(24):3753-8.
- 38) Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2733–43.
- 39) Cameron Oncologist 2010
- 40) Gomez HL, Doval DC, Chavez MA, et al. Efficacy and safety of lapatinib as first-line therapy for ErbB2-amplified locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;18:2999–3005.

- 41) Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z, et al. Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first-line treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;34:5544–5552.
- 42) Jones SF, Hainsworth JD, Spigel DR, et al. A phase I study of the dual kinase inhibitor GW572016 in combination with paclitaxel (EGF10009). *J Clin Oncol.* 2004;22:14S: abstract 2083.
- 43) Johnston S, Pippin P, Pivot X, et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor–positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:5538–5546.
- 44) Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, et al.; Expression of p95HER-2, a truncated form of the HER-2 receptor, and response to anti-HER-2 therapies in breast cancer. *JNCI* 2007;99:628-638
- 45) Liu, P. C., X. Liu, Y. Li et al. . Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 2006; 5:657–664.
- 46) Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J* 2006;25:3234–44.
- 47) Pedersen K, Angelini PD, Laos S, et al. A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Mol Cell Biol* 2009;29:3319–31.
- 48) Xia W, Liu LH, Ho P, Spector NL. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* 2004;23:646–53.

- 49) Molina MA, Saez R, Ramsey EE, et al. NH([2])-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8: 347–53.
- 50) Saez R, Molina MA, Ramsey EE, et al. p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:424–31.
- 51) Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L et al. Clinical Benefit of Lapatinib-Based Therapy in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Tumors Coexpressing the Truncated p95HER2 Receptor. *Clin Cancer Res* 2011; 16:2688-2695.
- 52) Parsons R and Simpson, L. PTEN and cancer. *Methods Mol. Biol.* 2003: 222, 147–166.
- 53) Nagata Y, Lan K-H, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117–27.
- 54) Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer.* 2006 Jan 30;94(2):247-52.
- 55) Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007;12:395–402.
- 56) Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY et al. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10992-1000.
- 57) Saal LH, Holm K, Maurer M, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:2554–9.

- 58) Knuefermann C, Lu Y, Liu B et al. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2003 May 22;22(21):3205-12.
- 59) Dave B, Migliaccio I, Gutierrez M.C, et al. Loss of Phosphatase and Tensin Homolog or Phosphoinositol-3 Kinase Activation and Response to Trastuzumab or Lapatinib in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Overexpressing Locally Advanced Breast Cancers. *J Clin Onc* 2011; 2 (29): 166-173.
- 60) Xia, W. et al. Combining lapatinib (GW572016), a small molecule inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, with therapeutic antiErbB2 antibodies enhances apoptosis of ErbB2overexpressing breast cancer cells. *Oncogene* 24, 6213–6221 (2005).
- 61) O'Brien N, Browne B, Chow L, et al. Activated Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Signaling Confers Resistance to Trastuzumab but not Lapatinib. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(6); 1489–502.
- 62) Esteva FJ, Guo H, Zhang S, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol* 2010; 177: 1647-1656.