

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA
Facoltà di Medicina e Chirurgia



TESI DI SPECIALIZZAZIONE

**VALUTAZIONE RETROSPETTIVA DEL RUOLO DEL BACKGROUND GENETICO
DI FATTORI PRO- ED ANTI-ANGIOGENICI NEL PREDIRE LA RISPOSTA AL
TRATTAMENTO CON BEVACIZUMAB IN PAZIENTI CON CARCINOMA
MAMMARIO METASTATICO**

RELATORE

Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone

CANDIDATO

Dott.ssa Eleonora Bona

Anno Accademico 2010-2011

Alla mia famiglia

INDICE DEI CONTENUTI

INDICE DEI CONTENUTI.....	3
RIASSUNTO	5
1 INTRODUZIONE.....	8
1.1 Epidemiologia e trattamento medico del carcinoma mammario metastatico.....	8
1.1.1 Trattamento medico della malattia metastatica HER2 positiva.....	9
1.1.2 Trattamento medico della malattia metastatica HER2 negativa.....	12
2 TRATTAMENTO ANTIANGIOGENETICO NEL CARCINOMA MAMMARIO METASTATICO.....	15
2.1 Ruolo dell'angiogenesi nello sviluppo e nella progressione tumorale.....	15
2.2 Bevacizumab nella terapia medica del carcinoma mammario metastatico	18
2.3 Aspetti farmacogenetici del trattamento con bevacizumab: ruolo dei polimorfismi dei geni coinvolti nel processo angiogenetico come biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità	23
3 RAZIONALE.....	34
4 OBIETTIVI DELLO STUDIO	36
5 MATERIALI E METODI.....	37
5.1 Pazienti e disegno dello studio	37
5.2 Valutazioni cliniche delle pazienti in studio	37
5.3 Analisi farmacogenetiche sul DNA germinale.....	38
5.3.1 Prelievo del campione	38
5.3.2 Estrazione e conservazione del DNA	38
5.3.3 Analisi dei polimorfismi.....	39
5.4 Analisi su preparati istologici di tessuto tumorale	41
5.5 Analisi statistiche	42
6 RISULTATI.....	43
6.1 Caratteristiche delle pazienti	43

6.2	Efficacia e tossicità dell'associazione di bevacizumab e taxani.....	45
6.3	Analisi univariate	48
6.4	Analisi di interazione genetica	51
6.5	Analisi multivariata	53
7	DISCUSSIONE.....	55
8	BIBLIOGRAFIA.....	61
9	APPENDICI.....	69
	<i>APPENDICE I Criteri RECIST per la valutazione della risposta (v 1.1)</i>	69
	<i>APPENDICE II National cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)</i>	75
	<i>APPENDICE III Sonde di DNA utilizzate per le analisi di genotipizzazione</i>	76
	<i>APPENDICE IV Frequenze genotipiche nella popolazione in studio ed Equilibrio di Hardy-Weinberg</i>	77
	<i>APPENDICE V Kaplan-Meier PFS/OS relative ai 102 pazienti genotipizzati</i>	79
	<i>APPENDICE VI Analisi univariata PFS/OS caratteristiche clinico-patologiche</i>	81
	<i>APPENDICE VII Correlazione genotipo-risposta [Fisher-Exact Test]</i>	82

RIASSUNTO

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. Nonostante il miglioramento della prognosi di questa malattia negli ultimi decenni, grazie agli avanzamenti nel campo della diagnosi precoce e dei trattamenti adiuvanti, una parte delle pazienti sviluppa una malattia metastatica e in queste pazienti la sopravvivenza mediana rimane di 24-48 mesi, variabile in base all'estensione, alla sede e all'aggressività biologica della malattia. In considerazione dell'eterogeneità clinico-biologica non esiste un trattamento standard per la malattia metastatica e la scelta del clinico deve conformarsi sul singolo caso e su un'attenta valutazione del rapporto tra beneficio e tossicità dei trattamenti. La chemioterapia è il trattamento di scelta per pazienti con malattia ormonoresistente, impegno viscerale o andamento rapidamente evolutivo e ad oggi disponiamo di numerosi farmaci attivi in questo setting. Il ruolo cruciale svolto dal processo di neoangiogenesi tumorale nella progressione e metastatizzazione neoplastica ha portato allo sviluppo e sperimentazione clinica in diverse neoplasie solide di bevacizumab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), mediatore chiave della neoangiogenesi tumorale. L'associazione di bevacizumab ad una chemioterapia di prima linea con taxani rappresenta una possibile opzione terapeutica in pazienti con neoplasia mammaria metastatica, sulla base dei risultati di studi clinici randomizzati. Tuttavia lo sviluppo di resistenza in una parte di pazienti, la disponibilità di numerosi farmaci attivi in questo setting e i costi del trattamento, costituiscono elementi di criticità sollevati a sfavore di questo approccio da una parte dei clinici. L'identificazione di biomarcatori predittivi di efficacia in grado di selezionare i soggetti con minori o maggiori possibilità di beneficiare dell'inibizione di VEGF permetterebbe al clinico un approccio terapeutico personalizzato ed un'ottimizzazione del rapporto costo/efficacia dei trattamenti. Ad oggi tuttavia non è noto alcun fattore predittivo di efficacia validato, nonostante i numerosi studi condotti. Sulla base di lavori recenti è stato ipotizzato che specifici polimorfismi del gene VEGF e di altri geni coinvolti nell'angiogenesi possano condizionare l'efficacia del trattamento con bevacizumab. Questo studio pilota è stato condotto grazie alla cooperazione di altre U.O. di Oncologia Medica italiane con

l'obiettivo di identificare polimorfismi genetici di mediatori pro- o antiangiogenetici (VEGF, VEGFR2, IL-8, TSP-1, EPAS1 e HIF1 α) potenzialmente in grado di predire la risposta al trattamento con bevacizumab in termini di attività ed efficacia, su campioni di DNA estratto da sangue periferico di pazienti affette da carcinoma mammario metastatico sottoposte ad un trattamento di prima linea con paclitaxel e bevacizumab. Le caratteristiche delle 111 pazienti inserite in questo studio retrospettivo sono: età mediana 59 anni (range 32-81), performance status (ECOG PS) 0/1=100/11, recettori ormonali positivi/negativi=92/19, intervallo libero da malattia (DFI) </>12 mesi=30/81, numero di sedi metastatiche </> 3 = 74/37, con mediana di 2 (range 1-6), impegno di malattia viscerale / scheletro o tessuti molli = 81/30, precedente chemioterapia/chemioterapia con taxani= 76/26. Ad un follow up di 17.4 mesi la PFS e l'OS mediane sono risultate di 11.6 e 32.4 mesi. Si sono osservate 14 CR (12.6%), 57 PR (51.4%) e 31 SD (27.9%). Sulle 102 pazienti genotipizzate, nessuno dei polimorfismi analizzati ha mostrato individualmente una significativa associazione con la PFS, all'analisi univariata, ad eccezione di un trend per il genotipo AG rispetto al genotipo GG di EPAS1. All'analisi univariata si è osservata un'associazione significativa con la PFS per l'espressione dei recettori ormonali, il trattamento di mantenimento con bevacizumab, ed un trend per la precedente chemioterapia con taxani. Tramite MDR software è stata eseguita un'analisi di interazione genetica che ha mostrato come varianti alleliche dei polimorfismi di due geni, il VEGFR-2 rs11133360 CT e l' IL-8 -251AT, concorrano nel determinare un profilo genetico favorevole (presente in oltre il 50% delle pazienti) associato significativamente con la PFS; si è osservata infatti una PFS mediana di 14.0 mesi (IC 95% 11.7-16.3) nel profilo definito favorevole rispetto alla PFS mediana di 10.9 mesi (IC 95% 9.4-12.4) dei restanti pazienti (46 pazienti) [p=0.033, log rank test] e la significativa associazione con la PFS si è mantenuta anche all'analisi multivariata (HR di 0.63, IC 95% 0.4-0.99, p=0.046, Cox model). Inoltre i genotipi EPAS-1 AG e AA rispetto al genotipo GG (HR 0.50, IC 95% 0.27-0.91, p=0.024), l'espressione dei recettori ormonali (HR 0.22, IC 95% 0.12-0.41, p<0.0001), il trattamento di mantenimento con bevacizumab (HR 0.42, IC 95% 0.25-0.71, p=0.001) e il DFI superiore a 12 mesi (HR 0.40, IC 95% 0.20-0.82, p=0.011) hanno mostrato una riduzione significativa del rischio di progressione all'analisi multivariata. In conclusione questa analisi retrospettiva suggerisce una possibile interazione tra IL8 e VEGFR2 in un

profilo genetico costituito da più profili allelici associati significativamente ad una migliore PFS, potenzialmente in grado di identificare un sottogruppo di pazienti con un miglior outcome/maggiori possibilità di beneficiare di un trattamento con bevacizumab; abbiamo pertanto intenzione di condurre uno studio prospettico per confermare o meno i dati generati da questa analisi in pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatiche trattate in prima linea con l'associazione di bevacizumab e paclitaxel.

1 INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia e trattamento medico del carcinoma mammario metastatico

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. In Italia ogni anno si registrano circa 35.000 nuovi casi ed 11.000 decessi e l'incidenza presenta un netto gradiente tra Nord e Sud con rischi superiori del 40% al Nord. In Toscana nel 2010 sono state stimate circa 4100 nuove diagnosi di tumore della mammella ed 850 decessi correlati a questa patologia. Negli ultimi decenni si è assistito ad un incremento dell'incidenza di tumore mammario a fronte però di una diminuzione della mortalità legata a questa patologia, grazie ai miglioramenti raggiunti nel campo della diagnosi precoce e dei trattamenti specifici [1]. Nonostante gli avanzamenti nel campo della diagnosi precoce e dei trattamenti adiuvanti abbiano sensibilmente migliorato la prognosi di questa malattia, il 20-30% delle pazienti con assenza di interessamento linfonodale alla diagnosi e fino al 50% delle pazienti con linfonodi positivi alla diagnosi svilupperanno metastasi a distanza, mentre in circa il 7% dei casi la paziente si presenta in stadio avanzato di malattia già al momento della diagnosi. Il carcinoma mammario metastatico rimane ad oggi una malattia non guaribile con una sopravvivenza mediana di 24-48 mesi, variabile in relazione alla sede, estensione e aggressività biologica della malattia, fatta eccezione di casi sporadici (circa il 2-3%) in cui le pazienti raggiungono lungo sopravvivenze [2,3,4]. Contestualmente, gli obiettivi principali del trattamento medico risultano il prolungamento della sopravvivenza libera da progressione, il controllo dei sintomi, il miglioramento della qualità di vita e, laddove possibile, della sopravvivenza globale. In tale scenario è evidente come la scelta del clinico debba conformarsi sul singolo caso e su un'attenta valutazione del rapporto tra beneficio e tossicità del trattamento. Risulta fondamentale lo sforzo di ridurre al minimo le tossicità correlate ai trattamenti e individualizzare il più possibile la terapia, contestualizzandola alle caratteristiche della neoplasia (livello di espressione dei recettori ormonali e di HER2 sul tumore primitivo o se disponibile sulle metastasi, sede ed estensione della malattia, aggressività biologica, intervallo libero da malattia) e della paziente (età,

performance status, comorbidità, precedenti trattamenti effettuati, disponibilità delle terapie ed accessibilità alle stesse, desideri ed aspettative della paziente) [5].

1.1.1 Trattamento medico della malattia metastatica HER2 positiva

Nella malattia mammaria metastatica che iperesprime HER2, noto fattore prognostico sfavorevole nella neoplasia mammaria, l'impiego nella pratica clinica di Trastuzumab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il dominio IV della porzione extracellulare del recettore HER2, ha modificato radicalmente la storia naturale della malattia. La combinazione di trastuzumab ad una chemioterapia con taxani [6,7], vinorelbina [8,9], derivati del platino, gemcitabina, capecitabina e antracicline liposomiali, ha dimostrato incrementare l'efficacia della chemioterapia, sia in prima linea che in fasi successive di trattamento in pazienti con carcinoma mammario sovraesprimente HER2, costituendo il regime terapeutico di riferimento in questo setting di pazienti [10]. Lo studio di fase III di Slamon e coll. su 469 pazienti metastatiche HER-2 positive ha portato alla registrazione del farmaco, dimostrando come l'aggiunta di trastuzumab con schedula settimanale (dosaggio di 2mg/Kg/settimana dopo una dose di carico di 4 mg/Kg, somministrato fino a progressione di malattia) ad una chemioterapia standard di prima linea con antraciclina e ciclofosfamida in pazienti non precedentemente trattate con antracicline (rispettivamente doxorubicina 60 mg/mq o epirubicina 75 mg/mq e ciclofosfamida 600 mg/mq, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) oppure paclitaxel nelle pazienti trattate con antraciclina in fase adiuvante (175 mg/mq trisettimanale), incrementi significativamente la sopravvivenza globale (OS) (25.1 mesi vs. 20.3 mesi, $p = 0.046$), il tempo a progressione (TTP) (7.4 mesi vs. 4.6 mesi, $p < 0.001$) e il tasso di risposte obiettive (ORR) (50% vs. 32%, $p < 0.001$) rispetto alla sola chemioterapia in queste pazienti [8]. Da questo studio deriva la registrazione del trastuzumab in associazione al paclitaxel come trattamento di prima linea nel carcinoma mammario metastatico nonché l'inappropriatezza clinica dell'associazione di antracicline e trastuzumab, in considerazione dell'elevata incidenza di cardiotoxicità riscontrata con tale combinazione (incidenza di disfunzioni cardiache del 27% e 13% e eventi cardiaci di classe III-IV secondo NYHA del 16% e 3%, rispettivamente nel braccio di combinazione con antraciline e con paclitaxel). Un successivo studio randomizzato di fase II condotto su 188 pazienti con carcinoma

mammario metastatico HER2 positivo ha confermato la maggiore efficacia in prima linea dell'associazione di trastuzumab settimanale con docetaxel (100 mg/m² con cicli ripetuti ogni 21 giorni, per sei cicli) rispetto al solo docetaxel in termini di ORR (61% vs 34%, p = 0.0002), TTP (11.7 mesi vs 6.1 mesi, p = 0.0001) e OS (31.2 mesi vs 22.7 mesi, p = 0.0325) [9]. Per quanto riguarda il trattamento della malattia HER2 positiva dopo la progressione ad una prima linea contenente trastuzumab, la scelta del clinico può ricadere sul proseguimento del trastuzumab in associazione ad un diverso chemioterapico oppure sull'associazione di lapatinib e capecitabina. La prima strategia rappresenta un'opzione diffusa nella pratica clinica, seppur in assenza di dati consolidati di studi randomizzati, fondata sulla base di esperienze precliniche e studi retrospettivi o prospettici non controllati [11,12]; inoltre i risultati dello studio randomizzato di fase III di Von Minckwitz e coll. di confronto tra l'associazione di trastuzumab e capecitabina rispetto alla sola capecitabina in pazienti con carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo progredite ad un trattamento di prima linea con trastuzumab, per quanto preliminari vista l'interruzione precoce del trial e lo scarso accrual (arruolate 156 pazienti sulle 482 previste dal disegno statistico), hanno mostrato un miglioramento significativo sia del TTP (8.2 mesi vs 5.6 mesi; p=0.0338) che dell'ORR (48.1% vs 27%; p=0.0115) a favore della combinazione, con un trend positivo in termini di sopravvivenza globale (mediana 25.5 mesi vs 20.4 mesi; p=0.257) [13], legittimando il diffuso impiego nella comune pratica clinica del trastuzumab dopo progressione di malattia. Per quanto riguarda l'utilizzo in pazienti progrediti al trastuzumab dell'associazione di capecitabina e lapatinib, inibitore reversibile intracellulare del dominio tirosin-chinasico dei recettori EGFR e HER2, lo studio di fase III randomizzato condotto da Gayer e coll su 324 pazienti con carcinoma mammario metastatico o localmente avanzato sottoposte sia ad un trattamento con antracicline e taxani che al trastuzumab per la malattia metastatica, ha mostrato ad un'analisi ad interim pianificata la superiorità dell'associazione di lapatinib e capecitabina (rispettivamente al dosaggio di 1250 mg die continuativamente e 2000 mg/mq die dal giorno 1 al giorno 14, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) rispetto alla capecitabina (al dosaggio di 2500 mg/mq die dal giorno 1 al giorno 14, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) in termini di TTP (8.4 mesi vs 4.4 mesi, rispettivamente, p<0.001), a fronte un lieve aumento di incidenza di eventi avversi, soprattutto di tipo gastrointestinale (diarrea [60% vs 39%

G1-4, $p < 0.001$] e dispepsia [11% vs 3% G1-4, $p = 0.014$]) e cutaneo (rash [27% vs 15% G1-4, $p = 0.011$] ed hand-foot syndrome), comunque di grado lieve-moderato, con un ottimo profilo di tollerabilità cardiologica in entrambi i gruppi di trattamento [14]. I dati relativi alle 399 pazienti in studio al momento della chiusura dell'arruolamento (Aprile 2006) da parte del Comitato di Revisione Indipendente, con successivo cross-over (36 pazienti), hanno confermato il vantaggio in termini di TTP e ORR a favore della combinazione [15]. Dal Maggio 2011 inoltre l'indicazione di lapatinib e capecitabina è stata estesa in Italia anche alla prima linea di trattamento nelle pazienti progredite entro sei mesi dal termine del trattamento adiuvante con Trastuzumab. Infine per quanto riguarda la malattia mammaria metastatica con coespressione di HER2 e recettori ormonali (HR), eventualità che si verifica in circa la metà delle neoplasie mammarie HER2 positive, la nota resistenza intrinseca al trattamento ormonale conferita dalla concomitante espressione di HER2, le crescenti acquisizioni sul cross-talk tra la pathway di HER2 e quella del recettore estrogenico e la possibilità di instaurare un'endocrinoresponsività in tumori HER2/HR positivi resistenti alla terapia ormonale tramite il simultaneo blocco delle due vie [16], hanno fornito il razionale per studi di combinazione tra ormonoterapia ed agenti anti-HER2 in questo setting di pazienti, che ad oggi giustificano l'impiego di questa strategia in casi selezionati di pazienti in post-menopausa con malattia metastatica HER2/HR positiva. In particolare lo studio randomizzato di fase III di Kaufman e coll. ha dimostrato come l'associazione in prima linea di trastuzumab settimanale e anastrozolo (1 mg/die) sia vantaggiosa rispetto al solo anastrozolo in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS) (4.8 mesi vs 2,4 mesi; $p = 0.0016$), con un trend in sopravvivenza globale (28,5 mesi vs 23,9 mesi), su 207 pazienti postmenopausali con carcinoma mammario metastatico HER2/HR positivo [17]. Analogamente lo studio randomizzato di fase III di Johnston e coll ha mostrato un vantaggio in PFS (8.2 vs 3.0 mesi; $p = 0.019$) a favore della combinazione di lapatinib (1500mg/die) e letrozolo (2.5 mg/die) rispetto al solo letrozolo, su una popolazione di 1286 pazienti in postmenopausa con malattia mammaria HR/HER2 positiva (non precedentemente trattate con trastuzumab o con un inibitore dell'aromatasi) [18], sulla base del quale lapatinib è attualmente registrato a livello nazionale e europeo in associazione con inibitori dell'aromatasi e rappresenta un'opzione per pazienti in post-

menopausa con malattia metastatica HR/HER2 positiva per le quali il clinico non ritiene opportuno un trattamento chemioterapico.

1.1.2 Trattamento medico della malattia metastatica HER2 negativa

La scelta del trattamento in pazienti con malattia mammaria metastatica HER2 negativa è basata sulla valutazione da parte del clinico di fattori clinico-patologici relativi alla malattia e alla paziente, tra cui la valutazione dell'endocrinoresponsività, dell'entità di malattia (intesa come sede, estensione e sintomaticità delle localizzazioni di malattia), dell'intervallo libero da malattia, dei precedenti trattamenti eseguiti nonché dell'età, comorbidità e aspettative della paziente. Il trattamento ormonale costituisce un'opzione ampiamente utilizzata nei casi di malattia endocrinoresponsiva con caratteristiche clinico-patologiche di scarsa aggressività (tra cui un lungo intervallo libero da malattia, un impegno prevalentemente scheletrico o ai tessuti molli, la pauci-/a- sintomaticità di malattia), la quale rappresenta un'opzione valida per donne di qualsiasi età e performance status grazie alla limitata tossicità. Nella paziente premenopausale candidata ad ormonoterapia il tamoxifene in associazione ad LHRH analogo rappresenta il trattamento ormonale di riferimento [19]; invece nella paziente in postmenopausa la scelta del clinico ricade più frequentemente sugli inibitori dell'aromatasi o sul fulvestrant, rispettivamente, sulla base della dimostrata superiorità in termini di TTP e ORR degli inibitori rispetto al tamoxifene [20-22], e dell'equiefficacia del fulvestrant rispetto agli inibitori dell'aromatasi in questo setting di pazienti [23-27]. Nelle pazienti con malattia rapidamente evolutiva, con localizzazioni viscerali multiple oppure nei casi di malattia non endocrinoresponsiva o divenuta ormonoresistente, la chemioterapia rappresenta il trattamento di riferimento. In considerazione dell'eterogeneità clinico-biologica osservata in questo setting e della disponibilità di numerosi farmaci attivi nella malattia mammaria metastatica non è definibile un approccio standard per queste pazienti, cosicché la scelta del clinico può variare da una monochimioterapia ad una strategia chemioterapica di associazione, conformandosi sulle caratteristiche di malattia e della paziente, con particolare riferimento all'età, comorbidità, performance status e terapia ricevuta in fase adiuvante, nonché sullo spettro di attività e tossicità specifica dei singoli farmaci. La polichimioterapia si caratterizza per un maggior tasso di risposte

obiettive e tempo alla progressione rispetto all'uso sequenziale di agenti singoli, a fronte di una maggiore incidenza di effetti collaterali e un impatto più limitato sulla sopravvivenza globale, come dimostrano una metanalisi di studi randomizzati e l'unico studio randomizzato di confronto tra combinazione di antracicline e taxani rispetto all'uso sequenziale degli stessi agenti [28,29]. La combinazione di più farmaci costituisce l'approccio comunemente impiegato per il trattamento di prima linea di pazienti con un buon performance status, malattia sintomatica o in rapida progressione clinica, mentre nei restanti casi l'utilizzo sequenziale di chemioterapici costituisce un'opzione ragionevole. Le combinazioni di antracicline e taxani hanno dimostrato un'inequivocabile vantaggio in termini di RR e un beneficio più limitato in termini di TTP quando confrontate con regimi contenenti antracicline, come dimostrato da una metanalisi di studi randomizzati [30]. Nelle pazienti precedentemente trattate con antracicline in fase adiuvante, l'impiego di un taxano in combinazione con un altro agente chemioterapico, come la capecitabina o la gemcitabina, come trattamento di prima linea ha mostrato un vantaggio rispetto al solo taxano in termini di RR, TTP e OS in diversi studi randomizzati, a spese di una maggiore tossicità del trattamento, variabile a seconda dello studio. In particolare nello studio di fase III di O'Shaughnessy e coll. la combinazione in prima linea di docetaxel e capecitabina è risultata superiore rispetto al solo docetaxel in termini di TTP (6.1 mesi vs 4.2 mesi, $p = 0.001$), end point primario, OS (14.5 vs 11.5 mesi, $p=0.0126$) e RR (42% vs 30%, $p = 0.006$), a fronte di una maggiore incidenza di effetti collaterali di grado 3-4 (secondo la scala NCI) (71% vs 49%, rispettivamente) soprattutto di tipo gastrointestinale e di hand-foot syndrome nell'associazione con la capecitabina, ed una riduzione di incidenza di neutropenia G4 e febbrile rispetto alla monoterapia con docetaxel [31]. Uno studio di fase III di Alabain e coll. ha inoltre dimostrato come la combinazione di gemcitabina e paclitaxel sia superiore rispetto al solo paclitaxel in termini di OS (18.6 vs 15.8 mesi; $p = 0.0489$), end point primario dello studio, TTP (6.1 vs 3.9 mesi; $p = 0.0002$) e RR (41.4% vs 26.2%, $p=0.0002$), a spese di una maggiore incidenza neutropenia di grado 3 e 4 (47.6% nel braccio di associazione rispetto all'11.5% con il solo paclitaxel) [32]. Un recente studio di fase III di Chan e coll. ha confrontato la combinazione di docetaxel e gemcitabina con la combinazione di docetaxel e capecitabina, evidenziando un'efficacia simile tra i due regimi, tuttavia con un disegno statistico di superiorità; inoltre se l'associazione con la capecitabina ha

mostrato una maggiore tossicità non ematologica (hand-foot syndrome, diarrea e mucosite), probabilmente da attribuire al dosaggio di capecitabina impiegato (1250 mg/mq bid giorno 1-14) superiore a quello ad oggi raccomandato nei regimi di combinazione (1000 mg/mq bid giorno 1-14), il regime con gemcitabina ha determinato un lieve incremento di tossicità midollare [33]. Una recente metanalisi su dati individuali (condotta su 11 studi e un totale di 3953 pazienti) condotta con l'obiettivo di valutare l'impatto dei taxani nel trattamento di prima linea della malattia metastatica, ha mostrato come l'impiego dei taxani in regimi di combinazione determini un vantaggio in termini di RR (57% vs 46%, $p < 0.001$) e PFS (HR 0.92, $p = 0.031$) rispetto a regimi senza taxani, in assenza di un vantaggio significativo in OS, mentre la monoterapia con taxani sia inferiore rispetto alla monoterapia con antracicline relativamente al RR (33% vs 38%, $p = 0.063$) e alla PFS (HR 1.19, $p = 0.011$) [34]. Infine, come illustreremo nel successivo capitolo, il ruolo cruciale svolto dall'angiogenesi nella progressione tumorale e meta statizzazione ha fornito il razionale per il disegno di studi clinici volti a dimostrare la superiorità dell'associazione di chemioterapia e farmaci antiangiogenetici rispetto alla sola chemioterapia in diverse neoplasie solide, tra cui il carcinoma mammario. In particolare l'aggiunta di bevacizumab, anticorpo monoclonale diretto contro VEGF-A, ad un trattamento chemioterapico di prima linea contenente taxani, in tre studi clinici randomizzati di fase III (E2100, AVADO, RIBBON-1), ha dimostrato un incremento significativo della sopravvivenza libera da progressione, end point primario in questi studi, e del tasso di risposte obiettive rispetto alla sola chemioterapia in pazienti affette da carcinoma mammario localmente avanzato o metastatico HER2 negativo, a fronte di un limitato impatto sul profilo di tollerabilità del trattamento [56-58]. Sulla base dei risultati dello studio E2100 l'associazione di bevacizumab e paclitaxel è stata registrata nel trattamento di prima linea del carcinoma mammario metastatico HER2 negativo, affermandosi come una tra le opzioni di riferimento per il clinico in questo setting di pazienti.

2 TRATTAMENTO ANTIANGIOGENETICO NEL CARCINOMA MAMMARIO METASTATICO

2.1 Ruolo dell'angiogenesi nello sviluppo e nella progressione tumorale

L'angiogenesi tumorale ovvero il processo di formazione di nuovi capillari a partire da cellule endoteliali di vasi già esistenti o tramite il reclutamento di precursori circolanti delle cellule endoteliali gioca un ruolo fondamentale nelle fasi di sviluppo, progressione e metastatizzazione neoplastica. Lo stretto legame esistente tra angiogenesi e crescita tumorale è stato inizialmente descritto negli anni '70 da Folkman, in seguito all'osservazione sperimentale che la proliferazione delle cellule neoplastiche era inibita quando la massa tumorale era privata di un adeguato 'arresto della crescita neoplastica indotta dalla privazione dell'apporto ematico [35]. Studi successivi hanno mostrato come l'angiogenesi tumorale sia un processo complesso, regolato dal bilanciamento locale di fattori in grado di promuoverla (VEGF, FGF, TGF- α , β , IL-8, leptina, angiogenina) e altri in grado di inibirla (angiostatina, endostatina, TSP-1, angiopoietina-2, interferone- α e IL-12), prodotti dalle cellule tumorali, dai leucociti e dalle cellule endoteliali stesse [36]. Evidenze sperimentali hanno dimostrato come fino a diametri della neoplasia di 1-2 mm, le cellule tumorali possano sopravvivere anche in assenza di un apporto ematico diretto tramite un processo di diffusione dei metaboliti, mentre nel momento in cui si ha uno sbilanciamento a favore dei fattori pro-angiogenetici rispetto agli inibitori si verifica il così detto "switch" angiogenetico e l'accrescimento tumorale avviene attraverso un apporto ematico diretto, garantito dai vasi neoformati tramite il processo dell'angiogenesi [37]. I principali mediatori del processo di neoangiogenesi sono rappresentati da una serie di molecole denominate *Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs)*, di cui il più importante è il VEGF-A (VEGF). Gli altri membri della famiglia comprendono VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF. Il VEGF è una glicoproteina omodimera di 45 kDA, originariamente identificata da Dvorak come VPF (*Vascular Permeability Factor*) per la sua capacità di promuovere la permeabilità vascolare e successivamente isolata da Napoleone Ferrara come fattore mitogeno per l'endotelio vascolare [38]. Tra le diverse isoforme di VEGF prodotte per splicing alternativo, le più importanti sono le isoforme solubili VEGF121 e VEGF165, quest'ultima iperespressa in numerosi

tumori solidi sia in forma solubile che legata alla matrice extracellulare. Il segnale proangiogenico di VEGF è mediato principalmente da VEGFR-2, recettore con attività tirosin-chinasica presente sulla superficie delle cellule endoteliali, appartenente alla famiglia di VEGFR (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3); nonostante VEGF leghi con elevata affinità VEGFR-1, il suo ruolo nell'angiogenesi tumorale appare meno importante. È dimostrato come attraverso il legame di VEGF a VEGFR-2, si abbia la dimerizzazione del recettore sulla superficie delle cellule endoteliali e l'attivazione di vie di segnale a valle, tra cui MEK-MAPK e PI3K-AKT, che conducono ad una up-regulation di geni coinvolti nella proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali, nella sopravvivenza delle cellule endoteliali, nella permeabilità vascolare, nel rimodellamento della matrice extracellulare e nella chemotassi dei precursori circolanti delle cellule endoteliali [39,45] (Fig.1). Inoltre il VEGF sembrerebbe supportare la crescita tumorale anche tramite altri meccanismi indipendenti dal processo angiogenetico, tra cui effetti anti-apoptotici diretti sulle cellule tumorali, un riduzione della risposta immunitaria anti-tumorale e promuovendo il processo di metastatizzazione tramite il reclutamento di progenitori di cellule emopoietiche nella cosiddetta "nicchia pre-metastatica" [40,41,42,43,44]. Il VEGF è prodotto nel microambiente tumorale soprattutto da cellule tumorali, ma anche da cellule mesenchimali ed endoteliali, attraverso una up-regulation genica indotta da numerosi stimoli, tra cui ipossia, fattori di crescita (tra cui FGF, EGF, TGF, IGF-1), citochine infiammatorie (tra cui IL-1 α , IL-6, prostaglandina E2), ormoni e fattori genetici come l'attivazione di oncogeni o l'inibizione di oncosoppressori (tra cui ras, src, EGF, p53, VHL, PTEN) [39]. In generale lo stato di ipossia che si sviluppa all' interno del microambiente tumorale a causa della rapida crescita e l'attivazione di numerosi oncogeni tumorali e citochine, determina un ambiente locale favorevole allo sviluppo del processo neo-angiogenetico.

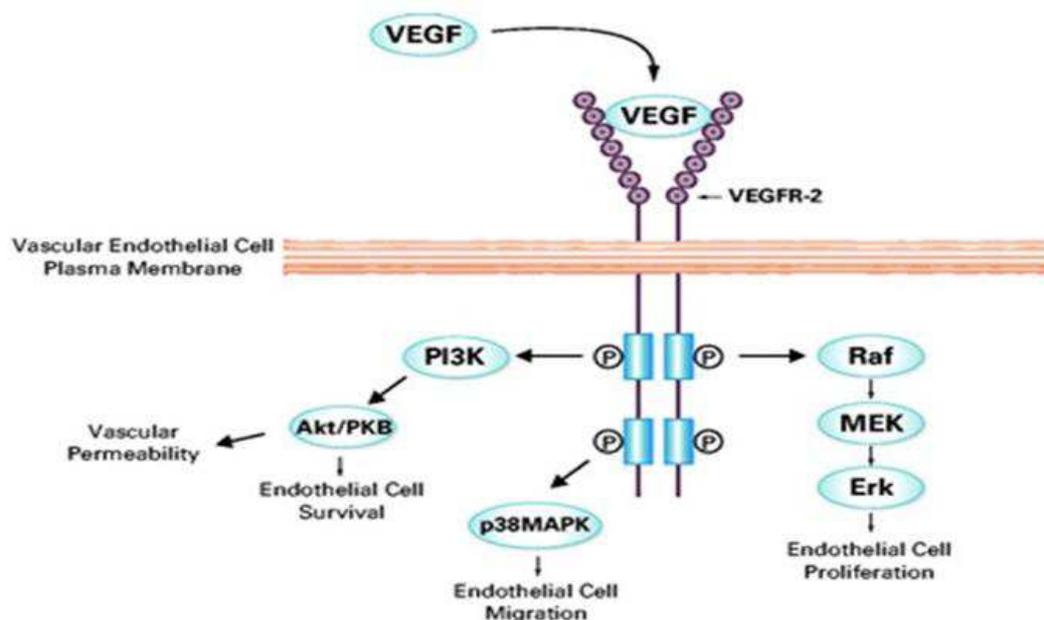


Fig.1- In seguito al legame del VEGF al recettore VEGFR-2 si verifica la dimerizzazione e l'autofosforilazione della porzione intracellulare del recettore tirosin-chinasico, con attivazione di vie di trasduzione del segnale alla base della permeabilità vascolare, proliferazione, sopravvivenza e migrazione delle cellule endoteliali.

L'ipossia rappresenta uno degli stimoli principali per la sintesi di VEGF e il suo effetto sulla regolazione dell'espressione di VEGF è mediato dal fattore di trascrizione HIF (*Hypoxia-Inducible transcription Factor*): in presenza di una ridotta tensione di ossigeno le subunità HIF-1 α e HIF-2 α (denominato anche EPAS1) interagiscono con la proteina nucleare HIF-1 β a formare un eterodimero $\alpha\beta$ che, legandosi ad una specifica sequenza della regione 5' del gene VEGF, denominata HRE (*Hypoxia Response Element*), ne stimola la trascrizione [46]. Studi di microarray dimostrano come EPAS1 sia coinvolto nella regolazione di diversi geni a livello endoteliale, non inducendo solo l'espressione di VEGF ma anche la concomitante espressione dei suoi recettori VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-1 (Flt1), così come l'espressione di Tie2, un altro recettore ad attività tirosin-chinasica, presente sulla superficie delle cellule endoteliali a cui si lega l'angiopoietina [47]. In studi condotti su tessuti tumorali umani è stata osservata un'elevata espressione, sulle superfici endoteliali intratumorali, di EPAS1, suggerendo il ruolo chiave di questo fattore per l'espressione tumorale di VEGF e la pathway angiogenetica. In particolare, uno studio condotto con metodiche di immunohistochimica su 62 campioni di tessuto tumorale mammario, ha evidenziato un'elevata espressione cellulare di EPAS-1 nel 36% dei casi ed una significativa associazione dell'espressione

di EPAS-1 con la densità vascolare ($p=0.0002$), oltre che con l'espressione di c-erbB2 e lo sviluppo di metastasi linfonodali ascellari [48]. Anche in uno studio condotto su campioni di tessuto tumorale pancreatico, è stata osservata una significativa correlazione dell'espressione di EPAS-1, ma non di HIF- α , sia con l'espressione di VEGF che con la densità microvascolare [49]. I risultati di alcuni lavori, supportano inoltre il ruolo di VEGF nei processi di sviluppo e progressione tumorale, tra cui l'osservazione di un'elevata espressione tumorale di VEGF in molte neoplasie ematologiche e solide maligne, la correlazione significativa riscontrata tra i livelli plasmatici del VEGF e lo stadio di malattia, il potenziale significato prognostico dei livelli di VEGF in diverse neoplasie maligne emerso da alcuni studi ed evidenze pre-cliniche che dimostrano la capacità di anticorpi diretti contro VEGF di inibire la crescita di linee cellulari tumorali [50-52]. Alla luce di questi dati nel corso dell'ultimo decennio sono stati sviluppati numerosi inibitori del processo patologico dell'angiogenesi tumorale, aventi come target il VEGF o il VEGFR e quindi le cellule endoteliali dei capillari in formazione. Il tentativo di inibire la crescita tumorale agendo, anziché sulle cellule tumorali, su cellule del microambiente tumorale che coadiuvano la crescita neoplastica, ha costituito una strategia innovativa. Inoltre la stabilità genetica che caratterizza le cellule endoteliali riduce le probabilità di accumulare mutazioni responsabili dello sviluppo di resistenze farmacologiche da parte delle stesse, rendendo questa modalità terapeutica particolarmente promettente. Alla luce di queste evidenze sperimentali, nel corso degli ultimi anni sono stati condotti una serie di studi clinici che hanno valutato l'impiego di farmaci a bersaglio molecolare diretti contro i promotori dell'angiogenesi tumorale, nell'ambito di diverse neoplasie solide, tra cui il carcinoma della mammella.

2.2 Bevacizumab nella terapia medica del carcinoma mammario metastatico

Il ruolo centrale del VEGF nel processo di angiogenesi tumorale, ha fornito il razionale per lo sviluppo e la sperimentazione clinica nel contesto di diverse neoplasie solide di bevacizumab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro tutte le isoforme di VEGF-A, sulla base di studi preclinici in cui il farmaco aveva mostrato la capacità di inibire la crescita neoplastica in modelli animali di trapianti eterologhi di tumori umani [53,62]. In uno studio di fase I/II che valutava un trattamento con bevacizumab come singolo agente a tre diversi dosaggi (3, 10 o 20 mg/Kg ogni 14

giorni) in 75 pazienti con carcinoma mammario metastatico pretrattato, si osservava un RR di 9.3% ed una risposta o stabilità di malattia a 22 settimane del 17%, con quattro pazienti che proseguivano il trattamento per oltre dodici mesi; lo studio suggeriva di utilizzare un dosaggio di 10 mg/Kg ogni 14 giorni negli studi successivi [54]. Alla luce dei risultati degli studi di fase II, sono stati condotti una serie di studi clinici di fase III che hanno definito il ruolo del bevacizumab nel setting dei pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella metastatico. Kayte Miller e coll. hanno condotto uno studio dove 462 pazienti precedentemente trattate con antracicline e taxani, sono state randomizzate a ricevere un trattamento chemioterapico con capecitabina (1250 mg/mq bid giorno 1-14, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) in aggiunta o meno a bevacizumab (15 mg/Kg al giorno 1, con cicli ripetuti ogni 21 giorni). Dai risultati dello studio emergeva un buon profilo di tollerabilità dell'associazione che comprendeva il bevacizumab, caratterizzata da una maggiore incidenza rispetto al trattamento con la sola capecitabina di ipertensione di grado 3 e 4 secondo la scala NCI (rispettivamente 17.9% v 0.5%), in assenza di un significativo aumento di incidenza di altri eventi severi quali diarrea, hand-foot syndrome, eventi tromboembolici o emorragie. Tuttavia l'incremento di risposte obiettive osservate con l'associazione di bevacizumab e capecitabina rispetto alla sola capecitabina (19.8% vs 9.1%, $p=0.001$), non si traduceva in un vantaggio significativo in sopravvivenza libera da progressione (4.86 vs 4.17 mesi, HR=0.98, 95% CI 0.77-1.25), end point primario dello studio, e sopravvivenza globale (15.1 vs 14.5 mesi) [55]. Successivamente sono stati condotti tre studi clinici randomizzati di fase III che hanno confrontato l'associazione di Bevacizumab e chemioterapia rispetto alla sola chemioterapia come trattamento di prima linea nel carcinoma mammario metastatico. Nel primo di questi studi (ECOG 2100), condotto da Miller KD e coll. è stata posta a confronto l'associazione di bevacizumab e paclitaxel (rispettivamente alla dose di 10 mg/kg al giorno 1, 15 e di 90 mg/mq al giorno 1, 8, 15, con cicli ripetuti ogni 28 giorni) rispetto al solo paclitaxel (alla dose di 90 mg/mq al giorno 1, 8, 15, con cicli ripetuti ogni 28 giorni) in 722 pazienti con carcinoma mammario metastatico, non precedentemente trattate con chemioterapia per la malattia metastatica; il paclitaxel veniva somministrato fino a progressione di malattia o interrotto in caso di tossicità rilevanti. I risultati dimostravano un vantaggio significativo in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS mediana 11.8 vs 5.9 mesi, $p<0.001$), end point primario

dello studio, e tasso di risposte obiettive (36.9% vs 21.2%, $p<0.001$) a favore della combinazione con bevacizumab; nel gruppo delle pazienti sottoposte alla terapia di combinazione, veniva inoltre osservata una migliore ad 1 anno (81.2% vs 73.4%; $P=0.01$), seppur in assenza di un significativo vantaggio in sopravvivenza globale (OS mediana 26.7 vs 25.2 mesi, $p=0.16$). In termini di tossicità la combinazione di paclitaxel e bevacizumab risultava sostanzialmente ben tollerata, con un limitato impatto sulla frequenza e severità degli eventi tossici attesi dal trattamento con paclitaxel, in assenza di differenze significative in termini di qualità di vita tra i due gruppi. Gli eventi di grado 3 e 4 secondo la scala NCI, osservati con maggior frequenza nelle pazienti trattate con l'associazione di bevacizumab e paclitaxel rispetto al solo paclitaxel, erano neuropatia (23.6% vs 17.6%; $P=0.03$), infezioni (9.3% vs 2.9%; $P<0.001$), fatigue (8.5% vs 4.9%; $P=0.04$), cefalea (2.2% vs 0.0%, $p<0.008$) ed eventi ischemici cerebrovascolari (1.9% vs 0.0%, $p=0.02$), nel contesto comunque di rari eventi tromboembolici ed emorragie severe in entrambi i bracci di trattamento (rispettivamente 2.1% e 0.5% nel gruppo trattato con bevacizumab e paclitaxel; rispettivamente 1.5% e 0% nel gruppo trattato con paclitaxel); infine nelle pazienti sottoposte al trattamento con bevacizumab veniva osservata una frequenza significativamente maggiore di proteinuria di grado 3 e 4 (NCI) (3.6% vs 0.0%, $p<0.001$) ed ipertensione di grado 3 e 4 (NCI) (14.8% vs 0.0%, $p<0.001$) [56]. Sulla base dei risultati di questo studio, l'associazione di paclitaxel e bevacizumab è diventato uno degli standard di riferimento per il trattamento di prima linea delle pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella metastatico HER-2 negativo. Successivamente altri due studi clinici randomizzati di fase III (AVADO e RIBBON-1) hanno confermato l'efficacia del bevacizumab in associazione ad un trattamento chemioterapico di prima linea e il limitato impatto sul profilo di tollerabilità del trattamento, in pazienti con carcinoma mammario metastatico [57,58]. Nello studio di Miles D e coll. (AVADO) sono stati confrontati come prima linea di trattamento, la combinazione di bevacizumab a due diversi dosaggi (7.5 mg/kg o 15 mg/kg al giorno 1, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) e docetaxel (100 mg/mq giorno1, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) rispetto a docetaxel in associazione a placebo, su 736 pazienti con carcinoma mammario metastatico o localmente recidivato HER2 negativo. I risultati dello studio dimostravano come la combinazione di docetaxel con bevacizumab al dosaggio di 15 mg/Kg, ma non al dosaggio di 7.5 mg/Kg, incrementi in modo significativo il tasso di risposte

obiettive (46% nel braccio placebo; 55% nel braccio bevacizumab 7.5 mg/Kg, $p=0.07$; 64% nel braccio bevacizumab 15 mg/Kg, $p<0.001$) e la sopravvivenza libera da progressione, end point primario dello studio (PFS mediana di 8.1 mesi nel braccio placebo, 9.0 mesi nel braccio con bevacizumab 7.5 mg/Kg [HR 0.80; $p=0.045$] e 10.0 mesi nel braccio con bevacizumab 15 mg/Kg [HR 0.67; $p<0.001$]). Lo studio confermava inoltre, per la combinazione bevacizumab più docetaxel, un incremento dell'incidenza di ipertensione arteriosa di ogni grado (10% nel braccio placebo; 14.3% con bevacizumab 7.5 mg/Kg; 21.9% con bevacizumab 15 mg/Kg), ipertensione di grado 3-4 secondo la scala NCI (1.3% nel braccio placebo; 0.8% con bevacizumab 7.5 mg/Kg; 4.5% con bevacizumab 15 mg/Kg) e proteinuria di grado 3-4 secondo la scala NCI (0% nel braccio placebo; 0.8% con bevacizumab 7.5 mg/Kg; 2% con bevacizumab 15 mg/Kg), con un impatto limitato sul noto profilo di tossicità del docetaxel, fatta eccezione per un lieve incremento di neutropenia di grado 3-4 e neutropenia febbrile (rispettivamente 17.3% e 11.3% nel braccio placebo; 19.8% e 15.1% nel braccio bevacizumab 7.5 mg/Kg; 19.8% e 16.2% nel braccio bevacizumab 15 mg/Kg) [57]. L'altro studio (RIBBON-1), condotto da Robert NJ e coll. confrontava un trattamento chemioterapico di prima linea standard rispetto allo stesso trattamento in associazione a bevacizumab (15 mg/kg giorno 1, con cicli ripetuti ogni 21 giorni), in pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella metastatico ($n=1237$). I regimi chemioterapici a disposizione del clinico erano rappresentati da capecitabina (2000 mg/mq giorno 1-14, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) [Cape Cohort = 615] oppure taxani (nab-paclitaxel 260 mg/mq o docetaxel 75/100 mg/mq, al giorno 1, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) o schemi contenenti antracicline [Tax/Antra Cohort = 622]. Anche in questo studio veniva osservata una sopravvivenza libera da progressione maggiore in ciascuna delle combinazioni di chemioterapia e bevacizumab rispetto alla sola chemioterapia (PFS mediana in Cape Cohort rispettivamente di 8.6 mesi vs 5.7 mesi, $p<0.001$; PFS mediana in Tax/Antra Cohort rispettivamente di 8 mesi vs 9.2 mesi, $p<0.001$). Lo studio confermava il limitato impatto dell'aggiunta del bevacizumab sulla tollerabilità del trattamento, in linea con quanto emerso dai precedenti studi di fase III (gli eventi di grado 3-4 maggiori nel braccio di associazione con bevacizumab rispetto a placebo erano ipertensione arteriosa (8.9% vs 2%), proteinuria (3.4% vs 0%) e sanguinamento (5.4% vs 0%)), e l'assenza di un vantaggio significativo in termini di

sopravvivenza globale derivante dall'aggiunta di bevacizumab alla chemioterapia di prima linea nel carcinoma mammario metastatico [58]. Dai risultati dei tre studi precedentemente illustrati emerge inoltre come l'efficacia del bevacizumab si mantenga in tutti i sottogruppi di pazienti, comprese le pazienti precedentemente trattate con taxani, come si osserva dalle analisi per sottogruppi condotte all'interno dei singoli studi di fase III [56-58]. Recentemente sono stati pubblicati i risultati dello studio osservazionale multicentrico ATHENA che hanno confermato, su oltre 2200 pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico o localmente recidivato HER2 negativo, trattati nella comune pratica clinica con una prima linea standard contenente bevacizumab, la sicurezza di bevacizumab al dosaggio di 10 mg/Kg ogni 2 settimane o 15 mg/Kg ogni 3 settimane [59]. I risultati di questo studio suggeriscono inoltre come il proseguimento del bevacizumab fino a progressione, una volta interrotto il trattamento chemioterapico, possa avere un impatto positivo sul controllo di malattia a lungo termine e sulla sopravvivenza globale. Ad un follow up mediano di 20.1 mesi, mentre nell'intera popolazione la sopravvivenza globale era di 25.2 mesi (95% CI 24.0-26.3 mesi), questa risultava essere di 30.0 mesi (95% CI 28.5-32.7 mesi) nei pazienti che proseguivano un mantenimento con bevacizumab al momento dell'interruzione della chemioterapia (n=1205) e di 18.4 mesi (95% CI 17.2-19.7 mesi) nei pazienti che avevano sospeso il bevacizumab prima o al momento dell'interruzione della chemioterapia (n= 1058). Dai dati finora presentati appare evidente come la combinazione di taxani e bevacizumab sia in grado di incrementare la sopravvivenza libera da progressione ed il tasso di risposte obiettive rispetto alla monoterapia con taxani, antracicline o fluoropirimidine, nel trattamento di prima linea della malattia mammaria metastatica, con una tossicità maneggevole ed una tollerabilità che, seppur da un confronto indiretto, appare favorevole rispetto ad altri regimi di combinazione dei taxani con farmaci chemioterapici, costituendo quindi una valida opzione come strategia di associazione in questo setting di pazienti. Recentemente infine sono stati pubblicati i dati relativi ad uno studio di fase III randomizzato (RIBBON-2) che ha confrontato l'aggiunta di bevacizumab (alla dose di 15 mg/Kg ogni 21 giorni o 10 mg/Kg ogni 14 giorni) ad una chemioterapia standard (a base di taxani o vinorelbina o gemcitabina o capecitabina) rispetto alla sola chemioterapia, come trattamento di seconda linea su 684 pazienti con carcinoma mammario metastatico HER2 negativo, da cui è emerso un vantaggio significativo in termini di

sopravvivenza libera da progressione (PFS mediana di 7.2 mesi vs 5.1 mesi, $p=0.0072$) a favore della combinazione con bevacizumab [60]. Sulla base di questi dati, è ad oggi in corso uno studio randomizzato di fase III per valutare l'efficacia dell'aggiunta di bevacizumab ad una chemioterapia di seconda linea in pazienti con carcinoma mammario metastatico progrediti ad un trattamento di prima linea con paclitaxel e bevacizumab [61].

2.3 Aspetti farmacogenetici del trattamento con bevacizumab: ruolo dei polimorfismi dei geni coinvolti nel processo angiogenetico come biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità

Nonostante l'impiego del bevacizumab rappresenti un'opzione di trattamento nel carcinoma mammario metastatico, la disponibilità di numerosi farmaci attivi, i costi del trattamento, il fatto che alcuni pazienti non traggano beneficio dalla terapia con bevacizumab per meccanismi di resistenza intrinseca o acquisita al farmaco e il mancato beneficio in termini di sopravvivenza globale [64], costituiscono elementi di criticità sollevati da alcuni clinici a sfavore di questo approccio terapeutico. Per quanto riguarda l'assenza di un impatto significativo sulla sopravvivenza globale, gli studi che hanno valutato l'associazione di bevacizumab e taxani in prima linea erano disegnati con una potenza tale da dimostrare un vantaggio in PFS, end point primario, e non in OS [56-58]. Inoltre sappiamo come i trattamenti successivi alla prima linea di trattamento limitino la possibilità che un beneficio in PFS di una prima linea si traduca in un vantaggio in OS, in malattie caratterizzate da una lunga sopravvivenza dopo la progressione alla prima linea di trattamento, come il tumore mammario metastatico [63]; era quindi improbabile che il beneficio in PFS osservato nello studio E2100 potesse determinare un vantaggio in OS, vista la sopravvivenza mediana post progressione di oltre venti mesi nei pazienti del gruppo controllo. Infine circa la metà dei pazienti del gruppo di controllo ha ricevuto bevacizumab come trattamento di seconda linea nell'ambito dello studio randomizzato RIBBON-2, i cui risultati hanno dimostrato come questo sia in grado di impattare sull'outcome dei pazienti [60], limitando ulteriormente la possibilità di osservare un vantaggio in OS. L'identificazione e la validazione di marcatori predittivi di efficacia in grado di selezionare i soggetti con maggiori possibilità di beneficiare dell'inibizione di VEGF permetterebbe un utilizzo più razionale delle risorse e una vantaggiosa ottimizzazione del rapporto costo/efficacia dei trattamenti, tramite un

approccio terapeutico personalizzato sul paziente. Se l'utilizzo di biomarcatori di efficacia permettesse al clinico di identificare un gruppo di pazienti in grado di beneficiare maggiormente del trattamento, il beneficio in PFS in questi pazienti potrebbe tradursi anche in sopravvivenza globale; se così fosse, l'associazione di paclitaxel e bevacizumab potrebbe affermarsi, non più come un'opzione, bensì come lo standard di trattamento in questo sottogruppo di pazienti. Nonostante i numerosi studi per identificare possibili meccanismi di resistenza al farmaco a livello preclinico [65] e potenziali marcatori predittivi di efficacia o resistenza al bevacizumab a livello clinico, ad oggi non disponiamo di alcun biomarcatore validato predittivo per bevacizumab [76]. Infatti gli studi condotti nel carcinoma mammario e in altre patologie su potenziali biomarcatori di attività antiangiogenetica (tra cui espressione di VEGF, densità microvascolare, mutazioni di p53 e K-Ras nel colon retto [66,67], livelli plasmatici di VEGF e cellule endoteliali circolanti [68-76], sviluppo di ipertensione arteriosa [55,59]), hanno fornito risultati non conclusivi o discordanti, cosicché il clinico ad oggi non dispone di biomarcatori predittivi di efficacia del bevacizumab da impiegare nella pratica clinica per un trattamento personalizzato sul paziente. Numerosi studi hanno tentato di correlare i livelli plasmatici di VEGF-A con l'efficacia del trattamento con bevacizumab in diverse neoplasie, mostrando tuttavia dati più convincenti riguardo al suo significato prognostico anziché al suo valore predittivo [72-76]. Recentemente alcuni lavori presentati in sede congressuale hanno suggerito un possibile ruolo predittivo dei livelli plasmatici di VEGF-A, analizzati tramite una nuova metodica ELISA con maggiore affinità verso isoforme più piccole (VEGFA121 e VEGFA110), nel carcinoma mammario, gastrico e pancreatico. In particolare al San Antonio Breast cancer Symposium 2010 Miles e coll hanno presentato un'analisi su 396 pazienti con carcinoma mammario metastatico trattate con docetaxel in associazione o meno a bevacizumab nello studio AVADO (egualmente distribuite tra i due bracci di trattamento) che suggerisce una correlazione tra elevati livelli basali di VEGF-A e VEGFR-2 plasmatici e una maggiore sopravvivenza libera da progressione nelle pazienti trattate con bevacizumab [73]. Analogamente due analisi presentate all'ECCO-ESMO 2011, rispettivamente nel carcinoma gastrico metastatico (nell'ambito dello studio randomizzato AVAGAST) [75] e nel carcinoma del pancreas metastatico (nello studio randomizzato AVITA) [74], suggeriscono una possibile correlazione tra elevati livelli basali di VEGF-A plasmatico e una

maggiore efficacia del bevacizumab in termini di sopravvivenza libera da progressione ($p=0.06$ nello studio AVAGAST e AVITA) e sopravvivenza globale ($p=0.08$ e $p=0.003$, rispettivamente nello studio AVAGAST e AVITA). Tuttavia un altro lavoro presentato all'ECCO-ESMO 2011 relativo alla correlazione dei livelli plasmatici di VEGF, determinati con la nuova metodica ELISA, e l'outcome di pazienti trattati con bevacizumab in altre neoplasie metastatiche, in particolare nel carcinoma del colon (studio AVF2107), nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (studio AVAIL) e nel carcinoma renale (studio AVOREN), ha confermato il significato prognostico ma non quello predittivo dei livelli plasmatici di VEGF-A [76]. L'eterogeneità di risposta a un trattamento che ha come bersaglio un processo principalmente mediato dall'ospite, quale l'angiogenesi tumorale, potrebbe teoricamente essere dovuta ad una variabilità individuale dell'ospite geneticamente determinata; pertanto lo studio dei polimorfismi dei geni correlati al processo angiogenetico e al meccanismo di azione del farmaco stesso, in particolare di VEGF-A, potrebbe costituire un approccio per identificare biomarcatori predittivi di efficacia. Il gene VEGF-A, localizzato in posizione 6p21.1 sul cromosoma 6, è infatti un gene altamente polimorfico di cui sono noti numerosi polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), risultato di una variabilità genetica costituzionale del paziente, tra cui il -2578 C>A, -1498 C>T e -1154 G>A nella regione promoter del gene, il -634 G>C nella regione 5'UTR e il 936 C>T nella regione 3'UTR (Fig.2). Essendo alcuni polimorfismi potenzialmente in grado di influenzare i livelli di espressione/secrezione o la funzione di VEGF, appare logico ipotizzare un loro coinvolgimento nella variabilità individuale di risposta a farmaci antiangiogenetici.

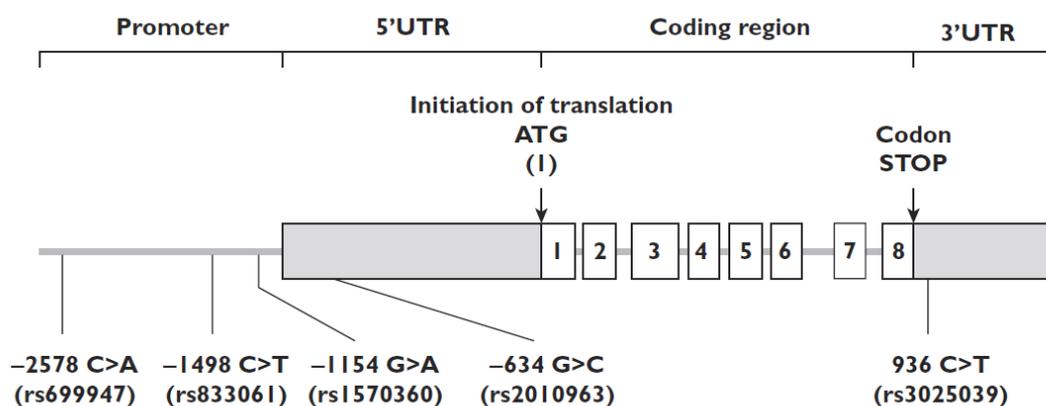


Fig.2 - SNPs VEGF

Diversi lavori hanno in effetti descritto associazioni tra alcuni SNPs di VEGF e i livelli di espressione della proteina VEGF. Shahbazi e coll. hanno valutato la correlazione tra gli SNPs della regione promoter di VEGF-A -1154 AG e -2578 AC e l'espressione di VEGF in vitro, dimostrando una maggiore produzione di VEGF-A da parte di cellule mononucleari ematiche derivanti da soggetti omozigoti -1154 GG rispetto a omozigoti -1154 AA e da individui omozigoti -2578 CC rispetto a omozigoti -2578 AA [77], mentre uno studio in vitro di Watson e coll. evidenzia una minore produzione di VEGF-A in cellule mononucleate ematiche derivanti da individui omozigoti -634CC [82]. Anche Koukourakis e coll. hanno descritto una minore espressione di VEGF-A ed una ridotta densità vascolare su campioni di tessuto tumorale polmonare nel genotipo -1154 AA, e -634 GG, mentre si osserva una tendenza opposta al precedente studio per il genotipo -2578 CC [78]. Altri studi descrivono invece una minore concentrazione plasmatica di VEGF-A associata alla variante allelica 936 T, suggerendo un possibile ruolo determinante dello SNP 936C/T nella regione promoter sui livelli di espressione della proteina VEGF [79-81]. In altri studi invece è descritto come la combinazione di più polimorfismi del gene VEGF impatti sui livelli di espressione della proteina, come l'osservazione di Lambrechts e coll. di una minore espressione di VEGF-A in soggetti con aplotipo -2578/-1154/-634 omozigote AAG o AGG e quella di Ferrante e coll. di ridotti livelli plasmatici di VEGF in soggetti affetti da morbo di Crohn in presenza dell'aplotipo -2578/-1154/-634 AAG [83]. In letteratura è inoltre documentato come alcuni SNPs di VEGF possano impattare su condizioni regolate dall'angiogenesi, come il rischio di sviluppare neoplasie. In particolare Schneider e coll. hanno osservato su una popolazione caucasica costituita da 520 pazienti affette da carcinoma della mammella e 715 controlli un aumentato rischio di sviluppare una neoplasia mammaria nei genotipi -2578AA e 1498CC [84], mentre Jacobs e coll. hanno evidenziato un aumentato rischio di sviluppare un carcinoma invasivo della mammella, ma non di carcinoma in situ, in pazienti con varianti -2578CC e 1154GG [85]; altri autori descrivono un effetto protettivo dell'allele -1154 A sul rischio di sviluppare un carcinoma prostatico [86,87], mentre Kripple e coll. in uno studio caso-controllo in soggetti austriaci, con 500 soggetti per ciascun gruppo, dimostrano un effetto protettivo della variante allelica -936T, associata sia ad una ridotta incidenza di neoplasia mammaria che ad

una minore concentrazione plasmatica di VEGF-A [79], dato confermato anche da Kataoka e coll. su una popolazione di donne cinesi [88]. Tutto ciò a sottolineare come alcuni polimorfismi di VEGF possano impattare sullo sviluppo e progressione neoplastica, sui livelli e funzione della proteina e quindi teoricamente potrebbero anche essere coinvolti nella risposta a farmaci che interferiscono con l'angiogenesi tumorale. Studi recenti hanno valutato la correlazione tra alcuni polimorfismi di VEGF e l'efficacia del trattamento con bevacizumab in pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico, nel tentativo di individuare potenziali biomarcatori predittivi. Lo studio di Schneider e coll. [89] è stato il primo a suggerire un'associazione significativa tra genotipo di VEGF ed efficacia di bevacizumab, aprendo la strada a successivi studi di farmacogenetica. Gli autori hanno condotto uno studio retrospettivo per valutare l'influenza di alcuni SNPs di VEGF e VEGFR-2 sull'efficacia del trattamento con bevacizumab in 363 pazienti arruolati nello studio registrativo E2100 (180 pazienti del braccio sperimentale e 183 pazienti del braccio di sola chemioterapia), per i quali erano disponibili i blocchetti paraffinati di tessuto tumorale. L'analisi genotipica è stata effettuata su alcuni SNPs di VEGFR [889G/A, 1416 A/T] e di VEGF [-2578C/A, -1498CT, -1154GA (nella regione promoter), -634 GC (nella regione 5'UTR) e 936CT (nella regione 3'UTR)], selezionati in base alla loro frequenza e capacità di alterare la funzione o espressione del gene in modo biologicamente rilevante, sul DNA estratto da campioni tissutali del tumore primitivo. Dai risultati emergeva come i genotipi VEGF-2578AA e -1154AA fossero predittivi di una migliore sopravvivenza globale per le pazienti nel braccio di combinazione con bevacizumab, ma non per le pazienti trattate con la sola chemioterapia. In particolare gli autori descrivevano nel braccio sperimentale una maggiore sopravvivenza globale per il genotipo VEGF-2578AA rispetto agli altri genotipi combinati [mOS di 37.0 mesi nel genotipo 2578AA, 24.4 mesi nel genotipo AC e 22.2 mesi nel CC. AA vs AC+CC: HR 0.58, 95%CI 0.36-0.93; p=0.023] e per ciascun allele VEGF-1154A [HR 0.62, 95%CI 0.46-0.83, p=0.001. mOS di 46.5 mesi nel genotipo VEGF-1154AA, 29.8 mesi nel GA e 22.3 mesi nel GG]. Confrontando i genotipi combinati VEGF-2578AA e -1154AA con tutti gli altri genotipi, gli autori descrivevano un incremento della sopravvivenza a favore della suddetta combinazione genotipica (P=0.041) nel braccio sperimentale, con una sopravvivenza mediana di 49.7 mesi. Non emergeva alcun significativo impatto del genotipo sul RR e la PFS, così come tra genotipo ed espressione di

VEGF e VEGFR-2 misurati sul tumore primitivo, con l'eccezione di un trend di minore espressione di VEGF nei genotipi associati ad una maggiore sopravvivenza. Inoltre gli autori descrivono un'associazione tra sviluppo di ipertensione arteriosa ed outcome, mostrando una sopravvivenza globale significativamente superiore per i pazienti con ipertensione di grado 3 e 4 rispetto ai pazienti che non sviluppavano ipertensione nello studio E2100 (rispettivamente 38.7 vs 35.3 mesi, $p=0.002$). Tuttavia per quanto riguarda l'analisi di associazione tra genotipo e sviluppo di tossicità correlata al bevacizumab, osservavano nei pazienti trattati con bevacizumab una minore incidenza di ipertensione di grado 3-4 nei genotipi VEGF-634CC e -1498TT (rispettivamente 0% nel -634CC e 8% nel -1498TT), rispetto agli altri genotipi combinati (rispettivamente, $p=0.005$ e $p=0.022$ [89]. Una possibile influenza dei polimorfismi 634-CC e 1498-TT di VEGF e lo sviluppo di tossicità correlata al bevacizumab era ipotizzata anche in un'analisi preliminare di Sun M. e coll del gruppo dell'M.D. Anderson su 75 pazienti affetti da diverse neoplasie solide trattati con bevacizumab, in cui era descritto un trend di minore tossicità di grado 3-4 correlata al bevacizumab a favore dei genotipi -1498TT (5% vs 21%, $p=0.086$) e -634CC (9% vs 16%, $p=0.0741$) [90]. Nonostante l'innovativa provocazione dei risultati dello studio di Schneider e coll., gli stessi autori raccomandavano cautela nell'interpretazione dei risultati, sottolineando le limitazioni dello studio e la necessità di validare le ipotesi generate in successive esperienze. I risultati emersi relativi all'impatto del genotipo sull'OS ma non sulla PFS (end point primario raggiunto dall'aggiunta di bevacizumab ai taxani negli studi di fase III), nonché il disegno retrospettivo dello studio, rendevano secondo gli autori stessi, i dati assolutamente preliminari e da verificare in altre esperienze; inoltre la mancata raccolta di campioni ematici, la scelta di condurre le analisi su DNA estratto dal tumore primitivo con un successo di genotipizzazione non ottimale e la misurazione dell'espressione di VEGF nel tumore primitivo, corrispondente ad un momento nella storia della malattia ben distinto dal trattamento con bevacizumab per la malattia metastatica, costituivano ulteriori criticità sollevate dagli stessi autori [89]. La scelta di Schneider e coll. di condurre l'analisi dei polimorfismi su preparati istologici di tessuto tumorale primitivo si basava sulla dimostrazione, in una precedente esperienza, di come i polimorfismi fossero la risultante di una variabilità genetica individuale con una concordanza tra il genotipo riscontrato sul tessuto tumorale e quello della linea germinale [91].

Sulla base di questa esperienza, gli studi successivi a quello di Schneider e coll. sono stati condotti sul DNA germinale ottenuto attraverso il prelievo di un campione ematico dai pazienti. Nessun altro studio successivamente ha provato a determinare quale fosse il campione più idoneo (tumorale e/o germinale) per le analisi genetiche. Tuttavia il nostro gruppo ha recentemente descritto in un case report, in una paziente con diagnosi di carcinoma mammario metastatico trattata con bevacizumab e paclitaxel, una discordanza tra i polimorfismi di VEGF del DNA della linea germinale e quello del tessuto tumorale di una lesione metastatica, suggerendo una potenziale rilevanza nel condurre le analisi su entrambi i campioni [92]. In considerazione della complessa interazione tra microambiente e tessuto tumorale alla base dell'angiogenesi tumorale, potrebbe essere quindi da confermare se i polimorfismi del VEGF siano solo la risultante di una variabilità genetica costituzionale del paziente, come sembra essere descritto da casistiche più ampie, oppure il risultato di una mutazione somatica del tumore, come suggerito dall'osservazione riportata in questo case-report. Il case report descrive inoltre una scarsa espressione di VEGF nel tessuto tumorale metastatico analizzato, nonostante l'elevata vascolarizzazione dello stesso, confermando il possibile ruolo determinante del microambiente dell'ospite nel favorire la risposta al bevacizumab [92]. Sulla base dei risultati emersi dal lavoro di Schneider, ulteriori studi hanno tentato di correlare SNPs di geni implicati nel processo angiogenetico alla risposta del bevacizumab. Tra questi, Etienne-Grimaldi e coll. hanno condotto un'analisi retrospettiva di alcuni polimorfismi germinali di VEGF (-2578CA, -1498CT, -1154GA, -634GC, -936CT) sul DNA estratto da un campione ematico basale di 137 in pazienti con carcinoma mammario metastatico trattate con l'associazione di bevacizumab e taxani nello studio osservazionale ATHENA. Al momento dell'analisi il follow up mediano risultava di 16 mesi. Sulle 127 pazienti valutabili per la risposta, si osservava un tasso di risposte obiettive del 60.6% e nessuno dei polimorfismi analizzati mostrava una significativa correlazione con la risposta clinica. Al momento dell'analisi 82 pazienti erano progredite (60%), 26 pazienti (19%) erano decedute ed il tempo alla progressione mediano risultava di 11.0 mesi. L'analisi del polimorfismo -936CT mostrava come i pazienti portatori dell'allele 936T (-936CT e -936TT, n=32) avessero una maggiore PFS rispetto ai pazienti omozigoti per l'allele -936C (-936CC, n=96), rispettivamente di 11.5 mesi e 9.7 mesi (Log Rank p=0.022) e gli autori nella discussione sottolineavano come il genotipo -936T si

associasse ad una ridotta concentrazione plasmatica di VEGF in precedenti studi [79-81]. Gli autori hanno inoltre valutato l'associazione tra genotipo e sviluppo di tossicità, tramite un "toxicity score" definito dalla somma del massimo grado osservato di ciascuna tossicità correlata al bevacizumab (ipertensione, emorragie, trombo embolia arteriosa, trombo embolia venosa). Le tossicità osservate sono state soprattutto di grado 1-2, con rari eventi di grado 3 (9.5% di ipertensione (13 pazienti) e 2.2% di eventi tromboembolici venosi (3 pazienti)) e di grado 4 (0.7% di eventi trombo embolici venosi e arteriosi (1 paziente)), ed un toxicity score mediano di 1 (range da 0 a 6). L'analisi del polimorfismo -634GC ha mostrato come il 39%, 49% e 81% dei pazienti con genotipo, rispettivamente, -634GG, -634GC e -634CC avessero un toxicity score > 1 (valore mediano) ($p=0.012$), suggerendo una possibile associazione tra l'allele -634C e il rischio di sviluppare tossicità, a differenza di quanto emergeva dallo studio di Schneider in cui il genotipo -634CC si associava ad una minore incidenza di ipertensione arteriosa di grado 3 e 4 [93]. Altri lavori invece non hanno evidenziato alcuna significativa associazione tra polimorfismi di VEGF ed efficacia del bevacizumab nel carcinoma mammario. In particolare Miles DW e coll hanno presentato in sede congressuale ECCO-ESMO 2011, un'analisi di diversi polimorfismi di geni coinvolti nella pathway angiogenetica, infiammatoria, nello sviluppo di ipertensione arteriosa e tumorigenesi (tra cui VEGF, VEGFR-1 e 2, eNOS, WNK-1, IL8, IL-6, IL8-R, ICAM-1, p53, ERCC1) sul DNA germinale di 336 pazienti con carcinoma mammario metastatico trattate con docetaxel associato o meno a bevacizumab nello studio randomizzato AVADO, non evidenziando alcuna correlazione significativa tra genotipo ed efficacia del bevacizumab, così come tra genotipo e livelli plasmatici di VEGF-A [94]. Altrettanto discordanti sono i risultati di studi condotti in altre neoplasie per valutare eventuali associazioni tra polimorfismi di VEGF ed efficacia del bevacizumab, in particolare nel carcinoma del colon retto metastatico. Mentre in alcuni lavori ipotizzavano un ruolo predittivo di alcuni genotipi, tra cui il polimorfismo -1498TT nello studio di Loupakis e coll. condotto su una popolazione di 111 pazienti trattati in prima linea con l'associazione di fluorouracile, acido folinico, irinotecano e bevacizumab (FOLFIRI-B) ed un gruppo controllo costituito da 107 pazienti trattati con FOLFIRI [95], ed i genotipi -2578AC e -1154AG nell'analisi di Koutroufoglou e coll su 209 pazienti trattati con FOLFIRI o XELIRI in associazione a bevacizumab [96], altre analisi non

confermavano l'impatto dei polimorfismi sull'efficacia del bevacizumab, tra cui quella condotta da Loupakis e coll su 54 pazienti trattati con l'associazione di fluorouracile, acido folinico, oxaliplatino, irinotecano e bevacizumab (FOLFOXIRI-B) nello studio GONO di fase II [97]. Uno studio condotto da Pander e coll su 279 pazienti trattati con l'associazione di capecitabina, oxaliplatino e bevacizumab (CAPOX-B) evidenziava come nessuno degli SNPs analizzati impattasse individualmente sull'outcome dei pazienti, e da un'analisi di interazione genica, condotta tramite un software dedicato, gli autori dimostravano come la combinazione di TYMS-enhancer regione VEGF-405GC identificasse un profilo genetico favorevole associato significativamente con la PFS, suggerendo la possibilità che l'interazione tra SNPs di più geni, piuttosto che SNPs individuali, potesse impattare sull'outcome del trattamento [98]. Alcuni lavori suggeriscono come non solo polimorfismi di VEGF bensì di altri geni correlati alla neoangiogenesi possano condizionare l'efficacia del trattamento con bevacizumab, e debbano essere valutati nel tentativo di individuare biomarcatori predittivi. Tra i lavori più recenti, all'ECCO-ESMO 2011 è stata presentata da Lambrechts D e coll. un'ampia analisi di polimorfismi, condotta su 1348 campioni di DNA germinale derivanti da 5 studi randomizzati sul trattamento di prima linea nella malattia avanzata, rispettivamente, colon rettale (NO16966 - XELOX ± bevacizumab vs FOLFOX ± bevacizumab), pancreatico (AVITA - gemcitabina e erlotinib ± bevacizumab), polmonare non a piccole cellule (AVAIL - cisplatino e gemcitabina ± bevacizumab), renale (AVOREN - IFN α -2a ± bevacizumab) e mammario (AVADO - docetaxel ± bevacizumab). Mediante spettrometria di massa MALDI-TOF sono stati genotipizzati 158 SNPs relativi a numerosi geni, tra cui VEGF-A, VEGFR-1 e 2 e i fattori inducibili dall'ipossia, HIF-1 e EPAS1; tramite una metanalisi dei dati individuali gli autori hanno quindi valutato le potenziali interazioni tra genotipo ed efficacia del bevacizumab. L'analisi mostra come le maggiori interazioni tra genotipo ed outcome siano relative ad alcuni polimorfismi di VEGFA, VEGFR-2 e EPAS1. In particolare è descritta un'associazione tra lo SNP rs699946, collocato nella regione promoter di VEGF-A, e la sopravvivenza libera da progressione nei pazienti trattati con bevacizumab [HR allelico (allele G) 1.26, 95%CI 1.07-1.48, p=0.005] ma non nella popolazione placebo, nonché un'associazione tra la variante allelica G di questo SNP e i livelli di VEGF plasmatici (aumento mediano del VEGF plasmatico del 27% nel genotipo GG rispetto ai

genotipi AA (wild type) e GA), suggerendo anche un possibile significato funzionale di questo SNP. Gli autori non hanno invece confermato l'associazione precedentemente descritta da Shneider tra il vicino polimorfismo rs699947 nella regione promoter di VEGF-A (-2578CA) e l'efficacia del bevacizumab. Inoltre dal lavoro è emersa un'associazione tra lo SNP intronico di VEGFR-2 rs11133360 e la sopravvivenza libera da progressione nei pazienti trattati con bevacizumab [HR allelico (allele C) 1.15, 95% CI: 1.02–1.30; p=0.022] ma non con placebo, suggerendo un possibile significato predittivo di questa variante genetica. Infine l'associazione più forte tra genotipo ed outcome in quest'analisi è relativa ad un polimorfismo in EPAS1 (HIF-2 α), uno dei fattori inducibili dall'ipossia; in particolare la variante allelica A nello SNP rs4145836 in EPAS1 ha mostrato una significativa associazione con la sopravvivenza libera da progressione (HR allelica 0.66, 95% CI: 0.54–0.80; p=0.00003) e con la sopravvivenza globale (HR allelica 0.77, 95% CI: 0.62, 0.97; 0.023) nella popolazione trattata con bevacizumab, così come nei pazienti trattati con placebo, emergendo come un possibile biomarcatore prognostico [99]. In un altro lavoro Schultheis AM. e coll hanno analizzato in modo prospettico l'impatto di polimorfismi di numerosi geni implicati nella pathway angiogenetica, non direttamente legati al noto meccanismo di azione anti-VEGFA del bevacizumab, e la risposta ad un trattamento con ciclofosfamide (50 mg p.o. continuativamente) e bevacizumab (10 mg/Kg e.v. ogni 14 giorni) sui campioni ematici di 53 pazienti con carcinoma ovario recidivato. L'analisi non ha evidenziato significative associazioni tra polimorfismi di VEGF e outcome, eccetto un trend di maggiore sopravvivenza libera da progressione nel genotipo -936CT rispetto ai genotipi CC e TT, rispettivamente di 11.8 mesi, 5.5 mesi e 3.2 mesi (p=0.061), descrivendo al contrario associazioni significative per varianti di alcuni geni coinvolti nell'angiogenesi e nella risposta immunitaria, come l'interleuchina-8 (IL-8) e il suo recettore CXCR2. In particolare gli autori descrivono un minor tasso di risposte obiettive nelle pazienti con genotipo IL-8 -251AA o AT (rispettivamente 0% e 19%) rispetto alle pazienti con genotipo omozigote TT (50%, p=0.006); inoltre è descritta una maggiore sopravvivenza libera da progressione nelle pazienti con genotipo CXCR2-785CC o CT (7.4 mesi) rispetto alle pazienti con genotipo omozigote TT (3.7 mesi, p=0.026) [100]. Infine un'analisi retrospettiva, presentata sottoforma di abstract da Lambrechts D e coll, su 154 pazienti con diagnosi di carcinoma pancreatico metastatico arruolati nello studio

sopracitato AVITA, ha mostrato un'associazione significativa tra lo SNP di VEGFR-1 rs9532086, collocato in una regione del gene codificante il dominio tirosin-chinasico del recettore, e l'efficacia del trattamento in termini di PFS e OS nei pazienti trattati con bevacizumab ma non con placebo [101]. Come precedentemente descritto, ad oggi è noto come l'angiogenesi tumorale sia un processo complesso regolato dal bilanciamento locale di numerosi fattori proangiogenetici ed altri antiangiogenetici. Un inibitore endogeno dell'angiogenesi è rappresentato dalla trombospondina-1 (TSP-1), grazie alle capacità di inibire la proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali e stimolarne l'apoptosi, la cui espressione è inversamente regolata rispetto a quella di VEGF dagli stimoli che promuovono l'angiogenesi [102,103]. Studi clinici suggeriscono come i meccanismi di feedback indotti dal trattamento con farmaci antiangiogenetici non siano ristretti alla sola espressione di VEGF, ma coinvolgano anche altri mediatori dell'equilibrio angiogenetico, tra cui la TSP-1. In particolare i risultati di uno studio condotto da Brostjan C. e coll. in pazienti con diagnosi di carcinoma coloretale trattati con un trattamento chemioterapico neoadiuvante in associazione o meno a bevacizumab, suggeriscono come la TSP-1 sia coinvolta nei meccanismi di feedback indotti dal trattamento con farmaci antiangiogenetici. Dall'analisi dei campioni di plasma dei pazienti in studio è emerso come nei campioni dei pazienti trattati con bevacizumab rispetto a quelli trattati con la sola chemioterapia vi fosse una maggiore capacità di stimolare la crescita endoteliale, nonostante la presenza di bevacizumab, ed un minor livello e alterata sensibilità alla TSP-1. La capacità di stimolare la crescita endoteliale non risultava rallentata dal bevacizumab ma correleva in modo inverso con i livelli di trombospondina. Tramite l'aggiunta di TSP-1 purificata a questi campioni di plasma, la crescita endoteliale risultava ridotta nei campioni dei pazienti trattati con bevacizumab ma non in quelli che avevano ricevuto il solo trattamento chemioterapico [104].

3 RAZIONALE

Alla luce di quanto precedentemente esposto, abbiamo deciso di effettuare uno studio su una casistica di pazienti con carcinoma mammario metastatico trattati con paclitaxel e bevacizumab per valutare l'impatto di polimorfismi germinali di geni correlati alla neoangiogenesi sull'outcome delle pazienti stesse. Il razionale del nostro studio deriva da quanto sopra riportato ed in particolare dalle seguenti considerazioni:

- Evidenze cliniche e laboratoristiche mostrano come il processo di neoangiogenesi giochi un ruolo fondamentale nei fenomeni di progressione e metastatizzazione neoplastica.
- Uno studio clinico di fase III, ha dimostrato come l'aggiunta del bevacizumab ad un trattamento di prima linea con paclitaxel in pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico, prolunghi in modo statisticamente significativo la PFS (PFS mediana 11.8 vs 5.9 mesi; $P < 0.001$) e incrementi il tasso di risposte obiettive (36.9% vs 21.2%, $P < 0.001$) rispetto al trattamento chemioterapico con solo paclitaxel; quest'associazione costituisce ad oggi un'opzione terapeutica in prima linea nelle pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella metastatico HER-2 negativo.
- Ad oggi non sono noti biomarcatori di efficacia per selezionare pazienti in grado di beneficiare maggiormente del trattamento con bevacizumab. L'identificazione di biomarcatori predittivi di efficacia permetterebbe un utilizzo più razionale delle risorse ed un vantaggioso rapporto tra costo ed efficacia dei trattamenti. Se disponessimo di un biomarcatore validato l'associazione di bevacizumab e taxani potrebbe costituire non un'opzione ma uno standard in un sottogruppo di pazienti, il cui beneficio in PFS potrebbe potenzialmente tradursi anche in OS.
- Sono state recentemente descritte associazioni significative tra alcuni polimorfismi dei geni coinvolti nell'angiogenesi e l'efficacia del bevacizumab, in diversi studi retrospettivi. In pazienti con carcinoma mammario metastatico trattate con bevacizumab, Shneider e coll hanno descritto una possibile associazione tra i genotipi VEGF-2578AA e -1154AA e l'OS, mentre Etienne-Grimaldi e coll hanno descritto una maggiore PFS associata al genotipo 936T. Inoltre Schulteis M. e coll. hanno ipotizzato una possibile influenza di un polimorfismo

dell'IL-8 sulla risposta al bevacizumab in pazienti con carcinoma ovarico refrattario, mentre Lambrecht e coll. hanno recentemente descritto un significativo impatto sull'efficacia del bevacizumab di alcuni SNPs di VEGF-A (rs699946) e VEGFR-2 (rs11133360). Altri studi non hanno evidenziato alcuna significativa associazione tra genotipo ed outcome, mentre lo studio di Pander e coll. descrive una possibile influenza non di un singolo SNP bensì di un profilo di interazione genetica sulla PFS di pazienti con carcinoma colon rettale metastatico trattati con l'associazione di capecitabina, oxaliplatino e bevacizumab.

- L'angiogenesi tumorale rappresenta un processo complesso, regolato da un equilibrio dinamico tra fattori promuoventi ed inibenti; studi descrivono come i meccanismi di feedback indotti dalla terapia con bevacizumab non siano ristretti solo all'espressione di VEGF ma coinvolgano ulteriori fattori coinvolti in questo delicato equilibrio, in particolare la TSP-1.
- Potrebbe essere da confermare se i polimorfismi siano la risultante esclusivamente di una variabilità genetica individuale, come descritto da ampie casistiche, o derivino anche da mutazioni somatiche nel tumore, sulla base della recente descrizione di una discordanza genotipica tra tumore e DNA.

4 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Questo studio pilota è stato condotto con l'obiettivo di identificare polimorfismi genetici dei mediatori pro- o antiangiogenetici, coinvolti nel processo di neovascolarizzazione potenzialmente in grado di predire la risposta al trattamento con bevacizumab in termini di attività ed efficacia, in pazienti affette da carcinoma metastatico della mammella. In questo studio sono stati analizzati i polimorfismi genetici di VEGF già indagati in precedenti studi e altri polimorfismi di mediatori coinvolti nel processo di neoangiogenesi, correlandoli con l'efficacia del trattamento. Oltre alla valutazione dell'impatto dei singoli polimorfismi, lo studio si è proposto di identificare profili di interazione genetica favorevoli correlati potenzialmente con l'efficacia del trattamento. L'analisi è stata condotta sul DNA estratto da cellule della serie bianca (ottenuto attraverso un prelievo di sangue) e su DNA estratto dai preparati istologici del campione tumorale, per confermare come questi polimorfismi siano la risultante di una variabilità genetica costituzionale del paziente, come sembra essere descritto da casistiche più ampie, oppure il risultato di una mutazione somatica del tumore.

5 MATERIALI E METODI

5.1 Pazienti e disegno dello studio

Sono state inserite nello studio pazienti con diagnosi istologica di carcinoma mammario HER2 negativo metastatico (con malattia misurabile o non misurabile), sottoposte ad un trattamento chemioterapico di prima linea con l'associazione paclitaxel e bevacizumab (ai dosaggi rispettivamente di 90 mg/mq ev al giorno 1,8,15 e 10 mg/mq ev al giorno 1,15, con cicli ripetuti ogni 28 giorni). Le pazienti sono state sottoposte al trattamento presso il nostro centro, U.O. Oncologia Medica Universitaria dell'Ospedale S. Chiara di Pisa, l' U.O. Oncologia Medica dell'Ospedale F.Lotti di Pontedera (centro coordinatore) ed altre oncologie italiane (U.O. Oncologia Medica dell'Ospedale Versilia, U.O. Oncologia Medica dell'Ospedale S. Chiara di Trento, Struttura Complessa di Oncologia Medica dell'AO S. Gerardo di Monza, U.O. Oncologia Medica di Pesaro, Sezione di Oncologia Medica dell'Ospedale Del Ceppo di Pistoia e U.O. Oncologia Medica dell'Ospedale SS. Cosma e Damiano di Pescia). Lo studio prevedeva l'esecuzione di un prelievo ematico alle pazienti in trattamento per le analisi farmacogenetiche che esprimevano il loro consenso al prelievo e alle analisi previste dallo studio. Non essendo reperibili in letteratura dati concernenti l'esatta correlazione tra polimorfismi dei geni obiettivo delle analisi farmacogenetiche dello studio ed efficacia/tollerabilità dei trattamenti con bevacizumab, non è stato possibile applicare l'analisi statistica per calcolare la numerosità del campione dei pazienti da arruolare. Pertanto il presente studio retrospettivo è da considerare uno studio pilota, con arruolamento previsto di 100 pazienti.

5.2 Valutazioni cliniche delle pazienti in studio

Delle pazienti in studio sono state raccolte caratteristiche cliniche basali relative ad età, sesso, ECOG, data di diagnosi della malattia primitiva, grading e caratteristiche immunoistochimiche del tumore primitivo (ER, PgR e HER2), eventuale chirurgia sul primitivo, terapie mediche adiuvanti, data di diagnosi della malattia metastatica, numero e sede delle localizzazioni metastatiche e informazioni relative al trattamento con bevacizumab e ad eventuali ulteriori provvedimenti per la malattia metastatica.

La risposta al trattamento è stata valutata secondo i criteri RECIST v1.1 (v. Appendice I). Per le pazienti con malattia non misurabile la progressione di malattia si è basata sul giudizio del medico oncologo secondo criteri clinici soggettivi (deterioramento del PS, aumento dei markers tumorali o dei versamenti neoplastici).

Gli eventi avversi correlati al trattamento sono stati valutati in accordo a National Cancer Institute Common Terminology Criteria (NCI- CTCAE v.4.0) (V Appendice II).

5.3 Analisi farmacogenetiche sul DNA germinale

5.3.1 Prelievo del campione

A ciascun paziente che ha accettato di partecipare allo studio è stato eseguito un prelievo ematico (3 ml) in provetta contenente EDTA. Ad ogni paziente è stato attribuito un codice (costituito dalle lettere BEVAGENE e da un numero progressivo di arruolamento a 4 cifre) riportato sia sul prelievo che sulla CRF cartacea. Ogni campione è stato inviato immediatamente al laboratorio per le esecuzioni delle analisi genetiche.

5.3.2 Estrazione e conservazione del DNA

Le analisi genetiche previste dallo studio sono state condotte presso i laboratori della Divisione di Farmacologia e Chemioterapia diretta dal Prof. Danesi – Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Pisa (Dr. Guido Bocci). Da ogni campione di sangue pervenuto al laboratorio è stata prelevata un'aliquota di sangue (200 µl) su cui è stata eseguita l'estrazione del DNA secondo procedure standard (Qiagen DNA Mini Kit e QIAamp DNA Blood Mini Kit, Milano, Italia). In particolare al fine di estrarre il DNA dai campioni di sangue intero, 200 µl di sangue intero e 200 µl di Buffer AL presente nella confezione del kit Qiagen impiegato 200 sono stati aggiunti ad una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml sul cui fondo erano stati preventivamente posti 20 µl di QIAGEN Proteasi (o Proteinasi K). Il campione è stato quindi centrifugato per 15 secondi e poi incubato a 56°C per 10 minuti; successivamente al campione sono stati aggiunti 200 µl di etanolo al 100% (v/v) ed è stato centrifugato per altri 15 secondi. Il campione ottenuto è stato quindi posto in una colonna per la separazione del DNA (QIAamp Spin Column) e quindi centrifugato a 8000 giri/minuto per 1 minuto. Dopo aver scartato l'eluato, nella QIAamp Spin Column sono stati aggiunti

al campione 500 µl di buffer AW1 ed è stato poi centrifugato a 8000 giri/minuto per un minuto. Il filtrato è stato nuovamente eliminato e dopo aver aggiunto buffer AW2 (500 µl), il campione è stato centrifugato a 14.000 giri/minuto per 3 minuti. Dopo aver eliminato il filtrato ed incubato il campione a temperatura ambiente per 1 minuto in 200 µl buffer AE, il DNA adsorbito sulla resina presente nella colonna è stato eluito in una nuova provetta da 1,5 ml mediante centrifugazione a 8000 giri/min per 1 minuto. La concentrazione di DNA presente nell'eluato è stata misurata mediante uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm (Abs_{260}) mediante la seguente formula: $[DNA] (\mu g/\mu l) = Abs_{260} \times 25$. Il DNA estratto e il rimanente volume di sangue sono conservati alla temperatura di -70 °C presso i laboratori della Divisione di Farmacologia e Chemioterapia del Dipartimento di Medicina Interna.

5.3.3 Analisi dei polimorfismi

La genotipizzazione è stata effettuata su piattaforma TaqMan mediante impiego di primers e sonde specifiche (Applied Biosystems) con strumento 7900HT Sequence Detection System. Le analisi sono state condotte su polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) di geni di mediatori coinvolti nel processo angiogenico già noti da precedenti studi, frequenti sufficientemente per osservare una possibile correlazione di tipo clinico e potenzialmente in grado di alterare la funzione del gene in modo biologicamente rilevante. I geni e polimorfismi selezionati per le analisi genetiche sono specificati di seguito nella Tabella 1. Nel saggio TaqMan (*Fluorogenic 5' Nuclease Assay*), una speciale sonda fluorogenica complementare alla sequenza del DNA bersaglio compresa tra il primer senso ed antisense viene aggiunta ad una normale reazione di Real Time PCR. Le sonde fluorogeniche complementari alle sequenze del DNA bersaglio impiegate nel saggio TaqMan per l'analisi genotipica sono specificate nell'appendice III. La sonda è un tratto di DNA complementare alla sequenza di interesse, legato covalentemente a due molecole fluorescenti, rispettivamente un fluorocromo ad alta energia R (Reporter) e un fluorocromo a bassa energia Q (Quencher), con la funzione di spegnere la fluorescenza del reporter. Infatti quando la sonda è intatta e i due fluorocromi sono ravvicinati, i fotoni del cromoforo reporter sono assorbiti dal quencher e non si ha l'emissione di fluorescenza; invece quando avviene la frammentazione della sonda e i due cromofori R e Q si distanziano, il quencher non riesce a spegnere l'effetto del reporter con conseguente

emissione di fluorescenza. Durante l'amplificazione nella reazione di PCR (fase di "annealing") sia i primer che la sonda si ibridano al template; quando durante l'estensione del primer la Taq polimerasi incontra la sonda ibridata che, essendo bloccata al 3' non può essere estesa dalla polimerasi, la taglia con la sua attività 5'-3' esonucleasica, liberandosi la strada e portando così a termine la copiatura del frammento. Come risultato, per ogni copia di prodotto PCR portata a termine si ha il taglio di una sonda fluorogena ad opera della Taq polimerasi, con conseguente separazione del cromoforo reporter dal quencher ed emissione della fluorescenza. Vengono utilizzate piastre di reazione da 96 pozzetti standard e il segnale generato è rilevato in soluzione durante la PCR (Fluorogenic 5' nuclease assay TaqMan®). Al termine dei cicli programmati, lo strumento ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection Systems misura la fluorescenza sviluppata permettendo di stabilire il contenuto allelico di ogni campione presente sulla piastra. Confrontando la fluorescenza dei campioni durante la fase esponenziale rispetto ad uno standard di riferimento si può risalire al numero di copie di DNA nel template di partenza. Per ogni campione si otterrà un grafico con la sua curva di crescita, che sarà tanto più ripida quanto maggiore è la quantità di template di partenza. Per l'analisi genotipica in studio vengono utilizzate due sonde, una per ciascuna variante allelica, in modo da poter definire, tramite la misurazione della fluorescenza, se un soggetto è eterozigote oppure omozigote per uno dei due alleli.

Tabella 1. Polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) dei geni candidati per lo studio			
Gene	Funzioni generali	SNP	Reference SNP
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> Fattore promuovente angiogenesi	-2578 C/A (promoter)	rs699947
		-1498 C/T (promoter)	rs833061
		-1154 G/A (promoter)	rs1570360
		-634 G/C (promoter)	rs2010963
		936 C/T (3' UTR)	rs3025039
		A/G (promoter)	rs699946

VEGFR-2	<i>VEGF Receptor- 2</i>	-604 A/G	rs2071559
	Recettore per VEGF	1192 C/T	rs2305948
		1719 T/A	rs1870377
		C/T	rs11133360
TSP-1	<i>Thrombospondin-1</i>	8831 A/G	rs2228262
	Inibitore angiogenesi		
IL-8	<i>Interleukin-8</i>	-251 T/A (promoter)	rs4073
	Chemochina coinvolta in angiogenesi e risposta immunitaria		
HIF-1α	<i>Hypoxia inducible factor-1α</i> [Subunità 1 α HIF- Regolazione espressione genica da ipossia]	1772 C/T (oxygen-dependent-domain)	rs11549465
EPAS-1	<i>Hypoxia inducible factor-2α</i> Subunità 2 α di HIF- Regolazione espressione genica da ipossia	introne	rs4145836

5.4 Analisi su preparati istologici di tessuto tumorale

L'analisi dei polimorfismi genetici su preparati istologici di campioni di tessuto tumorale sarà effettuata presso i laboratori della Sezione di Patologia Molecolare dell'Anatomia Patologica I dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana (Direttore Prof. G. Bevilacqua). Da ciascun blocchetto in paraffina di tessuto tumorale verranno preparate due sezioni in bianco di 10 μ M su cui sarà estratto il DNA secondo metodiche convenzionali. L'analisi è stata pianificata con l'obiettivo di confermare se questi polimorfismi siano la risultante di una variabilità genetica costituzionale del paziente, come descritto da casistiche più ampie, oppure il risultato di una mutazione somatica del tumore. Se necessario in alcuni casi si procederà alla microdissezione laser per selezionare dal blocchetto in paraffina contenente il tessuto tumorale esclusivamente le cellule non neoplastiche in modo da poter analizzare DNA appartenente alla linea germinale del paziente.

5.5 Analisi statistiche

L'obiettivo primario di questa analisi retrospettiva è la valutazione di potenziali associazioni significative tra polimorfismi di VEGF e di altri geni correlati alla neoangiogenesi e la sopravvivenza libera da progressione (PFS), definita come tempo dall'inizio del trattamento alla progressione di malattia o morte per ogni causa. Oltre a valutare le possibili associazioni tra i singoli polimorfismi e la PFS, lo studio si è proposto di identificare eventuali profili di interazione genetica associati con la PFS. Obiettivi secondari sono la valutazione di potenziali associazioni tra i polimorfismi e il tasso di risposte (RR), definito dalla somma delle risposte parziali e complete di malattia (PR+CR), e tra i polimorfismi e la sopravvivenza globale (OS), definita come tempo dall'inizio del trattamento alla morte per ogni causa. Il metodo di Kaplan-Meier è stato utilizzato per stimare l'impatto di ciascuna variabile clinica, patologica e genomica sul rischio di progressione o morte e il Log-rank test per analizzare eventuali differenze. Il modello a rischi proporzionali di Cox è stato utilizzato nelle analisi multivariate per valutare l'associazione di ogni singola variabile sull'outcome dei pazienti (calcolo degli hazards ratio (HR) e relativi intervalli di confidenza al 95%), utilizzando come covariate le variabili associate singolarmente con la PFS. Il test esatto di Fisher è stato usato per valutare l'associazione tra i genotipi analizzati e il RR. Data la natura esplorativa dello studio è stata assunta come significativa una $p < 0.05$. È stato inoltre utilizzato il software denominato Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) software [versione 2.0 beta 6; <http://sourceforge.net/projects/mdr/>] per valutare possibili interazioni tra doppiette di geni ed efficacia del trattamento, con l'obiettivo di identificare profili genetici associati con la PFS. Brevemente, il software tenta di identificare un profilo genico, in questo caso di una doppietta di geni (ammesso che esista), che si associ ad una PFS mediana migliore rispetto alla PFS mediana della popolazione in studio. Identificato un profilo biologico definito favorevole, sono stati utilizzati il metodo di Kaplan-Meier e il log-rank test per descrivere e confrontare le curve di PFS tra pazienti con profilo genetico favorevole rispetto alla restante popolazione di pazienti, e il modello a rischi proporzionali di Cox per valutare eventuali associazioni tra i profili genetici e l'outcome.

6 RISULTATI

6.1 Caratteristiche delle pazienti

A partire da marzo 2010 sono state incluse 111 pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico sottoposte ad una trattamento chemioterapico di prima linea con paclitaxel e bevacizumab c/o il nostro centro, l'U.O di Oncologia Medica di Pontedera (centro coordinatore) ed altre oncologie italiane, dal Luglio 2007. Nella tabella 2 sono incluse le caratteristiche basali delle pazienti arruolate. Si tratta di una popolazione di sesso femminile ad eccezione di un paziente di sesso maschile, con età mediana di 59 anni (32-81) e in buone condizioni generali, con ECOG Performance Status (PS) di 0 o 1 rispettivamente nel 90% (100/111) e 10% (11/111) dei casi. In merito alle caratteristiche istopatologiche del tumore mammario primitivo, il 100% dei casi risultava HER2 negativo (IHC 0/1+ oppure 2+/ FISH non amplificato), l'83% dei casi (92/111) esprimeva recettori estrogenici o progestinici, mentre nel 19% dei casi (19/111) il tumore primitivo non esprimeva recettori ormonali. In 27 pazienti la malattia era stata diagnosticata come metastatica ab inizio. I restanti pazienti avevano sviluppato malattia metastatica con un intervallo libero da malattia (DFI) mediano di 39 mesi [range 0 – 23 anni]; il DFI risultava inferiore a 12 mesi nel 27% dei casi (30/111) e superiore ai 12 mesi nel 73% dei casi (81/111) pazienti. Per quanto riguarda l'estensione della malattia metastatica il numero mediano di sedi metastatiche risultava superiore o uguale a tre nel 33% dei pazienti (37/111) e inferiore a tre nei rimanenti casi (74/111), con un numero mediano di sedi metastatiche pari a 2 (range 1-6). Inoltre il 73% delle pazienti (81/111) presentava malattia viscerale, mentre nel 27% dei pazienti (30/111) la malattia era limitata allo scheletro e/o tessuti molli. Per quanto riguarda il trattamento di prima linea, i pazienti hanno ricevuto una chemioterapia con paclitaxel in associazione a bevacizumab per una durata mediana di circa sette mesi. Il 73% dei pazienti (81/111) ha ricevuto bevacizumab di mantenimento (10 mg/mq ev ogni 14 giorni o 15 mg/mq ev ogni 21 giorni) dopo la sospensione della chemioterapia con taxani, per una durata mediana di circa 6 mesi. In merito ad altri trattamenti per la malattia metastatica, il 22.5% (22/111) dei pazienti ha ricevuto un trattamento ormonale mentre il 4.5% (5/111) è stato sottoposto a chirurgia sul primitivo. Per quanto riguarda i trattamenti precedenti lo sviluppo della malattia metastatica, la

totalità dei pazienti è stata sottoposta ad adeguato trattamento locale del primitivo (mastectomia, quadrantectomia e radioterapia, tecnica del linfonodo sentinella o linfadenectomia), il 68% dei pazienti (76/111) ha ricevuto un precedente trattamento chemioterapico adiuvante, il 23% dei pazienti (26/111) ha ricevuto una chemioterapia adiuvante con taxani e il 55% (61/111) è stata sottoposta ad ormonoterapia adiuvante. Le analisi di correlazione tra genotipo ed outcome sono state condotte su 102 pazienti, le cui caratteristiche erano simili a quelle dell'intera popolazione in studio, per le quali erano disponibili le informazioni relative alla genotipizzazione al momento dell'analisi. I polimorfismi osservati in queste pazienti con le relative frequenze genotipiche e sono riportati in appendice IV.

Tab. 2 Caratteristiche delle pazienti (n=111)	
Età mediana (range)	59 (32- 81)
ECOG PS – n (%)	
0	100 (90%)
1	11 (10%)
2	0
Recettori ormonali (tumore primitivo)	
ER e/o PgR positivi - n (%)	92 (83%)
ER e PgR negativi - n (%)	19 (17%)
Sconosciuto	-
HER2 (tumore primitivo)	
Negativo - n (%)	111 (100%)
Precedente chemioterapia adiuvante - n (%)	
No	35 (32%)
Antraciclina	33 (30%)
Antraciclina + taxani	26 (23%)
Precedente ormonoterapia – n (%)	
No	25 (22.5%)
Adiuvante	61 (55.0%)
Metastatico	25 (22.5%)

DFI	
mediana [range] (mesi)	39 (0-276)
< 12 mesi - n (%)	30 (27%)
≥12 mesi - n (%)	81 (73%)
Numero di lesioni metastatiche – mediana (range)	2 (1-6)
≥ 3 sedi - n (%)	37 (33%)
< 3 sedi - n (%)	74 (67%)
Localizzazione di malattia – n (%)	
Viscerale	81 (73%)
Scheletro e/o tessuti molli	30 (27%)
Bevacizumab di mantenimento - n (%)	
Si	81 (73%)
No	30 (27%)
Follow up mediano [mesi] (range)	17.4 (1.9 - 54.7+)

6.2 Efficacia e tossicità dell'associazione di bevacizumab e taxani

Nella tabella 3 sono riassunti i dati relativi ad efficacia e attività osservati nella nostra casistica di 111 pazienti con tumore mammario metastatico trattate con la combinazione di bevacizumab e taxani. Al momento in cui è stata condotta l'analisi il follow up mediano risultava di 17.4 mesi (range 1.9-54.7+), 88 pazienti erano progrediti e 41 deceduti. Ad eccezione di una paziente deceduta per una seconda neoplasia a livello del pancreas, le cause di morte risultavano nei restanti casi correlate alla malattia. In queste 111 pazienti la sopravvivenza libera da progressione (PFS) mediana è risultata di 11.6 mesi (IC 95% 10.6 -12.6) e la sopravvivenza globale (OS) mediana di 32.4 mesi (IC 95% 25.9 – 38.9) (111 pz). Per quanto riguarda l'attività del trattamento, dei 111 pazienti in studio 14 pazienti (12.6%) hanno avuto una risposta completa di malattia (CR), 57 pazienti (51.4%) una risposta parziale, con un tasso di risposte obiettive (ORR) pari al 64%, 31 pazienti (27.9%) una stabilità di malattia (SD), mentre si è osservata una progressione di malattia (PD) in 9 pazienti (8.1%). (Tab 3 e Fig.3-4). In appendice V sono riportate le curve di Kaplan-Meier relative a PFS e OS e i dati di attività riscontrati sulle 102 pazienti su cui è stata condotta l'analisi di correlazione tra

genotipo ed out come. La PFS mediana e l'attività del trattamento in queste pazienti è risultata simile a quella dell'intera popolazione.

Tabella 3. Attività e efficacia del trattamento(n=111)	
CR	14 (12.6%)
PR	57 (51.4%)
SD	31 (27.9%)
PD	9 (8.1%)
ORR (CR + PR)	71 (64.0%)
PFS mediana (mesi) <i>n eventi 88/111</i>	11.6 (IC 95% 10.6 - 12.6)
OS mediana (mesi) <i>n eventi 41/111</i>	32.4 (IC 95% 25.9 – 38.9)

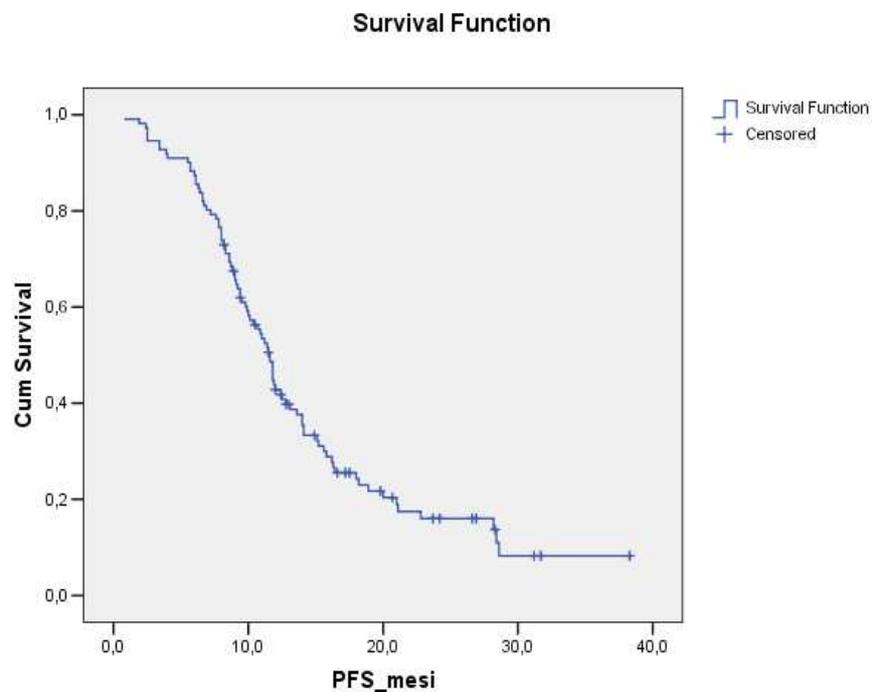


Fig.3 Kaplan-Meier PFS nella popolazione in studio

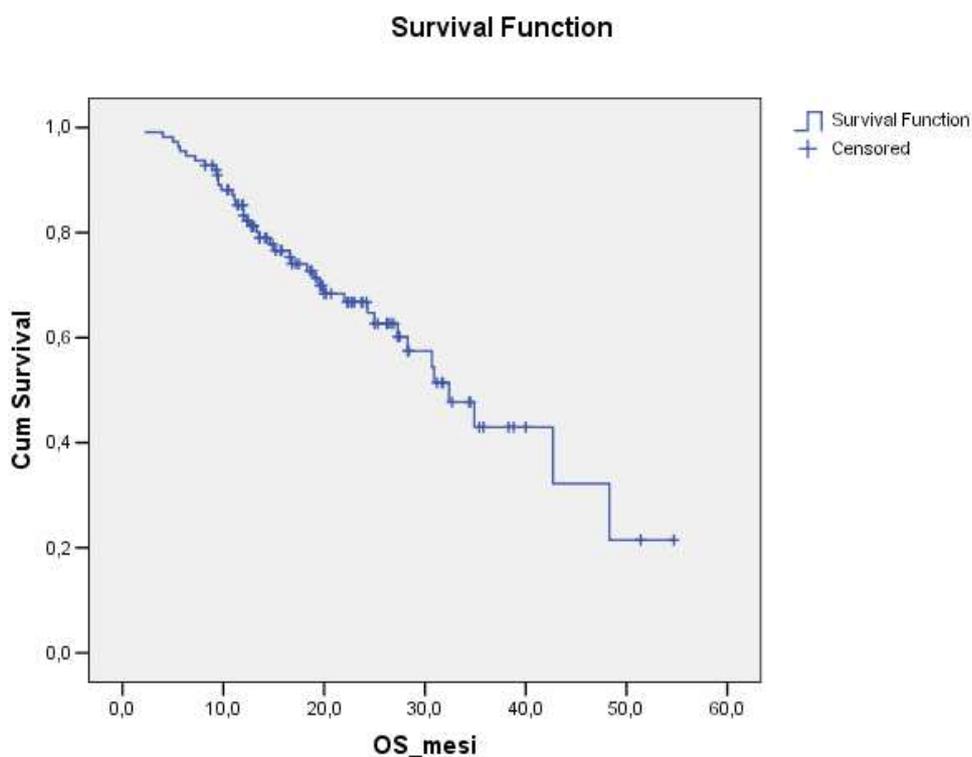


Fig.4 Kaplan-Meier OS nella popolazione in studio

Il trattamento con paclitaxel e bevacizumab è risultato ben tollerato, come si osserva dai dati di tossicità riassunti nella sottostante tabella 4. Non si sono infatti verificati eventi trombotici arteriosi o venosi nè emorragie severe. Si è tuttavia verificato un evento di perforazione gastrointestinale in corso di trattamento con bevacizumab in una paziente senza impegno peritoneale di malattia, gestito tramite adeguata chirurgia. In linea con il noto profilo di tossicità del bevacizumab, abbiamo osservato lo sviluppo di ipertensione arteriosa in 27 pazienti (24%), rispettivamente di grado 1/2/3 in 11 pazienti (10%), 12 pazienti (11%) e pazienti (4%), comunque in tutti casi adeguatamente gestita e controllata con terapia medica. Proteinuria ed epistassi sono state di entità lieve e non clinicamente significative. Per quanto riguarda le tossicità non direttamente correlate al bevacizumab globalmente il trattamento è stato ben tollerato, con eventi principalmente di grado lieve (grado 1 e 2 secondo NCI-CTCAE) di tipo gastrointestinali (nausea in 29 (26%) e 6 (5%) pazienti rispettivamente, diarrea in 16 (14%) e 3 (3%) rispettivamente, stomatite in 31 (28%) e 6 (5%) dei pazienti rispettivamente), astenia di grado 1 in 29 pazienti (26%) e grado 2 in 21 pazienti (19%) ed infine neurotossicità di grado 1 in 31 pazienti (28%) e di grado 2 in 25 pazienti (23%). Gli eventi di

grado 3, verificatisi raramente, sono relativi ad astenia in 4 pazienti (4%), neurotossicità in 6 pazienti (5%) e tossicità cutanea in 2 pazienti (2%).

Tabella 4. Tossicità del trattamento				
	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	G4 n (%)
<i>Ipertensione</i>	11 (10%)	12 (11%)	4 (4%)	-
<i>Sanguinamenti</i>	24 (22%)	-	-	-
<i>Eventi tromboembolici arteriosi/ venosi</i>	-	-	-	-
<i>Proteinuria</i>	5 (5%)	3 (3%)	1 (<1%)	
<i>Nausea</i>	29 (26%)	6 (5%)	-	-
<i>Vomito</i>	9 (8%)	-	-	-
<i>Mucosite</i>	31(28%)	6 (5%)		
<i>Diarrea</i>	16 (14%)	3 (3%)	-	-
<i>Astenia</i>	29 (26%)	21 (19%)	4 (4%)	-
<i>Neurotossicità</i>	31 (28%)	25 (23%)	6 (5%)	-
<i>Anoressia</i>	23 (21%)	6 (5%)	-	-
<i>Tossicità cutanea</i>	31 (28%)	5 (5%)	2 (2%)	-

6.3 Analisi univariate

Le analisi esplorative secondo il metodo di Kaplan-Meier ed il log-rank test sono state condotte per valutare l'impatto sulla PFS di variabili cliniche, patologiche e genotipiche. Come osserviamo nella tabella 5, sono risultate significativamente associate con la PFS nella nostra popolazione sia l'espressione dei recettori ormonali (HR 0.25, IC 95% 0.15- 0.44, $p < 0.0001$) che il trattamento di mantenimento con bevacizumab (0.42, IC 95% 0.26-0.68, $p=0.0003$), mentre il precedente trattamento chemioterapico adiuvante con taxani ha mostrato un trend di associazione con la PFS, con una riduzione non significativa del rischio di progressione nei pazienti non trattati con taxani (HR 0.61, IC 95% 0.37-1.01, $p=0.056$). Per quanto sia poco valutabile l'impatto di queste variabili

sull'OS, sulla base del ristretto numero di eventi osservati, abbiamo riscontrato un'associazione con l'OS per l'espressione dei recettori ormonali (HR 0.28, IC 95% 0.14-0.56, p=0.0003), il trattamento con bevacizumab di mantenimento (HR 0.19, IC 95% 0.1-0.38, p <0.0001), l'assenza di un precedente trattamento adiuvante chemioterapico (HR 0.42, IC 95% 0.20-0.87, p =0.02) e con taxani (HR 0.32, IC 95% 0.16-0.62, p=0.001), ma come specificato sopra, l'attendibilità dei risultati in termini di OS è limitata dal ristretto numero di eventi osservati (Appendice VI). Tra i polimorfismi di VEGF, VEGFR-2, IL8, HIF-1/2 α e TSP-1 analizzati, nessuno ha mostrato all'analisi univariata una significativa associazione con la PFS, ad eccezione di un trend in PFS per il genotipo EPAS1 a favore del genotipo AG rispetto al genotipo GG (HR 0.56, IC 95% 0.3-1.05, p=0.069) (Tabella 6). Alla luce dei risultati e della scarsa numerosità di eventi abbiamo scelto di non condurre le analisi di correlazione tra polimorfismi e OS. Infine dall'analisi non sono emerse associazioni particolarmente significative tra genotipo e risposta, con l'eccezione di deboli associazioni per alcune combinazioni alleliche degli SNPs di EPAS1, di TSP-1 e di VEGFR2-1192 (Appendice VII).

Tabella 5- Analisi univariata caratteristiche clinico-patologiche-PFS

Caratteristiche clinico-patologiche	N	PFS		
		HR	IC	p
PS	1	1		0,33
	0	0,72	(0,37-1,4)	
Recettori ormonali	Negativi	1		<0,0001
	Positivi	0,25	(0,15-0,44)	
DFI	<12 mesi	1		0,225
	\geq 12mesi	0,76	(0,49-1,19)	
Sedi mts	< 3	1		0,359
	\geq 3	0,82	(0,53-1,26)	
CT adiuvante	Si	1		0,406
	No	0,83	(0,53-1,29)	
Taxani adiuvante	Si	1		0,056
	No	0,61	(0,37-1,01)	
Bevacizumab mantenimento	No	1		0,0003
	Si	0,42	(0,26-0,68)	
Malattia viscerale	No	1		0,651
	Si	1,11	(0,7-1,78)	

Tabella 6- Analisi univariata SNPs –PFS

SNPs		HR	IC	p	N
VEGF -2578A/C	AA	1			14
	AC	1,72	(0,83-3,58)	0,144	55
	CC	1,25	(0,58-2,67)	0,569	33
VEGF-1498CT	CC	1			14
	CT	1,66	(0,8-3,44)	0,173	54
	TT	1,24	(0,58-2,65)	0,585	34
VEGF+936CT	CC	1			76
	CT	1	(0,57-1,74)	0,993	22
	TT	0,32	(0,07-1,34)	0,118	4
VEGFR_1192CT	CC	1			79
	CT	1,26	(0,73-2,17)	0,4	22
	TT	4,54	(0,6-34,41)	0,143	1
HIF1AαCT	CC	1			6
	CT	1,1	(0,41-2,91)	0,852	92
	TT	0,43	(0,08-2,39)	0,334	4
VEGFR_2 rs11133360	CC	1			20
	CT	1,12	(0,59-2,15)	0,726	49
	TT	1,48	(0,77-2,85)	0,244	33
VEGF-1154AG	AA	1			57
	AG	0,86	(0,54-1,38)	0,526	41
	GG	0,67	(0,16-2,82)	0,582	4
VEGFR-604AG	AA	1			23
	AG	0,67	(0,37-1,2)	0,174	48
	GG	0,75	(0,41-1,39)	0,362	31
TSP1 2278AG	AA	1			89
	AG	0,93	(0,46-1,91)	0,852	12
	GG	1,83	(0,25-13,62)	0,553	1
EPAS1 rs4145836	AA	0,31	(0,04-2,3)	0,255	2
	AG	0,56	(0,3-1,05)	0,069	21
	GG	1			79
VEGF rs699946	AA	1			54
	AG	1,02	(0,64-1,62)	0,935	44
	GG	0,65	(0,19-2,27)	0,502	4
VEGF-634CG	GG	1			36
	CG	0,98	(0,59-1,62)	0,941	54
	CC	0,53	(0,23-1,22)	0,137	12
VEGFR_1719AT	AA	1,22	(0,54-2,78)	0,635	8
	AT	1	(0,63-1,6)	0,992	42
	TT	1			52
IL8_251AT	AA	1			20
	AT	1,39	(0,71-2,72)	0,34	55
	TT	1,2	(0,57-2,54)	0,634	27

6.4 Analisi di interazione genetica

Tramite l'impiego del Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) software [versione 2.0 beta 6; <http://sourceforge.net/projects/mdr/>], è stata eseguita un'analisi di interazione che ha permesso di identificare alcune combinazioni di varianti geniche significativamente associate con la PFS, all'analisi univariata. In particolare si è osservato come alcune varianti alleliche dei polimorfismi di due geni, il VEGFR-2 rs11133360 CT e l' IL-8 -251AT, concorrano nel determinare un profilo genetico favorevole associato significativamente con la PFS. Secondo la nostra analisi il profilo genetico favorevole comprende la combinazioni VEGFR2 rs11133360 TT e IL8 -251 TT, la combinazioni VEGFR2 rs11133360 CC e IL8 -251 AA, e le combinazioni di IL8 -251 AT con VEGFR2 rs11133360 CT e AA e si presenta globalmente nel 55% dei pazienti (56/102) (Tabella 7). La PFS del sottogruppo con profilo genetico favorevole è risultata significativamente superiore rispetto alla restante popolazione [p=0.033, log rank test], con una PFS mediana rispettivamente di 14.0 mesi (IC 95% 11.7-16.3) e 10.9 mesi (IC 95% 9.4-12.4) (Fig.5). Per quanto sia attendibile ed informativa l'analisi relativa all'OS, limitata dal ristretto numero di eventi, questa non ha evidenziato alcuna associazione tra il profilo genetico favorevole individuato e l'OS (Fig.6).

Tabella 7 – Combinazioni di varianti alleliche degli SNPs VEGFR-2 rs11133360 C/T e IL8 rs4073 T/A comprese nel profilo favorevole individuato da MDR software.

VEGFR2 rs11133360	TT	IL-8 rs4073	TT
VEGFR2 rs11133360	CC	IL-8 rs4073	AA
VEGFR2 rs11133360	CT	IL-8 rs4073	AT
VEGFR2 rs11133360	AA	IL-8 rs4073	AT

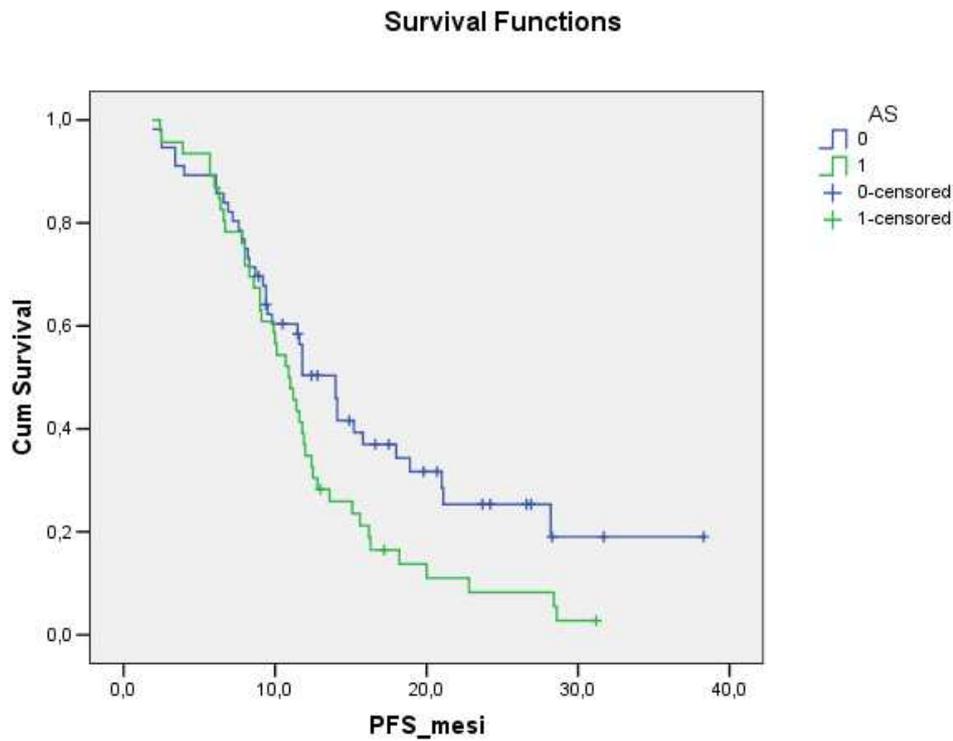


Fig. 5 Kaplan-Meier e Log-Rank Test per PFS: profilo genetico favorevole vs sfavorevole [VEGFR-2 rs11133360 CT / IL-8 -251AT] (AS 0=Profilo favorevole;AS 1= Profilo sfavorevole)

<i>Profilo interazione</i>	N	N Eventi	Censored	PFS mediana (mesi) [IC95%]	Log Rank (Mantel-Cox)
0 (favorevole)	56	38	18 (32.1%)	14.0 [11.7-16.3]	Chi-Square 4.535 p 0.033
1 (sfavorevole)	46	43	3 (6.5%)	10.9 [9.3-12.4]	
Totale	102	81	21 (20.6%)	11.6 [10.7-12.5]	

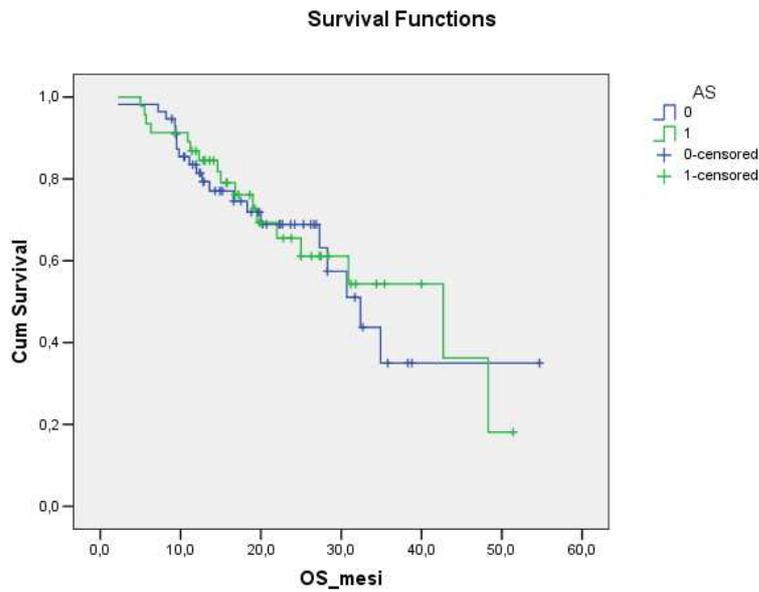


Fig. 6 Kaplan-Meier e Log-Rank Test per OS

Profilo genetico favorevole vs sfavorevole [VEGFR-2 rs11133360 CT / IL-8 -251AT]

(AS 0=Profilo favorevole; AS 1= Profilo sfaorevole)

VEGFR-2 rs11133360 CT / IL- 8 -251AT	N	N Eventi	Censored	OS mediana (mesi) [IC95%]	Log Rank (Mantel-Cox)
0 (favorevole)	56	20	36 (64.3%)	32.4 [25.9-38.9]	Chi-Square 0.072 p 0.788
1 (sfavorevole)	46	17	29 (63.0%)	42.7 [20.1-65.3]	
Totale	102	37	65 (63.7%)	32.4 [27.2-37.6]	

6.5 Analisi multivariata

L'analisi multivariata tramite il modello a rischi proporzionali di Cox, è stata condotta includendo i parametri clinico-biologici risultati più significativi all'analisi univariata. L'analisi ha evidenziato come l'espressione dei recettori ormonali ed il trattamento di mantenimento con bevacizumab mantengano un'associazione significativa con la PFS (rispettivamente HR 0.22, IC 95% 0.12-0.41, p<0.0001 e HR 0.42, IC 95% 0.25-0.71, p=0.001). E' emerso inoltre una significativa associazione tra DFI superiore a 12 mesi e PFS (HR 0.40, IC 95% 0.20-0.82, p=0.011). Per quanto riguarda l'impatto dei polimorfismi analizzati sull'outcome dei pazienti trattati con taxani e bevacizumab,

l'analisi multivariata ha mostrato un minore rischio di progressione nei genotipi EPAS-1 AG e AA rispetto al genotipo GG (HR 0.50, IC 95% 0.27-0.91, p=0.024) e confermato la significativa associazione tra il profilo genetico favorevole VEGFR2-IL8 individuato e la PFS, nella nostra casistica di pazienti trattate in prima linea con l'associazione di bevacizumab e taxani (HR di 0.63, IC 95% 0.4-0.99, p=0.046) (Tabella 8).

Tabella 8 – Analisi multivariata		PFS		
		HR	IC	P
Recettori Ormonali	Positivi	0,22	(0,12-0,41)	<0,0001
	Negativi	1		
DFI \geq 12mesi	si	0,4	(0,2-0,82)	0,011
	no	1		
CT adiuvante	si	1,84	(0,91-3,72)	0,088
	no	1		
Bevacizumab mantenimento	si	0,42	(0,25-0,71)	0,001
	no	1		
Profilo genetico favorevole	si	0,63	(0,4-0,99)	0,046
	no	1		
EPAS_1	AA+AG	0,5	(0,27-0,91)	0,024
	GG	1		

7 DISCUSSIONE

I risultati di studi clinici hanno ormai dimostrato come farmaci aventi come target elementi chiave della cascata di segnale che regola il processo di neoangiogenesi tumorale, siano efficaci nel trattamento di diverse neoplasie solide. Tre studi clinici randomizzati di fase III condotti in pazienti con carcinoma mammario metastatico, hanno dimostrato come l'associazione di Bevacizumab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), ad una chemioterapia di prima linea, determini un vantaggio in termini di sopravvivenza libera da progressione e di risposte obiettive rispetto alla sola chemioterapia, in assenza di un peggioramento clinicamente significativo della tossicità del trattamento, affermandosi come un'opzione di riferimento per il trattamento di questo setting di pazienti [56-58]. Tuttavia, l'eterogeneità di efficacia osservata nella pratica clinica, l'assenza di un dimostrato impatto sulla sopravvivenza globale, le potenziali tossicità del farmaco emerse soprattutto dall'impiego di bevacizumab nel contesto di altre neoplasie metastatiche, i costi del trattamento e la disponibilità di numerosi farmaci attivi nella malattia mammaria metastatica, costituiscono elementi di criticità sollevati a sfavore di questo approccio terapeutico da parte di molti clinici. L'identificazione e la validazione di marcatori predittivi di efficacia o resistenza in grado di selezionare i soggetti con maggiori possibilità di beneficiare del bevacizumab, permetterebbe un approccio terapeutico personalizzato sul paziente e un utilizzo più razionale delle risorse, con una vantaggiosa ottimizzazione del rapporto costo/efficacia del trattamento. Nonostante i numerosi studi preclinici e clinici effettuati, sia nel tumore mammario che in altre neoplasie, la disponibilità di biomarcatori predittivi di efficacia del bevacizumab rimane tuttavia una necessità irrisolta per il clinico. L'eterogeneità di risposta a un trattamento che ha come bersaglio un processo principalmente mediato dall'ospite, quale l'angiogenesi tumorale, potrebbe teoricamente essere dovuta ad una variabilità individuale dell'ospite geneticamente determinata, piuttosto che a mutazioni somatiche verificatesi nel tumore. In particolare, i polimorfismi (SNPs) di geni correlati alla neoangiogenesi e al meccanismo di azione di bevacizumab potrebbero, attraverso un'alterazione dei livelli di espressione o della funzione della proteina codificata, condizionare l'efficacia di bevacizumab e spiegare la variabilità individuale di risposta al trattamento, come ipotizzato da alcune analisi condotte [89,93,95,96,99-101]. Nel nostro

studio, condotto grazie alla cooperazione di 8 U.O. di Oncologia Medica italiane, abbiamo valutato retrospettivamente il significato predittivo/prognostico di alcuni polimorfismi germinali di VEGF già noti da precedenti analisi e di altri mediatori dell'angiogenesi come VEGFR2, IL-8, TSP-1, EPAS1 e HIF1 α , su una casistica di oltre cento pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico sottoposte ad un trattamento di prima linea con l'associazione di bevacizumab più paclitaxel, eseguendo le analisi sul DNA estratto da sangue periferico. I risultati di questo studio retrospettivo e privo di un braccio di controllo, pur non permettendo di trarre conclusioni definitive, suggeriscono alcune ipotesi meritevoli di valutazione in successivi studi. Nella nostra esperienza l'unico polimorfismo risultato associato con la PFS e la risposta obiettiva riguarda il gene EPAS1, in particolare lo SNP rs4145836, per cui è stata osservata all'analisi multivariata una riduzione del 50% del rischio di progressione nei pazienti portatori della variante allelica A (genotipi AA e AG, presenti in un quinto dei pazienti nella popolazione in studio) rispetto ai soggetti omozigoti GG. EPAS-1 o HIF-2 α , è una delle subunità di HIF (*Hypoxia - Inducible transcription Factor*), fattore di trascrizione indotto dall'ipossia e coinvolto nella regolazione dell'espressione di diversi geni a livello endoteliale, tra cui VEGF e i suoi recettori VEGFR-2 e VEGFR-1 [47]. I risultati di precedenti studi condotti con metodiche immunohistochimiche su campioni di tessuto tumorale mammario e pancreatico dimostrano come l'espressione di EPAS1 correli con la densità vascolare e l'espressione di VEGF all'interno del tumore, suggerendo quindi il possibile ruolo di EPAS-1 sulla regolazione del processo di neoangiogenesi tumorale [48,49]. Sulla base di questi risultati, è in corso un'analisi su campioni di tessuto tumorale per valutare possibili differenze in parametri come la densità vascolare o il grado di vascolarizzazione intratumorale, tra i genotipi EPAS1 con variante allelica A (AA/AG) e il genotipo GG, con l'obiettivo di formulare ipotesi biologiche su eventuali correlazioni tra gli SNPs di VEGF ed il fenotipo angiogenetico. L'associazione tra il genotipo EPAS1 (variante allelica A) e miglior outcome in termini di PFS osservata nella nostra analisi sembra confermare quanto riportato da Lambrechts e coll, dove su un'analisi condotta su un'ampia casistica di oltre 1300 campioni di DNA germinale di pazienti con malattia avanzata trattati in prima linea con bevacizumab o placebo in cinque studi randomizzati, veniva riportata una significativa associazione tra la PFS e lo SNP rs4145836 in EPAS1, indipendentemente dal trattamento, sia in

pazienti trattati con bevacizumab che con placebo, mostrandosi come un possibile biomarcatore prognostico [99]. Con l'eccezione di EPAS_1, nessuno dei polimorfismi analizzati ha mostrato individualmente una significativa associazione con la PFS, end point primario del nostro studio, come dimostra l'analisi univariata. Quanto osservato nella nostra analisi sembra quindi confermare quanto già riportato in altri studi, ovvero l'assenza di significative associazioni tra singoli polimorfismi di geni coinvolti nell'angiogenesi ed efficacia di bevacizumab, nell'ambito di diverse patologie neoplastiche. Tra questi ricordiamo i risultati dell'analisi di Miles e coll. condotta su oltre 300 pazienti con carcinoma mammario metastatico e sottoposte ad un trattamento con docetaxel associato o meno a bevacizumab (studio AVADO) [94], gli studi condotti da Loupakis e coll. [97] e da Pander e coll. [98] in pazienti con carcinoma del colon metastatico trattati, rispettivamente, con l'associazione FOLFOXIRI-bevacizumab nello studio GONO di fase II e CAPOX-bevacizumab, e quelli di Smerdel e coll. in pazienti con diagnosi di carcinoma ovarico refrattario in trattamento con bevacizumab [105]. Alla luce della negatività dei dati di associazione tra singoli SNPs ed outcome, abbiamo deciso di condurre un'analisi di interazione genetica, secondo quanto già suggerito dallo studio di Pander su 279 pazienti con carcinoma del colon metastatico trattati con la combinazione di capecitabina, oxaliplatino e bevacizumab, da cui emergeva un profilo genetico di interazione tra TYMS enhancer regione e VEGF +405 G/C significativamente associato con la PFS, in assenza di significative associazioni tra singoli polimorfismi ed outcome [98]. I risultati della nostra analisi, sembrano suggerire la possibilità che, non singole mutazioni puntiformi di singoli geni, bensì un'associazione tra SNPs di più geni possa predire la risposta al Bevacizumab, come riportato nell'analisi multivariata condotta. In particolare tramite l'utilizzo di un software dedicato (MDR software) è stato osservato come l'interazione tra alcune varianti alleliche dei polimorfismi VEGFR-2 rs1113360 C/T e IL8 rs4073 T/A, siano in grado di identificare un sottogruppo di pazienti con una PFS significativamente maggiore (profilo genetico favorevole) rispetto ai restanti pazienti (profilo genetico sfavorevole). Sebbene la natura retrospettiva e l'assenza di un braccio di controllo non permettano di trarre conclusioni definitive né di distinguere la potenzialità prognostica/predittiva del profilo genetico individuato, l'ipotesi che polimorfismi di geni diversi e più varianti alleliche di questi polimorfismi interagiscano tra loro, identificando un profilo genetico in grado di influenzare

l'efficacia del trattamento, è a nostro avviso un'ipotesi nuova per quanto riguarda l'individuazione di eventuali biomarcatori predittivi di risposta al bevacizumab in questo setting di pazienti. Infatti essendo l'angiogenesi un processo complesso, influenzato dall'equilibrio di numerosi fattori pro- ed anti-angiogenetici, da complessi meccanismi di regolazione dell'espressione genica dei vari mediatori coinvolti, da numerose cascate di segnale attivate all'interno della cellula endoteliale in risposta agli stimoli proangiogenetici e da una complessa interazione tra microambiente e tumore, è ragionevole pensare che la risposta al bevacizumab possa essere influenzata da un'interazione tra più geni che non essere il risultato dell'interazione tra un singolo SNP e il farmaco. Ovvero, è biologicamente più verosimile che sia l'interazione tra più varianti geniche a influenzare il fenotipo angiogenetico e la risposta a farmaci antiangiogenetici come bevacizumab. Il profilo genetico favorevole associato significativamente con la PFS nella nostra analisi, è stato osservato tra gli SNPs VEGFR-2 rs1113360 C/T e IL8 rs4073 T/A, ed è presente in oltre il 50% della nostra popolazione. Per quanto riguarda questi polimorfismi, lo SNP intronico di VEGFR-2 rs1113360 C/T aveva mostrato nell'analisi di Lambrechts un'associazione con la sopravvivenza libera da progressione nei pazienti trattati con bevacizumab ma non in quelli che ricevevano placebo [99], mentre Schultheis AM. e coll avevano osservato un'associazione tra IL8 rs4073 (IL8 -251 A/T) e l'attività del bevacizumab in termini di risposte obiettive su pazienti con carcinoma ovarico trattati con ciclofosfamide metronomica e bevacizumab, seppur con il limite dell'assenza di un braccio di controllo e della scarsa numerosità del campione [100]. Il fatto che almeno uno dei polimorfismi del profilo genetico individuato riguardi un elemento chiave della cascata angiogenetica VEGF-dipendente e che abbia mostrato una potenzialità predittiva e non prognostica in un precedente lavoro, potrebbe far ipotizzare, un possibile significato predittivo del profilo genetico individuato nella nostra analisi. Le analisi di genotipizzazione sul DNA tumorale previste, ad oggi non ancora disponibili, verranno condotte per confermare quanto già descritto in precedenti lavori di come i polimorfismi siano la risultante di una variabile genetica costituzionale del paziente, o alternativamente per identificare eventuali discordanze tra tessuto normale e tumore, come descritto in un case report da noi pubblicato [91,92]. Inoltre, alla luce dei risultati ottenuti, le analisi condotte sul tessuto tumorale serviranno per individuare possibili differenze tra i campioni dei pazienti con

profilo biologico favorevole e i campioni dei pazienti con il profilo sfavorevole, sempre con l'obiettivo di formulare ipotesi biologiche sulle differenze tra questi due profili. Inoltre vale la pena sottolineare come nella nostra casistica l'associazione di bevacizumab e paclitaxel abbia mostrato una PFS mediana in linea con i dati emersi dai principali studi randomizzati e soprattutto un buon profilo di tollerabilità, confermandosi come una ragionevole opzione per il trattamento di prima linea di pazienti con carcinoma mammario metastatico. Inoltre sia l'analisi univariata che multivariata mostrano come il trattamento di mantenimento con bevacizumab impatti in modo significativo sull'outcome delle pazienti, costituendo un'ulteriore rassicurazione sull'appropriatezza del proseguimento di bevacizumab nei pazienti non progrediti al momento dell'interruzione della chemioterapia, una scelta largamente impiegata nella pratica clinica seppur in assenza di evidenze da studi randomizzati. Questi dati confermano inoltre quanto già emerso in un'analisi esploratoria dello studio osservazionale ATHENA che suggeriva come il mantenimento fosse una strategia sicura in grado di assicurare un controllo di malattia a lungo termine, con valori di TTP mediano rispettivamente di 11.6 mesi e 6.7 mesi rispettivamente, e di OS mediana di 30 mesi e 18.4 mesi rispettivamente, nei pazienti che ricevevano un mantenimento con bevacizumab e in quelli in cui il bevacizumab veniva sospeso prima o al momento dell'interruzione della chemioterapia [59].

In conclusione questa analisi retrospettiva suggerisce una possibile interazione tra IL8 e VEGFR2 in un profilo genetico costituito da più profili allelici associati significativamente ad una migliore PFS, potenzialmente in grado di identificare un sottogruppo di pazienti con un miglior outcome o maggiori possibilità di beneficiare di un trattamento con bevacizumab. L'assenza di un gruppo di controllo non permette di distinguere l'eventuale potenziale predittivo o prognostico del profilo genetico individuato e trattandosi di uno studio pilota, i risultati sono comunque da intendersi come assolutamente preliminari. Abbiamo pertanto intenzione di condurre uno studio prospettico su pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatiche sottoposte ad un trattamento di prima linea con bevacizumab e paclitaxel per confermare o meno i dati generati da questa analisi ovvero l'impatto dell'interazione genetica in termini di riduzione del rischio di ripresa di malattia. Se altri studi confermassero questi risultati potremmo selezionare un sottogruppo di pazienti in grado di beneficiare maggiormente di un trattamento di prima linea con bevacizumab, così da ottimizzare

l'utilizzo delle risorse con importanti risvolti clinici ed economici; se venisse inoltre confermata l'incidenza dell'interazione osservata nella nostra analisi (oltre il 50% della popolazione studiata), la ricaduta clinica del dato potrebbe essere ancora più rilevante. Infine se i risultati venissero confermati, l'analisi di interazione genetica potrebbe risultare un approccio più razionale, rispetto all'analisi di polimorfismi individuali, per la selezione di pazienti da sottoporre a trattamenti potenzialmente tossici e costosi, data la complessità dei meccanismi che sostengono l'angiogenesi e la risposta ai farmaci antiangiogenetici.

8 BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.aiom.it/Attivit%20Scientifica/Linee+guida/Neoplasie+della+mammella>
2. Cardoso F, Fallowfield L, Costa A et al. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 (suppl 5): v15–19.
3. Saad ED et al. Overall survival and post-progression survival in advanced breast cancer: a review of recent randomized clinical trials. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1958–62.
4. 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.
5. Jones SE. Considerations in treatment choice for metastatic breast cancer. *Breast Cancer* 2008; 15: 35–39.
6. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *N Eng J Med* 2001;344:783-92.
7. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D et al. Efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer given as first-line treatment: Results of a randomized phase II trial by the M77001 Study Group . *J Clin Oncol* 2005; 23 (19): 4265-74.
8. Burstein HJ, Chen YH, Parker LM. et al. Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:2722-2730.
9. 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.
10. Pegram, MD, Konecny GE, O'Callaghan. Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer, *J. Natl Cancer Inst*. 2004;96: 739-49.
11. 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* 1998;17: 2235-49.
12. Mannonci 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;96(3):385-91.

13. 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
14. 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.
15. Cameron D, Casey M, Oliva C, et al. Lapatinib plus capecitabine in women with HER-2-positive advanced breast cancer: final survival analysis of a phase III randomized trial. *Oncologist* 2010;15(9):924-34.
16. 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* 2008; 5:531-42.
17. 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* 2009; 27:5529-37.
18. 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 2009;5538-46.
19. Klijn JG, Blamey R, Boccardo F et al. Combined Hormone Agents Trialists' Group and the European Organization for Research and Treatment of Cancer: Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a metaanalysis of four randomized trials. *J Clin Oncol* 19: 343-353, 2001
20. Bonneterre J, Buzdar A, Nabholz JM, et al. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy in hormone receptor positive advanced breast carcinoma. *Cancer* 2001;92(9):2247–58.
21. Paridaens R, Dirix L, Beex L et al. Phase III study comparing exemestane with tamoxifen as first-line hormonal treatment of metastatic breast cancer in postmenopausal women: the European organization for research and treatment of cancer breast cancer cooperative group. *J Clin Oncol* 2008;26(30):4883–9.
22. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y et al. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the international letrozole breast cancer group. *J Clin Oncol* 2003;21(11):2101–9.
23. Osborne CK, Pippin J, Jones SE, et al. Double blind, randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: Results of a North American trial. *J Clin Oncol* 2002; 20:3386-3395.

24. Howell A, Robertson JFR, Albano JQ, et al. Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol* 2002; 20:3396-3403.
25. Chia S, Gradishar W, Mauriac L et al. Double-blind, randomized placebo controlled trial of fulvestrant compared with exemestane after prior nonsteroidal aromatase inhibitor therapy in postmenopausal women with hormone receptor positive, advanced breast cancer: results from EFACT. *J Clin Oncol*. 2008;26:1664-70
26. Robertson JF, Llombart-Cussac A, Rolski J et al. Activity of fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg as first-line treatment for advanced breast cancer: results from the FIRST study. *J Clin Oncol* 2009;27:4530–5.
27. Angelo Di Leo, Guy Jerusalem, Lubos Petruzelka et al. Results of the CONFIRM Phase III Trial Comparing Fulvestrant 250 mg With Fulvestrant 500 mg in Postmenopausal Women With Estrogen Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol* 28:4594-4600.
28. Carrick S et al. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 18:CD003372, 2005.
29. Sledge GW, Neuberg D, Bernardo P et al. Phase III trial of doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer. An intergroup trial (E1193). *JCO* 2003, 21:588-92.
30. Bria E, Giannarelli D, Felici A. et al. Taxanes with anthracyclines as first line chemotherapy for metastatic breast cancer. Pooled analyses of 2805 patients. *Cancer* 2005; 103: 672-679.
31. O’Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S et al. Result of a large phase III trial of Xeloda/Taxotere combination therapy versus taxotere monotherapy in metastatic breast cancer patients. *J. Clin Oncol*. 2002; 20: 2812-2823.
32. Albain KS, Nag SM, Calderillo G et al. Gemcitabine plus paclitaxel versus paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment : final results of a global phase III study. *J Clin Oncol* 2008 ; 26:3950-3957.
33. Chan S, Romieu G, Huober J et al. Phase III Study of Gemcitabine Plus Docetaxel Compared With Capecitabine Plus Docetaxel for Anthracycline-Pretreated Patients With Metastatic Breast Cancer. *JCO* 2009;27(11):1753-60.
34. Piccart-Gebhart Mj, Burzykowski T, Buyse M et al. Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1980-1986.
35. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-15.
36. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Onc* 2004; 23: 1-17.

37. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1999; 86: 353-64.
38. Ferrara N., Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol Rev* 1997; 18:4-25.
39. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-49.
40. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 2003; 101, 4878-4886.
41. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al. VEGFR-1 positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 432, 820-827.
42. Bachelder RE, Crago A, Chung J et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61, 5763-5740.
43. Kim KJ, Li B, Winer J et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993; 362:841-844.
44. Klement G, Baruchel S, Rak J et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000;105: R15-R24.
45. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 26: 25-35, 2001.
46. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine* 2003;9, 677 – 684.
47. Takeda N, Maemura K, Imai Y et al. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res* 2004; 95(2):146-153
48. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A et al. Hypoxia inducible factor 2 alpha (HIF 2 alpha) induces angiogenesis in breast carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 78-82.
49. ZHU Dong-ming, Li DC, Zhang ZX et al. Effect of endothelial PAS domain protein 1 and hypoxia inducible factor 1 α on vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic carcinoma. *Chin Med J* 2008;121(22):2258-2264.
50. Bernards C et al. *J Clin Oncol* 2010;28:15s (suppl; abstr 10519)
51. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438:967-974.
52. Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001; 2:667-673.
53. Ferrara N., Hillan KJ, Gerber HP et al. Discovery and development of Bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2001;3: 391-400.

54. Cobleigh M, Miller K, Langmuir V et al. Phase II dose escalation trial of Avastin (bevacizumab) in women with previously treated metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001;69:301.
55. Miller KD, Chap LI, Holmes FA et al. Randomized phase III of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients previously treated metastatic breast cancer, *JCO* 2005; 23:792-799.
56. Miller K, Wang M, Gralow J et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone in metastatic breast cancer. *NEJM* 2007;357:2666-2676.
57. Miles DW, Chan A, Dirix Ly et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first line treatment of human epidermal growth factor receptor 2 negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 28, 3239-3247, 2010.
58. Robert NJ et al. RIBBON-1: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab for First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative, Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:1252-60.
59. Smith I et al. Final overall survival results and effect of prolonged (≥ 1 year) first-line bevacizumab-containing therapy for metastatic breast cancer in the ATHENA trial. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130 (1): 133-143.
60. Brufsky AM, Hurvitz S, Perez E et al. RIBBON-2: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Bevacizumab in Combination With Chemotherapy for Second-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2011, 29:4286-93.
61. www.clinicaltrials.gov-. A Study of Avastin (Bevacizumab) in Combination With Chemotherapy in Patients With Breast Cancer Progressing After First-Line Therapy With Avastin and Chemotherapy (TANIA) - NCTC01250379 .
62. Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362:841-844, 1993.
63. Broglio KR , Berry DA et al. Detecting an Overall Survival Benefit that Is Derived From Progression-Free Survival. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:1642–1649.
64. O'Shaughnessy et al. A meta-analysis of overall survival data from three randomized trials of bevacizumab (BV) and first-line chemotherapy as treatment for patients with metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol* 28:15s, 2010 (suppl; abstr 1005).
65. Hanan D and Berghers G. Models of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Rev Cancer* 2008;8: 592-603.
66. Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W et al. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:217-227.

67. Ince WL, Jubb AM, Holden SN, et al. Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:981-989.
68. Burstein H, Chen YH, Parker LM et al. VEGF as a marker for outcome among advanced breast cancer patients receiving anti-VEGF therapy with bevacizumab and vinorelbine chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:7871-7877.
69. Bidard FC, Mathiot C, Degeorger A et al. Clinical value of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy. *Ann Oncol* 2010, 21:1765-1771.
70. Della Pasqua S, Bertolini F, Baganardi V et al. Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer. *JCO* 2008, 26:4899-905.
71. Calleri A, Bono A, Bagnardi V et al. Predictive potential of angiogenic growth factors and circulating endothelial cells in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy plus bevacizumab *Clin Cancer Res* 2009, 15: 7652-57.
72. Bernards C et al. *J Clin Oncol* 2010; 28: 15s (suppl) (abs 10519)
73. Miles DW et al. *Cancer Res* 2010; 70 (24S):558 (abs P2-16-04)
74. Van Cutsem E et al. *Proc ECCO-ESMO* 2011 (abstr 803).
75. Shah Ma et al. *Proc ECCO-ESMO* 2011 (abstr 1415)
76. Jayson G et al. *Proc ECCO-ESMO* 2011 (abstr 804).
77. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (1), 260-264.
78. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A et al. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenetic activity in non small cell lung cancer. *Lung cancer* 2004; 46 (3), 293-298.
79. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer* 2003; 106: 468–71.
80. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000; 37: 443–8.
81. Zhai R, Gong MN, Zhou W et al. Genotypes and haplotypes of the VEGF gene are associated with higher mortality and lower VEGF plasma levels in patients with ARDS. *Thorax* 2007; 62:718–22.
82. Watson CJ, Webb Nj, Bottomley Mj et al. Identification of polymorphism within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000; 12 (8), 1232-1235.
83. Ferrante M, Pierik M, Henckaerts L et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis* 2006; 12 (9), 870-878.

84. Schneider BP, Radovich M., Sledge DW et al. Association of polymorphism of angiogenesis genes with breast cancer, *Breast Cancer Res Treat* 2008; 11:157-163.
85. Jacobs EJ, Feigelson HS, Bain EB et al. Polymorphism in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in the cancer prevention study II cohort, *Breast Cancer Res* 2006, 8: R22.
86. Mc Carron SL, Edwards S, Evans PR et al. Influence of cytokine gene polymorphism on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62 (12), 3369-3372.
87. Sfar S, Hassen E, Saad H et al. Association of VEGF genetic polymorphism with prostate carcinoma risk and clinical out come. *Cytokine* 2006;35 (1-2), 21-28.
88. Kataoka N, Cai Q, Wen W et al. Population-based case-control study of VEGF gene polymorphism and breast cancer risk among chinese women, *Cancer epidemiol Biomarkers Prev* 2006, 15: 1148-52.
89. Schneider BP, Radovich M, Wang M et al. Association of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Genetic Polymorphisms With Outcome in a Trial of Paclitaxel Compared With Paclitaxel Plus Bevacizumab in Advanced Breast Cancer: ECOG 2100, *JCO* 2008, 26:4672-4678
90. Sun M et al. *J Clin Oncol* 2011; 29 (suppl; abs e13560).
91. Schneider BP, Skaar DG, Sledge DW et al. Analysis of angiogenesis genes from paraffin-embedded breast tumor and lymph nodes. *Breast Cancer Res Treat* 96:209-215, 2006.
92. Coltelli L., Allegrini G, Orlandi P et al. Discordant somatic and germline VEGF-A genotype in a cancer patient resistant to paclitaxel/bevacizumab with chemosensitive hepatic metastasis. *Pharmacogenomics* , 2009 10(8), 1225-29.
93. Grimaldi M-CE, Formento P, Degeorges A et al. *British journal of clinical pharmacology* 2011; 71, issue 6, 921-28.
94. Miles DW et al. Polymorphism analysis in the AVADO randomized phase III trial of first-line bevacizumab combined with docetaxelin HER2- negative metastatic breast cancer. *Proc ECCO-ESMO 2011 (Abs 1423)*
95. Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L et al. Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer *BMC Cancer* 2011, 11:247
96. Koutras A et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy and bevacizumab in the first-line setting. *J Clin Oncol* 2010, 28:15s:(suppl; abstr 358)
97. Loupakis F, Cremolini C, Fioravanti A et al. Pharmacodynamic and pharmacogenetic angiogenesis-related markers of first-line FOLFOXIRI plus bevacizumab schedule in metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 104(8), 1262–1269 (2011).
98. Pander J, Wessels JA, Gelderblom H et al. Pharmacogenetic interaction analysis for the efficacy of systemic treatment in metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 22(5), 1147–1153 (2011).

99. Lambrechts DP et al. Proc ECCO-ESMO 2011 (abs 1414).
100. Schultheis AM, Lurye G, Rhodhes KE et al. Polymorphism and clinical outcome in recurrent ovarian cancer treated with Cyclophosphamide and bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7554-7563.
101. Lambrechts DP et al. VEGFR-1 polymorphisms as potential predictors of clinical outcome in bevacizumab treated patients with metastatic pancreatic cancer. *Eur J Cancer Suppl*; 7: 10, 2009 (Abs 16LBA).
102. Ren B, Yee KO, Lawler J et al. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta* 2006;1765:178-88
103. Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD et al. Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 2000;6:2941-50
104. Brostjan C, Gebhardt K, Guenberger B et al. Neoadjuvant Treatment of Colorectal Cancer with Bevacizumab: The Perioperative Angiogenic Balance Is Sensitive to Systemic Thrombospondin-1 Levels. *Clin Cancer Res* 2008; 14:2065-2074
105. Smerdel MP, Steffensen KD, Waldstrom M et al. The predictive value of serum VEGF in multiresistant ovarian cancer patients treated with bevacizumab. *Gynecol Oncol* 2010; 118 (2):167-71.

9 APPENDICI

APPENDICE I Criteri RECIST per la valutazione della risposta (v 1.1)

R.response E.valuation C.criteri in S.olid T.umors (sintesi)

Elegibilità

• Negli studi dove l'obiettivo primario è la progressione tumorale, il protocollo deve specificare se l'arruolamento è ristretto ai pazienti con malattia misurabile (almeno una lesione misurabile) o se possono essere inseriti anche quelli con solo malattia non misurabile, alla valutazione basale (Recist 1.0 Solo pazienti con malattia misurabile al momento della valutazione basale dovrebbero essere inseriti in protocolli in cui l'obiettivo primario è la valutazione della risposta obiettiva del tumore).

- **Malattia misurabile:** si ha quando è presente almeno una lesione misurabile. Se la malattia misurabile è ristretta ad una lesione solitaria, la sua natura neoplastica dovrebbe essere confermata con una indagine istologica/citologica.
- **Lesioni misurabili:** lesioni misurabili in almeno una dimensione (registrare diametro maggiore), il cui diametro maggiore sia ≥ 20 mm se valutate con le metodiche radiologiche tradizionali o ≥ 10 mm se valutate con la TAC spirale o RMN.
- **Lesioni non-misurabili:** sono tutte le lesioni che non rientrano nel criterio di definizione per le lesioni misurabili, lesioni scheletriche, lesioni meninge, ascite, versamento pleurico, versamento pericardico, carcinoma infiammatorio della mammella, linfangite carcinomatosa (cutanea o polmonare), masse addominali/organomegalia addominale identificata all'esame fisico che non è misurabile secondo metodiche riproducibili di imaging

- I linfonodi sono considerati normali se diametro minore < 10 mm, misurabili se diametro minore ≥ 15 mm e non misurabili se diametro minore compreso tra 10 e 15 mm (TC spirale)

- Possono essere considerate misurabili, lesioni scheletriche litiche con identificabile componente di tessuti molli, valutate alla TC o RMN, se la componente di tessuti molli rientra nei criteri di misurabilità sopra citati. (Lesioni osteoblastiche non sono misurabili)

- Lesioni cistiche semplici non dovrebbero essere considerate maligne. Lesioni "cistiche" complesse, radiologicamente indeterminabili, dovrebbero essere considerate lesioni non misurabili. Lesioni cistiche riferibili a metastasi possono essere considerate come lesioni misurabili, se rientrano nei criteri di misurabilità sopracitati. Comunque, se presenti nello stesso paziente lesioni non cistiche, è preferibile selezionare quest'ultime per la valutazione della risposta.

- La valutazione delle lesioni deve essere effettuata utilizzando regoli o calibri e le misurazioni devono essere riportate utilizzando il sistema metrico decimale.
- La valutazione basale delle dimensioni di una lesione deve essere fatta entro 4 settimane dall'inizio del trattamento chemioterapico.

- Le lesioni dovrebbero essere sempre valutate con la stessa metodica diagnostica durante tutto il trattamento.
- Le lesioni apprezzabili all'esame clinico sono considerate misurabili solo se superficiali (ad es. noduli cutanei e linfonodi palpabili). In caso di lesioni cutanee si raccomanda di allegare documentazione fotografica con scala metrica che permetta una stima del diametro della lesione.

Metodi di Misurazione

- TC e RMN sono attualmente le migliori metodiche disponibili e riproducibili per misurare le lesioni target selezionate per la valutazione della risposta. TC convenzionale e RMN dovrebbero essere effettuate con scansioni contigue < 10 mm. La TC spirale dovrebbe essere eseguita utilizzando un algoritmo di ricostruzione contigua a 5 mm. Queste indicazioni si applicano a tumori del torace, dell'addome e della pelvi. I tumori del distretto testa/collo e quelli delle estremità richiedono di solito specifici protocolli.
- Le lesioni valutate con Rx torace sono accettabili come lesioni misurabili quando sono chiaramente definite e circondate da parenchima polmonare aerato. Comunque la TC è preferibile.
- Quando l'endpoint primario dello studio è la valutazione della risposta obiettiva, l'ecografia non dovrebbe essere utilizzata per misurare le lesioni tumorali. Può comunque essere una possibile alternativa alle misurazioni cliniche di linfonodi palpabili e superficiali, lesioni sottocutanee e noduli tiroidei. L'ecografia può essere utile per confermare la scomparsa completa di lesioni superficiali valutate solitamente con l'esame clinico.

L'utilizzo di endoscopia e laparoscopia per la valutazione obiettiva di lesioni tumorali non è stata ancora convalidata pienamente ed estesamente. I loro usi in questo specifico contesto richiedono attrezzatura sofisticata ed un livello alto di esperienza che può essere solamente disponibile in alcuni centri. Perciò, l'utilizzo di tali tecniche per la valutazione obiettiva della risposta tumorale dovrebbe essere ristretta a scopi di conferma in centri specializzati.

Comunque, tali tecniche possono essere utili per confermare una risposta completa patologica con biopsie.

I marcatori tumorali non possono essere usati da soli per valutare la risposta. Se i marcatori sono inizialmente superiori al limite di normalità devono normalizzare perché un paziente possa essere considerato in risposta clinica completa quando tutte le lesioni siano scomparse.

La valutazione citologica ed istologica in alcuni casi possono essere usate per distinguere una RP da una RC.

Valutazione Basale: lesioni Target e non Target

Tutte le lesioni misurabili fino ad un totale di 5 (2 per ogni organo), rappresentative di tutti gli organi interessati dalla malattia, vengono identificate come lesioni "target" e quindi registrate e misurate nel corso della valutazione basale.

Le lesioni "target" devono essere selezionate in base alla dimensione del diametro maggiore (privilegiare le lesioni con diametro più lungo) e alla possibilità di poterle rivalutare nel corso del trattamento (con tecniche di immagine o clinicamente).

La somma dei diametri maggiori di *tutte le lesioni target* deve essere calcolata e registrata al momento della valutazione basale ed utilizzata in seguito come riferimento per la valutazione della risposta obiettiva del tumore.

- Tutte le altre lesioni (o sedi di malattia) dovrebbero essere definite come lesioni “non target” e possono essere registrate. La misurazione non è necessaria, ma la presenza o scomparsa può essere valutata nel corso del follow up. È possibile registrare un coinvolgimento di multiple lesioni non target in un organo come unica entità (es. “multiple linfadenopatie addominali” o “multiple lesioni epatiche”)

Valutazione delle lesioni Target

Risposta Completa (RC)	si osserva la scomparsa di tutte le lesioni “ <i>target</i> ”. Qualsiasi linfonodo patologico deve arrivare ad un diametro minore < 10 mm.
Risposta Parziale (RP)	si osserva una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “ <i>target</i> ” prendendo come riferimento la somma dei diametri maggiori calcolata al momento della valutazione basale
Progressione (PD)	si osserva un aumento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “ <i>target</i> ”, prendendo come riferimento la somma più piccola dei diametri maggiori (SLD) osservata dall’inizio del trattamento, e un aumento assoluto di almeno 5 mm nella SLD; oppure si osserva la comparsa di una o più nuove lesioni
Stabilità (SD)	non si osserva né una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “ <i>target</i> ” né un aumento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “ <i>target</i> ”

Valutazione delle lesioni Non-Target

Risposta Completa (RC)	si osserva la scomparsa di tutte le lesioni “ <i>non target</i> ” e la normalizzazione dei livelli sierici dei markers tumorali. Tutti i linfonodi devono avere dimensioni normali (diametro minore < 10 mm)
Non RC- Non PD	rimangono una o più lesioni “ <i>non target</i> ” e/o i livelli sierici dei markers tumorali restano sopra i valori normali
Progressione (PD)	si osservano una o più nuove lesioni e/o un inequivocabile progressione delle pre-esistenti lesioni “ <i>non target</i> ”

Tutte le lesioni target registrate al basale devono essere registrate nelle successive valutazioni, anche se molto piccolo. Per lesioni target che diventano non misurabili con precisione dal radiologo, si assume un valore default di 5 mm.

Valutazione della migliore risposta globale

La migliore risposta globale è la migliore risposta osservata dall'inizio del trattamento fino a quando non si ha progressione o ripresa della malattia (prendendo come riferimento la somma più piccola dei diametri maggiori osservata dall'inizio del trattamento).

Lesioni target	Lesioni non target	Nuove lesioni	Risposta globale
RC	RC	NO	RC
RC	SD	NO	RP
RP	Non PD o NE (not evaluable)	NO	RP
RC	NE	NO	RP
SD	Non PD o NE	NO	SD
PD	Qualsiasi risposta	SI-NO	PD
Qualsiasi risposta	PD	SI-NO	PD
Qualsiasi risposta	Qualsiasi risposta	SI	PD

Per i soggetti senza malattia misurabile

Non-target New Overall Response

CR	No	CR
Non-CR / non-PD	No	Non-CR / non-PD
Not all evaluated	No	NE
Unequivocal PD	Yes or No	PD Any Yes PD

- I pazienti che a causa di peggioramento globale dello status di salute devono interrompere il trattamento senza che si osservi l'evidenza obiettiva di una progressione di malattia dovrebbero essere classificati come pazienti con "deterioramento sintomatico" e dovrà essere fatto ogni sforzo per documentarne la progressione dopo la sospensione del trattamento
- In alcune circostanze può essere difficile distinguere la malattia residua dal tessuto sano. Pertanto quando la valutazione della risposta completa dipende da questa determinazione si raccomanda di indagare la lesione residua con agoaspirato o biopsia per confermare la risposta completa.

Conferma

- L'obiettivo principale della conferma della risposta obiettiva è quello di evitare un sovrastima della percentuale di risposte osservate. Nel caso in cui non sia possibile confermare la risposta ciò deve essere chiaramente riportato nei risultati dello studio.
- La risposta parziale (PR) o completa (CR) devono essere confermate eseguendo una rivalutazione delle lesioni non prima di 4 settimane dopo la prima osservazione. Intervalli superiori, se previsti dal protocollo dello studio, possono essere ugualmente appropriati.
- Nel caso di SD questa deve essere confermata almeno in una successiva misurazione da eseguire dopo l'intervallo minimo previsto nel protocollo dello studio (generalmente, non inferiore a 6-8 settimane).

Durata della risposta globale

- La durata della risposta globale è misurata dal momento in cui i criteri di misurazione consentono di definire una RC o RP fino alla prima data in cui sia documentata obiettivamente ripresa di malattia o PD, prendendo come riferimento per la definizione della PD le più piccole misurazioni registrate dall'inizio del trattamento.

Durata della stabilità di malattia

- La SD è misurata dall'inizio del trattamento fino a quando i criteri di misurazione permettano di definire una PD prendendo come riferimento le più piccole misurazioni registrate dall'inizio del trattamento.
- L'importanza clinica della durata di una SD può essere diversa per differenti tipi di tumore. E' pertanto di fondamentale importanza che il protocollo specifichi il minimo intervallo di tempo richiesto tra due misurazioni per la determinazione di una SD. Questo intervallo di tempo dovrebbe prendere in considerazione l'aspettato beneficio clinico che tale status può portare alla popolazione in studio.

Revisione delle risposte

- Per studi in cui l'obiettivo primario sia la percentuale di risposte si raccomanda fortemente che tutte le risposte siano verificate e confermate da uno o più esperti indipendenti al momento del completamento dello studio. La revisione simultanea delle cartelle dei pazienti ed delle immagini radiologiche è l'approccio migliore.

Presentazione dei risultati

- Tutti i pazienti inseriti nello studio devono essere valutati per la risposta al trattamento, anche se si siano verificate violazioni importanti del protocollo o se il paziente sia risultato inleggibile. Ciascun paziente sarà classificato in una delle categorie seguenti: 1) risposta completa, 2) risposta parziale, 3) malattia stabile, 4) progressione di malattia, 5) decesso precoce per la malattia maligna, 6) decesso precoce per tossicità, 7) decesso precoce per altre cause, o 9) sconosciuto (dati non valutabili, insufficienti).
- Tutti i pazienti che hanno soddisfatto i criteri di eleggibilità dovrebbero essere inclusi nell'analisi della percentuale di risposta. I pazienti la cui risposta rientri nelle categorie 4-9 dovrebbero essere considerati come non responsivi al trattamento (progressione di malattia).

Un errore nella schedula di trattamento o nella somministrazione di un farmaco non determina l'esclusione dalla valutazione della risposta. La definizione precisa delle categorie 4-9 deve essere specificata nel protocollo.

- Tutte le conclusioni dovrebbero essere basate sull'analisi di tutti i pazienti eleggibili.
- Le analisi su sottogruppi di pazienti possono essere effettuate escludendo i pazienti in cui si siano verificate importanti violazioni del protocollo (es., decesso precoce per altre cause, precoce interruzione del trattamento, significative deviazioni dal protocollo ecc.). Comunque, queste subanalisi non possono essere utilizzate come base per trarre conclusioni riguardo all'efficacia del trattamento, e le ragioni per cui i pazienti sono stati esclusi dall'analisi devono essere riportate chiaramente.
- Devono essere riportati gli intervalli di confidenza al 95%

APPENDICE II National cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)

La severità degli eventi avversi è registrata second the Common Terminology Criteria for Adverse Event (CTCAE), versione 4.0 (28/05/2009)

<http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE>

APPENDICE III Sonda di DNA utilizzate per le analisi di genotipizzazione

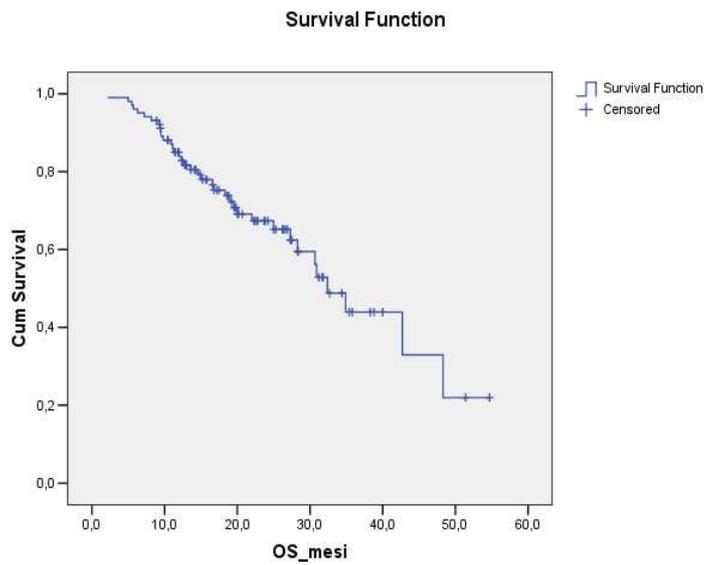
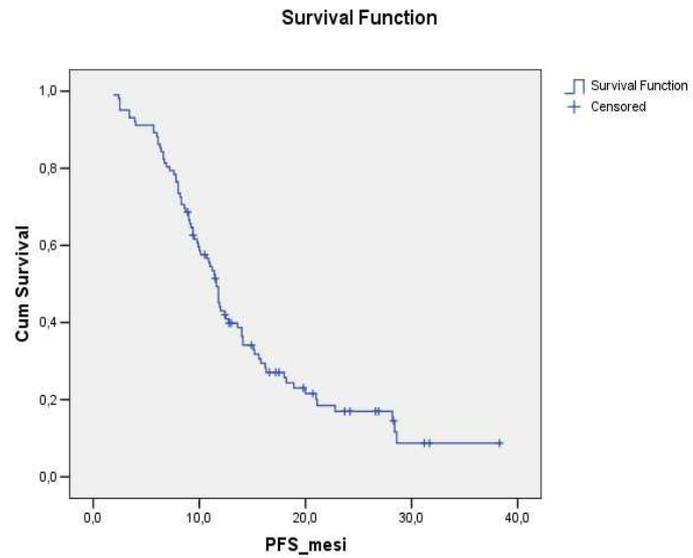
Polimorfismo	Taqman Applied Biosystem	Sonda fluorogenica
-2578 VEGF C/A rs699947	C__8311602_10	TGCCAGCTGTAGGCCAGACCCTG[AC]G ATCTGGGTGGATAATCAGACTGAC
-1498 VEGF C/T rs833061	C__1647381_10	GAGTGTGTGCGTGTGGGGTTGAGGG[C/T] GTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGG
-1154 VEGF G/A rs1570360	C__1647379_10	GAGCCCGGGCCCCGAGCCGCGTGTGGA [A/G]GGGCTGAGGCTCGCTGTCCCCGC
-634 VEGF C/G rs2010963	C__8311614_10	GCGCGCGGGCGTGCGAGCAGCGAAAG [C/G]GACAGGGGCAAAGTGAGTGACCTGC
936 VEGF C/T rs3025039	C__16198794_10	AGCATTCCCCGGCGGGTGACCCAGCA [C/T]GGTCCCTCTTGGGAATTGGATTGCGC
VEGF C/T rs699946	C__1647395_10	TTGTTTAAATTCTCTGACAGAGACA[A/G] ACTGTCCCAGGGGGCGGGGAAGGCA
-604 VEGFR-2 A/G rs2071559	C__15869271_10	GAAAACGCACTTGCCCAGTTCGCCA[A/G] CATTCCCGCTATTTCCCAAAATATT
1192 VEGFR-2 C/T rs2305948	C__22271999_20	TACAATCCTTGGTCACTCCGGGTTA[C/T]A CCATCTATAGTTAAGGTGCTCAAA
1719 VEGFR-2 T/A rs1870377	C__11895315_20	GGTATGGGTTTGTCACTGAGACAGC[A/T] TGGCTATAAGAAAGAGATAACAGCG
VEGFR-2 C/T rs11133360	C__26111278_10	TTCACATTGCTATGCCCAACACATC[C/T]C ATCAAGCATTCTCAGAGTGCTCA
TSP-1 8831 A/G rs2228262	C__16170900_10	GACACAGACCTGGATGGCTGGCCCA[A/G] TGAGAACCTGGTGTGCGTGGCCAAT
IL-8 -251 T/A rs4073	C__11748116_10	TTATCTAGAAATAAAAAAGCATACA[A/T] TTGATAATTCACCAAATTGTGGAGC
HIF- 1α rs11549465	C__25473074_10	GTTACGTTCCCTTCGATCAGTTGTCA[C/T]C ATTAGAAAGCAGTTCCGCAAGCCC
EPAS-1 rs4145836	C__32329435_10	AGGACTTCACGAGAGACGTTGTGCT[A/G] GAGGAAGTGGAGAGGGCTCTGTGGA

APPENDICE IV *Frequenze genotipiche nella popolazione in studio ed Equilibrio di Hardy-Weinberg*

Valutazione equilibrio Hardy-Weinberg effettuata con calcolatore online Michael H. Court's (2005-2008)
(<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>).

Posizione	Genotipo (Frequenza genica)	Chi-Quadro	Equilibrio di Hardy-Weinberg
VEGF (A-2578C)	14/102 AA (13.7%) 55/102 AC (53.9%) 33/102 CC (32.4%)	$\chi^2=1.401$	$P=0,237$
VEGF (C-1498T)	14/102 CC (13.7%) 54/102 CT (53.0%) 34/102 TT (33.3%)	$\chi^2= 2.969$	$P= 0.085$
VEGF (G-1154A)	57/102 GG (55.9%) 41/102 AG (40.2%) 4/102 AA (3.9%)	$\chi^2=1.046$	$P=0,307$
VEGF (G-634C)	12/102 GG (11.8%) 54/102 GC (53.0%) 36/102 CC (35.2%)	$\chi^2=1.490$	$P= 0.022$
VEGF (C+936T)	76/102 CC (74.5%) 22/102 CT (21.6%) 4/102 TT (3.9%)	$\chi^2=2.006$	$P=0,157$ I
VEGF rs699946A>G	54/102 AA (53%) 44/102 AG (43.1%) 4/102 GG (3.9%)	$\chi^2=1.876$	$P=0.171$
VEGFR2 (A-604G)	23/102 AA (22.5%) 48/102 AG (47.1%) 31/102 GG (30.4%)	$\chi^2=0.286$	$P=0.592$
VEGFR2 (C+1192T)	79/102 CC (77.5%) 22/102 CT (21.6%) 1/102 TT (0.9%)	$\chi^2=0.154$	$P=0.695$
VEGFR2 (T+1719A)	52/102 TT (51.0%) 42/102 TA (41.2%) 8/102 TT (7.8%)	$\chi^2=0.014$	$P=0.905$
VEGFR2 rs1113360T>C	33/102 TT (32.4%) 49/102 TC (48.0%) 20/102 CC (19.6%)	$\chi^2=0.025$	$P=0.874$
TSP-1 (A+2278G)	89/102 AA (87.3%) 12/102 AG (11.8%) 1/102 GG (0.9%)	$\chi^2=0.648$	$P=0.421$
IL8 (A+251T)	20/102 AA (19.6%) 55/102 AT (53.9%) 27/102 TT (26.5%)	$\chi^2=0.712$	$P=0.399$

HIF1 α (C+1772T)	6/102 CC (5.9%) 92/102 CT (90.2%) 4/102 TT (3.9%)	$\kappa^2=60$	$p<0.05$
HIF2 α rs4145836 G>A	79/102 GG (77.5%) 21/102 GA (20.6%) 2/102 AA (1.9%)	$\kappa^2=0.186$	$P=0.667$



	PFS	OS
Eventi/ Totale n	81/102	37/102
Censored n (%)	21 (20.6%)	65 (63.7%)
Mean	14.6	33.4
IC 95%	12.5-16.7	28.7-38.1
Median	11.6	32.4
IC 95%	10.7-12.5	27.3 -37.6

<i>Attività del trattamento sui 102 pazienti inclusi nell'analisi di genotipizzazione</i>	
CR	13/102 (12.7%)
PR	52/102 (51.0%)
SD	29/102 (28.4%)
PD	8/102 (7.8%)
ORR (CR + PR)	65/102 (63.8%)

APPENDICE VI Analisi univariata PFS/OS caratteristiche clinico-patologiche

<i>Analisi univariata</i>		N	PFS			OS		
			HR	IC	P	HR	IC	P
ECOG PS	1-2	11	1			1		
	0	100	0,72	(0,37-1,4)	0,33	0,39	(0,16-0,94)	0,036
Recettori Ormonali	negativi	19	1					
	positivi	90	0,25	(0,15-0,44)	< 0,0001	0,28	(0,14-0,56)	0,0003
DFI ≥ 12mesi	No	30	1			1		
	Si	81	0,76	(0,49-1,19)	0,225	1,57	(0,76-3,22)	0,222
Sedi mts ≥ 3	No	74	1			1		
	Si	37	0,82	(0,53-1,26)	0,359	0,97	(0,51-1,86)	0,932
CT adiuvante	Si	76	1			1		
	No	35	0,83	(0,53-1,29)	0,406	0,42	(0,2-0,87)	0,02
Taxani adiuvante	SI	26	1			1		
	No	85	0,61	(0,37-1,01)	0,056	0,32	(0,16-0,62)	0,001
Bevacizumab mant.	No	30	1			1		
	Si	81	0,42	(0,26-0,68)	0,0003	0,19	(0,1-0,38)	<0,0001
Malattia viscerale	Si	81	1			1		
	No	30	0,9	(0,56-1,44)	0,651	1,33	(0,69-2,58)	0,398

APPENDICE VII Correlazione genotipo-risposta [Fisher-Exact Test]

SNP	genotipi	n	No Risposta	Risposta (CR +PR)
VEGF -2578AC	AA	14	6 (42.9%)	8 (57.1%)
	AC	55	21 (38.2%)	34 (61.8%)
	CC	33	10 (30.3%)	23 (69.7%)
VEGF -1498CT	CC	14	6 (42.9%)	8 (57.1%)
	CT	54	20 (37.0%)	34 (63.0%)
	TT	34	11 (32.4%)	23 (67.6%)
VEGF +936CT	CC	76	28 (36.8%)	48 (63.2%)
	CT	22	9 (40.9%)	13 (59.1%)
	TT	4	0 (0.0%)	4 (100.0%)
VEGFR +1192CT	CC	79	24 (30.4%)	55 (69.6%)
	CT	22	13 (59.1%)	9 (40.9%)
	TT	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
HIF_1ALFA_CT	CC	6	2 (33.3%)	4 (66.7%)
	CT	92	33 (35.9%)	59 (64.1%)
	TT	4	2 (50.0%)	2 (50.0%)
VEGFR_2 rs1113360T>C	CC	20	8 (40.0%)	12 (60.0%)
	CT	51	17 (33.3%)	34 (66.7%)
	TT	31	12 (38.7%)	19 (61.3%)
VEGF -1154AG	AA	57	21 (36.8%)	36 (63.2%)
	AG	41	14 (34.1%)	27 (65.9%)
	GG	4	2 (50.0%)	2 (50.0%)
VEGFR -604AG	AA	23	8 (34.8%)	15 (65.2%)
	AG	48	16 (33.3%)	32 (66.7%)
	GG	31	13 (41.9%)	18 (58.1%)
TSP1 +2278AG	AA	89	36 (40.4%)	53 (59.6%)
	AG	12	1 (8.3%)	11 (91.7%)

	GG	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
EPAS_1 rs4145836 G>A	AA	2	0 (0.0%)	2 (100.0%)
	AG	21	4 (19.0%)	17 (81.0%)
	GG	79	33 (41.8%)	46 (58.2%)
VEGF rs699946A>G	AA	54	22 (40.7%)	32 (59.3%)
	AG	44	15 (34.1%)	29 (65.9%)
	GG	4	0 (0.0%)	4 (100.0%)
VEGF -634CG	GG	36	15 (41.7%)	21 (58.3%)
	CG	54	19 (35.2%)	35 (64.8%)
	CC	12	3 (25.0%)	9 (75.0%)
VEGFR +1719AT	AA	8	1 (12.5%)	7 (87.5%)
	AT	42	20 (47.6%)	22 (52.4%)
	TT	52	16 (30.8%)	36 (69.2%)
IL8 +251AT	AA	20	7 (35.0%)	13 (65.0%)
	AT	55	21 (38.2%)	34 (61.8%)
	TT	27	9 (33.3%)	18 (66.7%)
VEGF-2578_dom	AA+AC	69	27 (39.1%)	42 (60.9%)
	CC	33	10 (30.3%)	23 (69.7%)
VEGF-1498_dom	CC+CT	68	26 (38.2%)	42 (61.8%)
	TT	34	11 (32.4%)	23 (67.6%)
VEGF+936_dom	CC+CT	98	37 (37.8%)	61 (62.2%)
	TT	4	0 (0.0%)	4 (100.0%)
VEGFR+1192_dom	CC+CT	101	37 (36.6%)	64 (63.4%)
	TT	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
HIF_1ALFA_dom	CC+CT	98	35 (35.7%)	63 (64.3%)
	TT	4	2 (50.0%)	2 (50.0%)
VEGFR2_dom	CC+CT	71	25 (35.2%)	46 (64.8%)
	TT	31	12 (38.7%)	19 (61.3%)
VEGF-1154_dom	AA+AG	98	35 (35.7%)	63 (64.3%)

	GG	4	2 (50.0%)	2 (50.0%)
VEGFR-604_dom	AA+AG	71	24 (33.8%)	47 (66.2%)
	GG	31	13 (41.9%)	18 (58.1%)
TSP1+2278_dom	AA+AG	101	37 (36.6%)	64 (63.4%)
	GG	1	0 (0.0%)	1 (100.0%)
EPAS_1_dom <i>P=0.026</i>	AA+AG	23	4 (17.4%)	19 (82.6%)
	GG	79	33 (41.8%)	46 (58.2%)
VEGF_dom	AA+AG	98	37 (37.8%)	61 (62.2%)
	GG	4	0 (0.0%)	4 (100.0%)
VEGF-634_dom	GG+CG	90	34 (37.8%)	56 (62.2%)
	CC	12	3 (25.0%)	9 (75.0%)
VEGFR+1719_dom	AA+AT	50	21 (42.0%)	29(58.0%)
	TT	52	16 (30.8%)	36 (69.2%)
IL8+251_dom	AA+AT	75	28 (37.3%)	47 (62.7%)
	TT	27	9 (33.3%)	18 (66.7%)
VEGF-2578_rec	AA	14	6 (42.9%)	8 (57.1%)
	AC+CC	88	31 (35.2%)	57 (64.8%)
VEGF-1498_rec	CC	14	6 (42.9%)	8 (57.1%)
	CT+TT	88	31 (35.2%)	57 (64.8%)
VEGFR+936_rec	CC	76	28 (36.8%)	48 (63.2%)
	CT+TT	26	9 (34.6%)	17 (65.4%)
VEGFR+1192_rec <i>P=0.022</i>	CC	79	24 (30.4%)	55 (69.6%)
	CT+TT	23	13 (56.5%)	10 (43.5%)
HIF_1ALFA_rec	CC	6	2 (33.3%)	4 (66.7%)
	CT+TT	96	35 (36.5%)	61 (63.5%)
VEGFR2_rec	CC	20	8 (40.0%)	12 (60.0%)
	CT+TT	82	29 (35.4%)	53 (64.6%)
VEGF-1154_rec	AA	57	21 (36.8%)	36 (63.2%)
	AG+GG	45	16 (35.6%)	29 (64.4%)

VEGFR-604_rec	AA	23	8 (34.8%)	15 (65.2%)
	AG+GG	79	29 (36.7%)	50 (63.3%)
TSP1+2278_rec <i>P=0.018</i>	AA	89	36 (40.4%)	53 (59.6%)
	AG+GG	13	1 (7.7%)	12 (92.3%)
EPAS_1_rec	AA	2	0 (0.0%)	2 (100.0%)
	AG+GG	100	37 (37.0%)	63 (63.0%)
VEGF_rec	AA	54	22 (40.7%)	32 (59.3%)
	AG+GG	48	15 (31.3%)	33 (68.8%)
VEGF-634_rec	GG	36	15 (41.7%)	21 (58.3%)
	CG+CC	66	22 (33.3%)	44 (66.7%)
VEGFR+1719_rec	AA	8	1 (12.5%)	7 (87.5%)
	AT+TT	94	36 (38.3%)	58 (61.7%)
IL8_251_rec	AA	20	7 (35.0%)	13 (65.0%)
	AT+TT	82	30 (36.6%)	52 (63.4%)
Profilo VEGFR-2 rs1113360 C/T e IL8 rs4073 T/A (AS)	Favorevole	56	18 (32.1%)	38 (67.9%)
	Sfavorevole	46	19 (41.3%)	27 (58.7%)

Ringrazio tutti coloro che hanno permesso la realizzazione di questo studio, in particolare il Dott. Giacomo Allegrini, coordinatore dello studio, per la preziosa collaborazione, la Dott.ssa Chiara Finale, il Dott. Andrea Fontana e i colleghi della Divisione di Farmacologia e Chemioterapia diretta dal Prof. Danesi, in particolare il Dott. Guido Bocci, la Dott.ssa Paola Orlandi e la Dott.ssa Anna Fioravanti.