

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI
PROGETTO EPATONCOLOGIA

CICLO 26°

Settore Concorsuale di afferenza: 06/B1

Settore Scientifico disciplinare: MED/09

**Terapie sistemiche dell'epatocarcinoma (HCC):
dalla preclinica alla clinica**

Presentata da Sara Marinelli

Coordinatore del Dottorato

Relatori

Chiar.mo Prof. Nicola Rizzo

Dr. Fabio Piscaglia

Chiar.mo Prof. Luigi Bolondi

Esame finale anno 2014

INTRODUZIONE: Terapie sistemiche dell'HCC	3
ABSTRACT DELLA TESI	12
STUDI per esteso	
Studio 1	14
Studio 2	23
Studio 3	34

INTRODUZIONE

Terapie sistemiche dell'HCC

L'epatocarcinoma (HCC) è la lesione maligna primitiva più frequente a livello epatico, costituendo oltre il 90% delle neoplasie primitive maligne del fegato. L'HCC rappresenta la sesta causa di cancro al mondo e la terza causa di morte per cancro [1].

Lo scopo del trattamento dell'HCC è quello di prolungare la sopravvivenza dei pazienti e consentire loro la migliore qualità di vita possibile [2].

L'allocazione al trattamento si basa sul sistema BCLC, approvato sia dalle linee guida americane [5] che europee [4].

In considerazione della complessità dell'HCC e dei numerosi trattamenti disponibili e potenzialmente efficaci, i pazienti che ricevono questa diagnosi dovrebbero essere seguiti da team multidisciplinari che includano epatologi, radiologi, chirurghi, anatomopatologi e oncologi [5].

Convenzionalmente, i trattamenti si classificano in curativi e palliativi [16].

La resezione chirurgica, il trapianto ortotopico di fegato e l'ablazione locale, offrendo un elevato tasso di risposte complete, sono considerati trattamenti curativi [5,6].

La chemioembolizzazione transarteriosa e il sorafenib, invece, appartengono ai trattamenti cosiddetti palliativi, ma sono gli unici che, pur non avendo un intento curativo, determinano un miglioramento della sopravvivenza [5,6].

Per quanto riguarda l'embolizzazione senza chemioterapia, la radioterapia esterna e la radioembolizzazione, è stata dimostrata la loro attività antitumorale, ma non il loro beneficio sulla sopravvivenza [5,6].

L'HCC è uno dei tumori più chemioresistenti, tanto da rappresentare un caso senza precedenti in oncologia: prima del 2007, infatti, quando il sorafenib è diventato il trattamento di scelta per i pazienti con tumori in stadio avanzato, nessun trattamento sistemico era mai stato raccomandato [1].

La maggiore conoscenza acquisita riguardo alle vie molecolari coinvolte nell'epatocarcinogenesi ha portato allo sviluppo di numerosi farmaci "a target molecolare"[9].

Il sorafenib (Nexavar; Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Montville, NJ, USA), un inibitore multichinasico del VEGFR 1, 2 e 3, di Raf, PDGFR beta con azione antiangiogenica ed anti-apoptotica, è l'unico farmaco approvato per il trattamento dell'HCC avanzato (BCLC C) e in due studi randomizzati di fase III ha mostrato di aumentare la sopravvivenza media di circa 3 mesi (OS 10.7 vs 7.9 mesi $p < 0.001$ nello SHARP, OS 6.5 vs 4.2 mesi $p = 0.014$ Asian-Pacific trial). La minore sopravvivenza nello studio Asia-Pacific (A-P trial) è stata dovuta ad una malattia più avanzata e ad un maggiore tasso di pazienti affetti da HBV (7,8).

Il sorafenib è attualmente è l'unico trattamento sistemico raccomandato per l'HCC in stadio avanzato (BCLC C) con funzione epatica conservata (Child-Pugh A) [1,6,9].

Al momento non vi sono abbastanza evidenze sul suo utilizzo nel contesto di una funzione epatica compromessa (CPT B). Lo studio GIDEON, non interventivo osservazionale, ha dimostrato un profilo di sicurezza del sorafenib simile nei pazienti CPT A e B (10).

I principali effetti collaterali del sorafenib sono diarrea, nausea, astenia, ipertensione arteriosa e tossicità dermatologica (alopecia, stomatite, sindrome mano-piede-HFSR).

Il 38% dei pazienti in trattamento con sorafenib nello SHARP ed il 19% nell'A-P trial hanno dovuto interrompere per eventi avversi (AE). Inoltre il 26% dei pazienti nello SHARP ha dovuto ridurre il dosaggio del farmaco ed il 31% nell'A-P trial. Gli effetti collaterali più frequenti sono stati la sindrome mano-piede e la diarrea.

Solo parte dei pazienti in terapia con sorafenib risponde alla terapia, tuttavia tale risposta può attualmente essere valutata mediante metodiche di imaging, come TC o RM, ogni 2-3 mesi. Mancano al momento dei biomarcatori o delle metodiche d'imaging non invasive utili alla valutazione precoce della risposta del tumore alla terapia.

Lo studio SHARP ha inoltre messo in evidenza l'inadeguatezza dei criteri Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) nel valutare l'efficacia del trattamento, infatti in questo studio l'incremento dell'OS non era supportato dal tasso di risposta radiologica. Pertanto i criteri RECIST sono stati modificati tenendo conto della alta vascolarizzazione dell'HCC e della discordanza tra dimensioni tumorali e vitalità del tumore, dando origine ai modified RECIST (mRECIST). Questa differenziazione è stata di rilevante importanza in quanto l'attività dei farmaci anti-angiogenici è caratterizzata dalla necrosi tumorale o dalla riduzione della vascolarizzazione tumorale nonostante si possa avere una stabilità o un incremento delle dimensioni tumorali (11).

Inoltre, non sono stati individuati ancora biomarcatori sierici di risposta alla terapia.

Lo studio SHARP ha mostrato come valori prognostici indipendenti di sopravvivenza le concentrazioni basali (all'inizio del trattamento) di angiopoietina-2 ($p=0.001$), VEGF ($p=0.015$), AFP ($p=0.015$) e fosfatasi alcalina ($p=0.0003$), tuttavia non ha identificato marcatori predittivi di risposta del tumore alla terapia.

Alcuni studi nell'ultimo periodo hanno valutato su casistiche unicentriche il ruolo dell'AFP come predittore di risposta al trattamento; in uno studio di Nakazawa un precoce incremento del 20% dell'AFP è risultato in grado di predire la progressione tumorale nel 76% dei pazienti con una effettiva progressione di malattia (12). In un recente studio di Personeni et al; è stata valutata la risposta al trattamento con sorafenib di 85 pazienti con HCC, in cui nel 70% dei casi è stata ottenuta una stabilizzazione di malattia ed in circa la metà di questi pazienti la riduzione dell'AFP del 20% (in pazienti con valori basali di AFP > 20 ng/ml) ha predetto la risposta al trattamento ed è risultata associata ad un aumento dell'OS e del TTP (13).

L'avvento del sorafenib ha portato ad una "esplosione" di trials sperimentali di prima e seconda linea con diversi tipi di farmaci a target molecolare nel trattamento dell'HCC. Nell'ultimo periodo è stato allargato il ventaglio dei target molecolari bersaglio, prevedendo non solo bersagli di neovangiogenesi ma anche di vie del segnale oncogeniche specifiche della cellula tumorale. Inoltre le indicazioni terapeutiche si sono ampliate dallo stadio avanzato (BCLC C) anche allo stadio intermedio (BCLC B) e si ha dato inizio alla ricerca nel campo della terapia di combinazione di questi farmaci (15).

L'angiogenesi è il target terapeutico più studiato nell'HCC. Numerosi farmaci inibitori multichinasici sono stati studiati in studi di fase III, randomizzati controllati, tuttavia nessuna di queste molecole come ad esempio sunitinib, brivanib e linifanib hanno dimostrato una superiorità rispetto a sorafenib (15-17).

Sunitinib e linifanib, inibitori del VEGFR2 e del PDGFR non hanno dimostrato di aumentare l'OS rispetto a sorafenib (rispettivamente, 8.1 vs 10 mesi $p=0.0019$; 9.1 vs 9.8 mesi, $p>0.05$) ed hanno mostrato un maggior tasso di eventi avversi (AE) di grado 3/4 rispetto al sorafenib (15). Anche brivanib, inibitore del VEGFR, PDGFR e del FGFR, ha dimostrato di non prolungare l'OS rispetto a sorafenib (9.5 vs 9.9 mesi, $p>0.05$), tuttavia ha mostrato un migliore profilo di tossicità (17). Brivanib è stato inoltre confrontato con placebo che ha mostrato un maggiore tasso di risposte globali (ORR) (11.5% vs 1.9%) e un maggiore TTP (4.3 vs 2.7 mesi, $p=0.0001$) ma non ha aumentato significativamente l'OS (15).

La diversità nell'azione di inibizione molecolare di questi farmaci pone le basi del concetto di combinazione di sorafenib con sunitinib, brivanib, o linifanib in modo da ottenere attraverso

l'inibizione di differenti vie del segnale un effetto sinergico. E' già stata valutata l'associazione tra sorafenib ed erlotinib che però non ha mostrato di raggiungere il suo obiettivo di incremento dell'OS del 33% (OS 9.5 vs 8.5 mesi) (15). Sono tutt'ora in corso trial di prima linea con sorafenib in combinazione con altri inibitori tirosino-chinasici .

Nell'ultimo periodo stanno emergendo in letteratura dati preclinici e clinici dell'esistenza di meccanismi di resistenza al sorafenib che portano alla stimolazione della neoangiogenesi, al mimetismo vascolare ed all'incremento della proliferazione tumorale (14).

Sono stati identificati multipli meccanismi di resistenza:

- resistenza reattiva mediata dall'iperpressione di fattori indotti dall'ipossia tumorale [FGF, efrina, fattore inducibile dell'ipossia (HIF) 1 e 2] che vanno a stimolare l'angiogenesi attraverso vie alternative del segnale (14).
- alterazioni genetiche ed epigenetiche nel tumore che rendono meno sensibile le cellule all'ipossia e di conseguenza ai trattamenti antiangiogenici. Ad esempio mutazioni inattivanti dell'oncosoppressore p-53 wild-type possono ridurre la propensione cellulare all'apoptosi in un contesto ipossico. Quindi tumori con mutazioni di p-53 possono risultare meno responsivi ai trattamenti antiangiogenici (14,18).
- i farmaci antiangiogenici possono incrementare il reclutamento di periciti e la neovascolarizzazione attraverso multipli meccanismi, uno dei quali è la sovra espressione di PDGF-beta (14,19).
- recenti studi sul melanoma hanno identificato cellule simili a "precursori embrionali" che possono portare allo sviluppo di vasi che "mimano" l'angiogenesi embrionale. Il mimetismo vascolare è stato osservato in diversi tipi di tumore tra cui tumori di mammella, polmone, prostata ed ovaio (20).

Il risultato di questi eventi è una vascolarizzazione tumorale riorganizzata, meno dipendente dal VEGF per la crescita e di conseguenza meno responsiva alla terapia antiangiogenetica. Inoltre, vi sono studi in letteratura, maggiormente di ambito preclinico, che affermano che i farmaci antiangiogenici indurrebbero la selezione di cellule con maggiore propensione all'invasività ed alla metastatizzazione (14, 21).

Tuttavia tali evidenze preliminari e la loro ripercussione sulla gestione clinica dei pazienti, sono ancora in fase di dibattito e di approfondimento.

Attualmente, le linee guide internazionali, raccomandano per i pazienti in progressione a sorafenib la miglior terapia di supporto ed eventualmente l'ingresso in trial clinici di seconda linea (4,6,9).

Tuttavia i pazienti in progressione a sorafenib presentano caratteristiche molto diverse tra loro e solo una piccola quota di pazienti può effettivamente rientrare negli stretti criteri di inclusione ed esclusione dei trial di seconda linea.

Un recente lavoro del gruppo di Barcellona ha dimostrato che la sopravvivenza dopo progressione a sorafenib è significativamente diversa a seconda del pattern di progressione ed in particolare è minore nei pazienti in cui si riscontra la comparsa di lesioni extraepatiche o di invasione vascolare neoplastica, verosimilmente dovuto ad una neoplasia biologicamente più aggressiva, rispetto ad una progressione intraepatica (22). In particolare la sopravvivenza post-progressione (PPS) mediana di un gruppo selezionato di pazienti trattati con sorafenib (229 pazienti trattati con sorafenib, 147 rientravano nei criteri di inclusione/esclusione dello studio e di questi 85 sono andati in progressione a sorafenib) era di 9.85 mesi. Sono risultati essere predittori indipendenti di PPS la stadiazione BCLC, PS e il CPT e la comparsa di progressione extraepatica (valutati al momento della progressione).

Pertanto, veniva sottolineata la necessità di rifinire la stadiazione di BCLC al momento della progressione radiologica di malattia dopo sorafenib in modo da poter predire appropriatamente la prognosi di tutti i pazienti ed in particolare la prognosi dei pazienti potenzialmente arruolabili in trial di seconda linea (CPT A, PS 0-1). La proposta del “BCLC upon progression” definisce come:

-**BCLCp-B** i pazienti con progressione delle lesioni epatiche target ($\geq 20\%$) o con comparsa di nuovi noduli intraepatici, ma che sono ancora categorizzabili come BCLC B.

-**BCLCp C1** i pazienti già BCLC C con progressione sui noduli epatici target o comparsa di nuovi noduli intraepatici.

-**BCLCp C2** i pazienti già BCLC C con progressione dovuta alla comparsa di nuove lesioni extraepatiche e/o ad invasione macrovascolare.

Molto interessante di questo studio è inoltre il dato che solo la metà dei pazienti in progressione della coorte, e quindi il 29% di tutti i pazienti trattati con sorafenib presso il loro centro, sono risultati essere candidabili a trial di seconda linea (22).

L'eterogeneità dei pazienti in uscita da sorafenib, per stadio di malattia, aggressività tumorale, funzione epatica e comorbidità sottolinea l'effettiva necessità di un approccio terapeutico il più personalizzato possibile.

In mancanza di trial di seconda linea e di alternative terapeutiche è stato anche ipotizzato di mantenere la terapia con sorafenib anche dopo una documentata progressione di malattia. 8

Un team italiano ha condotto uno studio prospettico nel quale sono stati arruolati 101 pazienti con HCC avanzato andati in progressione a sorafenib e sono stati randomizzati in due gruppi, un gruppo continuava sorafenib al dosaggio aumentato di 600 mg x 2 al giorno, ed un gruppo in terapia di supporto (BSC). Il primo gruppo ha mostrato un TTP più lungo (4 vs 2 mesi, $p= 0.04$) con un incremento non significativo dell'OS (6 vs 6.1 mesi, $p= 0.14$) (23).

Altri farmaci a bersaglio molecolare sono stati valutati in seconda linea di trattamento, alcuni trial sono ancora in corso e di alcuni sono usciti da poco i risultati delle fase II come ad esempio: Erlotinib + bevacizumab di fase II 1.8 e 4.4 mesi; Tivantinib di fase II 1.6 e 6.6 mesi (con 2.7/7.2 nei pazienti con iperespressione di MET) e Regorafenib di fase II 4.3/13.8 mesi (15).

Infine negli ultimi anni è stato studiato ed introdotto in oncologia il concetto di chemioterapia “a dosaggio metronomico”, basato sulla somministrazione continuativa di bassi dosaggi di farmaci chemioterapici, senza interruzioni prolungate, in modo da ottimizzare le proprietà antiangiogeniche del farmaco e di ridurre la tossicità (24,25). Questo tipo di trattamento, a dosaggio metronomico, può essere appropriato anche nel caso di una funzione epatica lievemente deteriorata come nella cirrosi compensata (26-28). Inoltre vi sono alcune evidenze di attività antineoplastica e di beneficio clinico in pazienti con HCC avanzato (26-30).

Uno studio asiatico di fase 2 che testava in prima linea l'associazione con sorafenib e Tegafur/Uracile (UFT) a dosaggio metronomico aveva mostrato un PFS ed una OS di 3.7 e 7.4 mesi, lasciando intravedere la futura possibilità di studiare l'associazione di farmaci “biologici” con chemioterapici a dosaggio metronomico.

Conclusioni

Sorafenib è l'unico trattamento sistemico approvato per il trattamento dell'HCC avanzato nel contesto di una funzione epatica conservata (CPT). Il trattamento con antiangiogenetici porta alla iperstimolazione di vie del segnale alternative con sviluppo di resistenza alla terapia e possibile incremento dell'aggressività tumorale. Il passaggio da sorafenib ad un'altra terapia da sola o in associazione rappresenta una potenziale strategia terapeutica per i tumori resistenti a sorafenib. Al momento sono in corso di studio come prima e seconda linea di trattamento numerosi nuovi farmaci per l'HCC avanzato.

Bibliografia

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 2010; 127: 2893-2917
2. Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Seminars in Liver Disease* 2010; 30: 61-74
3. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020-1022. [12]
4. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012;56:908-943.
5. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012; 379: 1245-1255
6. Bruix J, Sherman M. AASLD Practice Guidelines. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53: 1020-1022
7. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 2008; 359: 378-390
8. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:25-34.
9. Position paper of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF): the multidisciplinary clinical approach to hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease* 2013
10. Lencioni R, Kudo M, Ye SL. GIDEON (Global Investigation of therapeutic Decisions in hepatocellular carcinoma and Of its treatment with sorafeNib): second interim analysis. *Int J Clin Pract.* 2013.
11. Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2010
12. Nakazawa T, Hidaka H, Takada J. Early increase in α -fetoprotein for predicting unfavorable clinical outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013.
13. Personeni N, Bozzarelli S, Pressiani T. Usefulness of alpha-fetoprotein response in patients treated with sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012
14. He AR, Goldenberg AS. Treating hepatocellular carcinoma progression following first-line sorafenib: therapeutic options and clinical observations. *Therap Adv Gastroenterol.* 2013
15. Shen YC, Lin ZZ, Hsu CH,. Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Liver Cancer.* 2013 Aug;2(3-4):345-364. Review.
16. Cheng AL, Kang YK, Lin DY. Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 2013
17. Johnson PJ, Qin S, Park JW. Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *J Clin Oncol.* 2013 Oct
18. Yu JL, Rak JW, Coomber BL. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science.* 2002 Feb 22;295(5559):1526-8.
19. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol.* 2010 Review.
20. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012
21. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 11

22. Reig M, Rimola J, Torres F. Postprogression survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma: rationale for second-line trial design. *Hepatology*.
23. Rimassa L, Pressiani T, Boni C. A phase II randomized dose escalation trial of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncologist*. 2013
- 24 Emmenegger U, Kerbel RS. Five years of clinical experience with metronomic chemotherapy: achievements and perspectives. *Onkologie*. 2007;30(12):606-8.
25. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):423-36.
26. Brandi G, de Rosa F, Bolondi L, Agostini V, Di Girolamo S, Nobili E, et al. Durable complete response of hepatocellular carcinoma after metronomic capecitabine. *Tumori*. 2010;96(6):1028-30.
27. Patt YZ, Hassan MM, Aguayo A, Nooka AK, Lozano RD, Curley SA, et al. Oral capecitabine for the treatment of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and gallbladder carcinoma. *Cancer*. 2004;101(3):578-86.
28. Xia Y, Qiu Y, Li J, Shi L, Wang K, Xi T, et al. Adjuvant therapy with capecitabine postpones recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection: a randomized controlled trial. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(12):3137-44.
29. Ballardini P, Marri I, Margutti G, Aliberti C, Benea G, Manfredini R. Long-lasting response with metronomic capecitabine in advanced hepatocellular carcinoma. *Tumori*. 2010;96(5):768-70.
30. Marinelli S, Granito A, Piscaglia F, Renzulli M. Metronomic capecitabine in patients with hepatocellular carcinoma unresponsive to or ineligible for sorafenib treatment: Report of two cases. *Hepat Mon*. 2013;13(9):e11721

ABSTRACT della tesi

Introduzione

Il sorafenib è attualmente l'unica terapia approvata per l'epatocarcinoma (HCC) avanzato. Attualmente i principali punti critici del trattamento dell'HCC avanzato sono: 1) la mancanza di predittori di risposta alla terapia con sorafenib, 2) lo sviluppo di resistenze al sorafenib, 3) la mancanza di terapie di seconda linea codificate.

Scopo della tesi

Analizzare con studi clinici e preclinici i principali punti critici della terapia dell'HCC avanzato ed in particolare: 1) ricerca di predittori clinico-laboratoristici di risposta al sorafenib in pazienti ambulatoriali con HCC; 2) valutazione dell'impatto della sospensione temporanea e definitiva del sorafenib in un modello murino di HCC mediante tecniche ecografiche; 3) studio pilota di valutazione dell'efficacia della capecitabina a dosaggio metronomico come farmaco di seconda linea in pazienti con HCC non responsivi a sorafenib.

Risultati

Lo studio 1) ha valutato retrospettivamente 94 pazienti con HCC trattato con sorafenib ed ha evidenziato che la presenza di metastasi e trombosi portale neoplastica non sembra inficiare i vantaggi clinici del sorafenib. Inoltre un valore di alfa-fetoproteina (AFP) basale <19 ng/ml è risultato un predittore indipendente di maggiore sopravvivenza mentre lo sviluppo di nausea nei pazienti in terapia con sorafenib è associata ad una peggiore sopravvivenza. Nello studio 2) 14 topi con xenografts di HCC sono stati suddivisi in 3 gruppi: gruppo 1 trattato con placebo, gruppo 2 trattato con sorafenib con interruzione temporanea del farmaco e gruppo 3 trattato con sorafenib con sospensione definitiva del sorafenib. L'ecografia con mezzo di contrasto targettato per il VEGFR2 (BR 55) ha mostrato al giorno 13 (sacrificio dei topi) valori maggiori di dTE nel gruppo 3 confermato da un aumento del VEGFR2 al Western-Blot. I tumori del gruppo 2 rispetto ai gruppi 1 e 3, dopo 2 giorni di ritrattamento, hanno mostrato un aumento dell'elasticità tissutale all'elastonografia. Lo studio 3 ha valutato 19 pazienti dopo sorafenib, trattati con capecitabina a dosaggio metronomico con un tempo di progressione (TTP) mediano di 5 mesi (95% CI 0-10), una progression free survival di 3,6 mesi (95% CI 2,8-4,3) ed una sopravvivenza mediana è stata di 6,3 mesi (95% CI 4-8,6).

Conclusioni

Lo sviluppo degli effetti collaterali nausea ed astenia, così come un valore basale di AFP >19, sono risultati predittivi di una minore risposta al sorafenib. La sospensione temporanea del sorafenib in un modello murino di HCC non impedisce il ripristino della risposta tumorale, mentre una interruzione definitiva tende a stimolare un “effetto rebound” dell’angiogenesi a livelli anche maggiori rispetto all’assenza di trattamento. La capecitabina metronomica in pazienti con HCC dopo sorafenib ha mostrato una discreta attività anti-neoplastica ed un profilo di sicurezza accettabile.

Studio 1- Predittori clinici di risposta al sorafenib in pazienti con epatocarcinoma.

Abstract

Scopo dello studio

Il Sorafenib è l'unico farmaco approvato per il trattamento dell'epatocarcinoma (HCC), ma in letteratura sono ancora pochi i dati sui parametri clinico-laboratoristici predittivi di risposta al trattamento.

Pazienti e Metodi

Sono state analizzate retrospettivamente le cartelle di 94 pazienti con cirrosi epatica compensata [M/F=85/9, età mediana 69 anni (38-88)] trattati con sorafenib nel periodo 2008-2012, con HCC in stadio avanzato (BCLC-C, n=57) ed intermedio (BCLC-B, n=37) non responsivi o non elegibili a terapie loco-regionali. Di tutti i pazienti sono stati valutati i dati clinico-laboratoristici e la risposta oggettiva al trattamento, utilizzando i criteri mRECIST. Gli eventi avversi sono stati classificati secondo i criteri del National Cancer Institut v-3.0 ed il trattamento è stato gestito secondo le indicazioni farmaceutiche.

Risultati

La durata mediana del trattamento (TD) è stata di 3.9 mesi (range 0.1-48) e la sopravvivenza mediana (OS) di 9.2 mesi (range 0.4-45). Sulla base del TD sono stati identificati due gruppi di pazienti con una significativa differenza in OS: gruppo long term responder-LTR (TD>6.6 mesi, TD mediano 11.4, 33 pazienti) e gruppo short term responder-STR (TD<6.6 mesi, TD mediano 2.3, 61 pazienti). L'OS mediana nel gruppo LTR ed STR è stata rispettivamente di 20.6 e 6.6 mesi ($p<0.001$). Il CPT score, lo stadio BCLC e il numero di pazienti con trombosi neoplastica della vena porta è risultato simile nei due gruppi.

All'analisi univariata il gruppo LTR ha mostrato un tasso maggiore di ECOG-PS 0 (75% vs 50%, $p=0.034$), livelli basali più bassi di alfa fetoproteina AFP (migliore cut-off: AFP<19 ng/dl, $p=0.006$). L'astenia e la nausea sono risultate più frequenti nel gruppo STR (67.2% vs 43.8%, $p=0.044$; 19.3% vs 3.2%, $p=0.05$, rispettivamente). L'ECOG PS 0 e AFP basale <19 ng/ml sono associate con una più lunga OS ($p= 0.003$; $p=0.006$; rispettivamente). La comparsa di nausea invece è risultata un fattore predittivo di minore sopravvivenza ($p= 0,008$).

All'analisi multivariata l'AFP >19 ng/ml si confermava predittore di una minore OS ($p=0.028$, OR=4).

Conclusioni

Lo sviluppo di astenia e in particolare di nausea durante il trattamento con sorafenib è associato ad una minore OS. L'AFP basale <19 ng/ml è un predittore indipendente di migliore sopravvivenza nei pazienti in trattamento con sorafenib. I parametri clinico-laboratoristici possono essere utili nell'identificare i pazienti che traggono beneficio clinico dal sorafenib.

Introduzione

L'epatocarcinoma (HCC) è il quinto cancro più frequente e la terza causa di morte cancro-relata nel mondo (1). La prognosi dei pazienti affetti da HCC è strettamente connessa alla funzione epatica, in quanto nell'80% dei casi l'HCC insorge su fegato cirrotico ed allo stadio BCLC.

Tra i trattamenti curativi contemplabili per tumori non avanzati (BCLC A e B), vi sono la resezione epatica, le tecniche di ablazione percutanea ed il trapianto di fegato. Tuttavia la maggior parte dei pazienti non è eligibile a tali trattamenti a causa dell'estensione neoplastica e della disfunzione epatica sottostante (2).

Il sorafenib (Nexavar; Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Montville, NJ, USA), un inibitore multichinasi del VEGFR 1, 2 e 3, di Raf, PDGFR beta con azione antiangiogenica ed anti-apoptotica, è l'unico farmaco approvato per il trattamento dell'HCC avanzato (BCLC C) e in due studi randomizzati di fase III ha mostrato di aumentare la sopravvivenza media di circa 3 mesi (OS 10.7 vs 7.9 mesi $p < 0.001$ nello SHARP, OS 6.5 vs 4.2 mesi $p=0.014$ AP trial). La minore sopravvivenza nello studio Asia-Pacific è stata dovuta ad una malattia più avanzata e ad un maggiore tasso di pazienti affetti da HBV (3,4).

Questi studi hanno portato all'approvazione dell'utilizzo del sorafenib nell'HCC avanzato con funzione epatica conservata (CPT A)(2,3,4), e sebbene lo studio GIDEON abbia dimostrato un profilo di sicurezza del sorafenib simile in pazienti CPT A e B, al momento non vi sono ancora dati sufficienti sulla tossicità e sul beneficio clinico in pazienti con funzione epatica modicamente o severamente compromessa (CPT B e C) (5).

I principali eventi avversi (AE) del sorafenib sono: diarrea, nausea, affaticamento, ipertensione arteriosa e tossicità dermatologica (sindrome mano-piede, alopecia, eritema).

Nello studio SHARP trial il 38% dei pazienti ha interrotto il sorafenib a causa di AE ed il 26% dei pazienti ha necessitato di una riduzione di dose (3).

Nello studio SOFIA, uno studio multicentrico italiano che ha valutato l'utilizzo del sorafenib in pazienti con HCC nella pratica clinica quotidiana, il 26% dei pazienti ha ricevuto il dosaggio dimezzato per più del 70% del periodo di trattamento, nella maggioranza dei casi per la comparsa di AE, con un sorprendente incremento dell'OS rispetto ai pazienti trattati a dosaggio pieno (6). In base a questo

risultato possiamo ipotizzare che il sorafenib a differenza dei farmaci citotossici convenzionali possa svolgere la sua attività antitumorale anche a dosaggio ridotto, con il vantaggio di minori AE e di una migliore aderenza dei pazienti alla terapia.

La presenza di parametri clinici predittivi di una maggiore risposta alla terapia con sorafenib non è stata ancora adeguatamente indagata, e la letteratura in merito è alquanto limitata. In questo studio abbiamo quindi analizzato la risposta alla terapia con Sorafenib nei pazienti con epatocarcinoma in trattamento presso il nostro Centro dal 2008, ed in particolare abbiamo valutato le differenze clinico-laboratoristiche tra i pazienti che hanno risposto più a lungo al trattamento (Long Term Responders – LTR) e quelli che hanno risposto al farmaco per un periodo di tempo più limitato (Short Term Responders – STR) allo scopo di trovare parametri predittivi di una maggiore risposta.

Pazienti e Metodi

Sono state valutate retrospettivamente le cartelle di 94 pazienti con cirrosi epatica compensata [M/F=85/9, età mediana 69-anni (38-88)] che sono stati trattati con sorafenib nel periodo 2008-2012, con HCC in stadio avanzato (BCLC-C, n=57) ed intermedio (BCLC-B, n=37) non responsivi o non eligibili a terapie loco-regionali. In tutti i pazienti sono stati valutati i dati clinici e laboratoristici.

La diagnosi di HCC è stata effettuata in accordo con le linee guida dell'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (2).

I pazienti sono stati valutati radiologicamente mediante TC o RM ogni 2-3 mesi dall'inizio del trattamento e la risposta radiologica è stata valutata mediante i criteri modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (mRECIST), definita come: risposta completa (CR), risposta parziale (PR), stabilità di malattia (SD) o progressione di malattia (PD) (7).

Le cause di fine trattamento sono state: progressione radiologica/clinica di malattia, eventi avversi e peggioramento della funzione epatica.

La dose di partenza è stata nella maggior parte dei casi 800 mg/die, tuttavia in casi di funzione epatica modicamente compromessa (CPT B7) o importanti comorbidità la terapia è stata iniziata al dosaggio ridotto di 400 mg e poi, se ben tollerata, incrementata fino al dosaggio pieno.

Gli eventi avversi farmaco relati (AE), come comparsa di ipertensione arteriosa, diarrea, sindrome mano-piede (HFSR), astenia, nausea, calo ponderale, sanguinamento ed ascite e le variazioni degli esami di laboratorio, sono stati classificati utilizzando i National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events versione 3.0. Nel caso di AE di grado 3/4 il trattamento è stato temporaneamente sospeso, poi eventualmente reinserito a dosaggio ridotto, e successivamente se ritenuto clinicamente opportuno riportato al dosaggio pieno iniziale.

La dose, se ritenuto clinicamente necessario, è stata modificata anche nel caso di AE di grado 2.

Statistica

È stata calcolata la frequenza delle diverse variabili clinico-laboratoristiche nei due gruppi in esame.

È stata successivamente effettuata l'analisi univariata (software SPSS 20.0.0) mediante test del Chi-quadro o test di Mann Whitney.

Sono state ritenute statisticamente significative le variabili che all'analisi univariata hanno mostrato un valore di $p \leq 0.05$. È stata successivamente effettuata l'analisi multivariata mediante regressione logistica binaria.

La sopravvivenza (OS) è stata calcolata dal giorno di inizio della terapia con Sorafenib alla data di decesso del paziente o al 9 settembre 2012 (chiusura del database).

L'OS è stata analizzata con metodo Kaplan-Meier, e le differenze nei tassi di sopravvivenza sono state valutate mediante log-rank test.

Risultati

La durata mediana del trattamento con sorafenib (TD) nell'intera popolazione è stata di 117 giorni (range 3-1440).

Sulla base della durata del trattamento (TD) è stato identificato un sottogruppo di pazienti con un TD maggiore definito come Long Term Responders (LTR) con TD > 200 gg (n=33, mediana 343 gg), così da poterne analizzare le caratteristiche clinico-laboratoristiche rispetto ai restanti pazienti con TD minore, Short Term Responders (STR) con TD < 200 gg (n=61, mediana 70 gg) ($p=0,000$).

Come evidenziato dalla curva di Kaplan-Meier (Fig.1,a), si è riscontrata una differenza significativa di OS mediana tra LTR ed STR rispettivamente di 620 giorni vs 198 giorni ($p=0,000$).

Sono state valutate le differenze tra le principali caratteristiche clinico-laboratoristiche dei due gruppi (LTR vs STR): il sesso dei pazienti (M/F, 87/13% vs 92/8%), l'eziologia dell'epatopatia sottostante definita come HBV (21% vs 15%) ed HCV-relata (39% vs 42%), alcolica (15% vs 16%), multifattoriale-virale ed alcolica (15% vs 7%), criptogenetica/metabolica (9% vs 18%), la funzione epatica basale come classe e score di Child Pugh (CPT A 94% vs 90%, B 6% vs 10%), la presenza di trombosi portale neoplastica (30% vs 34%) e metastasi (27% vs 37%), il Performance Status utilizzando la classificazione Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG 0/1/2, 75/19/6% vs 50/45/5%), il Barcelona Clinic Liver Cancer staging sistem (BCLC B/C 42/58% vs 37/63%) e la differenza in AFP all'inizio del trattamento (mediana 9 vs 30, $p=0,006$).

All'analisi multivariata l'AFP >19 ng/ml si confermava predittore di una minore OS ($p=0,028$, OR=4) (fig 1, c).

Sono stati inoltre valutati la durata della malattia pre-sorafenib, la presenza di eventuali trattamenti precedenti (TACE, resezione, OLT), la presenza all'inizio del trattamento di ipertensione portale, ascite, encefalopatia porto-sistemica, varici esofagee, diabete e di ipertensione arteriosa (tabella 1).

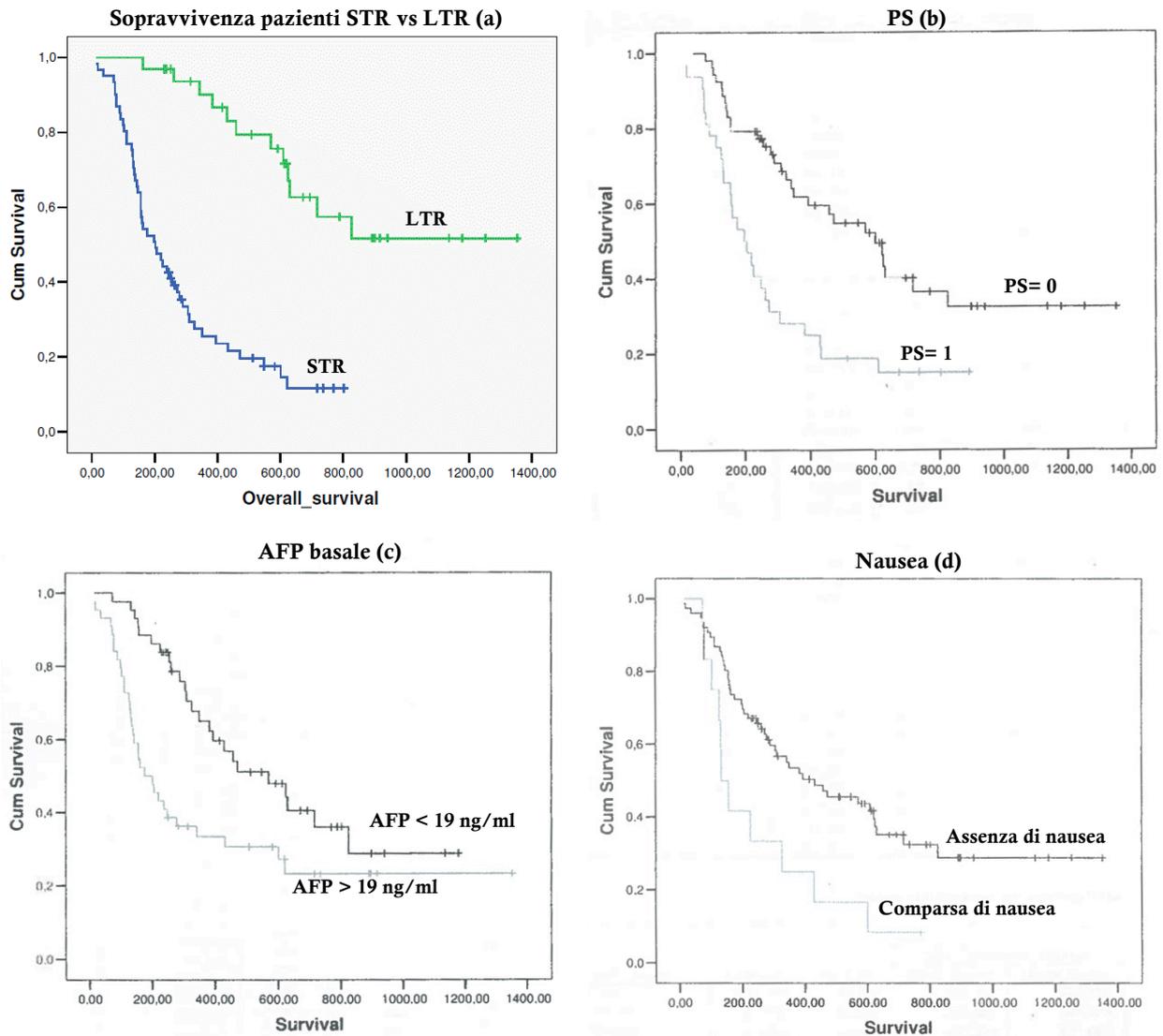
Non è stato possibile studiare la capacità predittiva del grado istologico tumorale per insufficiente quantità di dati al fine di un'adeguata analisi statistica.

E' stata valutata anche la differenza in AE tra LTR e STR ed in particolare: l'ipertensione arteriosa 24% vs 18%, la diarrea nel 45% vs 27%, sindrome mano-piede (HFSR) 30% vs 24%, fatigue 44% vs 67% ($p=0.044$), nausea 3% vs 19% ($p= 0.05$), calo ponderale 31% vs 20%, sanguinamento 12% vs 5% ed ascite 10% vs 15%. È stata quindi valutata l'influenza sull'OS delle variabili risultate statisticamente significative all'analisi univariata ed è emerso che il PS, i livelli basali di AFP e la comparsa di nausea hanno un'influenza significativa anche nell'OS dei pazienti in trattamento con sorafenib (rispettivamente; $p=0.003$, $p=0.006$ e $p=0.008$) (Figura 1- a, b, c).

Parametro	LTR	STR	Valore p
Pazienti (numero)	33	61	
TD (giorni)			0,000
mediana	343	70	
OS (giorni)			0,000
mediana	620	198	
Sesso (%)			0,715
M	87,9	91,8	
F	12,1	8,2	
Eziologia (%)			0,450
HCV	39,4	42,6	
HBV	21,2	14,8	
alcol	15,2	16,4	
multifattoriale	15,2	6,6	
altra (cripto/NASH)	9,1	19,7	
Malattia pre-trattamento (gg)			1,000
mediana	544	466	
Trombosi portale (%)	30,3	34,4	0,819
Ipertensione portale (%)	45	60,7	0,194
Metastasi (%)	26,7	37,5	0,348
Ascite basale (%)	18,8	16,9	1,000
Varici esofagee (%)	29,6	51	0,094
Ipertensione arteriosa (%)	51,5	57,4	0,666
Diabete (%)	24,2	37,7	0,251
CPT (%)			0,322
A	93,6	89,8	
B	6,4	10,2	
PS (%)			0,034
0	75	50	
1	18,8	44,8	
2	6,3	5,2	
AFP basale (ng/ml)			0,006
media	2157	2737	
mediana	9	30	
AE Ipertensione arteriosa (%)	24,2	18	0,592
con IPA basale	87,5	72,7	
AE Diarrea (%)	45,2	27,1	0,102
AE HFSR (%)	30	23,7	0,611
AE Fatigue (%)	43,8	67,2	0,044
AE Nausea (%)	3,2	19,3	0,050
AE Calo ponderale (%)	31,3	20,3	0,307
AE Sanguinamento (%)	12,5	5,2	0,241
AE Ascite (%)	10	15,3	0,744

Tabella 1 Analisi univariata delle variabili clinico-laboratoristiche tra le due popolazioni long term responder (LTR) e short term responder (STR).

Figura 1



a. Analisi Kaplan-Meier della sopravvivenza dei pazienti. STR in blu vs LTR in verde (mediana 20,7 vs 6,6 mesi, $p=0,000$). *b.* PS ($p=0,003$), *c.* AFP ($p=0,006$), *d.* comparsa di nausea ($p=0,008$)

Discussione

L'identificazione di parametri clinici predittivi di risposta al Sorafenib appare di grande rilevanza in considerazione dei possibili effetti collaterali ai quali sono soggetti anche i pazienti non-responder al trattamento, del peggioramento della qualità di vita e dell'elevato costo del farmaco.

Tuttavia in letteratura non vi sono molti studi che dimostrino la presenza di sicuri predittori clinici di risposta alla terapia.

L'AFP è stata riportata in più studi come possibile predittore di risposta: in uno studio di Nakazawa un precoce incremento del 20% dell'AFP è risultato in grado di predire la progressione tumorale nel 76%

dei pazienti con una effettiva progressione di malattia (8). In un recente studio italiano è stata valutata la risposta al trattamento con sorafenib di 85 pazienti con HCC, in cui nel 70% dei casi è stata ottenuta una stabilizzazione di malattia ed in circa la metà di questi pazienti la riduzione dell'AFP del 20% (in pazienti con valori basali di AFP > 20 ng/ml) ha predetto la risposta al trattamento ed è risultata associata ad un aumento dell'OS e del TTP. Inoltre nei pazienti non-responders sono stati osservati valori mediani basali più elevati di AFP pur in assenza di significatività statistica (9).

Ciò quindi suggerisce che l'AFP non solo sia un fattore prognostico nei pazienti con HCC, ma che in pazienti con livelli basali elevati possa anche essere utilizzata in corso di trattamento per valutare la risposta precoce alla terapia con Sorafenib.

Il nostro studio ha confermato che l'AFP basale > di 19 ng/ml è predittiva di minore sopravvivenza e di minore durata del trattamento in quanto risultata più frequentemente elevata negli STR.

Tra i due gruppi LTR e STR non sono state notate differenze significative in termini di stadiazione BCLC, di funzione epatica CPT, né di trattamenti pregressi. Un risultato simile è emerso anche dallo studio di Song et al, in cui venivano ricercati predittori clinici di risposta in 40 pazienti con HCC in trattamento con sorafenib mostrando come il CPT ed i trattamenti pregressi non influenzassero l'OS (10). Inoltre nel nostro studio è particolarmente interessante notare la scarsa correlazione tra la presenza di metastasi e trombosi portale neoplastica (distribuite omogeneamente tra LTR e STR) e la durata del trattamento con Sorafenib ed in particolare con l'OS. Tali parametri sembrano pertanto non influire oggettivamente su una buona risposta al trattamento, sebbene nello studio SOFIA si siano dimostrati entrambi fattori prognostici indipendenti di mortalità insieme al PS, alla progressione radiologica ed all'assunzione di dose terapeutica piena (6). Inoltre la presenza di metastasi si è rivelata in più studi predittiva di peggiore sopravvivenza ed in particolare di peggiore risposta al sorafenib, tanto da far emergere l'ipotesi di un miglior utilizzo del farmaco in un contesto meno avanzato di malattia (10,12).

I nostri dati sono stati ulteriormente confermati dalla sottoanalisi di un recente studio di Koschny, forse concettualmente più simile al nostro, nel quale 46 pazienti con HCC avanzato in terapia con sorafenib sono stati suddivisi in due gruppi, long (OS \geq 20 mesi) e short survivor (OS < 20 mesi), ed è emerso che non differivano in termini di BCLC, metastasi extraepatiche e CPT (11).

Da tali dati si evince pertanto che la presenza di malattia extraepatica e di invasione vascolare siano di per sé dei fattori prognostici sfavorevoli, ma tuttavia la loro presenza non impedisce in alcuni pazienti l'instaurarsi di una lunga risposta al sorafenib, facendo intravedere quanto la risposta tumorale al farmaco dipenda molto dalle sue intrinseche caratteristiche biologiche.

Nel gruppo LTR è emerso il maggior tasso di pazienti con un PS=0 (PS=0 nel 75% vs 50%, $p= 0,034$) con un incremento in OS ($p= 0,003$) confermando i dati di letteratura sul PS come fattore chiave nella prognosi dei pazienti con HCC, e in questo caso mettendolo in relazione con un maggiore TD, frutto forse di una migliore aderenza al trattamento e in generale ad un minore stato di compromissione generale del paziente (6,11,12).

Un recente studio giapponese ha raccolto una casistica nazionale di 3047 pazienti con HCC trattati con sorafenib ed in particolare ha analizzato tutti i casi di risposta completa (CR, n=18) per valutarne le caratteristiche cliniche, e sono emersi come fattori significativi il sesso femminile, un basso peso corporeo (<59 Kg), uno stadio di malattia precoce, una dose iniziale di farmaco ridotta e la presenza di eventi avversi sorafenib-specifici (13).

La comparsa di AE è stata recentemente messa in relazione alla risposta al trattamento con sorafenib, in particolare Song ha riportato che la presenza di AE predice un incremento di 2.5 volte del tasso di controllo della malattia (10).

L'ipertensione arteriosa, la diarrea e la tossicità cutanea sono stati messi frequentemente in relazione ad una migliore risposta al sorafenib e quindi ad un incremento in OS (11,14-17); nella nostra casistica i tassi di ipertensione arteriosa, di sindrome mano-piede ed in particolare di diarrea sono lievemente maggiori nel gruppo LTR pur in assenza di significatività (tab 1).

Emergono però come predittori di minore durata di trattamento la comparsa di astenia e di nausea, ed inoltre la nausea risulta anche predittrice di una peggiore sopravvivenza ($p=0,008$). Tuttavia tali sintomi possono essere sia sorafenib correlati sia conseguenza della sottostante progressione tumorale, pertanto è difficile correlarli strettamente alla risposta al sorafenib e ai suoi meccanismi d'azione, ma possono essere d'aiuto indiretto per capire l'imminente sviluppo clinico.

Infine il nostro studio presenta alcuni limiti: la retrospettività e la modesta numerosità del campione. Sono quindi necessari ulteriori approfondimenti, possibilmente con popolazioni più ampie, per meglio valutare il ruolo dei parametri clinici nella predizione della risposta al sorafenib.

Rimaniamo inoltre in attesa dei risultati di studi su potenziali nuovi biomarcatori coinvolti nella valutazione della risposta al trattamento.

Conclusioni

La presenza di metastasi e trombosi portale neoplastica non sembra inficiare i vantaggi clinici del sorafenib. Lo sviluppo di astenia ed in particolare di nausea sono predittori di minore durata del trattamento con sorafenib, e la nausea è associata ad una minore OS. L'AFP basale <19 ng/ml ed il PS 0 sono predittori indipendenti di migliore sopravvivenza. I parametri clinico-laboratoristici possono essere utili nell'identificazione dei pazienti che traggono un beneficio clinico dal sorafenib.

Bibliografia

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.
2. Bruix J, Sherman M; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42:1208-36.
3. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359:378-90.
4. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebocontrolled trial. *Lancet Oncol*. 2009;10:25-34.
5. Marrero JA, Lencioni R, Kudo M, Ye S, Nakajima K et al; Global investigation of therapeutic decisions in hepatocellular carcinoma and of its treatment with sorafenib (GIDEON) second interim analysis in more than 1,50 patients: clinical findings in patients with liver dysfunction. *J Clin Oncol* 2011;29
6. Iavarone M, Cabibbo G, Piscaglia F, Zavaglia C, Grieco A, Villa E et al; Field Practice study of sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma: a prospective multicenter study in Italy. *Hepatology* 2011;54:2055-2063.
7. Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2010 Feb;30(1):52-60.
8. Nakazawa T, Hidaka H, Takada J, Okuwaki Y; Early increase in α -fetoprotein for predicting unfavorable clinical outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun;25(6):683-9.
9. Personeni N, Bozzarelli S, Pressiani T, Rimassa L; Usefulness of alpha-fetoprotein response in patients treated with sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012 Jul;57(1):101-7.
10. Song T., Zahng W., Wu Q., Kong D., and Ma W.. A single center experience of sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma patients: evaluation of prognostic factors. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2011;23:1233-38
11. Koschny R, Gotthardt D, Koehler C, Jaeger D; Diarrhea is a positive outcome predictor for sorafenib treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2013;84(1):6-13.
12. Yau T, Chan P, Ng KK, Chok SH, Cheung TT, Fan ST, Poon RT. Phase 2 open-label study of single-agent sorafenib in treating advanced hepatocellular carcinoma in a hepatitis B-endemic Asian population: presence of lung metastasis predicts poor response. *Cancer*. 2009 Jan 15;115(2):428-36
11. Hsu C.Y., Lee Y.H., Hsia C.Y., Huang Y.H., Su C.W., et al. Performance status in patients with hepatocellular carcinoma: determinants, prognostic impact and ability to improve the BCLC system. *Hepatology* 2012
12. Zhao P, Chen D, Chen W; Clinic predictors of efficacy and adverse events of sorafenib therapy for advanced hepatocellular carcinoma patients. 2012 Jun; 50(6): 514-7
13. Shiba S, Okusaka T, Ikeda M, Saito H, Ichida T. Characteristics of 18 patients with hepatocellular carcinoma who obtained a complete response after treatment with sorafenib. *Hepatol Res*. 2014 Jan 9. [Epub ahead of print]
14. Zhao Y., Yang M., Qi X., Han G., Fan D. Drug-related adverse events may predict efficacy in sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012
15. Bettinger D., Schultheiß M., Knuppel E., Thimme R., Blum H.E., Spangenberg H.C. Diarrhea predicts a positive response to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012
16. Estfan B., Byrne M., and Kim R. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. Hypertension as a potential surrogate marker of efficacy. *American Journal of Clinical Oncology* 2012
17. Vincenzi B, Santini D, Russo A, Addeo R; Early skin toxicity as a predictive factor for tumor control in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Oncologist*. 2010;15(1):85-92.

Studio 2 - Valutazione dell'impatto della sospensione temporanea e definitiva della terapia antiangiogenica mediante tecniche ecografiche in un modello murino di carcinoma epatocellulare.

Abstract

Scopo dello studio

Lo sviluppo di vie di fuga dal trattamento antiangiogenico è riportato come associato ad un incremento dell'aggressività tumorale, ed è stato ipotizzato un effetto *rebound* neoangiogenico all'interruzione del trattamento. Lo scopo di questo studio è di valutare la risposta del tumore in un modello murino di epatocarcinoma (HCC) simulando differenti condizioni di somministrazione della terapia antiangiogenica, in particolare prevedendo l'interruzione temporanea e definitiva del trattamento.

Metodi

Sono stati creati tumori sottocutanei inoculando 5×10^6 cellule Huh7 nel fianco destro di 14 topi nudi. Quando le dimensioni del tumore hanno raggiunto i 5-10 mm, i topi sono stati divisi in 3 gruppi: Gruppo 1, trattato con placebo, Gruppo 2 trattato con sorafenib (62 mg/kg/die mediante gavage orale) con interruzione temporanea della terapia tra il giorno +5 e il giorno +9 ed il Gruppo 3, trattato con sorafenib con interruzione definitiva della terapia al giorno +5. Il giorno +13 tutti i topi sono stati sacrificati, e le masse tumorali sono state conservate per effettuare l'analisi Western - Blot. Ai giorni 0, +5, +9, +11 e +13 è stato calcolato il volume tumorale. Nei giorni +5 e +13 è stata effettuata una CEUS con mezzo di contrasto targettato per il VEGFR2 (BR55, Bracco Suisse). Ai giorni +9 e +11 è stata effettuata l'elastasonografia per valutare la rigidità tumorale.

Risultati

La mediana del delta di crescita percentuale tra il giorno 0 ed il giorno +13 è stata di 197 % (range 115 – 329%) nel Gruppo 1, 81 % (range 48 – 144%) nel Gruppo 2 e di 111 % (range 27 – 167%) nel Gruppo 3. La mediana del delta di crescita percentuale tra il giorno +5 ed il giorno +13 è stata di 79 % (range 48 – 127%) nel Gruppo 1, 37 % (range -14 – 127%) nel Gruppo 2 e 81 % (range 15 – 87%) nel Gruppo 3. La quantificazione della CEUS con BR55 al giorno +13 ha mostrato valori più elevati nel gruppo 3 (mediana 509, range 293 – 652) rispetto ai gruppi 1 (mediana 275, range 191 – 494) e 2 (mediana 181, range 63 – 318), ($p = 0,033$). L'analisi Western-Blot ha mostrato un'espressione del VEGFR2 leggermente superiore nel gruppo 3 rispetto ai gruppi 1 e 2.

Conclusioni

La sospensione temporanea della terapia antiangiogenica non impedisce il ripristino di risposta del tumore, mentre una interruzione definitiva tende a stimolare un effetto *rebound* dell'angiogenesi a livelli anche maggiori rispetto all'assenza di trattamento.

Introduzione

I trattamenti antiangiogenici sono diventati il pilastro dei trattamenti oncologici per diversi tipi di tumore [1-3]. Tale trattamento raramente produce una necrosi completa del tumore, piuttosto ritarda la progressione tumorale e deve pertanto essere utilizzata continuativamente come una terapia cronica. Tuttavia, anche in presenza di risposta del tumore alla terapia possono svilupparsi eventi avversi tali da richiedere l'interruzione transitoria o permanente del trattamento. Dal momento dell'interruzione del trattamento, la neoangiogenesi viene iperstimolata dalle vie del segnale precedentemente bloccate dal farmaco e attraverso vie alternative indotte in risposta al trattamento in particolare attraverso l'attivazione del programma cellulare di invasività, o cambiando il fenotipo cellulare e selezionando cloni resistenti all'ipossia [4-6]. Sono stati riportati in letteratura, un aumento fino a 10 volte dell'incidenza di carcinomi invasivi a 1,2 e 3 settimane dall'interruzione di farmaci anti angiogenici come pure un rapido incremento del volume tumorale [4,7]. Pertanto il mantenimento di trattamenti antiangiogenici anche durante la progressione potrebbero essere giustificati per prevenire l'effetto "rebound" di neoangiogenesi tumorale [8].

Sorafenib è l'unico farmaco attualmente approvato per il carcinoma epatocellulare avanzato (HCC) e agisce bloccando il recettore per il fattore di crescita vascolare endoteliale 2 (VEGFR2), il recettore per il fattore di crescita piastrinico (PDGFR), Raf - 1, B - Raf e c-kit [9]. A differenza dei farmaci chemioterapici convenzionali che ottengono un effetto diretto citotossico necrotizzante, il sorafenib, come altri farmaci antiangiogenetici, mira a bloccare la neoangiogenesi e la proliferazione delle cellule tumorali, rendendo per tale ragione i criteri dimensionali meno utili nella valutazione della risposta del tumore.

L'ecografia con mdc molecolare prevede l'utilizzo di microbolle targettate (MB-CEUS) con potenzialità in oncologia che vanno dalla rilevazione del cancro alla valutazione della risposta al trattamento. Per evitare agenti come streptavidina e biotina, che sono potenzialmente immunogenici, è stato recentemente introdotto un nuovo metodo di coniugazione, dove i lipopeptidi targettati per il VEGFR2 (BR-55) sono direttamente incorporati nel guscio delle microbolle [10]. Utilizzando questa tecnologia, le microbolle BR-55 possono essere utilizzate in esseri umani ed è già stato effettuato un primo studio in 12 pazienti [11]. Il BR-55 permette pertanto di identificare i siti di neoangiogenesi attivi, come quelli che si trovano nel tessuto tumorale, mentre il parenchima sano presenta solo minime e non vincolanti interazioni con le MB [12]. La loro specificità per il legame al VEGFR2, e quindi per il legame ai vasi sanguigni tumorali e la loro utilità nel monitoraggio del trattamento antiangiogenico sono già stati

riportati in letteratura [13, 14]. Inoltre, anche in tumori molto piccoli è stata dimostrata una correlazione diretta tra la quantificazione della CEUS con BR-55 e l'analisi immunohistochimica [15].

L'elastosonografia è una tecnica ecografica, del tutto non invasiva, in grado di valutare le proprietà elastiche di un tessuto analizzando la deformazione tissutale conseguente ad una compressione manuale. Abbiamo recentemente dimostrato la sua utilità nell'identificare la risposta tumorale al trattamento con sorafenib ed in particolare abbiamo osservato che dopo 2 giorni dall'inizio del trattamento il tumore dei topi che rispondevano bene al trattamento presentavano un tumore più morbido rispetto ai tumori non responsivi ed al gruppo in placebo [16].

Il presente studio ha lo scopo di valutare l'efficacia di sorafenib in un modello murino di HCC sottoposto a diversi schemi di trattamento, correlando l'effetto del trattamento con i meccanismi molecolari esplorati mediante le suddette tecniche ecografiche.

Materiali e metodi

La linea cellulare umana Huh7 (ATCC cell bank, VA, USA) è stata mantenuta ed ampliata utilizzando una tecnica di coltura standard con Dulbecco Modified Eagle Medium ad elevato di glucosio, integrato con L-glutammina, 1% ampicillina/amfotericina B e con il 10% di siero fetale bovino (Gibco, Italia).

I tumori eterotopici sono stati creati attraverso l'iniezione sottocutanea di 5×10^6 cellule sospese in soluzione salina sterile tamponata con fosfato (Gibco, Italia) nel fianco destro di topi nudi CD1 femmine di 6-8 settimane (Charles River, Italia).

I topi sono stati alimentati con cibo standard ed acqua a disposizione illimitatamente e sono stati disposti in un armadio con ricircolo d'aria specifico (privo di agenti patogeni), all'interno di una stanza con ciclo luce/buio di 12 ore, a temperatura ed umidità controllate.

I topi sono stati randomizzati in tre gruppi: il gruppo 1 è stato trattato con placebo, il gruppo 2 è stato trattato con sorafenib (BAY 43-9006 ; Bayer, Germania) alla dose di 62 mg/kg/die mediante gavage orale con una interruzione transitoria dal giorno +5 al giorno +9 ed il gruppo 3 è stato trattato con sorafenib fino al giorno +5 e poi con placebo [9]. La crescita tumorale è stata monitorata almeno due volte alla settimana con l'ecografia. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal comitato etico veterinario universitario di Bologna.

Per la sperimentazione è stato utilizzato un ecografo MyLab70 XVG (Esaote, Italia) con una sonda lineare da 4-13 MHz. I topi sono stati anestetizzati mediante una soluzione intraperitoneale costituita da una parte di ketamina 10 % (Ketavet, Intervet Production srl, Italia), una parte di xylazina 20 mg/ml (Rompun, Bayer AG, Germania) e otto parti di acqua sterile, per un totale di 0.2 mL.

Uno strato di gel per ultrasuoni riscaldato è stato posizionato sulla pelle dei tumori per l'esecuzione dell'esame B -mode, dell'elastosonografia e della CEUS con BR-55 (figura 1). Le dimensioni del tumore sono state acquisite ecograficamente ed il volume tumorale è stato calcolato con la formula : $\text{altezza} \times \text{larghezza} \times \text{spessore} / 2$. Quando i tumori hanno raggiunto 5-10 mm di diametro, i topi sono

stati inclusi nel protocollo di 13 giorni e quindi il volume è stato monitorato al giorno 0, +5, +9, +11 e +13.

L'elastosonografia è stata eseguita dallo stesso operatore. La deformazione del tessuto tumorale, ottenuta mediante una lieve compressione manuale sulla cute del topo, è rappresentata sul monitor dell'ecografo come una scala cromatica che varia dal rosso (tessuto rigido-duro) al verde (tessuto morbido). Tra la sonda ed il tumore è stato posto un pad di consistenza costante ed omogenea che è stato utilizzato come riferimento standard, in quanto lo strain imaging non dà delle misurazioni di rigidità tissutale di carattere assoluto. In questo modo, l'elasticità del tumore è stata correlata ad ogni tempo della sperimentazione con il pad ed i cambiamenti di elasticità nel tempo sono stati espressi come cambiamenti di tale rapporto. La tecnica di valutazione elastosonografica era la medesima utilizzata e descritta in un precedente studio del nostro gruppo [16].

Durante l'anestesia sono state effettuate tre misurazioni ed il valore medio è stato utilizzato per l'analisi.

Un rapporto più elevato indica una maggiore elasticità del tumore (cioè tessuti più morbidi). L'intera procedura elastografica è durata circa 2 minuti per ogni topo ed è stata eseguita ai giorni +9 e +11 per valutare in modo non invasivo il diverso comportamento dei tumori dal momento della reintroduzione del trattamento con sorafenib nel gruppo 2.

Per eseguire la CEUS con BR-55, la sonda è stata posta su un supporto meccanico fisso al fine di mantenere la stessa scansione del tumore durante tutta la durata dell'esame. Per avere la certezza di visionare l'area corretta è stato utilizzato un software specifico per il contrasto (Contrast Tuned Imaging, CnTI) che divide il display in due: una finestra B-mode ed una finestra contrasto.

La seguente impostazione è stata utilizzata e mantenuta per tutti gli esperimenti: range dinamico, 7 dB, potenza acustica, 30 kPa ; indice meccanico, 0.03, profondità, 22-37 mm ; categoria intermedia di compensazione del guadagno, sonda lineare.

Il mdc con MB targettate per il VEGFR - 2 (BR55, Bracco Suisse SA, Ginevra, Svizzera) è stato ricostituito iniettando 2 ml di una soluzione di glucosio al 5% sterile attraverso il setto del flaconcino. Un volume pari a 1.7 μ l/g di sospensione di MB (2.4×10^7 MBs) è stato iniettato attraverso il seno retro-orbitale nella circolazione venosa del topo. Subito dopo l'iniezione è stato acquisito un video-clip di 30 secondi ad un basso MI. Un secondo video-clip è stato acquisito a partire da 5 minuti e 55 secondi dopo l'iniezione del contrasto. A 6 minuti le MB presenti nel campo in visione del tumore sono state distrutte con un flash di 1 secondo ad alto MI (1.9). I successivi 18 secondi sono stati utilizzati per valutare la presenza di MB circolanti.

Questo processo è chiamato analisi di distruzione-rifornimento [17]. La stessa procedura è stata ripetuta come da protocollo al giorno +5 (quando il gruppo 2 e gruppo 3 erano in trattamento) e al giorno 13 (in cui solo gruppo 2 era in trattamento). La successiva analisi dei clips di distruzione di rifornimento, registrati come DICOM, è stata effettuata utilizzando un software prototipo (Bracco Suisse SA, Svizzera). Questo software è stato progettato per quantificare il contrasto all'interno di una

regione di interesse (ROI) che nel nostro caso racchiude per intero l'area tumorale. Prima di procedere alla quantificazione, l'analisi applica prima la linearizzazione dell'intensità del segnale a livello dei pixel in modo da invertire gli effetti della compressione "log". L'enhancement del contrasto nella ROI è espressa come valori relativi echo-power, che sono proporzionali al numero di MBs nella ROI selezionata.

Il software riconosce automaticamente i frames ad alto MI e considera per la quantificazione solo i 2 secondi prima del periodo ad alto MI e i 10 secondi seguenti in 15esimo secondo dopo il flash.

L'intensità del segnale dopo la distruzione (TE_{ad}) è stato sottratto dalla intensità del segnale determinato prima della distruzione (TE_{bd}) al fine di ottenere il differential target enhancement ($dTE = TE_{bd} - TE_{ad}$). Poiché il TE_{bd} esprime sia le MB circolanti che legate, mentre TE_{ad} solo i MB circolanti, la differenza tra loro (dTE) rappresenta un valore numerico proporzionale alla quantità di MB legate al recettore bersaglio VEGFR2.

I primi 30 secondi di clip acquisiti in fase arteriosa sono stati valutati in cieco e indipendentemente da due operatori per quantificare visivamente la percentuale di aree non perfuse.

I tassi di aree non perfuse sono stati quantificati utilizzando una scala di passaggio del 10% mediante la visualizzazione della perfusione del tumore al picco di enhancement.

Al giorno +13 dopo l'ultima misurazione e ancora in corso di anestesia, tutti gli animali sono stati sacrificati con 0,1 mL di una soluzione di embutramide, mebezonium ioduro e tetracaina cloridrato (Tanax, Intervet Italia srl, Italia) ed i tumori sono stati conservati a -80 °C per l'analisi Western - Blot.

Due anticorpi policlonali, uno diretto contro il VEGFR2 (Cell Signaling Technology, Inc. Danversa, MA, USA)(diluito a 1:1000) ed uno contro il Fattore inducibile dall'ipossia (HIF α) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. di Santa Cruz, CA, USA) (diluito a 1:200) sono stati incubati separatamente per 16 ore a 4 °C. Un anticorpo secondario coniugato (etichetta antirabbit polimero HRP, sistema Envision DAKO Cytomation, Carpinteria, CA, USA) è stato incubato per 45 minuti a temperatura ambiente e la corrispondente banda è stata rivelata con il metodo chemiluminescenza potenziata (Amersham, UK). Le immagini digitali delle autoradiografie sono state acquisite e quantificate con ChemiDoc™ XRS + (Immagine Lab™ Software, Bio - Rad).

Le immagini sono state calibrate contro un autoradiografia di riferimento ed espresse in unità di densità relativa (d.u.). Dopo l'acquisizione, le membrane sono state cancellate, e incubate nuovamente per due ore a temperatura ambiente con anticorpo anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. di Santa Cruz, CA, USA) per normalizzare la proteina carico. Per quantificare i livelli di ogni proteina (valore normalizzato) è stato usato un rapporto tra le bande di VEGFR2 o HIF1 e β -actina corrispondente. Tre campioni di ciascun gruppo, selezionati casualmente, sono stati usati per l'analisi Western - Blot.

Statistica

I dati sono presentati come mediana (range). Le differenze tra i gruppi sono stati valutati utilizzando il Test di Mann-Whitney o test di Kruskal-Wallis dove appropriato. Le differenze tra i diversi punti

temporali nello stesso gruppo sono stati analizzati utilizzando il Wilcoxon rank test. Il test di Spearman è stato utilizzato per l'analisi di correlazione. Una $P < 0.05$ è stata considerata significativa. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SPSS 16.0 (Chicago IL, USA).

Risultati

Il gruppo di studio è composto da 14 topi, 4 topi nel gruppo 1, 6 nel gruppo 2 e 4 nel gruppo 3.

Il volume tumorale al giorno 0 era di 143 mm^3 (105-408) nel gruppo 1, 174 mm^3 (128-190) nel gruppo 2 e 121 mm^3 (75-648) nel gruppo 3 ($p = \text{n.s.}$). Al giorno 13, il volume tumorale era 706 mm^3 (308-1748) nel gruppo 1, 277 mm^3 (85-465) nel gruppo 2 e 443 mm^3 (187-1118) nel gruppo 3, con un incremento percentuale del 197 % (115 -329), 81 % (48-144) e 111 % (27-167), rispettivamente ($p = \text{ns}$).

Quando i volumi tumorali al giorno +13 (fine dello studio) sono stati confrontati rispetto al giorno 5, momento in cui il trattamento è stato interrotto temporaneamente nel gruppo 2 e definitivamente nel gruppo 3 l'incremento tumorale percentuale è stato del 79% (48-127) per il gruppo 1, 37 % (-14 - +127) nel gruppo 2 e 81 % (15-87) nel gruppo 3 ($p = \text{NS}$), con un relativo aumento di 1,8, 1,4 e 1,8 volte (fig 1).

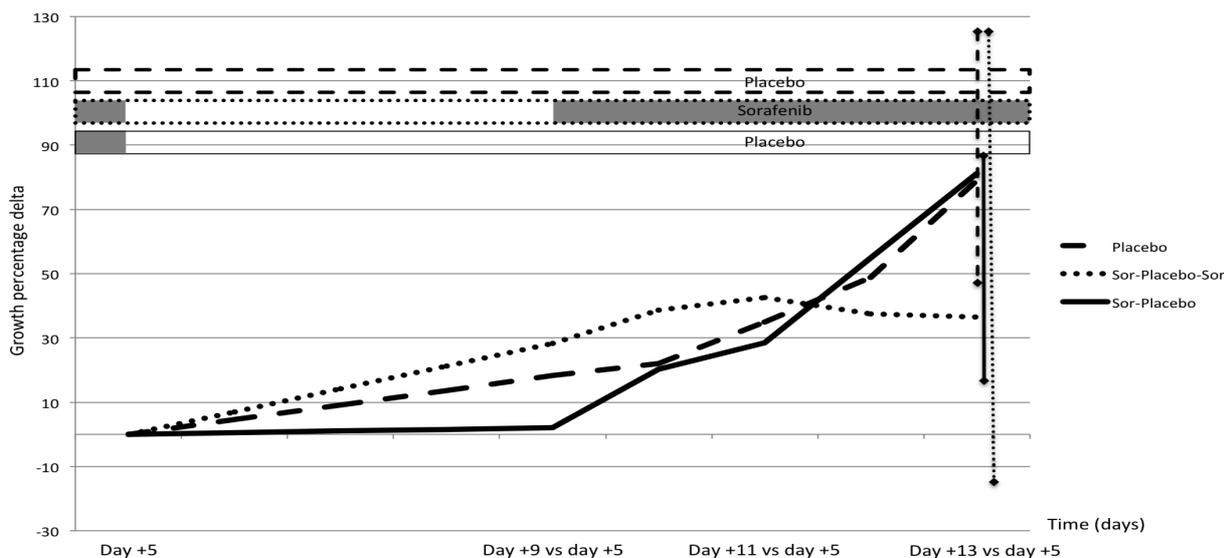


Figura 1, Delta percentuale di crescita tumorale dal giorno +5 al giorno +13.

La CEUS con BR-55 è stata eseguita al giorno +5 ed al giorno +13. I valori di dTE al giorno +5 erano 293 a.u. (121-1340) nel gruppo 1, 190 a.u. (62-255) nel gruppo 2 e 132 a.u. (79-786) nel gruppo 3 ($p = \text{n.s.}$). I valori di dTE al giorno 13 erano 275 a.u. (191-494) nel gruppo 1, 181 (65-318) nel gruppo 2 e 509 a.u. (193-652) nel gruppo 3 ($p = 0,033$ tra i tre gruppi e $p = 0.019$ confrontando solo il gruppo 2 e gruppo 3 tra loro). I delta percentuale del dTE erano +5 % (-51 - +91) nel gruppo 1, -17 % (-46 - 81) nel gruppo 2 e +266 % (+119- 730) nel gruppo 3 ($p = 0.018$ tra i tre gruppi, $p = 0.010$ tra il gruppo 2 e 3 e $p = 0,029$ tra il gruppo 1 e 3). I valori di dTE sono rimasti abbastanza costanti nel gruppo 1 e 2

(variazione mediana di 1 e 0,8 volte, rispettivamente), mentre è nettamente aumentata nel gruppo 3 (aumento mediano di 3,7 volte), suggerendo una iper-espressione di VEGFR2 in risposta all'interruzione definitiva del trattamento, considerando sia i valori assoluti che le variazioni relative del dTE tra G5 e G13 ($p = 0,068$ nel gruppo 3).

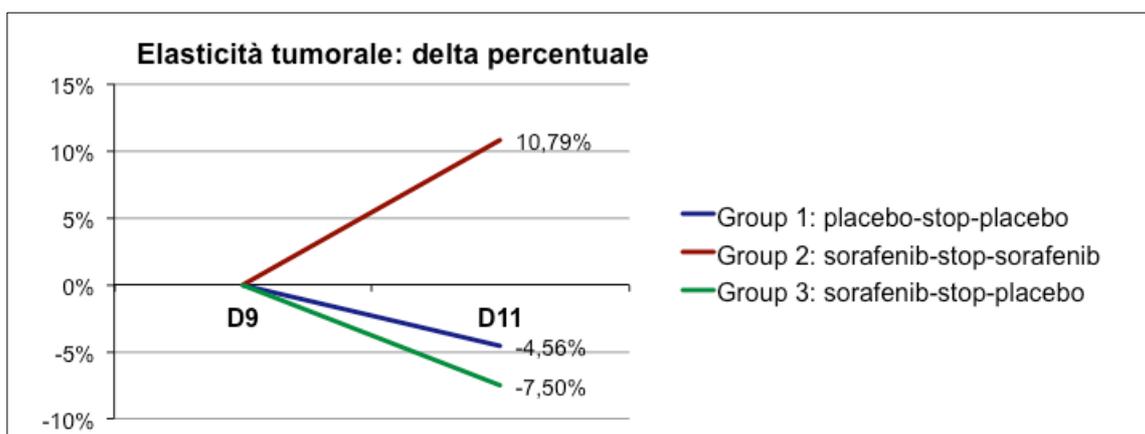
Abbiamo inoltre valutato la percentuale di enhancement in fase arteriosa, al fine di individuare il tasso di aree non perfuse (teoricamente ipossiche). In particolare, al giorno +13 era più elevata nel gruppo 1 (30 %, 20-50) che nel gruppo 2 (15 %, 0-30), ma soprattutto rispetto al gruppo 3 (5 %, 0-10), suggerendo che l'iperstimolata neoangiogenesi è stata in grado di perfondere tutte le aree tumorali.

La differenza tra i tre gruppi a giorno +13 tendevano a raggiungere la significatività statistica ($p = 0,059$) a causa della diminuzione aree necrotiche nel gruppo 3 ($p = ns$ tra il gruppo 1 e il gruppo 2 e tra il gruppo 2 e 3; $p = 0.019$ tra il gruppo 1 e il gruppo 3).

All'analisi Western Blot: i livelli di VEGFR2 al giorno +13 erano più alti nel gruppo 3 rispetto agli altri gruppi, coerente con i risultati della CEUS con MBS targettate per il VEGFR2. In particolare, i livelli di VEGFR2 erano 0,33 d.u. nel gruppo 1, 0,05 d.u. nel gruppo 2 e 2.01 d.u. nel gruppo 3 ($p = 0,061$ tra i tre gruppi, $p = 0,05$ tra il gruppo 1 e il gruppo 3 e tra il gruppo 2 e 3, $p = ns$ tra il gruppo 1 e il gruppo 2). L'analisi di HIF1 α ha confermato i risultati dell'analisi dei tassi di tessuto necrotico, infatti, livelli leggermente superiori di questa proteina sono stati riscontrati nel gruppo 1 (0.52 du) rispetto al gruppo 2 (0.47 du) ma soprattutto al gruppo 3 (0.30 du) ($p = NS$), sostenendo l'idea che l'iperstimolata neoangiogenesi nel gruppo 3 è stata in grado di perfondere tutte le aree tumorali, riducendo le regioni ipossiche. Al fine di escludere qualsiasi influenza di tumore dimensione sull'espressione di HIF-1 α , è stata effettuata una correlazione tra questi due parametri senza raggiungere alcuna significatività statistica ($p = ns$).

Le misurazioni elastosonografiche sono state eseguite ai giorni +9 e +11 per valutare la risposta dei tumori alla reintroduzione del trattamento con sorafenib nel gruppo 2, rispetto agli altri due gruppi trattati con placebo.

Il rapporto di elasticità al giorno 9 era di 1.34 (0,87-1,49) nel gruppo 1, 1,10 (1,04-1,45) nel gruppo 2 e 1.14 (1,09-1,19) nel gruppo 3 ($p = n.s.$). Al giorno +11 l'elasticità era 1,15 (0,93-1,42) nel gruppo 1,



1,33 (1,07-1,65) nel gruppo 2 e 1,08 (0,88-1,28) nel gruppo 3 ($p = ns$). L'elasticità è aumentata solo nel gruppo 2 (corrispondente ad un tumore più morbido), confermando i risultati precedenti che un aumento dell'elasticità è un indicatore precoce della risposta del tumore [16]. In particolare, il delta percentuale dei valori di elasticità erano -4,56 % (-26,65-7,28) nel gruppo 1, 10,79 % (- 3,45-55 %) nel gruppo 2 e -7.50 % (- 19,02-11,27) nel gruppo 3 (figura 4) ($p = n.s.$).

Discussione

Questo studio ha valutato l'effetto dell'interruzione temporanea e definitiva del sorafenib nell'HCC utilizzando la CEUS con MB targettate per il VEGFR2 (BR-55) e l'elastosonografia. Abbiamo dimostrato che l'interruzione precoce e breve del trattamento antiangiogenico non compromette il ripristino della risposta del tumore, mentre una definitiva interruzione porta ad una iperstimolazione della neoangiogenesi tumorale superiore rispetto anche alla mancanza di qualsiasi trattamento.

La riduzione e la normalizzazione della vascolatura tumorale e la prevenzione della formazione di nuovi vasi da parte dei farmaci antiangiogenici sono stati già dimostrati e sono le ragioni chiave del loro utilizzo in oncologia [1, 18, 19]. Tuttavia, è stato riportato in studi animali la presenza di una ricrescita vascolare già dopo 2 giorni dall'interruzione della terapia antiangiogenica [7, 20] come anche una incrementata metastatizzazione a distanza [21]. I meccanismi proposti, che possono svolgere un ruolo in questo contesto sono una stimolazione di citochine e fattori di crescita pro-angiogenici, la mobilitazione di cellule derivate dal midollo osseo, ma anche la risposta microambientale ai farmaci multitarget [21].

Inoltre, è stata riportata una maggiore invasività tumorale dopo l'interruzione del trattamento anti-VEGFR2, che si verificherebbe già dopo 1 settimana. In particolare, i tumori più aggressivi presentano una capsula sottilissima (o addirittura assente) con un ampio fronte di invasione [4]. L'effetto "rebound" è soprattutto evidente a livello vascolare [22] e tumori sono completamente vascolarizzati già dopo 7 giorni dalla sospensione del trattamento [20]. Oltre che in modelli animali e ad un limitato numero di pazienti, questo fenomeno, in cui l'interruzione del trattamento porta ad un più alto rischio di progressione e metastatizzazione, è stato ipotizzato come generalizzabile [23 22].

Nel presente studio abbiamo dimostrato la progressione "rebound" utilizzando metodi di imaging, come la CEUS molecolare con BR-55 e l'elastosonografia. Infatti, l'elevata espressione di VEGFR2 che si verifica dopo la sospensione definitiva del sorafenib, dimostrata dalla CEUS molecolare, rappresenta l'iperstimolazione della neoangiogenesi. Al contrario, il ripristino della risposta del tumore sottoposto ad un secondo ciclo di trattamento è testimoniato dalla down-regulation del VEGFR2, documentato anche dal BR-55. La conferma di tale ripristino della risposta, oltre che dalla riduzione dimensionale, deriva anche dai risultati elastosonografici, con un incremento dell'elasticità dei tumori trattati.

HIF - 1 α rappresenta un fattore chiave nell'angiogenesi tumorale, essendo in grado di attivare la trascrizione del VEGF. Durante l'ipossia, l'attività di idrossilasi è inibita dalla bassa concentrazione di ossigeno, stabilizzando HIF - 1 α , che è così in grado di traslocare nel nucleo dove dimerizza con HIF-

1 β per attivare i geni bersaglio. I nostri risultati sono in linea con altri che dimostrano che il sorafenib inibisce la sintesi di HIF - 1 α , portando ad una ridotta espressione di VEGF [24]. Tuttavia, una rapida crescita è essa stessa in grado di indurre ipossia, e quindi l'alta espressione di HIF - 1 α nel gruppo 1 del placebo è giustificata. Inoltre, altri fattori pro-angiogenici come il fattore di crescita placentare (PIGF), il fattore di crescita dei fibroblasti ed altri possono essere stimolati per sostenere la crescita del tumore ipossico [25]. Infine, l'effetto "rebound" neoangiogenetico che si verifica dopo la sospensione definitiva del sorafenib permette una perfusione del tumore quasi completa (come dimostrato anche dalla quantificazione arteriosa) lasciando aree ipossiche solo minime e quindi portando ad una minore espressione di HIF - 1 α (come dimostrato nel nostro studio).

La conseguenza di queste osservazioni per la pratica clinica è la consapevolezza che alla interruzione definitiva del trattamento si avrà l'effetto "rebound" della neoangiogenesi. Si potrebbe pertanto ipotizzare, in assenza di valide alternative terapeutiche di seconda linea, di mantenere comunque il trattamento, almeno fino ad una chiara progressione clinica oltre che radiologica. Inoltre, in caso di insorgenza di eventi avversi, se non gravi, una riduzione del dosaggio può essere raccomandato invece di una interruzione temporanea. Vale la pena di ricordare che nei trials registrativi del sorafenib [1] il protocollo non prevedeva di interrompere il trattamento al momento della documentazione di progressione radiologica ma solo quando si sommava una progressione sintomatica, in questo modo i pazienti sono stati trattati per un periodo di tempo più lungo, prevenendo in tale modo gli effetti negativi "rebound".

Il presente studio presenta tuttavia delle limitazioni: nonostante sia stata segnalata una completa rivascularizzazione tumorale ad una settimana dalla sospensione, la stabilizzazione della concentrazione del farmaco è raggiunta in 7 giorni e l'emivita del farmaco è di 25-48 ore, pertanto le tempistiche di interruzione, reintroduzione e di valutazione finale potrebbero essere state sub-ottimali [20]. Tuttavia, pensiamo che un trattamento di maggiore durata potrebbe portare ad un effetto "rebound" di neoangiogenesi più pronunciato, ma questa ipotesi deve essere ulteriormente valutata in futuro.

Vi sono inoltre limitazioni intrinseche relative al modello come in ogni esperimento preclinico ed i nostri risultati richiederebbe una validazione in ambito clinico umano, che però per ragioni etiche non può essere valutato nel contesto di un trial.

Conclusioni

In conclusione, il presente studio conferma lo sviluppo di un effetto "rebound" neoangiogenetico dopo la sospensione definitiva del trattamento con sorafenib in un modello murino di HCC. Inoltre, l'identificazione di iperespressione del VEGFR2 attraverso la CEUS molecolare con BR-55, una nuova tecnica consolidata per l'imaging nei piccoli animali, ne suggerisce il potenziale come strumento per l'utilizzo umano nel prossimo futuro.

Bibliografia

1. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al: Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008, 359(4):378-390.
2. Oh WK, McDermott D, Porta C, et al: Angiogenesis inhibitor therapies for advanced renal cell carcinoma: Toxicity and treatment patterns in clinical practice from a global medical chart review. *Int J Oncol* 2014, 44(1):5-16.
3. Lai EC, Lau SH, Lau WY: Current management of gastrointestinal stromal tumors--a comprehensive review. *Int J Surg* 2012, 10(7):334-340.
4. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J; Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009, 15(3):220-231.
5. Ferrara N: Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010, 21(1):21-26.
6. Shojaei F: Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. *Cancer Lett*, 320(2):130-137.
7. Fox WD, Higgins B, Maiese KM, Drobnjak M; Antibody to vascular endothelial growth factor slows growth of an androgenindependent xenograft model of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002, 8(10):3226-3231.
8. Pazo-Cid RA, Lanzuela M, Esquerdo G; Novel antiangiogenic therapies against advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *Clin Transl Oncol*, 14(8):564-574.
9. Wilhelm S, Carter C, Lynch M; Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5(10):835-844.
10. Kaneko OF, Willmann JK: Ultrasound for molecular imaging and therapy in cancer. *Quant Imaging Med Surg*, 2(2):87-97.
11. Moestue SA, Gribbestad IS, Hansen R: Intravascular targets for molecular contrastenhanced ultrasound imaging. *Int J Mol Sci*, 13(6):6679-6697.
12. Tardy I, Pochon S, Theraulaz M, Emmel P; Ultrasound molecular imaging of VEGFR2 in a rat prostate tumor model using BR55. *Invest Radiol*, 45(10):573-578.
13. Pochon S, Tardy I, Bussat P, Bettinger T; a lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis. *Invest Radiol* 2010, 45(2):89-95.
14. Pysz MA, Foygel K, Rosenberg J; Antiangiogenic cancer therapy: monitoring with molecular US and a clinically translatable contrast agent (BR55). *Radiology* 2010, 256(2):519-527.
15. Bzyl J, Palmowski M, Rix A, Arns S; The high angiogenic activity in very early breast cancer enables reliable imaging with VEGFR2-targeted microbubbles (BR55). *Eur Radiol* 2013, 23(2):468-475.
16. Salvatore V, Baron Toaldo M, Marinelli S; Early Prediction of Treatment Response to Sorafenib with Elastosonography in a Mice Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma: A Proof-of-Concept Study. *Ultraschall Med* 2011, 32(6):541-549.
17. Dietrich CF, Averkiou MA, Correas JM; An EFSUMB introduction into Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound (DCE-US) for quantification of tumour perfusion. *Ultraschall Med* 2012, 33(4):344-351.
18. Jain RK: Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001, 7(9):987-989.
19. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D: Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003, 111(9):1287-1295.
20. Mancuso MR, Davis R, Norberg SM; Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 2006, 116(10):2610-2621.
21. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W; Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009, 15(3):232-239.
22. Zuniga RM, Torcuator R, Jain R; Rebound tumour progression after the cessation of bevacizumab therapy in patients with recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol* 2010, 99(2):237-242.

23. Johannsen M, Florcken A, Bex A; Can tyrosine kinase inhibitors be discontinued in patients with metastatic renal cell carcinoma and a complete response to treatment? A multicentre, retrospective analysis. *Eur Urol* 2009, 55(6):1430-1438.
24. Liu LP, Ho RL, Chen GG, Lai PB; Sorafenib inhibits hypoxia-inducible factor-1alpha synthesis: implications for antiangiogenic activity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012, 18(20):5662-5671.
25. Cuenod CA, Fournier L, Balvay D, Guinebretiere JM; Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced MRI and CT assessment. *Abdom Imaging* 2006, 31(2):188-193.

Studio 3 - Capecitabina metronomica come trattamento di seconda linea in pazienti resistenti o intolleranti a sorafenib.

Abstract

Scopo dello studio

I pazienti con epatocarcinoma (HCC) che terminano la prima linea di terapia con sorafenib presentano frequentemente una funzione epatica compromessa ed una prognosi severa. Al momento non esistono trattamenti “codificati” per la seconda linea di trattamento.

Pertanto lo scopo del nostro studio è quello di valutare retrospettivamente i dati relativi alla sicurezza ed all’efficacia del trattamento con capecitabina a dosaggio metronomico in pazienti con HCC in progressione o intolleranti a sorafenib.

Pazienti e metodi

Nel periodo tra Gennaio 2012 al Gennaio 2014, 19 pazienti HCC su cirrosi (14 Child-Pugh A, 5 Child-Pugh B7 patients, 1 BCLC-A, 2 BCLC-B, 16 BCLC-C) sono stati trattati capecitabina a dosaggio metronomico (500 mg bid) dopo progressione o intolleranza a sorafenib (n=15, n=4 rispettivamente).

Sedici pazienti (85%) non risultavano elegibili all’ingresso in trial di seconda linea sulla base dei criteri di inclusione/esclusione clinico-laboratoristici.

Risultati

La mediana della durata del trattamento è stata di 2.9 mesi (range 0.4-21.7 mesi).

Hanno portato all’interruzione del trattamento la progressione radiologica di malattia (53%, n=10), la progressione sintomatica (21%, n=4), il peggioramento della funzione epatica (10%, n=2) e gli eventi avversi (AE, 5%, n=1). Ad oggi 2 pazienti sono ancora in trattamento.

Una riduzione di dose ed almeno una sospensione temporanea è stata necessaria in 3 pazienti (2 per AE) ed in 7 pazienti (5 per AE), rispettivamente.

I più frequenti eventi avversi farmaco-relati sono stati: anemia (tutti I gradi n=3; grado \geq 3 n=1), linfedema (n=3, n=1), astenia (n=2, n=0), cardiotoxicità (n=1, =1), diarrea (n=1, n=0) e sd mano piede (n=1, n=1).

La migliore risposta radiologica è stata valutata mediante i criteri m-RECIST. Il controllo di malattia è stato ottenuto in 5 pazienti (risposta parziale n=1 e stabilità di malattia n=4). La documentazione radiologica non è stata disponibile alla valutazione per 4 pazienti.

Il tempo di progressione (TTP) mediano è stato di 5 mesi (95% CI 0-10), la progression free survival di 3,6 mesi (95% CI 2.8-4.3) e la sopravvivenza mediana è stata di 6.3 mesi (95% CI 4-8.6).

Conclusioni

Il trattamento con capecitabina metronomica ha dimostrato una buona tollerabilità ed una discreta attività anti-neoplastica in pazienti con epatocarcinoma già trattato con sorafenib.

Introduzione

Sorafenib (Nexavar; Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Montville, NJ, USA), un inibitore multichinasico del recettore per il fattore di crescita vascolo-endoteliale (VEGFR), del recettore per il fattore di crescita piastrinico (PDGFR) e di Raf, è l'unico farmaco sistemico approvato nell'epatocarcinoma in stadio avanzato (HCC). Sorafenib ha mostrato, in due studi randomizzati di fase III di aumentare la sopravvivenza media di circa 3 mesi (OS 10.7 vs 7.9 mesi $p < 0.001$ nello SHARP, OS 6.5 vs 4.2 mesi $p = 0.014$ Asian Pacific trial) (1,2). La minore sopravvivenza nello studio Asia-Pacific era dovuto ad una malattia più avanzata e ad un maggior tasso di pazienti affetti da HBV (2). Questi studi hanno portato all'approvazione dell'utilizzo del sorafenib nell'HCC avanzato con funzione epatica conservata (CPT A).

L'avvento del sorafenib rappresenta un cambiamento innovativo nel trattamento dell'HCC.

I trial di fase III che hanno testato farmaci inibitori multichinasici come sunitinib, brivanib o linifanib da soli, in nessun caso hanno mostrato la superiorità rispetto a sorafenib nel prolungare la sopravvivenza nel trattamento di prima linea dell'HCC (3,4).

Inoltre stanno emergendo sempre maggiori evidenze riguardanti lo sviluppo di resistenze al sorafenib dovute alla stimolazione di vie alternative della neoangiogenesi e l'induzione di una maggiore aggressività tumorale dopo l'interruzione definitiva del trattamento (3,4).

In attesa dei risultati di trial con altri farmaci a target molecolare, che inibiscono differenti vie del segnale dell'epatocarcinogenesi, mancando terapie approvate per la seconda linea di trattamento al di fuori di studi sperimentali, e mancando evidenze fondate al mantenimento del sorafenib anche dopo la progressione tumorale, il problema del "vuoto terapeutico" al termine del trattamento con sorafenib appare di notevole rilievo.

La capecitabina (Xeloda®, Roche) può essere una opzione terapeutica nei pazienti non responsivi o intolleranti a sorafenib. La capecitabina è un profarmaco orale del 5-fluorouracile (5-FU) metabolizzato a FU in una reazione a 3 enzimi, l'ultima avviene a livello del fegato e del tumore ad opera della timidina fosforilasi (TP) (5).

Negli ultimi anni è stato studiato ed introdotto in oncologia il concetto di chemioterapia "a dosaggio metronomico", basato sulla somministrazione continuativa di bassi dosaggi di farmaci chemioterapici, senza interruzioni prolungate, in modo da ottimizzare le proprietà antiangiogeniche del farmaco e di

ridurre la tossicità (6,7). E' stato proposto che il dosaggio metronomico dovrebbe essere il più alto possibile nel regime metronomico, tale però da non indurre soppressione midollare in quanto quest'ultima potrebbe agire come stimolo pro-angiogenico (7).

Questo tipo di trattamento, a dosaggio metronomico, può essere appropriato anche nel caso di una funzione epatica lievemente deteriorata come nella cirrosi compensata (9-11). Inoltre vi sono alcune evidenze di attività antineoplastica e di beneficio clinico in pazienti con HCC avanzato (9, 10-13).

E' stato recentemente pubblicato uno studio di Fase II dove la capecitabina metronomica è stata utilizzata nel trattamento dell'HCC sia in prima che in seconda linea dopo sorafenib, con risultati particolarmente incoraggianti, in particolare è stata ottenuta una PFS rispettivamente di 6.03 e 3.27 mesi ed una OS rispettivamente nei due gruppi di 14.47 e 9.77 mesi. Sono state inoltre riportate nella prima coorte due risposte complete ed una risposta parziale. (14).

Lo scopo di questo studio è pertanto quello di valutare retrospettivamente i dati relativi la sicurezza e l'efficacia della capecitabina metronomica nei pazienti non più responsivi o intolleranti a sorafenib, trattati presso il nostro centro epatologico nel periodo Gennaio 2012-Gennaio 2014.

Pazienti e Metodi

In questo studio unicentrico, sono state consultate retrospettivamente le cartelle di 19 pazienti con cirrosi epatica complicata da HCC non responsivi o intolleranti al sorafenib che sono stati trattati con capecitabina metronomica, nel periodo Gennaio 2012- Gennaio 2014. L'utilizzo della capecitabina per i pazienti con HCC è stata approvato presso il nostro centro dalla Regione Emilia Romagna come terapia off-label.

L'HCC è stato diagnosticato secondo i criteri American Association for the Study of the Liver Diseases (AASLD). Tutti i pazienti hanno ricevuto precedentemente solo sorafenib in prima linea di trattamento. Al termine della terapia con sorafenib i pazienti sono stati valutati per l'inserimento in trial clinici di seconda linea, quando disponibili. Qualora non vi fossero stati trial di seconda linea disponibili o i pazienti non fossero stati eleggibili sulla base dei principali criteri di inclusione o esclusione clinici e/o laboratoristici, veniva proposto il trattamento off-label con capecitabina metronomica se venivano soddisfatti i seguenti requisiti: $CPT \leq 7$, bilirubina totale < 3 mg/dl, $PS \leq 2$, piastrine $> 50.000/mmc$, Hb > 9 g/dl, WC $> 1500/mmc$, transaminasi $< 5x$ UNL, creatinina < 1.5 UNL, INR < 2 , assenza di ascite non controllata/refrattaria, assenza di encefalopatia, assenza di cardiopatia.

Dopo aver firmato il consenso informato, i pazienti hanno cominciato la terapia con capecitabina metronomica, al dosaggio metronomico di 500 mg ogni 12 ore. I pazienti sono stati periodicamente monitorati clinicamente e con controlli ematochimici. Le reazioni avverse farmaco-relate (AE) segnalate nelle cartelle cliniche sono state gradate secondo i criteri National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0.

Gli AE di grado 3/4 hanno portato a modificazioni del dosaggio (500 mg al giorno) o a sospensione temporanea fino a riduzione dell'AE a grado ≤ 2 . Altre cause di modificazione temporanea del dosaggio o temporanea sospensione sono stati: AE di qualsiasi grado alla richiesta del paziente, AE di grado 2 clinicamente rilevanti o deterioramento della funzione epatica. Il trattamento con capecitabina è stato continuato fino all'occorrenza di tossicità o al momento della progressione radiologica o clinica di malattia.

La valutazione dell'efficacia della terapia è stata effettuata mediante TAC o RM con mezzo di contrasto ogni 3 mesi quando possibile e la valutazione è stata ripetuta nel tempo con la medesima metodica.

Sono stati utilizzati i criteri di valutazione della risposta m-RECIST (modified version of the Response Evaluation Criteria In Solid Tumor 1.0) e la risposta è stata definita come: risposta completa (CR), risposta parziale (PR), stabilità di malattia (SD) o progressione di malattia (PD). Il tasso di controllo di malattia è stato definito come CR+PR+SD.

Il tempo di progressione radiologica (TTP) è stato definito come il tempo dalla data di inizio della capecitabina fino alla data di progressione di malattia. La sopravvivenza (OS) è stata calcolata dalla data di inizio della capecitabina fino alla data di morte o alla chiusura del periodo di osservazione.

È stata calcolata la frequenza dei diversi parametri clinico-laboratoristici e i tassi di progressione (PD) e di controllo di malattia (PR+ SD).

Per l'analisi del tempo di progressione (TTP) e della sopravvivenza (OS), sono stati calcolati il tempo mediano e gli intervalli di CI al 95% (CIs) utilizzando il metodo di Kaplan Meier.

Risultati

Le caratteristiche cliniche dei 19 pazienti sono riassunte nella tabella 1.

L'età mediana era di 65 anni (range 50-78). La mediana della durata della malattia pre-trattamento era di 16 mesi (range 7-238 mesi). La durata mediana di trattamento con sorafenib era di 3.2 mesi (range 0.6-20 mesi).

Caratteristiche cliniche	N=19
Età mediana, (range)	65 (50-78)
Genere, maschi/femmine, (n, %)	16/3 (84/16)
ECOG-PS 0/1/2, (n, %)	10/9 (53/47/0)
Eziologia HCV/HBV/alcool/mista/NASH, (n, %)	9/4/3/1 (47/21/16/10/5)
Cirrosi epatica, (n, %)	19 (100)
Child Pugh classe A/B, (n, %)	14/5 (73/27)
Score di Child 5/6/7, (n, %)	6/8/5 (32/42/26)
Presenza di ascite, assente/lieve, (n, %)	13/6 (68/32)
MELD, mediana (range)	10 (7-13)
Invasione vascolare neoplastica, (n, %)	8 (42)
Trombosi portale del tronco o segmentaria, (n, %)	6 (32)
Trombosi vene sovraepatiche e/o vena cava, (n, %)	2 (10)
Metastasi a distanza, (n, %)	9 (47)
BCLC A/B/C, (n, %)	1/2/16 (5/10/85)
Pregressi trattamenti curativi, (n, %)	10 (53)
Pregressi trattamenti TACE/TARE, (n, %)	9 (47)
Pregressa terapia con sorafenib, (n, %)	19 (100)
Durata mediana del trattamento con sorafenib (TD), mesi (range)	98 (20-611)
AFP baseline, mediana (range)	16 (4-13469)
AFP finale, mediana (range)	19,8 (3,3-10505)
Tabella 1	

Quindici pazienti (79%) avevano interrotto il sorafenib per progressione di malattia (n=8 con progressione extraepatica, n=7 per progressione intraepatica), due pazienti (10%) per eventi avversi e due pazienti (10%) per peggioramento della funzione epatica.

All'inizio del trattamento con capecitabina, 16 pazienti (85%) erano in stadio Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) C, 2 (10%) in BCLC B e 1 paziente (5%) in BCLC A. Il paziente in BCLC A è stato trattato con sorafenib in quanto non era trattabile con trattamenti curativi o non aveva risposto a trattamenti loco-regionali.

Nove (47%) pazienti presentavano metastasi extraepatiche e 8 pazienti (42%) avevano trombosi neoplastica portale (n=6, 32%) o cavale (n=2, 10%). Quattordici (73%) pazienti avevano una funzione epatica Child-Pugh (CPT) A e 5 pazienti CPT B7.

Dieci pazienti (53%) erano Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG-PS) 0 e 9 (47%) pazienti ECOG-PS 1.

Alla fine del periodo di osservazione, 17 (89%) pazienti avevano interrotto il trattamento con capecitabina mentre 2 (10%) erano ancora in trattamento. La mediana della durata del trattamento è stata di 2,97 mesi (range 0,4-21,7 mesi).

Una riduzione di dose è stata effettuata in 3 pazienti (16%) per AE e in 7 pazienti la terapia è stata temporaneamente sospesa per AE (n=4) o per il peggioramento della funzione epatica (n=3).

Hanno portato all'interruzione del trattamento la progressione di malattia in 10 pazienti (53%), la progressione sintomatica in 4 pazienti (21%), il peggioramento della funzione epatica in 2 pazienti (10%) e AE in un paziente (5%).

Tredici (68%) pazienti hanno avuto almeno un AE. I più frequenti eventi avversi farmaco-relati sono stati: iperbilirubinemia in 5 pazienti (26%, 3 di Grado 2 e 2 di Grado 3), anemia in 3 pazienti (16%, 1 Grade 3), linfedema in 3 pazienti (16%, 1 Grado 3), astenia in 2 pazienti (10%, Grado 1), cardiotoxicità in 1 paziente (5%, Grado 3), diarrea in 1 paziente (5%, Grado 2), e sindrome mano piede in 1 paziente (5%, Grado 3). (Tabella 2)

Sei pazienti (31%) hanno presentato un peggioramento della funzione epatica, definito come un

incremento dello score di Child di almeno 2 punti. Non sono state osservate morti farmaco correlate.

Le rivalutazioni radiologiche programmate sono risultate eseguite da 15 pazienti (79%).

E' stata valutata la documentazione radiologica disponibile di 15 pazienti (79%), e la migliore risposta basata sui criteri m-RECIST è stata: PR in un paziente (5 %, n=1), SD in 4

Eventi avversi (AE)*	Tutti i gradi	Grado 1/2	Grado 3/4
Tutti, n (%)	13*2 (68)	8*2 (42)	5*2 (26)
Sindrome mano-piede, n (%)	1 (5)	0	1 (5)
Diarrea, n (%)	1 (5)	1 (5)	0
Linfedema, n (%)	3 (16)	2 (10)	1 (5)
Fatigue, n (%)	2 (10)	2 (10)	0
Anemia, n (%)	3 (16)	2 (10)	1 (5)
Cardiotoxicità, n (%)	1 (5)	0	1 (5)
Iperbilirubinemia, n (%)	5 (26)	3 (15)	2 (10)

Tabella 2

*Gli AE sono stati gradate mediante il National Cancer Institute Common Terminology Criteria (v3.0)

*2 presenza di almeno 1 AE di qualsiasi grado, di grado 1/2 e 3/4 in 19 pazienti

pazienti (21%, n=4) e PD in 10 pazienti (53%, n=10). Il controllo di malattia è stato ottenuto in 5 pazienti (risposta parziale n=1; stabilità di malattia n=4).

Il tempo di progressione (TTP) mediano è stato di 5 mesi (CI 95% 0-10) e la progression free survival di 3,6 mesi (95% CI 2,8-4,3). (Figura 1, a)

La sopravvivenza mediana è stata di 6,3 mesi (95% CI 4-8,6). (Figura 1, b)

Le cause di morte sono state: progressione della malattia neoplastica (n=9) ed insufficienza epatica (n=4).

Risposta tumorale e sopravvivenza (OS)	Stimati
Migliore risposta tumorale*	
Risposta completa (CR), n (%)	0
Risposta parziale (PR), n (%)	1 (5)
Stabilità di malattia (SD), n (%)	4 (21)
Progressione di malattia (PD), n (%)	10 (53)
Controllo di malattia (CR+PR+SD)	5 (26)
Obiettivi di sopravvivenza*2	
Tempo di progressione (TTP)	
Mediana (range)	5 (0-22) mesi
95% CI	0-10
Sopravvivenza libera da malattia (PFS)	
Mediana (range)	3.6 (0.4-21.9) mesi
95% CI	2.8-4.3
Sopravvivenza globale (OS)	
Mediana (range)	6.3 (0.4-26) mesi
95% CI	4-8.6

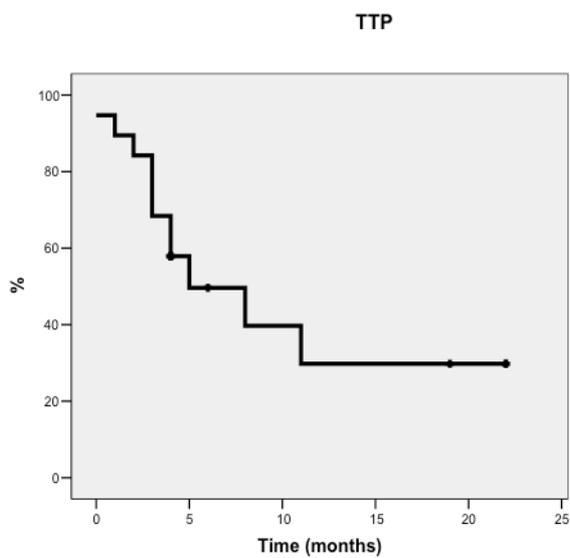
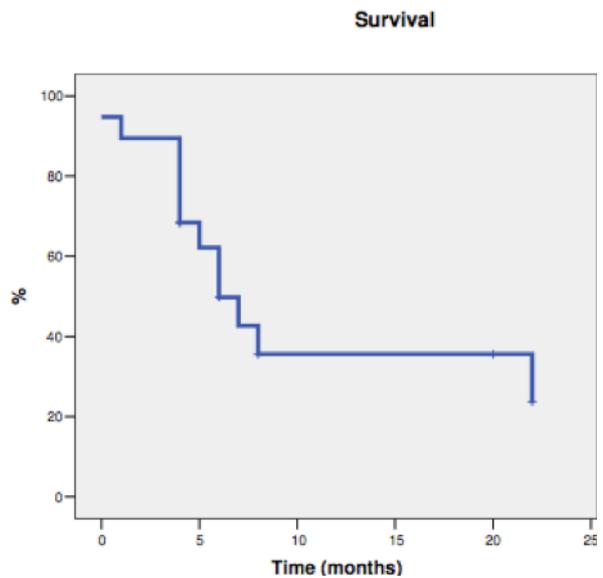


Figura 1a, TTP mediana è stato di 5 mesi (CI 95% 0-10)

Figura 1b, OS mediana 6,3 mesi (95% CI 4-8,6)



Discussione

Il presente studio retrospettivo ha come obiettivo di valutare i dati relativi la sicurezza e l'efficacia della terapia con capecitabina a dosaggio metronomico come trattamento di seconda linea in pazienti cirrotici con HCC non responsivi o non tolleranti il sorafenib. Pertanto i risultati, sia in termini di sicurezza sia di OS, risentono dello studio una popolazione "reale", molto diversa dal campione di popolazione che otteniamo nell'arruolamento prospettico in trial di fase II.

Uno studio di Shao et al; ha analizzato 192 pazienti rientrati in trials di prima linea di trattamento (sorafenib, sunitinib, brivanib, sorafenib + tegafur/uracile, talidomide + tegafur/uracile, bevacizumab + capecitabine, bevacizumab + erlotinib) ed ha mostrato che al termine di queste terapie la sopravvivenza dell'intero gruppo era di 4 mesi e differiva notevolmente a seconda della funzione epatica residua (CPT A vs B vs C = 7.5 vs 1.3 vs 1 mesi).

Nel nostro studio abbiamo analizzato un gruppo di pazienti veramente "avanzati" con una cattiva prognosi, tenendo conto di un 47% di PS-1, un 85% di BCLC C, nel 42% con invasione vascolare neoplastica (in 2 pazienti con trombosi cavale) e con una funzione epatica CPT B nel 27% dei casi.

I risultati in termini di efficacia hanno mostrato una discreta attività anti-tumorale della capecitabina. Su una durata mediana di trattamento di quasi 3 mesi il 26% dei pazienti (n=5) ha ottenuto un controllo di malattia, con un TTP mediano dell'intera popolazione di 5 mesi ed una sopravvivenza globale di 6.3 mesi. Infine nei pazienti in cui abbiamo ottenuto il controllo di malattia tutti i pazienti

hanno raggiunto i 6 mesi di trattamento, tre pazienti erano in trattamento ad 1 anno, e due pazienti erano ancora in trattamento alla chiusura del periodo di osservazione.

Tale risultato appare buono, tenuto conto della popolazione avanzata analizzata e dei risultati di trial sperimentali di seconda linea usciti negli ultimi anni ed in particolare: Brivanib in studio di fase III ha mostrato valori di TTP e OS rispettivamente di 4.2 e 9.4 mesi; Erlotinib + bevacizumab di fase II 1.8 e 4.4 mesi; Tivantinib di fase II 1.6 e 6.6 mesi (con 2.7/7.2 nei pazienti con iperespressione di MET) ed infine Regorafenib di fase II 4.3/13.8 mesi (15). Inoltre dobbiamo considerare che tali risultati sono il frutto di criteri di inclusione molto restrittivi.

Uno studio asiatico di fase 2 che testava in prima linea l'associazione con sorafenib e Tegafur/Uracile (UFT) a dosaggio metronomico aveva mostrato un PFS ed una OS incoraggianti di 3.7 e 7.4 mesi comparabili se non lievemente migliori del risultato del trial Asian-Pacific, lasciando intravedere la futura possibilità di studiare l'associazione di farmaci "biologici" con chemioterapici a dosaggio metronomico.

Il confronto tra questi dati appare quindi molto difficile in considerazione delle caratteristiche estremamente diverse dei pazienti. D'altra parte in letteratura non vi sono dati riguardanti la sopravvivenza dei pazienti dopo il trattamento con sorafenib.

Un recente lavoro del gruppo di Barcellona ha dimostrato che la sopravvivenza dopo progressione a sorafenib è significativamente diversa a seconda del pattern di progressione ed in particolare è minore nei pazienti dove si riscontra la comparsa di lesioni extraepatiche o di invasione vascolare neoplastica, verosimilmente dovuto ad una neoplasia biologicamente più aggressiva, rispetto ad una progressione intraepatica. In particolare la sopravvivenza postprogressione (PPS) mediana di un gruppo selezionato di pazienti trattati con sorafenib (229 pazienti trattati con sorafenib, 147 rientravano nei criteri di inclusione/esclusione dello studio e di questi 85 sono andati in progressione a sorafenib) era di 9.85 mesi, mentre la PPS di pazienti potenzialmente arruolabile in trial di seconda linea era di 13.6 mesi. Sono risultati essere predittori indipendenti di PPS la stadiazione BCLC, PS e il CPT e la comparsa di progressione extraepatica (valutati al momento della progressione).

Molto interessante è inoltre il dato che solo la metà dei pazienti in progressione della coorte, e quindi il 29% di tutti i pazienti trattati con sorafenib presso il loro centro, sono risultati essere candidabili a trial di seconda linea. Hanno pertanto proposto di ridefinire il BCLC al tempo della progressione radiologica in modo da predire più accuratamente la prognosi dei pazienti che possono rientrare in studi di seconda linea per funzione epatica conservata e PS 0-1 (16).

Valutando il nostro gruppo di pazienti sulla base del pattern di progressione a sorafenib, il 42% presentava progressione di malattia extraepatica o comparsa di invasione vascolare macroscopica e pertanto apparteneva al sottogruppo a prognosi peggiore.

Per quanto concerne il profilo di sicurezza, il 68% dei pazienti ha sperimentato almeno un evento avverso, nel 26% di grado 3/4. I principali AE farmaco-relati sono stati anemia, linfedema, diarrea e sindrome mano-piede che sono stati nella maggior parte dei casi lieve-moderati e sono stati ben gestiti

con terapie di supporto e con riduzioni di dosaggio o con brevi interruzioni. Solo in un caso il trattamento è stato sospeso unicamente a causa di un AE ed è stato in un paziente che ha presentato la comparsa di scompenso cardiaco con cardiopatia ipocinetico-dilatativa. La tossicità cardiaca è un potenziale evento avverso della capecitabina, il cui meccanismo d'azione è sconosciuto, anche è stato ipotizzato che sia dovuta ad una ischemia miocardica indotta da vasospasmo coronarico (17).

In due pazienti (10%) il peggioramento della funzione epatica ha portato alla sospensione definitiva della capecitabina, senza tuttavia un rapido e significativo incremento degli enzimi di citolisi epatica che potessero far pensare a tossicità epatica acuta. Possiamo pertanto dire che in generale la capecitabina è stata generalmente ben tollerata con effetti collaterali gestibili, solo un paziente ha dovuto sospendere per AE cardiaco e che non sono state osservate morti correlate al farmaco.

Inoltre la capecitabina potrebbe aver contribuito, tuttavia in assenza di sicura relazione, al peggioramento della funzione epatica nei due pazienti che poi hanno definitivamente interrotto il trattamento.

Tale studio risente comunque di alcuni limiti come la retrospettività ed il limitato numero di pazienti, dovuto all'inizio dell'utilizzo della capecitabina metronomica presso il nostro centro solamente da Febbraio 2012.

Conclusioni

Il trattamento con capecitabina metronomica si è dimostrato essere un trattamento sicuro in pazienti con epatocarcinoma già trattato con sorafenib, in particolare nei pazienti con una conservata funzione epatica ed ha mostrato una discreta attività anti-neoplastica.

Bibliografia:

1. Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V., Hilgard P., Gane E., et al., for the SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 2008;359:378-90
2. Cheng A-L, Kang Y-K, Chen Z, Tsao C-J, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2009;10(1):25-34.
3. Ruth He A, Goldenberg A. S. Treating hepatocellular carcinoma progression following first-line sorafenib: therapeutic options and clinical observations. *Ther Adv Gastroenterol*. 2013; 6(6) 447-458.
4. Llovet J M, Villanueva A. Second-line therapies in HCC: emergence of resistance to sorafenib. *Clin Cancer Res*. 2012
5. Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. *Clin Ther*. 2005;27(1):23-44.
6. Emmenegger U, Kerbel RS. Five years of clinical experience with metronomic chemotherapy: achievements and perspectives. *Onkologie*. 2007;30(12):606-8.
7. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):423-36.
8. Maraveyas A, Lam T, Hetherington JW, Greenman J. Can a rational design for metronomic chemotherapy dosing be devised? *Br J Cancer*. 2005;92(8):1588-90.
9. Brandi G, de Rosa F, Bolondi L, Agostini V, Di Girolamo S, Nobili E, et al. Durable complete response of hepatocellular carcinoma after metronomic capecitabine. *Tumori*. 2010;96(6):1028-30.
10. Patt YZ, Hassan MM, Aguayo A, Nooka AK, Lozano RD, Curley SA, et al. Oral capecitabine for the treatment of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and gallbladder carcinoma. *Cancer*. 2004;101(3):578-86.
11. Xia Y, Qiu Y, Li J, Shi L, Wang K, Xi T, et al. Adjuvant therapy with capecitabine postpones recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection: a randomized controlled trial. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(12):3137-44.
12. Ballardini P, Marri I, Margutti G, Aliberti C, Benea G, Manfredini R. Long-lasting response with metronomic capecitabine in advanced hepatocellular carcinoma. *Tumori*. 2010;96(5):768-70.
13. Marinelli S, Granito A, Piscaglia F, Renzulli M. Metronomic capecitabine in patients with hepatocellular carcinoma unresponsive to or ineligible for sorafenib treatment: Report of two cases. *Hepat Mon*. 2013;13(9):e11721
14. Brandi G, de Rosa F, Agostini V, di Girolamo S. Metronomic capecitabine in advanced hepatocellular carcinoma patients: A phase II study. *The Oncologist*. 2013-009.
15. Shen YC, Lin ZZ, Hsu CH, Hsu C, Shao YY, Cheng AL. Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Liver Cancer*. 2013 Aug;2(3-4):345-364.
16. Reig M, Rimola J, Torres F, Darnell A. Postprogression survival of patients with advanced hepatocellular carcinoma: rationale for second-line trial design. *Hepatology*. 2013 Dec;58(6):2023-31.
17. Ang C, Kornbluth M, Thirlwell MP, Rajan RD. Capecitabine-induced cardiotoxicity: case report and review of the literature. *Curr Oncol*. 2010;17(1):59-63.