

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Chirurgia Epatobiliopancreatica e Gastroenterologica

Avanzata e Fisiopatologia dell'Apparato Digerente

Ciclo XXIV

**MARCATORI MOLECOLARI PREDITTIVI DI RISPOSTA AL
TRATTAMENTO CON SORAFENIB IN PAZIENTI AFFETTI DA
CARCINOMA EPATOCELLULARE AVANZATO**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Mario Sianesi

Tutor:
Chiar.mo Prof. Paolo Del Rio

Dottorando: Dr. Francesca Negri

INDICE	2
RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	5
STADIAZIONE MOLECOLARE DELLE NEOPLASIE	5
EPATOCARCINOGENESI	7
PATOGENESI MOLECOLARE	8
VIE ONCOGENICHE	11
SORAFENIB: MECCANISMI D'AZIONE	18
CLINICAL TRIALS	18
 OBIETTIVI DI STUDIO	23
 MATERIALI E METODI	24
POPOLAZIONE DEI PAZIENTI	24
STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO	24
ANALISI STATISTICA	25
 RISULTATI	27
 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI	27
 RISPOSTA CLINICA A SORAFENIB E LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI BIOMARCATORI TISSUTALI	27
 SOPRAVVIVENZA LIBERA DA PROGRESSIONE E OVERALL SURVIVAL IN RELAZIONE AI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI BIOMARCATORI TISSUTALI	27
 BIOMARCATORI TISSUTALI E SOPRAVVIVENZA NELLA POPOLAZIONE DEI CONTROLLI	27
DISCUSSIONE	30
BIBLIOGRAFIA	36
 TABLE 1	48
 TABLE 2	49
 TABLE 3	50
 TABLE 4	51
 FIGURE LEGEND	52
 FIGURE 1A	53
 FIGURA 1B	54
 FIGURA 2A	54
 FIGURA 2B	56
 FIGURA 3A	57
 FIGURA 3B	58

RIASSUNTO

Presupposti: L'inibitore multichinasico sorafenib si è dimostrato in grado di aumentare significativamente la sopravvivenza in pazienti affetti da carcinoma epatocellulare avanzato. Sorafenib interferisce sia con la proliferazione delle cellule tumorali sia con i processi angiogenetici agendo sulla cascata intracellulare Ras/Raf/MEK/ERK e sui recettori tirosinchinasici VEGFR-2/-3 (vascular endothelial growth factor receptor-2/-3) e PDGFR- β (platelet derived growth factor receptor beta). Ad oggi non esistono parametri clinici o biologici che possano essere considerati predittivi di risposta al trattamento. Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare il ruolo di marcatori tissutali nel predire l'efficacia clinica di sorafenib in pazienti affetti da carcinoma epatocellulare avanzato.

Metodi: È stata analizzata una popolazione di 77 pazienti affetti da carcinoma epatocellulare avanzato trattati con sorafenib nell'ambito di 2 studi prospettici randomizzati. I campioni tissutali sono stati valutati sulla base delle caratteristiche architetturali e citologiche secondo criteri predefiniti. L'espressione di beta-catenina (BCAT), glutammina sintetasi (GS), pERK (phosphorylated extracellular signal regulated kinase), pAKT (phosphorylated v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) e VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) è stata valutata mediante immunohistochimica e l'intensità di colorazione misurata impiegando un sistema semiquantitativo. E' stata utilizzata come gruppo di

controllo una popolazione di 56 pazienti trattati con la sola terapia di supporto.

Risultati: La sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS) sono risultate significativamente ridotte nei pazienti con elevata espressione cellulare di pERK. Inoltre, un'elevata espressione di VEGFR-2 è stata correlata in maniera statisticamente significativa con una ridotta OS ottenuta dopo trattamento con sorafenib. Questi risultati non sono stati confermati nel gruppo di controllo.

Conclusioni: Un'elevata espressione cellulare di pERK e di VEGFR-2 predicono una ridotta sopravvivenza libera da progressione ed una ridotta sopravvivenza globale in pazienti affetti da carcinoma epatocellulare trattati con sorafenib. Questi dati suggeriscono che i carcinomi epatocellulari contenenti livelli di pERK e di VEGFR-2 più elevati sono meno sensibili, o responsivi a sorafenib. In considerazione del disegno retrospettivo del nostro studio sono richieste ulteriori indagini, nell'ambito di studi prospettici, per confermare il ruolo di questi biomarcatori nel predire l'andamento clinico dei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare in trattamento con sorafenib.

INTRODUZIONE

STADIAZIONE MOLECOLARE DELLE NEOPLASIE

Negli ultimi 20 anni si è assistito ad un'esplosione delle conoscenze nel campo della biologia tumorale grazie a cui le classificazioni tradizionali delle neoplasie, basate su criteri clinico-patologici, sono state arricchite da parametri molecolari. A differenza dei dati clinico-patologici, quelli molecolari tengono conto del substrato biologico della neoplasia, fornendo informazioni aggiuntive a livello diagnostico, prognostico e terapeutico. Infatti, il tipo e la quantità di aberrazioni molecolari di un dato tumore sono il risultato dei meccanismi eziopatogenetici e ne determinano il comportamento biologico, che si riflette di conseguenza sull'andamento clinico della malattia. I marcatori biomolecolari sono stati recentemente inseriti negli algoritmi di gestione clinica per alcune neoplasie umane come indicatori prognostici o diagnostici di malattia. Inoltre, grazie all'identificazione di aberrazioni molecolari specifiche, l'approccio alla farmacologia antineoplastica è radicalmente cambiato, passando da una farmacologia basata sulla malattia ad una terapia trasversale basata sul difetto molecolare. Questi concetti farmacologici sono alla base della target therapy o farmaci a bersaglio molecolare, ossia farmaci che agiscono su distinte catene di segnale attive nel tumore. La comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono alla trasformazione neoplastica nelle leucemie Ph⁺ ha spianato la strada alla realizzazione del primo, efficace esempio di terapia molecolare mirata: imatinib mesilato (1-4). La traslocazione conosciuta come il

cromosoma Philadelphia è stata identificata da Nowel e Hungerford nel 1961 (5). Nelle cellule Philadelphia positive la proteina c-Abl è fusa con i residui terminali della proteina Bcr ed è in forma fosforilata e costituzionalmente attiva. Imatinib, un derivato 2-fenil-amino-pirimidinico, inibisce l'attività tirosin-kinasica delle proteine Abl e Bcr-Abl, di KIT, di PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) e di ARG (Abl-related gene). Lo studio della struttura cristallografica del dominio catalitico di Abl complessato con un omologo di imatinib, ha dimostrato che il farmaco si lega alla proteina Bcr-Abl e la blocca nella conformazione inattiva, che non lega ATP (6), evitando così il trasferimento di fosfato dall'ATP ai substrati e quindi l'attivazione delle vie di segnalazione a valle. Nei pazienti con LMC in fase cronica trattati con imatinib in prima linea si è ottenuta una risposta ematologia completa del 98% ed una risposta citogenetica completa dell'87%. L'approvazione da parte della FDA (Food and Drug Administration) è datata 2001, ma è nel 2002 che sia la FDA che l'EMA (European Medicines Evaluation Agency) approvano Imatinib come farmaco di prima scelta per la LMC (7). CML può essere unica, in quanto una singola anomalia molecolare guida la malattia, mentre nella maggior parte dei tumori ci sono molteplici meccanismi molecolari coinvolti. Tuttavia, i risultati forniscono la prova di principio del potenziale terapeutico della dei farmaci a bersaglio molecolare.

I dati di sequenza del genoma hanno suggerito che molte delle anomalie associate al cancro sono dovute alla funzione anomala di recettori ad attività tirosino-chinasica e dei segnali da essi trasdotti nei

processi che regolano la proliferazione cellulare (8). Una strategia terapeutica per interagire con tale sistema ed inibire la trasduzione dei segnali mitogenetici è costituita dall'uso di farmaci inibitori selettivi della tirosino-chinasi associata al recettore. Molte di queste piccole molecole sono state approvate dalla Food and Drug Administration per il trattamento di tumori solidi da sempre considerati resistenti alla chemioterapia standard, i.e. carcinomi a cellule renali, tumori stromali gastrointestinali (9-15).

EPATOCARCINOGENESI

Il carcinoma epatocellulare rappresenta il sesto tumore al mondo in termini di incidenza e la terza causa di morte dovuta a tumore (16). Evidenze sperimentali suggeriscono che l'epatocarcinogenesi ha una dinamica multifasica, cioè procede per fasi distinte cronologicamente caratterizzate da alterazioni molecolari e morfologiche specifiche (17). Nella maggior parte dei casi, il carcinoma epatocellulare si sviluppa in presenza di condizioni patologiche a carico del fegato, il più delle volte epatite o cirrosi, ma, in alcuni rari casi, si può avere una progressione anche da tessuto sano (18). La cirrosi è il fattore di rischio e predisposizione più importante nell'insorgenza del carcinoma epatocellulare, essa può essere causata da sofferenza tissutale innescata da infezione da parte dei virus dell'epatite B e C (HBV, HCV), assunzione di alcool ed emocromatosi ereditaria (19). L'eterogeneità dei fattori etiologici rende conto della complessità dei meccanismi molecolari dell'epatocarcinogenesi. È noto che lo sviluppo e la promozione dei tumori sono accompagnati da complessi

cambiamenti nei profili di espressione dei geni in uno specifico tessuto all'interno del quale si possono presentare numerose diversità tra tessuto sano e tessuto tumorale o pretumorale in termini genetici, molecolari e morfologici (17). Diversi geni il cui assetto molecolare risulta modificato nella progressione tumorale sono implicati nella regolazione del ciclo cellulare. Se si considera che i tumori sono malattie da iperproliferazione, questo evento molecolare e cellulare assume un carattere rilevante nello studio della progressione neoplastica. L'iperespressione dei geni *c-myc*, *cyclina D1*, *ciclina A*, e *E2f1*, che porta alla formazione dei complessi ciclina D1- Cdk4, E2f1 – Dp1, e all'iperfosforilazione di pRb è stata riscontrata nelle lesioni epatiche preneoplastiche in topi transgenici *c-Myc/Tgf- α* (20) e nei ratti Fisher 344 indotti alla cancerogenesi con il modello dell'epatocita resistente (21). L'effetto generale delle deregolazioni riscontrate anche in campioni umani di carcinoma epatocellulare (22) è di determinare una mancata regolazione nella transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, quando avviene la duplicazione del DNA. Un ruolo molto importante nel favorire la transizione G1-S attraverso l'induzione di ciclina D1, CDK4, *c-Myc* e l'iperfosforilazione di pRB è determinato dalla cascata di RAS, la cui attivazione regola numerosi segnali coinvolti nella crescita cellulare nella sopravvivenza e nella migrazione (23).

PATOGENESI MOLECOLARE

L'assenza di una predisposizione ereditaria evidente per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare, a differenza del modello paradigmatico

dell'adenoma che si trasforma in carcinoma del colon-retto (24), ha impedito l'identificazione di geni chiavi e la definizione di una gerarchia di eventi genetici coinvolti nei vari stadi della carcinogenesi epatica. Il notevole progresso delle conoscenze e degli strumenti tecnologici nel campo della genetica molecolare e della citogenetica ha portato nella seconda metà degli anni '90 ad un notevole aumento delle informazioni disponibili circa le alterazioni genetiche presenti nel carcinoma epatocellulare. Gli studi di biologia molecolare, di analisi dei "microsatelliti" (ripetizioni di piccole sequenze polimorfiche - cioè possibilmente variabili da individuo ad individuo - di 2-6 nucleotidi sparse in tutto il genoma) mediante MSA (PCR-based Microsatellite Marker Analysis), di ibridizzazione genomica comparativa (CGH, Comparative Genomic Hybridization), gli array ad alta densità di polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) e gli studi di allelotipizzazione hanno messo in evidenza un'ampia varietà di alterazioni cromosomiche, che vanno dai riarrangiamenti genomici legati all'integrazione dell'HBV-DNA, alla perdita di eterozigosi (perdita di un allele - LOH) in numerosi loci su un ampio numero di cromosomi, ad amplificazioni geniche (aumento del numero di alleli) (25, 26). Le alterazioni cromosomiche nel carcinoma epatocelulare comprendono LOH a carico dei cromosomi 1p, 4q, 8p, 13q, 16q, 17p ed amplificazioni o aumenti del contenuto di DNA nelle regioni 1q, 8q e 17q (27-29). Una LOH in 1p è più frequente nei carcinomi epatocellulari di piccole dimensioni e ben differenziati mentre le LOH in 16p e 17q sono più frequenti in tumori avanzati e metastatici. L'amplificazione della regione distale a 8q24 è in relazione alla

sovraespressione del proto-oncogene c-myc. Nell'insieme numerosi geni oncosoppressori risultano inattivati da mutazioni o delezioni (p53, pRb, p16/INK4A, M6P/IGF2R, axina, E-caderina, BRCA2, PTEN/MAC).

Per quanto riguarda p53, una LOH a carico di 17p13 è stata osservata in una percentuale variabile dal 2% al 60% dei casi, con evidenti e marcate differenze geografiche (30). La frequenza di mutazione di p53 è legata all'esposizione alla micotossina aflatossina B1 (AFB1), di cui va considerata a tutti gli effetti un marcatore molecolare. Si tratta di una mutazione puntiforme della terza base del codone 249 dell'esone 7, con trasversione G-T o, più raramente, transizione G-C. Le mutazioni a carico di p53, evento tardivo nel processo a tappe multiple dello sviluppo del carcinoma epatocellulare, sono più frequenti in tumori di dimensioni più grandi, ad alto " *grading* " o poco differenziati, con prognosi peggiore e con un intervallo libero da tumore minore. Recentemente sono state identificate una serie di proteine p53 correlate, denominate p73 e p63 (31). Nel carcinoma epatocellulare non vi sono mutazioni di p73 e diverse osservazioni indicano vi sia una prevalenza dell'espressione di isoforme p73 dominanti negative (DN-p73 e DTA-p73) (anti-apoptotiche e pro-proliferative) capaci di bloccare le funzioni della p53 *wt* (32).

La proteina codificata dal gene RB, pRb (proteina del retinoblastoma) e gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (in particolare p16/INKA) sono inattivati in almeno il 50% dei carcinomi epatocellulari (26). Le funzioni di pRb vengono inattivate nel EC con meccanismi molteplici, legati sia ad alterazioni genetiche (LOH del

locus Rb nel 25-48%, perdita della risposta antiproliferativa al TGF- β nel 10% perdita di p16/INK4 nel 50% per mutazioni o più spesso per ipermetilazione del promotore) che ad alterazioni epigenetiche dell'espressione dei suoi diversi modulatori (sovraespressione di ciclina D1 e ciclina E, diminuzione dei livelli di p27.

Nessuna delle alterazioni descritte è presente in una percentuale di casi che supera il 50-60%, a dimostrazione della eterogeneità genetica dei carcinomi epatocellulari, probabile conseguenza dell'instabilità cromosomiale che si verifica in stadi più avanzati dell'epatocarcinogenesi e che è a sua volta prodotta principalmente dall'accorciamento dei telomeri e dalla disregolazione dei meccanismi di controllo del ciclo cellulare (17, 33). Lo studio dei profili globali di espressione mediante microarrays ha portato alla identificazione di numerosi nuovi geni modulati nell'EC ed in particolare geni la cui espressione correla con la progressione tumorale (p16, SOCS1, PEG10), la disseminazione tumorale e la formazione di metastasi (nm23-H1, osteopontina, RhoC, KAI1, MMP14), la recidiva dopo trattamento radicale (REL, A20, vimentina, PDGFRA), senza però consentire l'identificazione univoca di "marcatori" utilizzabili per il momento nella pratica clinica (34).

VIE ONCOGENICHE

Via della Wnt/ β -catenina

Wnt è un fattore di crescita che durante l'embriogenesi svolge un ruolo fondamentale nella determinazione del destino cellulare. I recettori di superficie per le proteine Wnt appartengono alla famiglia

Frizzled di proteine transmembrana a sette passaggi. Quando il ligando Wnt lega il proprio recettore “frizzled” viene attivata, secondo un meccanismo non ancora del tutto chiaro, una proteina intracellulare chiamata Dishvelled (Dsh) la quale viene reclutata sulla membrana e destabilizza il complesso APC (Adenomatous Polyposis Coli), GSK-3 β (glicogeno-sintasi-chinasi 3 β), axina, che non è più in grado di fosforilare la β -catenina. In conseguenza della diminuita fosforilazione della β -catenina aumenta la quantità citosolica della proteina, che si trasferisce nel nucleo legandosi ai fattori di trascrizione Lef-1 (Lymphocyte Enhancer Factor) e TCF (T-cell Factor) (35-37). In seguito a queste interazioni viene regolata l’espressione di geni coinvolti nella migrazione cellulare. L’attivazione della via Wnt/ β -catenina nel carcinoma del colon dipende da mutazioni del gene APC. Quando APC è mutato, β -catenina si accumula e penetra nel nucleo, dove può attivare direttamente il gene per la ciclina D1, ciò provoca una proliferazione cellulare incontrollata contribuendo all’insorgenza del tumore (36). Molto più frequenti nell’epatocarcinoma sono invece le mutazioni che interessano β -catenina e assina 1. Le mutazioni di β -catenina sono state riscontrate nell’esone 3 del gene, nei codoni 32-37 e 41-45. Queste mutazioni proteggono la proteina dalla degradazione, stabilizzandola. Mutazioni del gene di β -catenina e conseguente accumulo nucleare sono riportate nell’epatocarcinoma rispettivamente nel 13-34% e nell’11-43% (38-40). Gli epatocarcinomi insorti in pazienti HCV-positivi sembrano mostrare più frequentemente mutazioni di β -catenina, rispetto a quelli insorti in pazienti HBV-positivi. Inoltre, le mutazioni di β -catenina sono tipiche dei carcinomi

epatocellulari che non presentano inabilità genomica. Mutazioni a carico dell'axina sono riportate nel 10% circa degli epatocarcinomi. Esse sono principalmente mutazioni puntiformi e/o piccole delezioni che stabilizzano β -catenina impedendo la formazione del complesso APC/GSK-3 β / β -catenina. Altri geni implicati nel Wnt/ β -catenina pathway sono deregolati nell'epatocarcinomi. Tra questi, sFRP1 (*soluble Frizzled Related Protein 1*), epigeneticamente silenziato, l'iperespressione di Dsh1 e l'inibizione di due inibitori di Dsh1, quali HDPR1 e Prickle-1.

Via delle proteine Hedgehog

La via di trasmissione del segnale di Hedgehog rappresenta un mediatore cruciale dei normali processi di sviluppo e differenziamento dell'embrione. Le proteine Hedgehog (Hh) sono state scoperte in *Drosophila*, dove una mutazione produce una larva con processi spinosi che assomiglia a un porcospino (Hedgehog). La molecola-chiave del sistema è il recettore Smoothened, SMO, che è il trasduttore del segnale. La sua funzione recettoriale è inibita da un'altra proteina transmembrana, Patched (PTCH1), in assenza del ligando Hh. Nei mammiferi sono state descritte 3 molecole Hedgehog: Indian, Desert e Sonic. Il gene *indian* è prevalentemente espresso nel fegato. Il legame del ligando Hh al recettore PTCH1, avvia la trasmissione del segnale: la proteina SMO attivata, dirige una cascata di segnali intracellulari che portano all'attivazione dei fattori di trascrizione Gli e al blocco della produzione dei loro inibitori. Quindi Hedgehog regola la funzione delle proteine Gli e la loro attivazione.

Esistono evidenze che suggeriscono che la via di trasmissione del segnale di Hedgehog abbia un ruolo importante nell'epatocarcinogenesi (41). È stata infatti dimostrata l'iperespressione di Hedgehog in circa il 60% degli epatocarcinomi. Inoltre, l'attivazione di SMO sembra poter attivare l'iperespressione di c-myc, il cui ruolo è rilevante nell'epatocarcinogenesi.

Via di Ras-MAP chinasi

RAS è stato il primo oncogene scoperto, ed è stato inizialmente descritto come un oncogene retro virale. In seguito, è stato dimostrato che circa il 30% dei tumori umani contiene forme mutate di geni *RAS*. La proteina *RAS* è una piccola GTPasi mantenuta sulla faccia interna della membrana plasmatica da un gruppo lipidico immerso nello strato interno del doppio strato. Le proteine *RAS* sono presenti in due diverse forme, una attiva legata al GTP e una inattiva legata al GDP. Mutazioni del gene *RAS* che sono alla base di neoplasie impediscono alla proteina di idrolizzare il suo GTP per tornare alla forma legata al GDP, sottoponendo continuamente la cellula allo stimolo proliferativo. Esistono diverse vie attivate da *RAS*, ma l'effettore maggiormente caratterizzato che promuove la progressione del ciclo cellulare è la cascata di attivazione delle MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (42). Questa via trasmette il segnale extracellulare dalla membrana citoplasmatica attraverso il citoplasma fino al nucleo. Questa via è attivata quando un fattore di crescita come EGF (fattore di crescita epiteliale) o PDGF (fattore di crescita derivante dalle piastrine), si lega al dominio extracellulare del suo recettore tirosina-

chinasi. Molti di questi recettori attivati contengono residui tirosinici fosforilati che servono per reclutare la proteina Grb2, che, a sua volta lega Sos promuove lo spostamento di Grb2-Sos dal citoplasma alla superficie citoplasmatica della membrana plasmatica, vicino a Ras. L'interazione di Sos con Ras apre il sito di legame dei nucleotidi di Ras. Il GDP viene rilasciato e sostituito dal GTP. L'induzione di RAS determina, in successione, l'attivazione delle proteine ad attività chinasi RAF, MEK ed ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (42). La proteina ad attività chinasi ERK1/2, che è attivata dalla fosforilazione di MEK, può essere trasportata attraverso la membrana nucleare. Una volta nel nucleo, pERK fosforila e attiva il fattore di trascrizione nucleare Elk e altri fattori di trascrizione. Tali fattori determinano la trascrizione di numerosi geni i cui prodotti portano a proliferazione, sopravvivenza ed angiogenesi, attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione c-fos, c-jun, c-myc (proliferazione e sopravvivenza) e del fattore di crescita vasale (VEGF- α), del fattore indotto dall'ipossia (Hif-1 α) e dell'esochinasi II per l'angiogenesi e lo sfruttamento delle sostanze energetiche in assenza di vasi sanguinei (i.e. in condizioni anaerobiche). Un numero sempre crescente di osservazioni sperimentali attribuisce un ruolo assai importante alla cascata chinasi di attivazione RAS-MAPK nella genesi e nella progressione del carcinoma epatocellulare umano (43-46). Livelli di espressione di pERK1/2 sono stati osservati nei carcinomi epatocellulari umani a cattiva prognosi rispetto ai carcinomi epatocellulari umani a buona prognosi ed in entrambi i tipi di tumore più elevati se comparati con il tessuto epatico normale e con quello

circostante. Anche proteine dei virus HBV, HCV e HEV possono modulare la via delle MAP chinasi. È stato visto che la proteina E2 dell'HCV attiva la via delle MAP chinasi nelle linee cellulari Huh-7 di carcinoma epatocellulare promuovendo la proliferazione cellulare. La via RAF/MEK/ERK svolge, anche un ruolo primario nell'angiogenesi del carcinoma epatocellulare e rappresenta il bersaglio ideale di alcune terapie antiangiogenetiche. Studi preclinici hanno dimostrato che sorafenib, molecola capace di inibire b-RAF a concentrazioni nanomolari (47), riduce la proliferazione cellulare con concomitante riduzione dell'angiogenesi e promuove l'apoptosi delle cellule nel carcinoma epatocellulare.

Via della PI3K/Akt/mTOR

Akt/PKB (da qui in poi chiamata semplicemente Akt) è una serina/treonina chinasi, nota anche come "RAC" (Related to A and C kinases) o "PKB" per l'omologia del suo dominio catalitico con quello della PKA e delle PKC (48, 49). Essa è stata inizialmente identificata come il prodotto dell'oncogene v-Akt, isolato da un retrovirus AKT 8 (50, 51). La struttura della proteina è caratterizzata da un dominio PH N-terminale, un dominio chinasi centrale e un dominio regolatorio C-terminale. Il dominio PH (plekstrin homology domain) consiste di circa 100 aa, ed è stato originariamente identificato nella proteina Plekstrin, il substrato più fosforilato da parte di PKC, nelle piastrine. Tale dominio è in grado di interagire con i fosfoinositidi prodotti dalla chinasi lipidica fosfoinositide 3-chinasi (PI 3-chinasi), fosfatidilinositolo (3, 4, 5) trisfosfato (PIP3) e fosfatidilinositolo (3, 4)

bisfosfato (PIP2) (52). Il dominio chinasi è localizzato nella porzione centrale della molecola e mostra un'elevata analogia con quello presente nelle altre proteinchinasi della famiglia AGC. Akt ha un'estensione C-terminale di circa 40 aminoacidi contenente il motivo idrofobico, caratteristico della famiglia delle AGC chinasi, la cui fosforilazione è necessaria per la completa attivazione enzimatica (53). L'attivazione del segnale Akt e la diminuita espressione di PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) sono state riportate nel 40-60% degli epatocarcinomi (54). L'attivazione di Akt sopprime l'apoptosi indotta da TGF β e l'attività inibitoria di crescita di CCAAT/enhancer binding protein α . Inoltre, l'attivazione di Akt potrebbe a sua volta attivare la via della β -catenina, suggerendo una connessione nell'epatocarcinogenesi tra due frequenti vie oncogeniche. Un'importante mediatore della via PI3K-Akt è mTOR (mammalian target of rapamycin), in quanto è noto che questa proteinchinasi, fosforila proteine che controllano la traduzione del mRNA, svolgendo un ruolo centrale nella regolazione della sintesi proteica (55). L'attività chinasi di mTOR dipende dalla fosforilazione della proteina PRS40 (Proline rich Akt substrate 40kDa), che è parte del complesso mTORC1 ed è un diretto substrato di Akt (56, 57). Il pathway di Akt-mTOR favorisce l'overespressione della ciclina D attraverso l'aumento della traduzione del suo messaggero (58) e l'induzione della trascrizione del suo gene, con un meccanismo che coinvolge CREB (59). La via mTOR è attivata in un sottogruppo di carcinomi epatocellulari ed il suo blocco

tramite rapamicina e/o l'analogo everolimus inibisce la crescita di xenotrapianti di carcinoma epatocellulare in modelli preclinici (60).

SORAFENIB: MECCANISMI D'AZIONE

Sorafenib è un inibitore orale multi-chinasi che interferisce con la cascata intracellulare Ras/Raf/MEK/ERK coinvolta nella proliferazione della cellula tumorale, agendo su Raf1 ed entrambe le varianti, wild-type e mutante V600E di B-Raf (61). Sorafenib agisce anche sui recettori tirosin chinasi presenti sulla superficie cellulare coinvolti nella crescita tumorale e nell'angiogenesi, inclusi VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) 1, 2, 3, PDGFR- β (platelet-derived growth factor receptor beta), c-Kit, FLT-3 (FMS-like tyrosine kinase 3) e RET (62). In uno studio di fase I su pazienti con neoplasie solide avanzate refrattarie, il trattamento con sorafenib ha determinato una risposta parziale (63). Questi dati hanno suggerito il potenziale impiego di questo farmaco in un ampio spettro di neoplasie, inclusi tumori con diverse eziologie molecolari. I risultati di studi clinici randomizzati di fase III hanno dimostrato che sorafenib è in grado di aumentare la sopravvivenza nei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare avanzato. Sorafenib, pertanto, è diventato il trattamento standard in questi pazienti.

CLINICAL TRIALS

Il primo studio clinico di fase II con sorafenib in ionoterapia (64) ha coinvolto 137 pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato, istologicamente accertato, non precedentemente trattati con terapia

sistemica, con ECOG performance status di 0 o 1, Child-Pugh A (72%) o B (28%) ed aspettativa di vita superiore a 12 mesi. La dose di farmaco utilizzata prevedeva la duplice assunzione giornaliera di 400 mg di sorafenib. I pazienti hanno ricevuto il trattamento fino a tossicità o a progressione di malattia; le risposte al trattamento sono state osservate nel 2% dei pazienti e stabilità di malattia superiore a 16 settimane nel 34% dei casi. La terapia con sorafenib era, inoltre, associata a un tempo medio alla progressione di 4,2 mesi con una sopravvivenza globale media di 9.2 mesi. L'efficacia di sorafenib e la sua ridotta tossicità hanno stimolato l'ulteriore studio di sorafenib in monoterapia nel trattamento del carcinoma epatocellulare avanzato. Due studi multicentrici, randomizzati di fase III in doppio cieco hanno recentemente confermato il beneficio di sorafenib per questi pazienti: lo studio Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol (SHARP) (65), condotto in 121 Centri di 21 Stati in Europa, America, Australia e Nuova Zelanda, dove l'insorgenza del tumore è prevalentemente legata all'infezione da HCV e all'alcol, e lo studio Asia-Pacific (66), condotto in 23 Centri in Cina, Taiwan e Corea del Sud, dove l'infezione cronica da HBV è responsabile dell'insorgenza della maggior parte degli epatocarcinomi. Entrambi gli studi hanno incluso pazienti con epatocarcinoma in stadio avanzato, istologicamente accertato, con lesioni misurabili, non pretrattati con terapia sistemica, Child-Pugh A, ECOG PS 0-2, con aspettativa di vita di almeno 12 settimane e adeguata funzionalità renale, epatica, ematologica e midollare. Nello studio SHARP, dei 902 pazienti sottoposti a screening, 602 sono stati

randomizzati 1:1 a ricevere sorafenib 400 mg x 2 volte/die (299 pazienti) o placebo (303 pazienti). I pazienti hanno proseguito l'assunzione del farmaco assegnato fino a progressione radiologica, valutata secondo i criteri RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), e progressione sintomatica, verificata attraverso il questionario FHSI-8 (Functional Assessment of Cancer Therapy-Hepatobiliary Symptom Index 8). Prima della randomizzazione i pazienti sono stati stratificati in base alla presenza di invasione vascolare e/o di malattia extraepatica, all'ECOG PS e alla regione geografica. Nello studio Asia-Pacific sono stati arruolati 226 pazienti, randomizzati 2:1 a ricevere sorafenib (150 pazienti) o placebo (76 pazienti). Lo studio Asia-Pacific è stato disegnato in parallelo allo studio SHARP per verificare l'efficacia e la sicurezza di sorafenib nella popolazione con caratteristiche epidemiologiche e cliniche dell'epatocarcinoma diverse dall'Occidente, ai fini della registrazione del farmaco in Asia; in questo studio non erano definiti obiettivi primari. Gli obiettivi primari dello studio SHARP erano la sopravvivenza ed il tempo alla progressione sintomatica, calcolato come aumento del punteggio al questionario FHSI-8 di 4 punti o peggioramento dell'ECOG fino a 4 o la morte. Gli obiettivi secondari erano il tempo alla progressione radiologica e la percentuale di controllo della malattia (definita come percentuale di risposte complete, risposte parziali e stabilità di malattia ottenute per almeno 28 giorni). L'arruolamento è stato interrotto prematuramente alla seconda analisi ad interim, quando è stato evidenziato un beneficio in termini di sopravvivenza nei pazienti che assumevano sorafenib. In

entrambi gli studi di fase III, la sopravvivenza mediana globale è risultata significativamente maggiore nei pazienti che hanno assunto sorafenib: dopo 2 anni il gruppo trattato con sorafenib aveva una sopravvivenza globale media di 10,7 mesi versus 7,9 mesi dei pazienti che hanno ricevuto placebo nello studio SHARP e 6,5 mesi versus 4,2 mesi nello studio Asia-Pacific. La sopravvivenza libera da progressione di malattia è stata di 5,5 mesi nei pazienti che assumevano sorafenib e di 2,8 mesi nei pazienti che ricevevano placebo nello studio SHARP e di 2,8 mesi nei pazienti che assumevano sorafenib versus 1,4 mesi nei pazienti che ricevevano placebo nello studio Asia-Pacific, con una differenza statisticamente significativa in entrambi gli studi. Le percentuali di controllo della malattia sono state del 43% e del 32% a favore di sorafenib nello studio SHARP e del 35% e del 16%, rispettivamente, nello studio Asia-Pacific. Un'analisi dei sottogruppi ha mostrato un migliore andamento nei pazienti con Child-Pugh A rispetto ai Child-Pugh B in termini di efficacia, con profili di tollerabilità simili nei due gruppi. L'attività di sorafenib nel bloccare la crescita neoplastica e la neoangiogenesi può spiegare il ritardo nella progressione di malattia ed il beneficio in termini di sopravvivenza nonostante il basso tasso di risposte obiettive. Vari studi hanno indagato l'efficacia di sorafenib in combinazione con agenti chemioterapici in pazienti affetti da epatocarcinoma in stadio avanzato. Uno studio randomizzato di fase II in doppio cieco ha confrontato l'efficacia di sorafenib più doxorubicina con placebo più doxorubicina (67). In 2 dei 47 pazienti (4%) trattati con sorafenib e doxorubicina si sono osservate risposte

cliniche (complete o parziali), mentre solo 1 dei 49 pazienti (2%) trattati con doxorubicina ha avuto una risposta clinica. La terapia con sorafenib era associata ad un incremento della sopravvivenza globale e della sopravvivenza libera da progressione. Questo studio ha mostrato risultati incoraggianti senza tuttavia dimostrare alcun sinergismo tra sorafenib e l'agente chemioterapico, vista la mancanza di un gruppo di controllo trattato con sorafenib in monoterapia.

Per ottimizzare l'impiego di sorafenib nei pazienti con carcinoma epatocellulare è necessario identificare fattori predittivi di risposta. Nel monitorare la risposta a sorafenib sono stati studiati i livelli di α -fetoproteina e l'impiego della PET per valutare la risposta precoce alla terapia. In uno studio condotto su 6 pazienti (68), in cui la valutazione della risposta è stata eseguita con PET prima di iniziare la terapia e dopo 3 settimane di trattamento, 3 pazienti hanno mostrato una riduzione nella captazione PET; 2 di questi hanno sviluppato una risposta parziale alla TC a 12 settimane. La TC a 12 settimane ha, inoltre, mostrato stabilità di malattia in un paziente che non aveva presentato alcuna modificazione nella captazione PET tra esame basale e quello a 3 settimane. Un paziente con progressione clinica, presentava lesioni multiple alla PET comparse alla terza settimana ed è deceduto prima della 12^a settimana. È necessario, tuttavia, confermare questi dati con ulteriori studi su campioni più numerosi. Al momento non esistono parametri clinici o biomarcatori che permettano di identificare quali pazienti potranno trarre beneficio dal trattamento.

OBIETTIVI DI STUDIO

L'obiettivo del nostro studio è dimostrare l'esistenza di una correlazione tra marcatori tissutali (beta-catenina (BCAT), glutammina sintetasi (GS), phosphorylated extracellular signal regulated kinase (pERK) (colorazione combinata nucleare e citoplasmatica), phosphorylated v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (pAKT) (colorazione citoplasmatica) e vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) (colorazione citoplasmatica) e l'efficacia clinica di sorafenib in pazienti affetti da carcinoma epatico in stadio avanzato.

MATERIALI E METODI

POPOLAZIONE DEI PAZIENTI

Questo studio ha coinvolto 77 pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato, trattati con sorafenib in monoterapia nell'ambito di due studi clinici prospettici randomizzati nelle Unità di Oncologia Medica di Parma, Pavia e Reggio Emilia nel periodo 2005-2008. Tali pazienti sono stati selezionati in base alla disponibilità del pezzo tumorale. La risposta clinica è stata valutata ogni 6-8 settimane dall'inizio del trattamento. Per la valutazione della risposta sono stati usati i criteri RECIST (69). Sorafenib è stato somministrato alla dose di 400 mg due volte al giorno fino a progressione di malattia o tossicità severa. Come controlli, abbiamo valutato 56 pazienti affetti da carcinoma epatocellulare, 10 casi con stadio BCLC A e 19 casi inclusi in trial clinici e randomizzati a ricevere la sola terapia di supporto. 10 casi con stadio BCLC A non erano candidabili a trattamento per la presenza di comorbidità.

STUDIO IMMUNOISTOCHEMICO

Tutti i preparati isto-patologici (16 resezioni chirurgiche e 146 biopsie percutanee) sono state rivisti da due patologi esperti in patologia del fegato; le discrepanze sono state risolte mediante raggiungimento di un consenso. Lo studio prevedeva la registrazione sistematica di parametri citologici ed architetturali dei tumori secondo criteri predefiniti e validati. Tra le variabili raccolte sono incluse: tipo di crescita, capsula, invasione portale, architettura, alterazioni vascolari, caratteristiche nucleari e citoplasmatiche, presenza di flogosi, necrosi

e statosi. In 64 pazienti l'analisi è stata effettuata sul tumore primitivo del fegato; in 10 casi su una recidiva di malattia; in 20 casi vi erano multipli campioni tissutali. La colorazione immunohistochimica è stata effettuata seguendo procedure standard. Sono state utilizzate sezioni tissutali in paraffina dello spessore di 4 μm ottenute da tessuti inclusi in paraffina. Sono stati impiegati i seguenti anticorpi contro beta-catenina (CTNN1) (BD Transduction Laboratories, CA, USA) , glutamina sintetasi (GS) (BD Transduction Laboratories, CA, USA), phosphorylated extracellular signal regulated kinase (pERK) (Cell Signaling Technologies, MA, USA), phosphorylated v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (pAKT) (Cell Signaling Technologies, MA, USA) e VEGFR, FLK-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA); l'intensità di colorazione è stata misurata utilizzando un sistema semiquantitativo sulla base della letteratura. Sia le variabili patologiche che quelle immunohistochimiche sono state valutate in cieco da due patologi; la riproducibilità intra ed interosservatore sono state calcolate con statistica kappa.

ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche cliniche e la risposta al trattamento dei pazienti sono stati confrontati in base ai livelli di espressione dei marcatori tissutali, utilizzando il test esatto di Fisher (70). La sopravvivenza è stata calcolata usando il metodo di Kaplan-Meier (71). La sopravvivenza libera da progressione (PFS) è stata misurata dalla data di inizio del trattamento alla data della diagnosi di progressione di malattia o di morte per carcinoma epatocellulare. Le differenze nella sopravvivenza

libera da malattia in relazione ai livelli di espressione dei marcatori tissutali sono state valutate in base al log rank test (72). Per individuare i fattori prognostici indipendenti per PFS è stata eseguita un'analisi multivariata utilizzando il modello di Cox (73) e i risultati sono stati espressi come hazard ratio (HR) e relativi intervalli di Confidenza al 95%.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti trattati con sorafenib e dei pazienti trattati con la sola terapia di supporto sono illustrate nella Tabella 1. Le caratteristiche dei pazienti e dei tumori sono adeguatamente bilanciate tra i due gruppi, ad eccezione di una più alta percentuale di pazienti con Child-Pugh B-C nel gruppo di controllo rispetto alla popolazione dello studio (16% versus 39%, $p=0.002$). I livelli di espressione cellulare dei marcatori molecolari esaminati non differiscono significativamente tra i casi ed i controlli.

RISPOSTA CLINICA A SORAFENIB E LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI BIOMARCATORI TISSUTALI

La percentuale di risposta totale alla terapia con sorafenib è stata del 10% (1 risposta completa [RC], 6 le risposte parziali [RP]) (Tabella 2). Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative nella risposta clinica al trattamento con sorafenib in relazione ai marcatori tissutali esaminati.

SOPRAVVIVENZA LIBERA DA PROGRESSIONE ED OVERALL SURVIVAL IN RELAZIONE AI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI BIOMARCATORI TISSUTALI

Con un follow-up mediano di 15.4 mesi (range 0.3- 130.5), le mediane di PFS e di OS sono state di 3.8 mesi e 6.38 mesi, rispettivamente (Table 2). PFS ed OS stimate dei pazienti con elevata espressione cellulare di pERK si sono dimostrate significativamente

inferiori a quelle osservate nei pazienti con livelli bassi di pERK (Figura 1). La PFS al 75° percentile è stata di 4.4 mesi per i pazienti con elevata espressione di pERK e di 8.4 mesi (mediana: 3.7 mesi versus 3.9 mesi) per quelli con livelli di pERK bassi (HR 2.15; 95% CI, 1.20-3.85; P=0.01) (Figura 1A). La OS al 75° percentile è stata di 7.0 mesi per i pazienti con elevata espressione di pERK e di 15 mesi (mediana: 4.9 mesi versus 8.6 mesi) per quelli con livelli di pERK bassi (HR 2.23; 95% CI, 1.27-3.94; P=0.005) (Figura 1B). Calcolando PFS ed OS in relazione al livello di VEGFR-2, si osserva che PFS ed OS stimate per i pazienti con un'alta espressione di VEGFR-2 sono significativamente inferiori rispetto ai pazienti con livelli di VEGFR-2 bassi (Figura 2), con una PFS al 75° percentile di 3.8 mesi e 7.0 mesi, rispettivamente (mediana: 3.0 vs 3.8; HR 1.97; 95% CI, 1.03-3.75; P=0.039) (Figura 2A) ed una OS al 75° percentile di 6.3 mesi e 15.0 mesi, rispettivamente (mediana: 4.6 vs 7.0; HR 2.65; 95% CI, 1.36-5.18; P=0.004) (Figura 2B). Nella nostra popolazione di pazienti trattati con sorafenib, non è stata ottenuta alcuna correlazione tra BCAT, GS, pAKT e PFS ed OS. L'analisi multivariata di Cox dimostra che sia pERK che VEGFR-2 sono fattori prognostici indipendenti per la OS (HR 2.09; 95% CI, 1.13-3.86, P=0.019 e HR 2.28; 95% CI, 1.13-4.61, P=0.021, rispettivamente) (Table 3), mentre solo pERK rappresenta un fattore prognostico indipendente per la PFS (HR 2.13; 95% CI, 1.17-3.90; P=0.014) (Table 4). Tra le variabili cliniche, ECOG PS correla significativamente sia con la PFS che con OS.

BIOMARCATORI TISSUTALI E SOPRAVVIVENZA NELLA POPOLAZIONE DEI CONTROLLI

Nei 56 pazienti trattati con la sola terapia di supporto non si è osservata alcuna correlazione tra i biomarcatori tissutali e OS (Figura 3). La OS al 75° percentile è stata di 20.4 e 9.5 mesi (mediana: 10.9 vs 8.1, HR 1.8; 95% CI, 0.9-3.6; P=0.112), rispettivamente per i pazienti con livelli alti e bassi di pERK (Figure 3A) e di 15.4 e 20.4 mesi (mediana: 9.6 vs 8.2, HR 1.01; 95% CI, 0.6-1.8; P=0.963) per i pazienti con bassa espressione di VEGFR-2 rispetto a quelli con alta espressione. Questi dati suggeriscono che pERK e VEGFR-2 non rivestono un ruolo prognostico e predicono specificatamente l'efficacia clinica a sorafenib.

DISCUSSIONE

Questo studio suggerisce che l'entità di fosforilazione basale di ERK e l'espressione tissutale di VEGFR-2 sono fattori predittivi e prognostici in pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato trattati con sorafenib. Livelli elevati di pERK e di VEGFR sono significativamente associati ad una ridotta PFS ed OS al trattamento con sorafenib rispetto a bassi livelli tissutali. Non è stato riscontrato alcun impatto clinico di questi marcatori biologici nei pazienti che hanno ricevuto la sola terapia di supporto.

Sorafenib è stato approvato nel 2007 per il trattamento del carcinoma epatocellulare (74), e rappresenta la terapia standard negli stadi avanzati (BCLC-C). Nello studio SHARP (65), studio randomizzato controllato in doppio cieco il cui endpoint primario era la sopravvivenza globale (75), sorafenib ha migliorato significativamente la sopravvivenza dei pazienti affetti da carcinoma epatocellulare avanzato, da 7.9 mesi a 10.7 mesi, con un profilo di tossicità facilmente gestibile. Pertanto, sorafenib in monoterapia dovrebbe costituire il gruppo di controllo in trial clinici con nuovi farmaci nei pazienti con carcinoma epatocellulare che non hanno ricevuto precedenti trattamenti chemioterapici (76). L'efficacia antitumorale di sorafenib è stata ottenuta principalmente attraverso un prolungamento del tempo alla progressione radiologica (da 2.8 a 5.5 mesi). Il tasso di risposte obiettive, valutate secondo i classici criteri di risposta in oncologia (RECIST) (69), è stato basso (<3%). Questi criteri, tuttavia, rischiano di sottovalutare l'attività dei nuovi farmaci a bersaglio molecolare. Nel tentativo di risolvere questo problema, sono

state sviluppate alcune linee guida per la valutazione della risposta diverse da quelle tradizionali (modified RECIST) (77).

Sorafenib è un inibitore multichinasi che interferisce sia con la crescita tumorale (via di RAS–MAP chinasi) sia con i processi angiogenetici (via VEGFR e PDGFR). La sfida è determinare quale fra gli effetti specifici di sorafenib rallenta la progressione del carcinoma epatocellulare. Sebbene il meccanismo attraverso cui sorafenib induce una regressione dei carcinomi epatocellulari non sia completamente conosciuto, diversi effetti molecolari e cellulari sono stati osservati in sperimentazioni con modelli in vivo ed in vitro. Sorafenib inibisce la fosforilazione di MEK ed ERK e riduce l'espressione di ciclina D1 sia nelle linee cellulari PLC/PRF/5 che HepG2 (47). Inoltre, sorafenib reduce il livello di fosforilazione di eIF4E e della proteina antiapoptotica Mcl-1 in modo indipendente da MEK/ERK. Di conseguenza, attraverso entrambi questi effetti, sorafenib provoca l'arresto della proliferazione cellulare ed induce l'apoptosi in differenti linee cellulari.

In contrasto con le nostre osservazioni, in uno studio di fase II i pazienti con elevata espressione cellulare di pERK, indice di attivazione della via Ras/MAPK, mostravano un tempo alla progressione significativamente prolungato, suggerendo che le neoplasie contenenti livelli di pERK più elevati sono più sensibili a sorafenib (64). Tuttavia, questi risultati non sono stati confermati nello studio di fase 3. L'analisi di campioni plasmatici ed istologici dei pazienti partecipanti allo studio SHARP, con l'obiettivo di individuare biomarcatori in grado di predire la prognosi o la risposta

al sorafenib, ha mostrato una associazione non significativa tra risposta a sorafenib e livelli di KIT (kinase v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) e HGF (hepatocyte growth factor), senza poter identificare alcun marcatore molecolare predittivo di risposta. Uno studio canadese recentemente ha dimostrato il vantaggio di sorafenib in termini di costi rispetto alla terapia di supporto nel trattamento del carcinoma epatocellulare (78), tuttavia sono auspicabili ulteriori studi finalizzati a migliorare il rapporto costo-efficacia del trattamento.

La proliferazione e la sopravvivenza di alcune cellule tumorali richiede l'attivazione di specifici oncogeni e l'inattivazione di specifici geni oncosoppressori, chiamata *oncogene addiction* (79). Questa definizione è stata originariamente impiegata per identificare distinti fenotipi maligni di diversi tumori associati all'attivazione di certe vie di segnale (80). MYC riveste un ruolo importante negli osteosarcomi e la crescita tumorale è rallentata quando MYC è inattivato (81). Mutazioni a carico di *EGFR* sono richieste per la crescita di alcuni tipi di tumori polmonari, che rispondono al trattamento con l'inibitore tirosinichinasico gefitinib. L'amplificazione del recettore per il fattore di crescita HER2/neu nel carcinoma della mammella e nel carcinoma gastrico identifica un sottogruppo di pazienti con prognosi peggiore, ma possibile risposta al trattamento con trastuzumab, anticorpo monoclonale in grado di legarsi selettivamente ad HER2 (82, 83). Alcuni tipi di melanoma con mutazioni del gene *BRAF1* rispondono al trattamento con l'inibitore di BRAF1 (84). La conoscenza delle aberrazioni molecolari di un dato

tumore ha aiutato a definire i bersagli molecolari contro i quali sviluppare nuovi farmaci molecularly-targeted ed impiegare correttamente quelli già disponibili sul mercato, nel contesto della cosiddetta medicina personalizzata, basata sulle caratteristiche genetiche del tumore e del paziente (85). L'assenza di marker molecolari univoci e caratteristici per il carcinoma epatocellulare, sia di tipo diagnostico sia di tipo prognostico e predittivo, fa sì che diversi geni o vie molecolari possano essere il bersaglio di differenti terapie mirate. Tuttavia, una terapia mirata vera sarà possibile solo se saranno esplorate e completamente delucidate le varie vie di segnale presenti nei primi stadi dell'epatocarcinogenesi, nella progressione tumorale e nel processo di diffusione metastatica. Per esempio, WNT e RAS sono attivati rispettivamente nel 25% e nel 50% circa dei carcinomi epatocellulari, tuttavia inibitori specifici di queste vie non sono stati valutati nei trial clinici nel carcinoma epatocellulare (86). Inoltre, l'alterazione del cosiddetto microambiente epatico nello stadio di cirrosi contribuirebbe alla genesi del carcinoma epatocellulare, alla disseminazione intraepatica e alla progressiva disfunzione epatica. L'espressione di 17 geni, legati prevalentemente alla risposta immune ed infiammatoria, a livello del tessuto epatico peritumorale, è in grado di distinguere pazienti con carcinoma epatocellulare metastatico da quelli con carcinoma epatocellulare senza metastasi (87). Una prognosi accurata per i pazienti affetti da carcinoma epatocellulare richiederà un ulteriore impegno per arrivare all'integrazione di variabili cliniche (algoritmo BCLC) con variabili molecolari ottenute dal tumore e dal tessuto cirrotico adiacente.

Segnali e processi che avvengono a livello del microambiente possono contribuire allo sviluppo neoplastico ed alla disseminazione metastatica, attraverso la neoangiogenesi. La crescita e lo sviluppo dei vasi sanguigni intratumorali sono strettamente regolati e sono necessari per la progressione del carcinoma epatocellulare (88); l'angiogenesi avviene all'interno del tessuto cirrotico e contribuisce allo sviluppo del carcinoma epatocellulare (89). L'angiogenesi inoltre promuove l'ipertensione portale e la progressione dell'insufficienza epatica. Diversi inibitori tirosino-chinasici sono stati sviluppati per inibire questo processo: farmaci che bloccano solo VEGFR (cediranib), farmaci che inibiscono diverse tirosin-chinasi (sorafenib, sunitinib, linifanib, pazopanib) e farmaci duplici inibitori del pathway di VEGFR e di FGFR (fibroblast growth factor receptor) (brivanib). Anche l'anticorpo monoclonale anti VEGF-A (bevacizumab) inibisce i segnali angiogenetici prodotti a livello del microambiente. L'inibizione dei recettori angiogenetici contribuisce all'attività antifibrotica di sunitinib ed imatinib e riduce il rischio di sviluppare carcinoma epatocellulare in modelli sperimentali (90, 91). L'impiego dei farmaci anti-angiogenetici si è dimostrato efficace nella cura delle neoplasie. Tuttavia, il beneficio clinico di questi farmaci è limitato ad una parte di pazienti ed, al momento, i pazienti non vengono selezionati sulla base di marcatori di sensibilità o di resistenza al tumore. VEGF gioca un ruolo chiave nell'angiogenesi tumorale. Tuttavia, trial clinici che utilizzano farmaci che hanno come bersaglio VEGF sono spesso inefficaci, suggerendo che altri fattori potrebbero essere coinvolti nell'angiogenesi tumorale. Dallo studio svolto,

l'espressione di VEGFR-2 si è rivelata, per i pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato, un possibile fattore predittivo per la resistenza a sorafenib. La valutazione dell'espressione di VEGFR-2 potrebbe, pertanto, rappresentare una strategia efficace per migliorare la selezione dei pazienti candidabili al trattamento con sorafenib.

In conclusione, il presente studio supporta per la prima volta l'ipotesi che il livello di pERK e di VEGFR-2 giochi un ruolo importante nel predire l'efficacia clinica di sorafenib in pazienti con carcinoma epatocellulare. In considerazione del disegno retrospettivo del nostro studio sono richieste ulteriori indagini circa il ruolo predittivo di questi marcatori tissutali nell'ambito di studi prospettici. Solo un'approccio multimediale, che si focalizzi sull'importanza delle aberrazioni di alcune vie di segnale, potrà consentire in futuro di ottimizzare le combinazioni di farmaci a bersaglio molecolare da impiegare nel trattamento del carcinoma epatocellulare, integrandoli nell'algoritmo terapeutico attuale, per ogni stadio clinico-patologico di malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, et al. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 1: 493-502, 2002
2. Clark J, Cools J, Gilliland DG. EGFR inhibition in non-small cell lung cancer: resistance, once again, rears its ugly head. *PLoS Med* 2: e75, 2005
3. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344: 1038-1042, 2001
4. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99: 3530-3539, 2002
5. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 96: 3343-3356, 2000
6. Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, et al. Molecular Mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *The Lancet Oncol* 4: 75-85, 2003
7. Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanism of resistance to Imatinib. 2003. *Sem Hematol* 40: 69-79, 2003
8. Sawyers, C. L. Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. *Genes Dev* **17**: 2998-3010, 2003

9. Paez, J. G. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500 (2004).
10. Sordella, R., Bell, D. W., Haber, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305: 1163-1167, 2004
11. Stephens, P. et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431; 525-526, 2004
12. Davies, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954, 2002
13. Bardelli, A. et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 300: 949-950, 2003
14. Samuels, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304: 554, 2004
15. Cools, J. et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348: 1201-1214, 2003
16. Parkin DM: Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2: 533-543, 2001
17. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6: 674-687, 2006
18. Grando-Lemaire V, Guttier C, Chevert S, et al. Hepatocellular carcinoma without cirrhosis in the west: epidemiological factors and histopathology of the non-tumorous liver. *J Hepatol* 31:508-513, 1999
19. Wong CM, Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver International* 28: 160-174, 2008

20. Santoni-Rugiu E, Jensen MR, Thorgeirsson SS. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c-myc and transforming growth factor α . *Cancer Res* 58:123-134, 1998
21. Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, et al. Cell cycle deregulation in liver lesions of rats with and without genetic predisposition to hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 35:1341-1350, 2002
22. Greenbaum LE. Cell cycle regulation and hepatocarcinogenesis. *Cancer Biol Ther* 3:1200–1207, 2004
23. Marshall C. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 11:732-736, 1999
24. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170, 1996
25. Buendia MA. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol* 39:530-535, 2002
26. Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, et al. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 21: 2593-2604, 2002
27. Tornillo L, Carafa V, Sauter G, et al. Chromosomal alterations in hepatocellular nodules by comparative genomic hybridization: high grade dysplastic nodules represent early stages of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 82: 547-553, 2002
28. Tornillo L, Carafa V, Richter J, et al. Marked genetic similarities between hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive hepatocellular carcinomas. *J Pathol* 192: 307-312, 2000

29. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, et al. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27: 55-76, 2007
30. Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, et al. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat* 21:201-216, 2003
31. De Laurenzi V, Rossi A, Terrinoni A, et al. p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 342-346, 2000
32. Stiewe T, Tuve S, Peter M, et al. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 10:626-633, 2004
33. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557-2576, 2007
34. Kim JW, Ye Q, Forgues M, et al. Cancer-associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis. *Hepatology* 39: 518-527, 2004
35. Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of β -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *The Journal of Cell Biology* 167: 339-349, 2004
36. Moreno-Bueno G, Hardisson D, et al. Abnormalities of the APC/ β -catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 21: 7981-7990, 2002
37. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of β -catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 34: 401-406, 2005

38. Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48: 2047-2063, 2008
39. Edamoto Y, Hara A, Biernat W, et al. Alteration of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer* 106: 334-341, 2003
40. Levy L, Renard CA, Wei Y, et al. Genetic alterations and oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 963: 21-36, 2002
41. Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, et al. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 27: 748-757, 2006
42. Hoscino R, Chatani Y, Yamori T, et al. Constitutive activation of the 41/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18:813-822, 1999
43. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 130:1117-1128, 2006
44. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 117:2713-2722, 2007
45. Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signalregulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27:951-958, 1998
46. Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, et al. Overexpression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in

- hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis.
BMC Gastroenterol 3:19–39, 2003
47. Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 66: 11851-11858, 2006
48. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, et al. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254:274-277, 1991
49. Coffey PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem.* 1991 201:475-481, 1991
50. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88:435-437, 1997
51. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 68:965-1014, 1999
52. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1697: 3-16, 2004
53. Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7:261-269, 1997

54. Hu TH, Huang CC, Lin PR, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97: 1929-1940, 2003
55. Aberle H, Bauer A, Stappert J, et al. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16:3797-3804, 1997
56. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275:1787-1790, 1997
57. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103:253-262, 2000
58. Gille H, Downward J. Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 274:22033-22040, 1999
59. Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, et al. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 344:427-431, 1999
60. Huynh H, Chow KH, Soo KC, et al. RAD001 (Everolimus) inhibits tumor growth in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 13: 1371-1380, 2008
61. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64: 7099-7109, 2004
62. Adnane L, Trail PA, Taylor I, et al. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK

- pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol* 407: 597-612, 2005
63. Strumberg D, Richly H, Hilger RA, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 23: 965-972, 2005
64. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 24: 4293-4300, 2006
65. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl Med* 359: 378-390, 2008

66. 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 randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 10: 25-34, 2009
67. Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox J et al. Final results from a phase II (PhII), randomized, double-blind, study of sorafenib plus doxorubicin (P + D) in patients with advanced hepatocellular carcinoma (AHCC) [abstract no.128] 2008 Gastrointestinal Cancer Symposium 2008 January 25-27, Orlando, FL, USA
68. Siemerink E, Mulder NH, Brouwers AH et al. Early prediction of response to sorafenib treatment in patients with hepatocellular carcinoma with 18fluorodeoxyglucose-positron emission tomography [abstract no. 15600]. 44th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. 2008 Chicago (IL).
69. Therasse, P., Arbuck, SG., Eisenhauer, EA., Wanders, J., Kaplan, RS., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, AT., Christian, MC., Gwyther, SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92: 205-16, 2000
70. Freeman. DH, Applied categorical data analysis. New York: Marcel Dekker, INC., 1987
71. Kaplan, EI., Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*; 53: 457-481, 1958

72. Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*; 50: 163-170, 1966
73. Cox, DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc*; 34: 187-220, 1972
74. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7: 3129-3140, 2008
75. Croswell JM, Kramer BS. Clinical trial design and evidence-based outcomes in the study of liver diseases. *J Hepatol* 50:817-826, 2009
76. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 100: 698-711, 2008
77. Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 30: 52-60, 2010
78. Muszbek N, Shah S, Carroll S, et al. Economic evaluation of sorafenib in the treatment of hepatocellular carcinoma in Canada. *Curr Med Res Opin* 24: 3559-3569, 2008
79. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136: 823-837, 2009
80. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science* 297: 63-64, 2002
81. Jain M, Arvanitis C, Chu K, et al. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297: 102-104, 2002

82. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1659-1672, 2005
83. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomized controlled trial. *Lancet* 376: 687-697, 2010
84. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 809-819, 2010
85. van't Veer LJ, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* 452:564-570, 2008
86. Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* 130: 986-988, 2007
87. Budhu A, Forgues M, Ye QH, et al. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* 10: 99-111, 2006
88. Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 41: 864-880, 2004
89. Fernandez M, Semela D, Bruix J, et al. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 50: 604-620, 2009

90. Knight B, Tirnitz-Parker JE, Olynyk JK. C-kit inhibition by imatinib mesylate attenuates progenitor cell expansion and inhibits liver tumor formation in mice. *Gastroenterology* 135: 969-979, 79 e1, 2008
91. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, et al. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 49: 1245-1256, 2009

Table 1. Patient Characteristics and immunostaining results

Parameter	<u>Study Cases*</u>		<u>Control</u>		<u>P</u>
	No	%	<u>Group*</u>		
			No	%	
No. of patients	77	100	56	100	
Median age—yrs (range)	70 (20-84)		68.5 (38-79)		0.414
Sex					
Male	63	82	45	80	0.831
BCLC					
C	31	40	27	48	0.361
Child-Pugh status					
B-C	12	16	22	39	0.002
Median [IQR] survival (mo) from diagnosis	22.6 [13.3-43.6]		9.5 [3.8-15.4]		<0.001
High nuclear grade†	56	73	42	75	0.824
GS positivity	42	57	28	51	0.510
High BCAT	34	47	26	46	0.987
High pERK	25	36	15	27	0.289
High pAKT	38	54	38	68	0.122
High VEGFR-2, FLK-1	14	21	20	36	0.058

Abbreviations: No, number; yrs, years; BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer; IQR, interquartile range; mo, months; GS, glutamine synthetase; BCAT, beta-catenin; pERK, phosphorylated extracellular signal regulated kinase; pAKT, phosphorylated v-akt murine thymoma viral oncogene homolog; VEGFR-2, FLK-1, vascular endothelial growth factor receptor-2.

*Study cases: advanced hepatocellular cancers who had received sorafenib; controls: patients treated with best supportive care.

Table 2. Treatment outcome in advanced hepatocellular patients treated with sorafenib

	No.	%
Response rate*		
CR + PR	7	10%
SD	41	57%
PD	24	33%
Median PFS — mo	3.8	95%CI: 1.7-6.4
Median OS — mo	6.38	IQR: 3.2 -11.9
Response rate*		
CR + PR	7	10%

Abbreviations: No, number; CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease ; PFS, progression-free survival ; mo, months ; OS, overall survival. IQR : Interquartile Range

* 5 patients had non-evaluable disease.

Table 3. Multivariate analysis overall survival (OS) among patients treated with sorafenib

Factor	Group	P-value	HR	95% CI
Sex	Male vs Female	0.919	0.96	0.40-2.28
ECOG PS	1+2 vs 0	0.011	2.34	1.21-4.52
pERK	High vs Low	0.019	2.09	1.13-3.86
VEGFR-2	High vs Low	0.021	2.28	1.13-4.61

Table 4. Multivariate analysis progression-free survival (PFS) among patients treated with sorafenib

Factor	Group	P-value	HR	95% CI
ECOG PS	1+2 vs 0	0.035	1.86	1.04-3.31
pERK	High vs Low	0.014	2.13	1.17-3.90
VEGFR-2	High vs Low	0.086	1.77	0.92-3.42

Figure Legend

Figure 1. Kaplan-Meier estimates of progression-free survival (PFS) [A] and overall survival (OS) [B] by pERK intensity for patients treated with sorafenib.

Figure 2. Kaplan-Meier estimates of progression-free survival (PFS) [A] and overall survival (OS) [B] by VEGFR-2 levels for patients treated with sorafenib.

Figure 3. Kaplan-Meier estimates of overall survival (OS) by pERK intensity [A] and by VEGFR-2 levels [B] for controls.

Figure 1. A

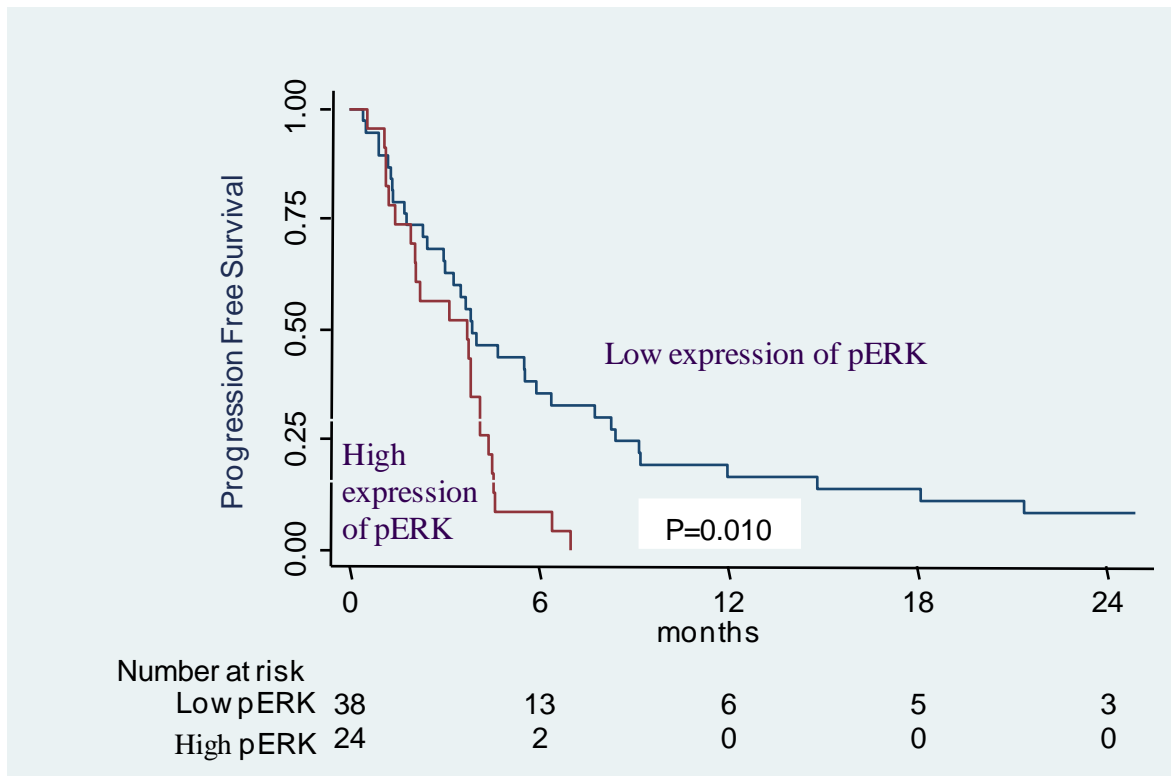


Figure 1. B

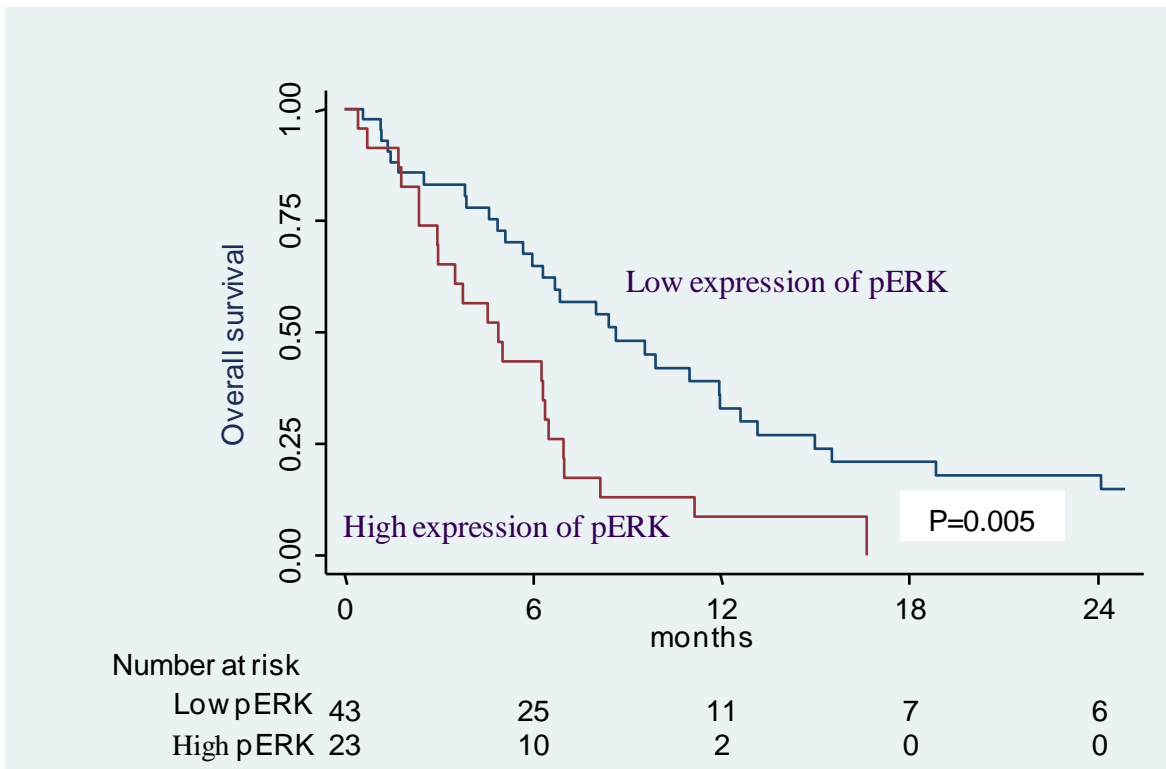


Figure 2. A

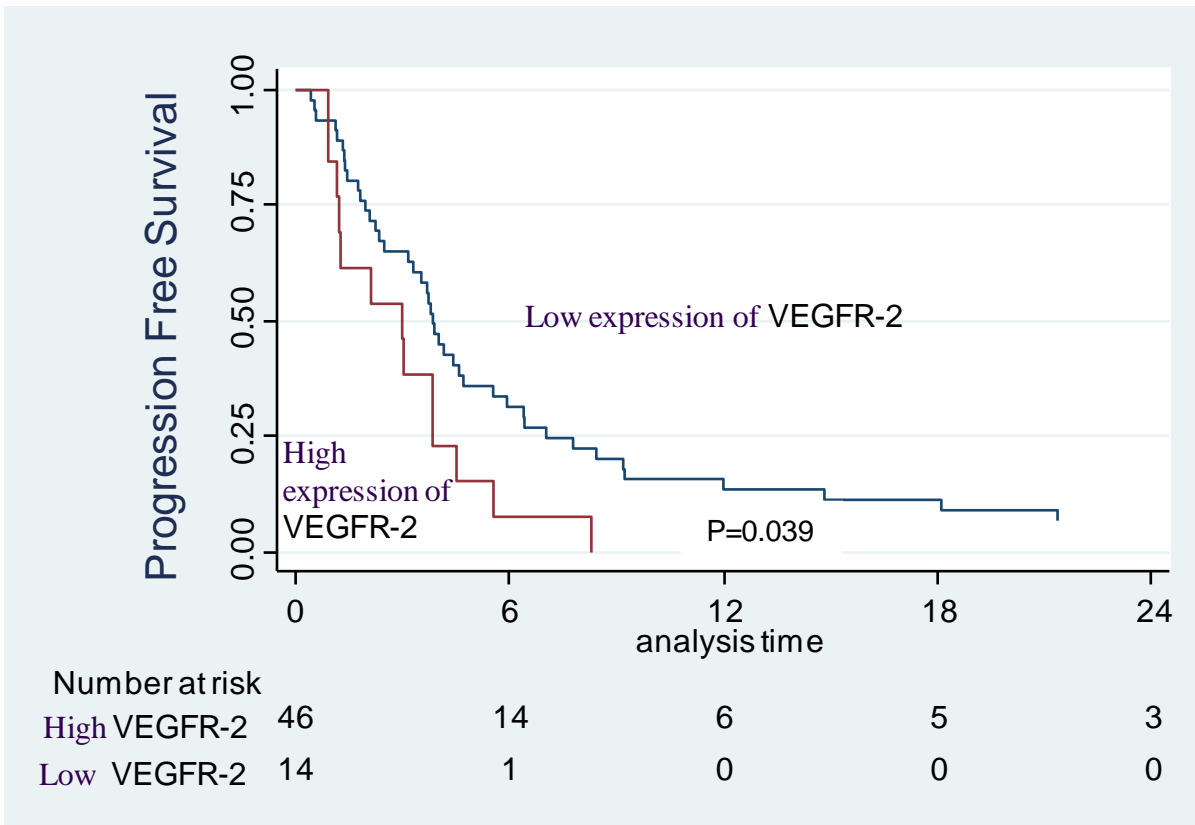


Figure 2. B

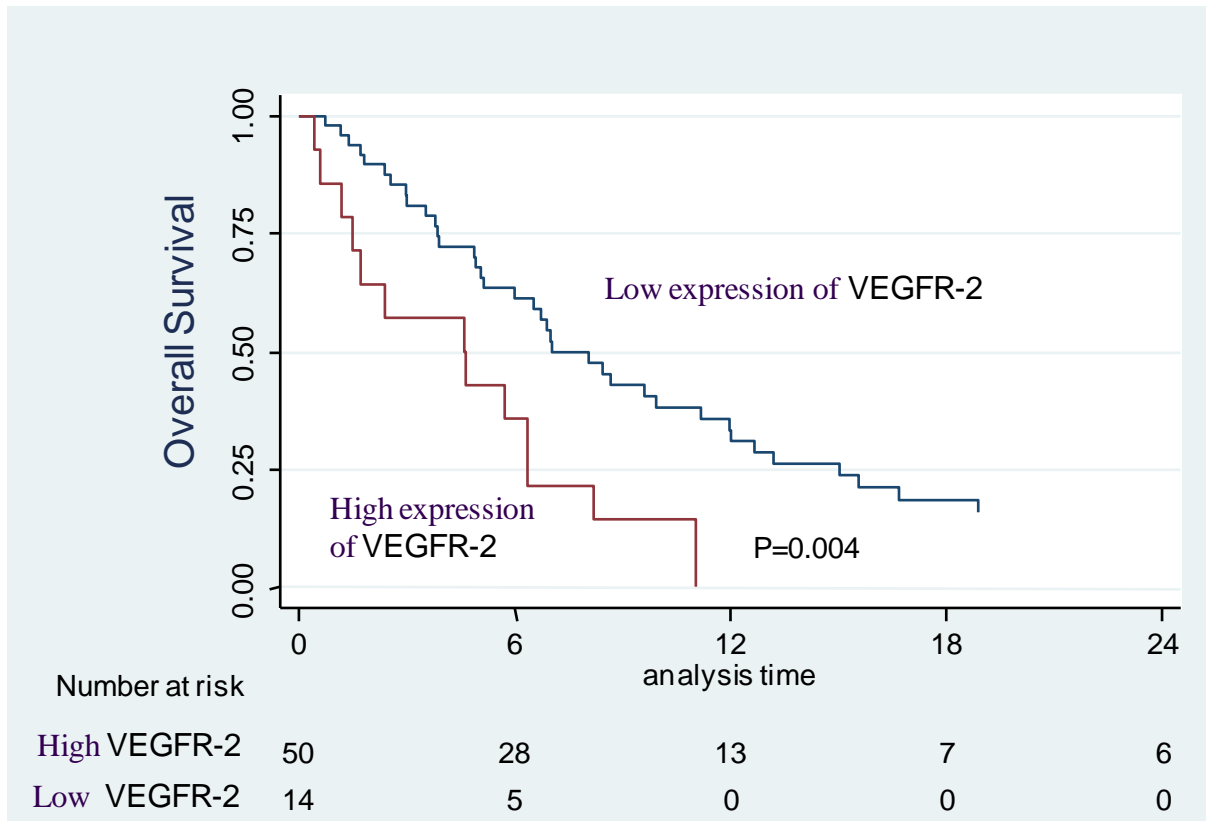


Figure 3. A

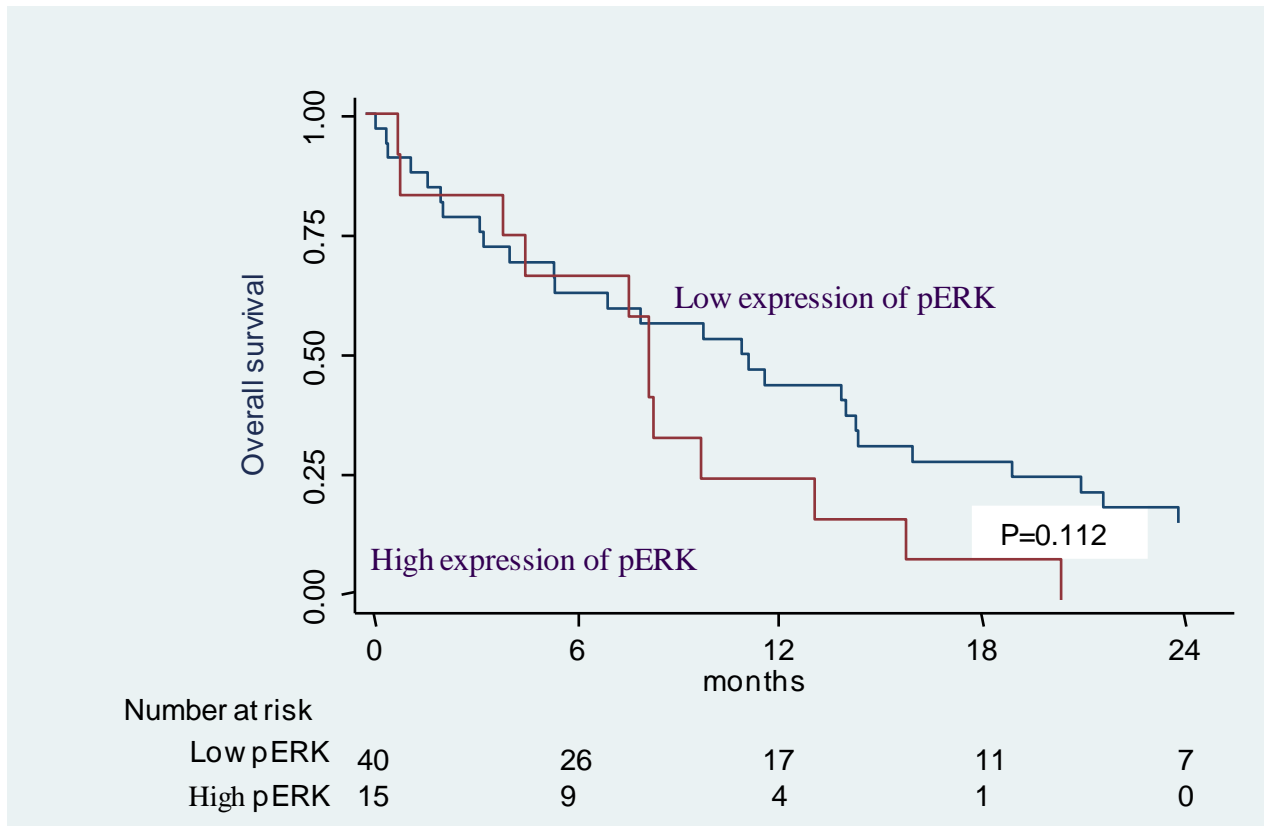


Figure 3. B

