



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE
MARCHE**

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in Salute Dell'Uomo

XXX Ciclo

**IL PROFILO ANGIOGENICO NEL
CARCINOMA RENALE METASTATICO:
IMPLICAZIONI PROGNOSTICHE E
TERAPEUTICHE**

Relatore:

Prof.ssa Rossana Berardi

Tesi di Dottorato di:

Dr.ssa Maristella Bianconi

Anno Accademico 2016-2017

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il carcinoma renale	1
1.2 Angiogenesi e tumore del rene	12
2. SCOPO DELLO STUDIO	18
3. MATERIALI E METODI	19
3.1 Selezione dei pazienti	19
3.2 Analisi dei polimorfismi	19
3.3 Analisi statistica	21
4. RISULTATI	23
4.1 Caratteristiche della popolazione generale	23
4.2 Risultati dell'analisi dei polimorfismi nei pazienti trattati in seconda linea	23
5. DISCUSSIONE	26
6. FIGURE	30
7. TABELLE	38
8. BIBLIOGRAFIA	42

RIASSUNTO

Il trattamento del carcinoma renale avanzato è radicalmente cambiato nell'ultimo decennio e continua ad arricchirsi di nuove opzioni terapeutiche. Le opzioni disponibili sono per la maggior parte dirette contro la via dell'angiogenesi o contro pathway che ad essa si riconducono. Nonostante questo i pazienti trattati sperimentano outcome molto diversi tra di loro e, al momento, non siamo in possesso di fattori che possano predire i beneficiari di una o dell'altra terapia. Sulla scorta delle nostre precedenti analisi dei polimorfismi di VEGF e VEGFR nel carcinoma renale avanzato in pazienti trattati in prima linea con sunitinib o pazopanib, abbiamo voluto analizzare l'eventuale influenza di tali polimorfismi per quanto concerne la seconda linea.

Dei pazienti trattati per carcinoma renale avanzato, 63 sono risultati eleggibili per l'analisi dei polimorfismi in correlazione alla seconda linea. Su questi pazienti sono stati analizzati un gruppo di polimorfismi di VEGF e VEGFR correlandoli con la PFS e la OS, i pazienti sono stati divisi in due gruppi in base al trattamento (anti-VEGF vs anti-mTOR).

Il polimorfismo rs2010963 di VEGF A mostra un vantaggio in termini di PFS per il genotipo GG o GC nel gruppo anti-VEGF (7,5 vs 3,3 mesi) e nel gruppo trattato con anti-mTOR (6,3 vs 2,9 mesi) ($p < 0,0001$); questo vantaggio persiste in OS sia nel gruppo trattato con anti-VEGF (26,4 vs 10,8 mesi) sia in quello trattato con anti-mTOR (13,2 vs 3,4 mesi) ($p = 0,0006$). Il polimorfismo di VEGFR-3 rs6877011 si è dimostrato vantaggioso in PFS per il genotipo CC nel gruppo anti-VEGF (7,6 vs 3,2 mesi) e per GG o GC nel gruppo trattato con anti-mTOR (10,3 vs 3,7 mesi) ($p = 0,0018$). Per quanto riguarda la OS la presenza di C evidenzia un vantaggio nel gruppo trattato con anti-VEGF (26,4 vs 3,7 mesi) mentre in quello trattato con anti-mTOR il vantaggio si ha con l'espressione di GG o GC (12,9 vs 8,9 mesi) ($p = 0,0045$).

Dalle nostre analisi sembra evidenziarsi un profilo angiogenico con i polimorfismi rs833061, rs2010963, rs699947 e rs6877011 che sia in grado di predire la scelta del farmaco in prima linea e indirizzare la scelta della seconda linea di trattamento.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il carcinoma renale

Il carcinoma a cellule renali (RCC) rappresenta il 2-3% di tutti i tumori, con tassi di incidenza (Figura 1, Globocan 2012) e di mortalità (Figura 2, Globocan 2012) standardizzati per età, nelle aree più sviluppate del mondo, rispettivamente di 5,8 e di 1,4 per 100.000 abitanti [1].

Per quanto riguarda l'Italia (AIOM/AITRUM 2017), i casi attesi nel 2017 sono circa 13.600, 9.000 tra gli uomini e 4.600 tra le donne (4% e 2% di tutti i tumori incidenti, rispettivamente). Circa 11.500 casi sono localizzati nel parenchima renale e circa 2.000 casi nelle vie urinarie. Si stima che il rischio di sviluppare un tumore del rene sia pari a 1 su 39 negli uomini e 1 su 90 nelle donne: il rischio è estremamente basso nelle fasce di età più giovani e aumenta progressivamente all'aumentare dell'età. Il trend d'incidenza del tumore del rene appare sostanzialmente stabile. Il carcinoma renale presenta una incidenza negli uomini con valore simile nelle Regioni del Nord (31,9) e Centro Italia (32,0), mentre l'incidenza appare più bassa nelle Regioni del Sud (18,2); anche nelle donne i valori sono più elevati nelle Regioni del Centro-Nord (circa 13 casi per 100.000 donne) rispetto al Sud (8,0).

Nel 2014 sono stati registrati 3.371 decessi per tumore del rene (2.184 uomini e 1.187 donne) in Italia, pari al 3% e 2% dei decessi per tumore, rispettivamente. Si stima che il rischio di morire per un tumore del rene nell'arco della vita sia di 1 su 101 uomini e 1 su 270 donne. La mortalità presenta una sostanziale stabilità nel tempo sia tra gli uomini sia tra le donne (rispettivamente +0,8%/anno e +1,5%/anno).

La sopravvivenza a 5 anni nei tumori del rene in Italia è pari al 71%. Esiste un forte gradiente per età: la sopravvivenza a 5 anni passa dall'87% nella classe di età 15-44 anni al 56% nelle persone più anziane (75+). La probabilità di sopravvivere a 5 anni dalla diagnosi, essendo vissuti il primo anno, è pari all'84%

nei maschi e all'85% nelle femmine, mentre a 5 anni la probabilità è pari al 92% nei maschi e all'89% nelle femmine. Mediamente nel Sud Italia la sopravvivenza a 5 anni è più bassa rispetto al Centro-Nord, sia nei maschi (66%) sia nelle femmine (69%) [2].

Il carcinoma a cellule renali origina dalle strutture tubulari del rene ed è classificato in quattro principali tipi istologici. Il carcinoma renale a cellule chiare è il sottotipo più frequente tra i carcinomi sporadici nell'adulto (70%-85%) [3]. La caratteristica istologica tipica è l'aspetto chiaro delle cellule a causa del glicogeno e dei lipidi nel loro citoplasma. Il carcinoma renale papillare (7%-15%) [4] deriva il suo nome dalla distribuzione delle cellule maligne attorno a nuclei capillari (papille) nel 50%-70% del tumore. Nel carcinoma renale cromofobo (5%-10%) le cellule sono tipicamente poligonali con una chiara delimitazione della membrana citoplasmatica (che dà loro l'aspetto di una cellula vegetale). Il carcinoma renale del dotto collettore (tumore di Bellini) rappresenta meno dell'1% dei carcinomi renali, questi tumori derivano dal nefrone distale o dotto di Bellini.

I principali fattori prognostici in grado di predire il rischio di recidiva e/o progressione a distanza e la sopravvivenza dei pazienti con carcinoma renale possono essere classificati in clinici, di laboratorio, anatomici, istologici e molecolari [5].

Nel corso degli ultimi anni, con l'obiettivo di aumentare l'accuratezza prognostica, è stata creata una serie di modelli matematici basati sull'integrazione delle principali variabili di tipo clinico e patologico. Sebbene il loro utilizzo nella pratica clinica non sia ancora molto diffuso, alcuni di questi sistemi vengono proposti come importanti strumenti per la razionalizzazione del follow-up dei pazienti sulla base del diverso rischio di progressione [6] e per il miglioramento della selezione dei pazienti da arruolare nell'ambito di nuovi studi clinici randomizzati.

Tra le variabili cliniche, emerge il ruolo prognostico di età, performance status e modalità di esordio della neoplasia. Ad oggi, pochi studi hanno valutato il significato prognostico dell'età; le maggiori evidenze sono riconducibili ad un

recente studio multicentrico, che ha dimostrato come i pazienti più giovani presentino neoplasie di stadio e grado più basso e con istotipo più favorevole rispetto ai pazienti più anziani. In questo studio, l'età ≤ 40 anni è risultata una variabile in grado di predire una più favorevole sopravvivenza causa-specifica, anche in maniera indipendente dagli altri parametri clinici e patologici tradizionali [7]. La classificazione dello Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) e quella di Karnofsky sono i due sistemi maggiormente utilizzati per l'assegnazione del performance status nei pazienti con RCC. Il valore prognostico del performance status ECOG è stato ampiamente confermato nell'ambito di casistiche multicentriche internazionali di pazienti sottoposti a nefrectomia parziale o radicale per RCC sia localizzato sia metastatico [8].

Sebbene sia il performance status ECOG che la presenza di sintomi siano variabili predittive indipendenti della sopravvivenza causa-specifica, Karakiewicz et al. hanno recentemente dimostrato come queste variabili cliniche non apportino un sostanziale miglioramento all'accuratezza prognostica di modelli matematici, che includono le principali variabili di tipo patologico [8].

I principali parametri di laboratorio studiati come fattori prognostici dei pazienti con RCC sono la velocità di eritrosedimentazione (VES), la conta delle piastrine, i livelli di proteina C reattiva, i livelli ematici di Calcio, di emoglobina e di Lattico-deidrogenasi (LDH).

Questi numerosi fattori prognostici, inclusi nei principali sistemi integrati, vengono utilizzati per predire il rischio di progressione o la sopravvivenza dei pazienti con RCC localizzato o metastatico. I dati della letteratura hanno evidenziato come l'integrazione di più variabili predittive in un unico sistema comporti un incremento significativo dell'accuratezza prognostica. Per tale motivo, è presumibile che i sistemi integrati possano diventare nel prossimo futuro gli strumenti di principale utilizzo per la pianificazione del follow-up post-operatorio, per il counselling dei pazienti e per la definizione dei criteri per l'inclusione e la valutazione dei risultati degli studi clinici [8 -10].

Tuttavia, al momento attuale, la disponibilità di più di un sistema integrato, l'eterogeneità delle variabili cliniche e/o patologiche incluse, l'assenza di studi di comparazione che dimostrino l'eventuale superiorità dell'uno rispetto all'altro e l'indicazione di diversi modelli prognostici per differenti linee terapeutiche, giustificano la loro scarsa diffusione nella pratica clinica.

I fattori prognostici di tipo anatomico-patologico sono rappresentati dalle dimensioni della neoplasia, estensione del tumore primitivo (T), coinvolgimento dei linfonodi loco-regionali (N) e presenza di metastasi a distanza (M). L'insieme di queste informazioni è contemplato nella classificazione Tumour Nodes Metastasis (TNM), un sistema di stadiazione dinamico, progressivamente aggiornato nel corso degli anni sulla base delle nuove evidenze provenienti dalla letteratura.

La Tabella 1 riassume l'ultima versione del TNM pubblicata nel 2009, una versione aggiornata di tale definizione degli stadi di malattia verrà pubblicata nel 2018 [11].

Numerosi aspetti della suddetta classificazione rimangono al momento controversi sia per quanto riguarda le neoplasie localizzate (T1-2) sia per quelle localmente avanzate (T3-4) [12-15] e con coinvolgimento linfonodale (N1-2) [16].

La classificazione di Fuhrman rappresenta il sistema maggiormente utilizzato negli Stati Uniti e in Europa per assegnare il grading nucleare degli RCC. Questo sistema distingue gli RCC in 4 differenti gradi sulla base delle dimensioni e della morfologia del nucleo e della presenza o assenza dei nucleoli. Il valore predittivo indipendente del grading nucleare di Fuhrman è stato confermato in numerosi studi clinici. Un recente studio multicentrico ha dimostrato che le differenti modalità di accorpamento dei 4 gradi che corrispondono alla classificazione di Fuhrman non influenzano l'accuratezza prognostica [17]. Esistono dati recenti della letteratura che tendono a riconsiderare la correttezza dell'applicazione del grading nucleare di Fuhrman nell'ambito degli RCC ad istotipo papillare [18] e a negarla in quelli a istotipo cromofobo [19]. Durante la Conferenza della International Society for Uro-Pathology (ISUP) di Vancouver nel 2013 è stata svolta una

Consensus Conference rivolta al valutare tra gli esperti il grado di appropriatezza di alcuni dati morfologici classificativi. Da questa conferenza si desume che il sistema di grading secondo Fuhrman non è più ritenuto adeguato a classificare i carcinomi renali, è stato invece proposto di adottare un nuovo sistema di grading che si basa principalmente sulla evidenza nucleolare e che negli ultimi anni si è sempre più fatto strada nella comunità dei Patologi che si interessano di carcinomi renali [19].

Il miglioramento delle conoscenze nell'ambito dei meccanismi molecolari implicati nella genesi e nello sviluppo del carcinoma renale ha contribuito negli ultimi anni ad identificare alcuni marcatori molecolari e a studiarne il loro potenziale impatto prognostico. Attualmente, viene studiato il valore prognostico di circa 100 geni o proteine tra cui molecole di adesione (Caderina-6, E-caderina, MUC1/EMA, ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, KSA), molecole stimolanti risposte immuno soppressive (HLA classe I, interleukina-6, interleukina-8, IP-10, MIG, MIP-1 β , B7-H1, B7-H4, CD44), recettori dei fattori di crescita (VEGFR-3, TGF β R-II), molecole indotte dall'ipossia (CAIX, CAXII, CXCR-4, HIF-1 α , VEGF, IGF-I), marcatori di proliferazione (Ki-67, PCNA, Ag-NORs) e proteine implicate nella regolazione del ciclo cellulare (p53, bcl-2, PTEN, Cyclin A, Akt, p27).

L'Anidrasi carbonica IX (CAIX) è uno dei fattori molecolari al momento maggiormente studiati. Sebbene CAIX sia espressa in maniera molto limitata nel contesto del parenchima renale normale, risulta iperespressa nel 95% dei carcinomi a cellule chiare e nel 50% dei papillari. Alcuni autori hanno dimostrato il ruolo di CAIX nel predire la sopravvivenza causa-specifica dei pazienti con carcinoma a cellule chiare. In una delle serie più numerose disponibili, Bui et al. hanno dimostrato come la ridotta espressione di CAIX (<85%) nel tessuto tumorale di 321 pazienti sottoposti a nefrectomia era un fattore prognostico indipendente dallo stadio tumorale, dal grado e dal performance status. Inoltre, i livelli più elevati di espressione di CAIX possono far predire una più efficace risposta all'immunoterapia nei pazienti con malattia metastatica. Tuttavia, i risultati precedenti non sono stati confermati da un recente studio, che ha

analizzato 730 pazienti con carcinoma a cellule chiare. In quest'analisi, il CAIX non è risultato significativo all'analisi multivariata, non confermando il suo valore prognostico indipendente [20].

Alcuni studi hanno recentemente valutato il ruolo prognostico delle proteine B7-H1 e B7-H4, membri della super-famiglia delle immunoglobuline. In particolare B7-H1, associata alle cellule NK, attiva le cellule T, mentre B7-H4 è espressa nelle cellule T attivate. In particolare, Thompson et al. hanno evidenziato come B7-H1 sia espresso in circa il 37% dei pazienti con RCC a cellule chiare. Questi pazienti hanno una probabilità di morire per il tumore 4.5 volte maggiore, indipendentemente dall'informazione proveniente dagli altri parametri prognostici tradizionali. Simili risultati sono stati riportati valutando l'espressione di B7-H4 sul pezzo operatorio. Nei prossimi anni, ulteriori studi sul pezzo operatorio potranno consentire l'identificazione di marcatori prognostici e predittivi di risposta al trattamento per permettere terapie personalizzate [21].

Il trattamento di scelta per il carcinoma renale localizzato è la chirurgia, che, a seconda delle dimensioni della lesione e della sua posizione all'interno dell'organo (polare vs mesorenale), può realizzarsi con differenti modalità. Se, infatti, la radicalità oncologica per lesioni polari di piccole dimensioni può essere raggiunta con la semplice enucleoresezione, per lesioni di maggiori dimensioni oppure mesorenali tale finalità può essere raggiunta solo con la nefrectomia radicale [22]. Rimane a tutt'oggi controverso il ruolo della surrenalectomia per lesioni che nelle indagini stadiative non abbiamo una diretta infiltrazione di tale organo, così come quello della linfadenectomia estesa [23].

Nonostante l'alto tasso di recidive locali e a distanza nel carcinoma renale, specialmente se a cellule chiare, non esiste a tutt'oggi un trattamento sistemico a intento adiuvante che si sia dimostrato efficace. Lo studio ASSURE è stato il primo studio e il più consistente per numero di pazienti arruolati in adiuvante (1.943 pazienti) a rendere noti i risultati [24]. Lo studio è stato considerato negativo per il non raggiungimento dell'obiettivo principale. Successivamente, è stato pubblicato lo studio S-TRAC [25] nel quale 615 pazienti affetti da carcinoma renale ad alto rischio (pT3, pT4, linfonodi positivi) sono stati

randomizzati a ricevere sunitinib 50 mg per 1 anno o placebo. La DFS è stata di 6,8 anni per sunitinib e 5,6 anni per il placebo con una differenza statisticamente significativa. I dati di sopravvivenza non sono ancora maturi. Sulla base di questi dati, la Food and Drug Administration (FDA) ha disposto una revisione accelerata dei dati, con termine previsto per Gennaio 2018, al fine di poter garantire ai pazienti, qualora ritenuto positivo lo studio, un trattamento sistemico post chirurgico.

Per un decennio o più, le citochine erano l'unico trattamento sistemico disponibile per i pazienti con carcinoma renale metastatico. Tuttavia, il beneficio clinico era stato limitato a pazienti con carcinomi a cellule chiare e con un profilo di rischio favorevole. Tuttavia la stragrande maggioranza dei pazienti, inclusi quelli con una significativa compromissione della funzione cardiaca, polmonare, renale, epatica o del sistema nervoso centrale, sono stati generalmente inadatti alla terapia con citochine. Nonostante l'iniziale entusiasmo, l'immunoterapia a base di interferone alfa ha dimostrato uno scarso impatto sulla sopravvivenza dei pazienti con carcinoma renale avanzato, ed è stata associata a tossicità significative, soprattutto astenia, che è stata difficile da quantificare [26-29].

Negli ultimi anni si è assistito a una rivoluzione del panorama terapeutico con l'introduzione di nuove terapie a bersaglio che hanno cambiato radicalmente la prognosi dei pazienti. Questi nuovi agenti hanno dimostrato di essere efficaci se principalmente diretti contro la via dell'angiogenesi [30].

Nel trattamento del carcinoma renale avanzato nella prima linea di trattamento, sono principalmente utilizzati il sunitinib e il pazopanib. Altri farmaci disponibili per il trattamento come il sorafenib o il bevacizumab, attualmente vengono raramente utilizzati in prima linea, per essere a volte utilizzati in linee successive.

Sunitinib è una piccola molecola che inibisce molteplici recettori tirosin-chinasici (RTK). Sunitinib è stato valutato per la sua attività inibitoria contro una varietà di chinasi (>80 chinasi) ed è stato identificato come un inibitore di PDGFR α e PDGFR β , VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3, recettori per le cellule staminali (KIT), tirosin-chinasi tipo fms-3 (FLT3), recettore del fattore stimolante le colonie di

tipo 1 (CSF-1R) e il fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale (RET) [31]. Sunitinib è stato confrontato con l'interferone in pazienti con carcinoma renale avanzato, in uno studio di grandi dimensioni di fase III, 750 pazienti sono stati randomizzati a sunitinib 50 mg al giorno (scheda di 4 settimane di trattamento, seguite da 2 settimane di pausa) o interferone- α alla dose di 9 milioni di unità (MU) tre volte alla settimana. L'endpoint primario, la sopravvivenza libera da progressione (PFS), ha mostrato un chiaro beneficio e altamente significativo dal trattamento con sunitinib. La PFS mediana è stata di 11 mesi, rispetto ai cinque mesi nel gruppo trattato con interferone [32]. La sopravvivenza globale mediana è stata maggiore nel gruppo sunitinib rispetto al gruppo IFN- α con un confronto ai limiti della significatività statistica [33].

L'attività di pazopanib, un inibitore multi-target dei recettori tirosin-chinasici VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α/β e c-KIT, [34-36] è stata valutata in uno studio randomizzato, controllato con placebo, di fase III, che ha coinvolto 435 pazienti con carcinoma renale localmente avanzato o metastatico (46% dei quali sono stati precedentemente trattati con citochine) [37]. La PFS mediana era significativamente più lunga con pazopanib rispetto al placebo nella popolazione generale dello studio (9,2 mesi vs 4,2 mesi, $p < 0,0001$), così come nel trattamento naive (11,1 mesi vs 2,8 mesi, $p < 0,0001$) e che nella sottopopolazione pretrattata con citochine (7,4 mesi vs 4,2 mesi, $p < 0,001$). La differenza di sopravvivenza globale finale tra pazienti trattati con pazopanib e pazienti trattati con placebo non è stata statisticamente significativa. Il crossover precoce e frequente da placebo a pazopanib e una durata prolungata del trattamento di crossover potrebbero essere stati fattori confondenti l'analisi proposti dagli autori dello studio [38].

I risultati dello studio COMPARZ, il primo studio di fase III che ha confrontato sunitinib e pazopanib, sono stati recentemente pubblicati. Questo studio è stato progettato per dimostrare la non-inferiorità di queste opzioni terapeutiche, in termini di efficacia (PFS). Anche se lo studio ha mostrato una non-inferiorità in termini di PFS di pazopanib rispetto a sunitinib, ha anche suggerito che pazopanib potrebbe avere una migliore tollerabilità [39]. Questi due farmaci possono essere quindi considerati valide opzioni per il trattamento di prima linea.

Il trattamento del carcinoma renale avanzato nelle linee successive alla prima si avvale, ad oggi, di numerose opzioni che possono essere classificate in tre possibili alternative: proseguire il trattamento con un inibitore delle tirosin-chinasi diretto principalmente anch'esso contro l'angiogenesi oppure sfruttare un diverso target intracellulare, come ad esempio il bersaglio per la rapamicina nei mammiferi (mTOR) oppure sfruttare la più recente delle acquisizioni nel bagaglio terapeutico del carcinoma renale, cioè l'immunoterapia con i farmaci diretti contro l'asse PD-1/PDL-1. La scelta della seconda linea terapeutica è ancora oggetto di discussione in ambito oncologico.

Axitinib è un potente inibitore dei recettori VEGFR-1, 2 e 3, utilizzabile dopo sunitinib o citochine. Lo studio di fase III AXIS 1032, che ha arruolato 723 pazienti in progressione di malattia dopo trattamento con sunitinib (54%), citochine (35%), bevacizumab (8%) o temsirolimus (3%), randomizzati a ricevere axitinib a una dose di 5 mg bid o sorafenib 400 mg bid. Axitinib ha dimostrato una maggior percentuale di risposte e una più lunga PFS (particolarmente evidente dopo citochine). Il 90% dei pazienti era stato sottoposto a nefrectomia [40].

Sorafenib è un inibitore orale multitarget (PDGFR, c-KIT, RAF-chinasi) ma con attività inibitoria prevalente su VEGFR-2. L'utilizzo di sorafenib in seconda linea dopo fallimento di una terapia con citochine è basato sui dati dello studio randomizzato in doppio cieco verso placebo di fase III TARGET [41]. Lo studio ha confermato, in 903 pazienti in progressione dopo trattamento con citochine, l'attività del farmaco in termini sia di mPFS (5,5 vs 2,8 mesi) sia di risposta obiettiva (risposte parziali nel 2%-10% dei casi, ma con un controllo di malattia nell'80% dei casi). Ad oggi, i dati di efficacia e tollerabilità di sorafenib nel setting terapeutico della seconda linea dopo inibitori di VEGF/VEGFR derivano da due studi randomizzati in cui sorafenib era stato selezionato come braccio di controllo: lo studio AXIS, già citato in precedenza, e lo studio INTORSECT [42]. Quest'ultimo studio randomizzato di fase III, in pazienti con mRCC, ha confrontato l'efficacia di temsirolimus (un inibitore i.v. del pathway di mTOR) e di sorafenib, in un setting di seconda linea terapeutica vincolata ad un precedente

trattamento con sunitinib. I pazienti (n = 512) sono stati randomizzati 1:1 a ricevere temsirolimus 25 mg per via endovenosa una volta alla settimana (n = 259) o sorafenib orale 400 mg due volte al giorno (n = 253). L'analisi dei risultati della mPFS (4,3 mesi per temsirolimus e 3,9 mesi per sorafenib) non ha rivelato alcuna differenza significativa fra i due gruppi di trattamento (HR 0,87; 95% CI 0,71-1,07; p = 0,19). La sopravvivenza mediana nei pazienti trattati con temsirolimus e sorafenib è stata invece, inaspettatamente, pari a 12,3 e 16,6 mesi (con significativa differenza di OS a favore di sorafenib; HR 1,31; 95% CI 1,05-1,63; p = 0,01).

Cabozantinib è una piccola molecola che inibisce diversi recettori tirosin-chinasici quali MET e VEGFR-2 e altre chinasi potenzialmente rilevanti tra cui RET, KIT, AXL e FLT3. AXL e MET sono implicati nella resistenza acquisita alla terapia anti-VEGF. Cabozantinib ha dimostrato nello studio di fase III METEOR [43] una superiorità rispetto ad everolimus in pazienti con carcinoma renale metastatico dopo una o più linee di trattamento con inibitori VEGF-TKI. Lo studio, che ha arruolato 658 pazienti, ha dimostrato una superiorità statisticamente significativa in PFS, OS e ORR a favore di cabozantinib.

L'efficacia di everolimus (inibitore di mTOR) è stata dimostrata in uno studio randomizzato versus placebo e miglior terapia di supporto (BSC), in pazienti già sottoposti ad una prima o seconda linea terapeutica a base di VEGFR-TKI (sunitinib e/o sorafenib). Everolimus ha dimostrato migliore PFS rispetto al placebo e BSC. Non è stata riscontrata differenza in OS, dal momento che l'80% dei pazienti del gruppo placebo aveva ricevuto everolimus dopo progressione di malattia [44].

Nivolumab è un anticorpo monoclonale umano, che si lega al recettore per la morte programmata-1 (PD-1) e blocca la sua interazione con il PD-L1 e il PD-L2. Il recettore PD-1 è un regolatore negativo dell'attività delle cellule T, che è stato dimostrato essere coinvolto nel controllo delle risposte immunitarie T mediate. L'interazione del PD-1 con i ligandi PD-L1 e PDL2, che sono espressi dalle cellule presentanti l'antigene e che possono essere espressi dalla cellula tumorale o da altre cellule nel microambiente tumorale, comporta l'inibizione della

proliferazione delle cellule T e della secrezione delle citochine. Nivolumab potenzia le risposte delle cellule T, incluse le risposte anti-tumorali, attraverso il blocco del legame del PD-1 ai ligandi PD-L1 e PD-L2. Nell'ultimo studio di fase III randomizzato, CheckMate-025 [45], che ha confrontato nivolumab versus everolimus in 821 pazienti con carcinoma renale a cellule chiare in stadio avanzato precedentemente trattati, dopo una prima o seconda linea con farmaci anti-angiogenici. Tale studio, il cui obiettivo principale era la sopravvivenza globale (OS), ha dimostrato un significativo vantaggio di sopravvivenza in pazienti con carcinoma renale avanzato precedentemente trattati rispetto allo standard di cura. In questo studio, i pazienti hanno raggiunto una OS mediana di 25 mesi con nivolumab e di 19,6 mesi con everolimus (HR 0,73; 98,5% CI 0,57-0,93; $p = 0,0018$), indipendentemente dal livello di espressione di PD-L1. Le risposte obiettive globali (ORR) sono state pari al 25% con nivolumab vs il 5% con everolimus ($p < 0,0001$). Il vantaggio di nivolumab è confermato sia in seconda sia in terza linea. Non è stata dimostrata nessuna differenza in PFS.

I dati dell'immunoterapia sembrano evidenziare una nuova "rivoluzione" nel trattamento del carcinoma renale avanzato, prolungando in maniera significativa la sopravvivenza dei pazienti. Va notato però che non tutti i pazienti beneficiano in maniera significativa di questo approccio terapeutico e, anche per questa classe di farmaci, non esistono fattori predittivi di risposta affidabili. Oltretutto l'immunoterapia è solo una delle nuove opzioni di trattamento che si affacciano alla pratica clinica. Infatti farmaci come Cabozantinib, la cui azione si esplica anche attraverso la inibizione della via angiogenica, rendono questa via di segnale così importante nel carcinoma renale, ancora centrale nella decisione terapeutica, soprattutto nell'ottica di una strategia complessiva.

Globalmente, quindi, la possibilità di una scelta più ampia per il trattamento di prima linea, così come quello delle linee successive, rende la ricerca di marcatori predittivi di risposta per i trattamenti angiogenici ancora rilevante con l'obiettivo finale di migliorare l'esito clinico globale per il singolo paziente. Una selezione più efficiente permetterebbe anche di evitare inutili tossicità a pazienti potenzialmente resistenti.

1.6 Angiogenesi e tumori del rene

Più di tre decenni fa, il professor Folkman formulò l'ipotesi dell'angiogenesi. In breve, questa ipotesi afferma che la formazione del vaso sanguigno è necessaria per i tumori per crescere oltre una dimensione di 2 mm [46]. La formazione dei vasi sanguigni è anche critica nello sviluppo di metastasi e risulta dalla complessa interazione tra i vari tipi di cellule, inclusi la cellula tumorale, le cellule endoteliali, i periciti, i fibroblasti e altri componenti dello stroma circostante. L'implicazione terapeutica che deriva direttamente da questa affermazione è che l'inibizione della formazione di vasi sanguigni potrebbe essere un obiettivo strategico per lo sviluppo di farmaci e il trattamento del cancro. Studi condotti da allora hanno dimostrato come l'ipotesi dell'angiogenesi sia corretta, hanno fornito importanti progressi nella nostra comprensione dei meccanismi che portano ad una anormale formazione dei vasi sanguigni nel cancro, e, forse ancora più importante, hanno portato nella pratica clinica degli agenti che, inibendo questo processo, migliorano la prognosi di pazienti [47].

La formazione di vasi sanguigni è un processo altamente regolato, in cui i fattori pro-angiogenici operano in concerto con fattori di anti-angiogenici. L'elenco di questi fattori continua a crescere con oltre 30 mediatori conosciuti ad oggi. Uno dei mediatori chiave, sia dal punto di vista meccanicistico che terapeutico, è il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF). Il legame di ligandi ai loro recettori affini situati sulle cellule endoteliali e sui periciti determina l'attivazione di recettori ad attività tirosin-chinasica (RTK) che avviano l'attivazione a cascata della trasduzione del segnale intracitoplasmatico attraverso vari mediatori. Questo porterà alla proliferazione di nuove cellule endoteliali e periciti, al reclutamento di precursori di cellule endoteliali e alla generazione di capillari. Dato il loro ruolo significativo nella angiogenesi tumore-mediata, questi recettori sono diventati il fulcro della attenzione per gli interventi terapeutici. Come con altri sistemi ligando-recettore, gli approcci di trattamento hanno spaziato da anticorpi monoclonali diretti contro il ligando o il recettore e piccole molecole inibitrici la RTK [48]. Poiché l'angiogenesi è un fenomeno complesso in cui sono coinvolti

più recettori, molecole in grado di inibire alcuni di questi recettori sono potenzialmente efficaci a scopo terapeutico [49].

I membri della famiglia del VEGF sono glicoproteine dimeriche, secrete, di circa 40 kDa. Nei mammiferi, la famiglia VEGF è composta da cinque membri, VEGF A, B, C, D e il fattore di crescita placentare (PLGF), più tre recettori (VEGFR-1, 2,3) [50]. VEGF A, B e il PLGF si legano a VEGFR1, il VEGF A ed E si legano a VEGFR2, e il VEGF C e D si legano a VEGFR3. I VEGF interagiscono sia con VEGFR1 sia con VEGFR2 [51-53].

I recettori di VEGFR sono dotati di un dominio extracellulare di circa 750 residui amminoacidici, che è organizzato in sette ripiegamenti simil-immunoglobuline (Ig). Nel VEGFR3, il quinto dominio Ig è sostituito da un ponte disolfuro. Il dominio extracellulare è seguito da una singola regione transmembrana, un dominio juxtamembrana, un dominio tirosin-chinasico scisso, che è interrotto da un inserto chinasico di 70 amminoacidi, e una coda C-terminale [54].

Due importanti vie di segnale, il VEGF e il bersaglio della rapamicina nei mammiferi (mTOR), si fondono nella biologia del carcinoma renale al livello del fattore inducibile l'ipossia (HIF), che è mediato a monte, in parte, attraverso l'azione del gene di von Hippel-Lindau (VHL) [Figura 3]. Questo gene è stato scoperto attraverso lo studio di famiglie con una malattia ereditaria nota come sindrome di von Hippel-Lindau, che è caratterizzata dalla suscettibilità per tumori altamente vascolarizzati. Il gene VHL viene inattivato anche nella maggior parte dei carcinomi renali sporadici, spiegando così l'alto grado di vascolarizzazione caratteristico di questi tumori.

Il fattore indotto dall'ipossia (HIF) gioca un ruolo centrale nella tumorigenesi renale agendo come fattore di trascrizione di geni che sono coinvolti nella angiogenesi, la proliferazione delle cellule tumorali, la sopravvivenza cellulare e la progressione, la diffusione metastatica, l'apoptosi e il metabolismo del glucosio. Questi geni includono il VEGF, il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita epidermico (EGFR), il fattore di crescita trasformante alfa ($TGF\alpha$), l'esaltatore umano della filamentazione 1 (HEF-1), il

trasportatore di glucosio 1 (GLUT1) e la mucina 1 (MUC1) [55]. L'HIF si compone di una subunità α (HIF-1 α , HIF-2 α e subunità HIF-3 α) e una subunità β (HIF-1 β). L'HIF-1 β è costitutivamente presente, mentre i membri HIF- α sono altamente instabili, ad eccezione delle basse concentrazioni di ossigeno. Entrambi HIF-1 α e HIF-2 α possono attivare la trascrizione genica. Diversi studi preclinici indicano che la deregolamentazione di HIF-2 α può giocare un ruolo causale nella carcinogenesi del carcinoma renale a cellule chiare.

L'aumentata espressione di molti dei geni bersaglio di HIF è implicata nella promozione del cancro [56], inducendo cambiamenti sia all'interno del tumore (cellulare intrinseca) che nella crescita delle cellule endoteliali adiacenti al fine di promuovere la crescita dei vasi sanguigni. I bersagli di HIF meglio studiati, VEGF e PDGF, sono potenti mitogeni delle cellule endoteliali. Il livello di espressione di VEGF nel carcinoma renale è noto per correlare fortemente con la densità microvascolare, una misura del grado di angiogenesi [57]. Un passo fondamentale nell'angiogenesi è l'upregulation dei recettori dei fattori di crescita delle cellule endoteliali quali VEGFR e PDGFR.

Il gene di VEGF è piuttosto complesso, con diverse isoforme di splicing alternativo, quindi la regolazione dell'espressione potrebbe differire tra tessuto normale e tessuto tumorale. È interessante notare che, poiché tutti i polimorfismi identificati nel VEGF non sono nella regione codificante, sono stati proposti meccanismi alternativi per il loro ruolo nell'espressione genica. Infatti, sebbene molti fattori di trascrizione si leghino alle regioni promotrici di VEGF [58], nessun legame si verifica nei siti polimorfici più comuni associati con l'espressione di VEGF. Tuttavia, i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) sono stati segnalati come causa di cambiamenti nei livelli di espressione di VEGF [59].

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nei geni per i fattori di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e nei geni per i suoi recettori (VEGFR) sono stati correlati all'angiogenesi tumorale attraverso diversi meccanismi biologici.

Numerosi SNP sono presenti in geni della famiglia del VEGF nel promotore e nelle regioni 5'- e 3'- non tradotte (UTR). Le 5'- e 3'-UTR contengono elementi

regolatori chiave che sono sensibili all'ipossia [60] e contribuiscono alla elevata variabilità nella produzione di VEGF tra tessuti [61]. Ad esempio, l'SNP 634G>C nella 5'-UTR di VEGF influisce sull'efficienza di traduzione della proteina [61], e l'SNP 936C>T nella 3'-UTR influenza le concentrazioni plasmatiche circolanti [62] e l'espressione di VEGF nel tessuto tumorale [63]. Tuttavia, è probabile che solo un piccolo numero di questi polimorfismi e aplotipi (SNP collegati linearmente) in realtà abbia un effetto funzionale sulla traduzione di VEGF, mentre altri agiscono come "proxy" [64].

Mentre un crescente numero di evidenze ha suggerito una possibile correlazione tra l'espressione alterata della via angiogenica e l'outcome di pazienti con carcinoma del colon-retto, della mammella e dell'ovaio, trattati con terapia antiangiogenica [65-69], i dati nel carcinoma renale mancano. In uno studio condotto su campioni di sangue e campioni di tessuto tumorale Kim e al. ha dimostrato una differenza statisticamente significativa nei pazienti con SNP -634 per la comparsa di ipertensione correlata al trattamento con sunitinib [70]. In un altro studio pubblicato da Garcia-Donas e al. gli SNP si sono mostrati capaci di predire la risposta e la tossicità nei pazienti trattati con sunitinib. Gli autori hanno dimostrato che polimorfismi di VEGFR3 e CYP3A5*1 potrebbero essere in grado di definire un sottoinsieme di pazienti con ridotta risposta al sunitinib e scarsa tollerabilità [71].

Analogamente a quanto studiato nel sunitinib, l'influenza di diversi SNP è stata valutata in un'analisi pianificata di Xu e al. nei pazienti arruolati nello studio registrativo del pazopanib. E' stata valutata in campioni di sangue la correlazione tra SNP dell'angiogenesi, tra cui alcuni di VEGF, con la sopravvivenza e la tossicità. In questo studio il genotipo CC di VEGFA _1498 confrontato con il genotipo TT conferiva una PFS e un tasso di risposte inferiori ai pazienti trattati con pazopanib (33% v 51%) [72].

Dai dati di letteratura si desume, quindi, una influenza dei polimorfismi dell'angiogenesi nei trattamenti con inibitori di VEGF, ma i dati su tali polimorfismi sono alquanto variegati e non univoci. Abbiamo quindi deciso di verificare tali dati in una serie retrospettiva di pazienti trattati con Sunitinib [73].

L'analisi dei polimorfismi identificava un profilo di polimorfismi che conferivano una migliore risposta al trattamento. Infatti, il VEGF A rs833061 è risultato significativo in termini di PFS (17 vs 4 mesi; $P < 0.0001$) e OS (38 vs 10 mesi; $P < 0.0001$). Il VEGF A rs699947 è risultato significativo per la PFS (18 vs 4 mesi; $P < 0.0001$) e OS (37 vs 16 mesi; $P < 0.0001$). Il VEGF A rs2010963 è anch'esso significativo in PFS (18 vs 8 vs 2 mesi; $P < 0.0001$) e OS (31 vs 36 vs 9 mesi; $P < 0.0045$). Infine il VEGFR3 rs6877011 è risultato significativo in PFS (12 vs 4 mesi; $P < 0.0075$) e OS (36 vs 17 mesi; $P < 0.0001$). All'analisi multivariata, rs833061, rs2010963 e rs68877011 si sono confermati significativi in PFS, mentre rs833061 e rs68877011 risultano fattori indipendenti in OS [74].

Abbiamo quindi voluto quindi confrontare se i polimorfismi di VEGF e VEGFR avessero anche una influenza nei pazienti trattati con pazopanib in prima linea e se il profilo angiogenico fosse differente in base al farmaco correlato con l'outcome.

L'analisi combinata dei polimorfismi espressi dai pazienti in base al farmaco somministrato ha mostrato una migliore PFS per i pazienti che esprimono CC o CT del polimorfismo rs833061, GG o CG del polimorfismo rs2010693, AA o AC del polimorfismo rs699947 nei pazienti sunitinib, mentre un vantaggio in PFS si osserva nel genotipo TT del polimorfismo rs833061, CC del polimorfismo rs2010693, CC del polimorfismo rs699947 nei pazienti con pazopanib. Possiamo ipotizzare che differenti SNP in diverse regioni del gene VEGF possano influenzare i livelli di VEGF e quindi la risposta alle terapie anti-VEGF, sebbene il reale effetto biologico degli SNP analizzati non sia ancora chiaro. E' stato interessante notare come l'espressione dei polimorfismi sia speculare nel predire una risposta favorevole al sunitinib o al pazopanib [74].

Sunitinib e pazopanib non hanno mostrato differenze statisticamente significative nella loro efficacia nella nostra analisi, come riportato anche negli studi clinici [39]. Tuttavia, una differenza è stata trovata in base al genotipo angiogenico delle cellule tumorali. I pazienti con un polimorfismo favorevole hanno avuto una buona PFS sia con sunitinib o pazopanib, ma in particolare, il polimorfismo favorevole era l'opposto per i due farmaci [74]. I nostri dati sembrano suggerire

che la biologia possa avere un ruolo nella scelta del trattamento di prima linea per i pazienti con carcinoma renale metastatico. Queste evidenze ci hanno indotto a valutare l'ipotesi di una influenza dei polimorfismi di VEGF e VEGFR nell'outcome della seconda linea di terapia. Perché nonostante i nuovi dati e le nuove opzioni terapeutiche con l'immunoterapia, la via dell'angiogenesi resta un target fondamentale nel trattamento del carcinoma renale avanzato nella prima come in linee successive. Si prenda ad esempio il Cabozantinib, farmaco in corso di approvazione dalle autorità regolatorie, diretto contro l'angiogenesi oltre che il pathway di MET, che sembra fornire un notevole vantaggio nell'outcome.

2. SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo primario dello studio è quello di valutare il ruolo predittivo e prognostico dei polimorfismi di VEGF e VEGFR in pazienti affetti da carcinoma renale avanzato trattati in seconda linea, in termini di tempo libero da progressione (PFS) e sopravvivenza globale (OS).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Selezione dei pazienti

I pazienti con diagnosi istologica di carcinoma renale avanzato che ricevono il trattamento presso la Clinica Oncologica dell'Università Politecnica delle Marche sono eleggibili per la nostra analisi.

Il follow-up dei pazienti consisteva in esame fisico, esame emocromocitometrico completo, radiografia del torace e ecografia dell'addome o scansioni TC/RM ogni 8 settimane o come clinicamente indicato.

3.2 Analisi dei polimorfismi

Sono stati raccolti campioni di tessuto tumorale primitivo o metastatico.

La genotipizzazione di VEGF e VEGFR è stata eseguita su blocchetti di tessuto paraffinati fissati in formalina (circa 30 mg) di campioni di carcinoma renale prelevati da nefrectomie o biopsie, prelevati dalla periferia della neoplasia.

La paraffina è stata rimossa con xilene e i campioni sono stati lavati due volte con etanolo al 100%. Il DNA è stato isolato dal tessuto deparaffinato utilizzando il kit di isolamento RecoverAll™ per acidi nucleici totali per tessuti paraffinati fissati in formalina (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), secondo le istruzioni del produttore. Il DNA di ogni campione è stato quindi diluito in 120 ml di soluzione di eluizione.

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) all'interno di ogni gene sono stati selezionati utilizzando il software Pupasuite (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es/index.jsf> - versione 2.0.0, bioinfo 2008), il database per i polimorfismi a singolo nucleotide (dbSNP) del CIPF (Centro de Investigación Príncipe Felipe) generato dal Centro Nazionale per l'Informatizzazione delle Biotecnologie

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) e dalla revisione della letteratura medica, utilizzando i seguenti criteri:

- 1) il polimorfismo aveva un certo grado di probabilità di alterare la struttura o l'espressione del gene in modo biologicamente rilevante (cioè che interessano sequenze 5', 3' UTR o regione promotore);
- 2) la frequenza allelica minore era superiore al 10% (con la sola eccezione di rs2305948, rs6877011 e rs307822);
- 3) il polimorfismo genetico è stato stabilito e ben documentato.

Ulteriori considerazioni hanno guidato la selezione degli SNP per il nostro studio. Una correlazione tra la presenza di un allele specifico su un sito polimorfico e l'espressione della rispettiva proteina è stata precedentemente documentata per VEGF [113,114]. Gli SNP in sequenze regolatrici, come introni e 5' e 3' UTR, hanno dimostrato di influenzare la stabilità dell'mRNA, l'efficienza di elaborazione, l'isoforma di espressione e la localizzazione. Inoltre, le sequenze motivi regolatorie all'interno del 3'UTR dell'mRNA hanno dimostrato di influenzare la stabilità del messaggero e/o la sua efficienza traduzionale. In questo modo, si può sostenere che gli SNP in queste sequenze possano influenzare VEGF e l'espressione del gene VEGFR. Anche su queste basi, abbiamo selezionato gli SNP noti per influenzare VEGF e VEGFR e quelli situati in sequenze regolatrici, per i quali un presunto ruolo nella regolazione della proteina può essere assunto.

Globalmente abbiamo ipotizzato che gli SNP selezionati abbiano impatto sulla espressione della proteina e quindi sulla funzione biologica.

Gli SNP selezionati sono stati i seguenti: sei polimorfismi nel gene VEGFA (rs10434, G>A; rs2010963, G>C; rs25648, C>T, rs3025039, C>T, rs699947, A>C; rs833061, C>T), due in VEGFC (rs4604006, T>C, rs7664413, C>T), due in VEGFR1 (FLT1) (rs664393, G>A, rs7993418, A>G), quattro VEGF-R2 (KDR) (rs1870377, A>T, rs2071559, A>G; rs2305948, G>A, rs7667298, A>G) e tre in VEGFR3 (FLT4) (rs307805, A>G; rs6877011, C>G; rs307822, G>A). Le

localizzazioni cromosomiche, le posizioni e gli effetti biologici degli SNP indagati di VEGF e VEGFR sono stati riassunti nella Tabella 2.

La genotipizzazione degli SNP è stata effettuata con tecnologia TaqMan, utilizzando prodotti per la genotipizzazione SNP (Applied Biosystems, Foster City, CA). E' stata eseguita la reazione a catena delle polimerasi (PCR) e i genotipi sono stati analizzati sul Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizzando un software ABI Prism 7300 Sequence Detection System (versione 1.3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA). Ciascuna reazione conteneva 0,2 ml di DNA genomico totale. Il personale di laboratorio all'oscuro dello stato del paziente ha eseguito la genotipizzazione, e un 10% casuale dei campioni sono stati ripetuti per convalidare le procedure di genotipizzazione.

Tutti i genotipi degli SNP dovevano presentare un tasso di frequenza globale $\geq 90\%$ per essere inclusi nella nostra analisi, tutti i campioni sono risultati significativi durante l'analisi e non hanno necessitato di ripetizione del test.

3.3 Analisi statistica

Obiettivo primario del nostro studio è la PFS, l'OS è stata considerata come obiettivo secondario.

L'analisi statistica è stata effettuata con il software MedCalc versione 10.4.8 per Windows.

L'associazione tra le variabili categoriali è stata stimata con il test Chi-quadrato.

La distribuzione di sopravvivenza è stata stimata con il metodo Kaplan-Meier (Kaplan e Meier, 1958).

Un livello significativo di 0.05 è stato scelto per valutare la significatività statistica.

Per l'analisi statistica, la sopravvivenza globale (OS) e la sopravvivenza libera da progressione (PFS) sono stati definiti come l'intervallo tra la data di inizio del trattamento di seconda linea a morte o ultima visita di follow-up, e alla progressione clinica o morte o ultimo follow-up se non progredito.

L'analisi rispetto alla seconda linea di trattamento è stata eseguita sulla popolazione di pazienti che in prima linea aveva eseguito terapia con sunitinib, onde ridurre i possibili fattori confondenti dovuti al differente vantaggio in base ai differenti polimorfismi rilevato nelle nostre analisi precedenti [74]. I trattamenti di seconda linea sono stati raggruppati in base al meccanismo di azione in anti-VEGF e anti-mTOR.

Tutti i polimorfismi sono stati esaminati per la deviazione di Hardy-Weinberg utilizzando il Powermarker v 3.25 ([www.statgen.ncsu.edu / powermarker](http://www.statgen.ncsu.edu/powermarker)).

L'analisi del linkage disequilibrium (LD) è stata anche eseguita utilizzando il Powermarker v 3.25 ([www.statgen.ncsu.edu / powermarker](http://www.statgen.ncsu.edu/powermarker)). Il LD è stato stimato utilizzando r^2 , con $r^2 = 1$ indicante il totale LD e $r^2 = 0$ indicante l'assenza di LD.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche della popolazione generale

Sono stati selezionati pazienti affetti da carcinoma renale avanzato trattati presso la Clinica Oncologica dell'Università Politecnica delle Marche, che avessero iniziato il trattamento dal 2004 al 2013. E' stato possibile reperire i dati clinici di 123 pazienti, 88 maschi e 35 femmine. L'età mediana alla diagnosi è stata di 64,2 anni.

4.2 Risultati dell'analisi dei polimorfismi nei pazienti trattati in seconda linea

L'analisi dei polimorfismi dell'angiogenesi è stata eseguita su 63 pazienti con carcinoma renale avanzato trattati in seconda linea con anti-VEGF (34 pazienti) o anti-mTOR (29 pazienti), di cui erano disponibili campioni istologici adeguati per l'analisi: 24 maschi e 10 femmine nel gruppo anti-VEGF; 21 maschi e 8 femmine nel gruppo anti-mTOR. L'età mediana alla diagnosi (range 40-80) era di 62 anni per i pazienti trattati con anti-VEGF e 61 anni per i pazienti trattati con anti-mTOR (Tabella 4).

Cinquanta pazienti sono stati sottoposti a chirurgia renale (79%, 27 anti-VEGF, 23 anti-mTOR), per tredici pazienti erano disponibili solo biopsie (21%, 7 anti-VEGF, 6 anti-mTOR). Ventisei pazienti erano metastatici al momento della diagnosi (41%, 14 anti-VEGF, 12 anti-mTOR). Cinquantotto pazienti presentavano istologia a cellule chiare (92%, 31 anti-VEGF, 27 anti-mTOR), mentre 5 avevano altri tipi di neoplasia (1 sarcomatoidi e 4 inclassificabili). Tutti i pazienti hanno ricevuto anti-VEGF o anti-mTOR con schedula standard come trattamento di seconda linea, la riduzione della dose è stata applicata nei pazienti con gradi 3 e 4 di tossicità o come clinicamente indicato.

Differenze statisticamente significative non sono state trovate in base al trattamento ricevuto per le principali caratteristiche dei pazienti (età, sesso, performance status, carico tumorale, grading, stadio alla diagnosi).

Le frequenze dei genotipi testati sono risultate paragonabili a quelle riportate nei Caucasicci, senza alcuna deviazione significativa dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Il Linkage disequilibrium è stato osservato per i polimorfismi rs833061, rs699947 e rs2010963 di VEGF A ($p > 0,0001$), correlato sia con PFS che OS. Nessun linkage disequilibrium è stato osservato per gli altri polimorfismi testati.

Tutti gli SNP hanno presentato un tasso complessivo di frequenza del $\geq 90\%$.

Il confronto nella popolazione generale trattata in seconda linea con anti-VEGF e anti-mTOR ha mostrato un vantaggio per gli anti-VEGF sia in PFS (7,5 vs 4,1 mesi; $p = 0,0272$) (Figura 4) sia in OS (24 vs 9,1 mesi; $p = 0,0043$) (Figura 5).

Di tutti i polimorfismi testati, sono risultati statisticamente significativi: rs2010963 e rs6877011.

In particolare, 26 pazienti (76%) hanno espresso il genotipo GG o GC di rs2010963, mentre 8 (24%) hanno espresso il genotipo CC nel gruppo anti-VEGF, invece 20 (69%) presentavano GG o GC e 9 (31%) il genotipo CC nel gruppo anti-mTOR. Un vantaggio in termini di sopravvivenza mediana libera da progressione è stato osservato per i pazienti che esprimono il genotipo GG o GC nel gruppo anti-VEGF (7,5 vs 3,3 mesi) e per i pazienti nel gruppo trattato con anti-mTOR (6,3 vs 2,9 mesi) ($p < 0,0001$) (Figura 6). Questo vantaggio della presenza dell'allele G si evidenzia anche in OS sia nel gruppo trattato con anti-VEGF (26,4 vs 10,8 mesi) sia in quello trattato con anti-mTOR (13,2 vs 3,4 mesi) ($p = 0,0006$) (Figura 7) (Tabella 5).

Nove (26%) pazienti hanno espresso il genotipo GG o CG e 25 (74%) il genotipo CC nel gruppo anti-VEGF per rs6877011, mentre 9 (31%) hanno mostrato GG o CG e 20 (69%) CC nel gruppo trattato con anti-mTOR. La PFS si è dimostrata migliore per i pazienti che esprimono il genotipo CC nel gruppo anti-VEGF (7,6

vs 3,2 mesi) e per i pazienti con polimorfismo GG o GC nel gruppo trattato con anti-mTOR (10,3 vs 3,7 mesi) ($p=0,0018$) (Figura 8). Per quanto riguarda l'OS l'espressione dell'allele C evidenzia un vantaggio nel gruppo trattato con anti-VEGF (26,4 vs 3,7 mesi) mentre in quello trattato con anti-mTOR il vantaggio si ha con l'espressione di GG o GC (12,9 vs 8,9 mesi) ($p=0,0045$) (Figura 9) (Tabella 5).

5. DISCUSSIONE

Le terapie che prendono a bersaglio la via dell'angiogenesi hanno permesso una rivoluzione completa nel trattamento e nella prognosi dei pazienti con carcinoma renale metastatico. Tuttavia, nei pazienti trattati con inibitori delle tirosin-chinasi anti-VEGF e anti-mTOR, la PFS e l'OS possono ampiamente variare da paziente a paziente, andando da alcune settimane ad anni senza alcuna spiegazione apparente nella maggior parte dei casi. Queste osservazioni non possono essere facilmente spiegate dai precedenti fattori predittivi e prognostici noti e dalle categorie di rischio [61]. I dati dei nostri precedenti studi, benché retrospettivi, indicano come un certo assetto polimorfico di VEGF e VEGFR possa essere predittivo di un migliore outcome con una delle due più diffuse terapie anti-VEGF al momento disponibili in prima linea di trattamento, cioè sunitinib o pazopanib [74].

Nella quota di pazienti che però, giunge in seconda linea di trattamento, la difficoltà del clinico a scegliere la migliore sequenza terapeutica per quel paziente diventa ancora più difficile e dominata da fattori clinici ed esperienza. Questo porta certamente a un bias nella scelta terapeutica, che potrebbe esporre il paziente a tossicità di trattamenti potenzialmente non vantaggiosi o che potrebbe anche ridurre il suo outcome complessivo. In questo senso dati retrospettivi, anche di gruppi italiani, hanno provato a identificare una possibile migliore sequenza terapeutica. Iacovelli et al. hanno, infatti, valutato su un'ampia coorte di pazienti con carcinoma renale avanzato l'efficacia in termini di PFS e OS della sequenza di tre linee di trattamento e hanno identificato come vi sia un miglioramento statisticamente significativo nella prognosi di pazienti trattati con una sequenza di inibitori VEGF-VEGF-mTOR, rispetto a VEGF-mTOR-VEGF (50.7 contro 37.8 mesi, $p=0.004$ in OS) [75].

Non esistono evidenze di confronto diretto tra i farmaci attualmente approvati per l'utilizzo nella seconda linea, infatti, nella maggior parte degli studi clinici in questo setting il confronto veniva proposto con placebo oppure con un altro

trattamento anti-VEGF, come ad esempio nello studio AXIS di confronto tra axitinib e sorafenib. Tuttavia lo studio METEOR per il trattamento con cabozantinib, farmaco multitarget con un ampio spettro di recettori tra cui quelli dell'angiogenesi, ne ha confrontato l'efficacia rispetto a everolimus e ha mostrato un vantaggio significativo per la strategia di prosecuzione dell'inibizione dell'angiogenesi [43].

Anche nella nostra casistica emerge un vantaggio della sequenza con anti-VEGF seguito da un altro anti-VEGF piuttosto che un cambio di meccanismo di azione con inibitori di mTOR sia in termini di PFS ($p=0,0272$) sia in termini di OS ($p=0,0043$). Questo dato sembra confermare quindi una positiva influenza della prosecuzione dell'inibizione diretta di VEGF.

Dall'analisi dei polimorfismi confrontando la strategia di prosecuzione di anti-VEGF rispetto all'inibizione di mTOR emerge come la presenza dell'allele G dell'rs2010963 di VEGF A conferisca una migliore PFS indipendentemente dal tipo di farmaco utilizzato, mentre l'omozigosi C comporta una significativa riduzione della stessa ($p<0,0001$). Analizzando la OS si evince come l'omozigosi C diventi particolarmente sfavorevole se si esegue un trattamento con anti-mTOR ($p=0,0006$). Questo dato potrebbe quindi indurre a escludere dal trattamento con mTOR quei pazienti che hanno un'omozigosi C.

Per quanto riguarda il polimorfismo rs6877011 di VEGFR-3, questo sembra conferire una migliore prognosi in termini di PFS e OS a quei pazienti che hanno presenza dell'omozigosi C nel loro genotipo e vengono trattati con anti-VEGF, mentre la presenza di un genotipo GG o GC sembra favorevole in PFS e OS se trattati con anti-mTOR. Tale dato, che non trova corrispettivi in letteratura al momento della stesura della presente tesi, dovrà essere approfondito per poter essere maggiormente spiegato.

Tra i potenziali meccanismi d'azione che coinvolgono sia cellule stromali sia tumorali che sono stati ipotizzati per le piccole molecole anti-VEGF, c'è la cosiddetta 'normalizzazione vascolare' che ha mostrato l'evidenza clinica più robusta [76]. De Primo et al. hanno recentemente mostrato come i TKI rivolti alle

RTK (ad es. sunitinib) producono un aumento dei livelli di VEGF e una diminuzione del VEGFR2 solubile (sVEGFR2) e sVEGFR3 nei pazienti con carcinoma renale metastatico refrattari alle citochine [77]. È interessante notare che questi cambiamenti del VEGF e sVEGFR sono stati osservati durante il trattamento con sunitinib, e che i livelli tendevano a tornare a quelli simili al basale dopo 2 settimane di riposo dal trattamento, indicando che questi effetti dipendevano dall'esposizione al farmaco. Inoltre, cambiamenti considerevolmente maggiori nei livelli di VEGF, sVEGFR2 e sVEGFR3 sono stati osservati in pazienti che mostrano una risposta obiettiva del tumore rispetto a quelli che presentano una malattia stabile o progressione della malattia ($p < 0,05$ per ciascun analita).

Questi risultati e ipotesi potrebbero spiegare come una certa variazione costitutiva dei livelli di VEGF e VEGFR potrebbe esercitare una significativa differenza nell'andamento del tumore durante il trattamento antiangiogenico. Gli studi su geni candidati che esplorano le associazioni tra polimorfismi di VEGF e i livelli circolanti di VEGF hanno dato risultati controversi. Otto studi hanno trovato associazioni significative con i polimorfismi candidati (rs699947, rs1570360, rs833061, rs2010963, rs3025039, e 2549 18bp I / D) nel promotore e nelle regioni non tradotte 5' e 3' del gene VEGF [78-80]. Tuttavia, diversi altri studi non hanno identificato alcuna associazione con questi e altri SNP di VEGF. Utilizzando un approccio genomico, DeBette et al. hanno trovato associazioni con 140 SNP. Di questi, 68 SNP sono situati sul cromosoma 6, circa 150 kb a valle dell'estremità 3' del gene VEGF, lontano dagli SNP candidati precedentemente testati [81]. Tuttavia l'effetto reale degli SNP sui livelli di VEGF circolante o nei tessuti tumorali necessita di ulteriori studi per associare definitivamente uno specifico SNP a un effetto specifico sul fattore di crescita corrispondente o sul recettore.

La nostra analisi dei polimorfismi di VEGF e VEGFR nel trattamento di prima e seconda linea di pazienti con carcinoma renale avanzato sembra in definitiva identificare un possibile profilo angiogenico consistente nella genotipizzazione di tre polimorfismi di VEGF A cioè rs833061, rs2010963, rs699947 e di un polimorfismo di VEGFR-3 cioè rs6877011. Questo profilo potrebbe fornire

l'indicazione di una prima linea di trattamento con un migliore outcome per quel singolo paziente e in quali pazienti l'inibizione di mTOR possa essere ritenuta come una opzione terapeutica da prendere in considerazione.

Il presente studio è un'analisi retrospettiva su una casistica limitata, un ampliamento della casistica potrebbe permettere un'analisi più adeguata dell'impatto dei diversi farmaci a inibizione di VEGF disponibili in seconda linea (axitinib vs sorafenib).

La nostra analisi genera ipotesi per altri possibili futuri progetti che mirino ad approfondire l'influenza del pathway di VEGF nella predizione della risposta e nella prognosi dei pazienti con carcinoma renale avanzato, ad esempio attraverso l'analisi di HIF, comprendendo anche pazienti che attualmente sono sottoposti a immunoterapia per una più esatta predizione della sequenza terapeutica in base alle più recenti opzioni.

Il profilo angiogenico dei nostri studi, essendo basato su dati retrospettivi, necessita di una validazione in un setting prospettico prima di poter essere traslato nella pratica clinica.

6. FIGURE

Figura 1. Incidenza dei tumori del rene a livello mondiale (Globocan 2012).

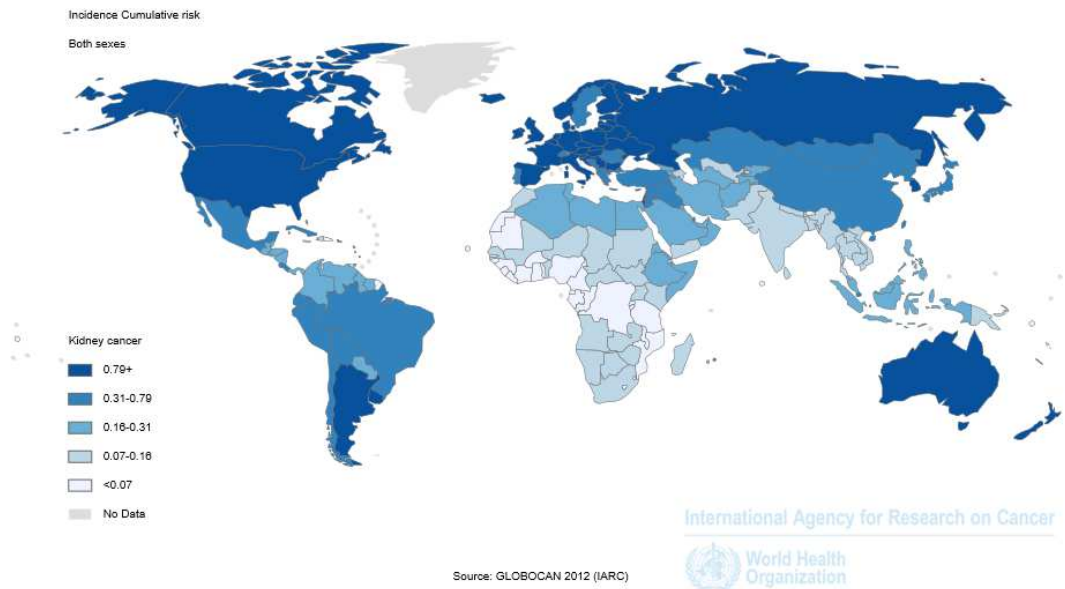


Figura 2. Mortalità per tumori del rene a livello mondiale (Globocan 2012).

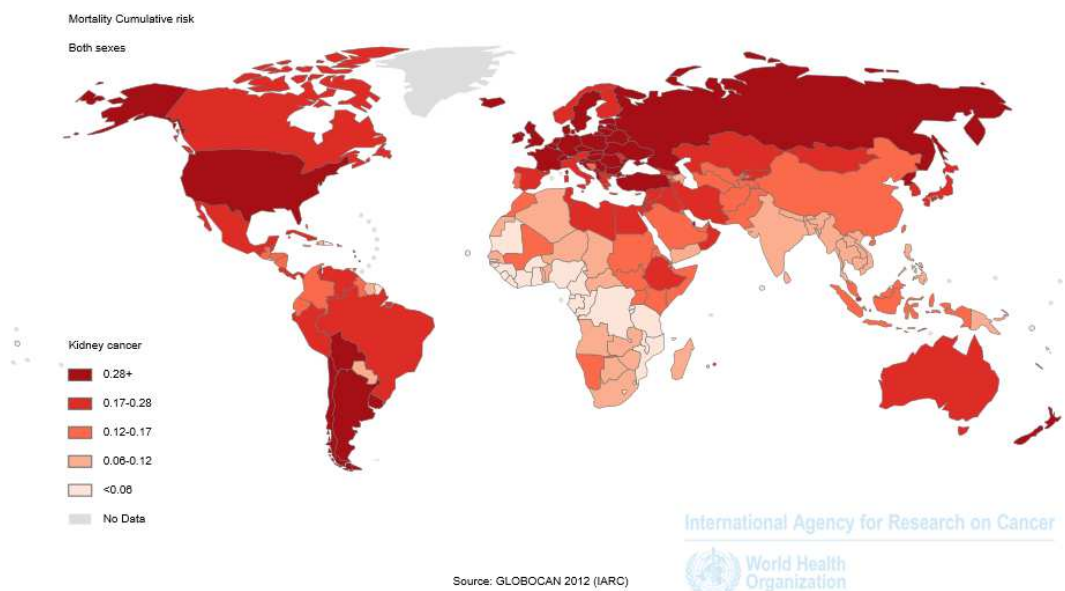


Figura 3. Vie di segnale coinvolte nell'angiogenesi tumorale.

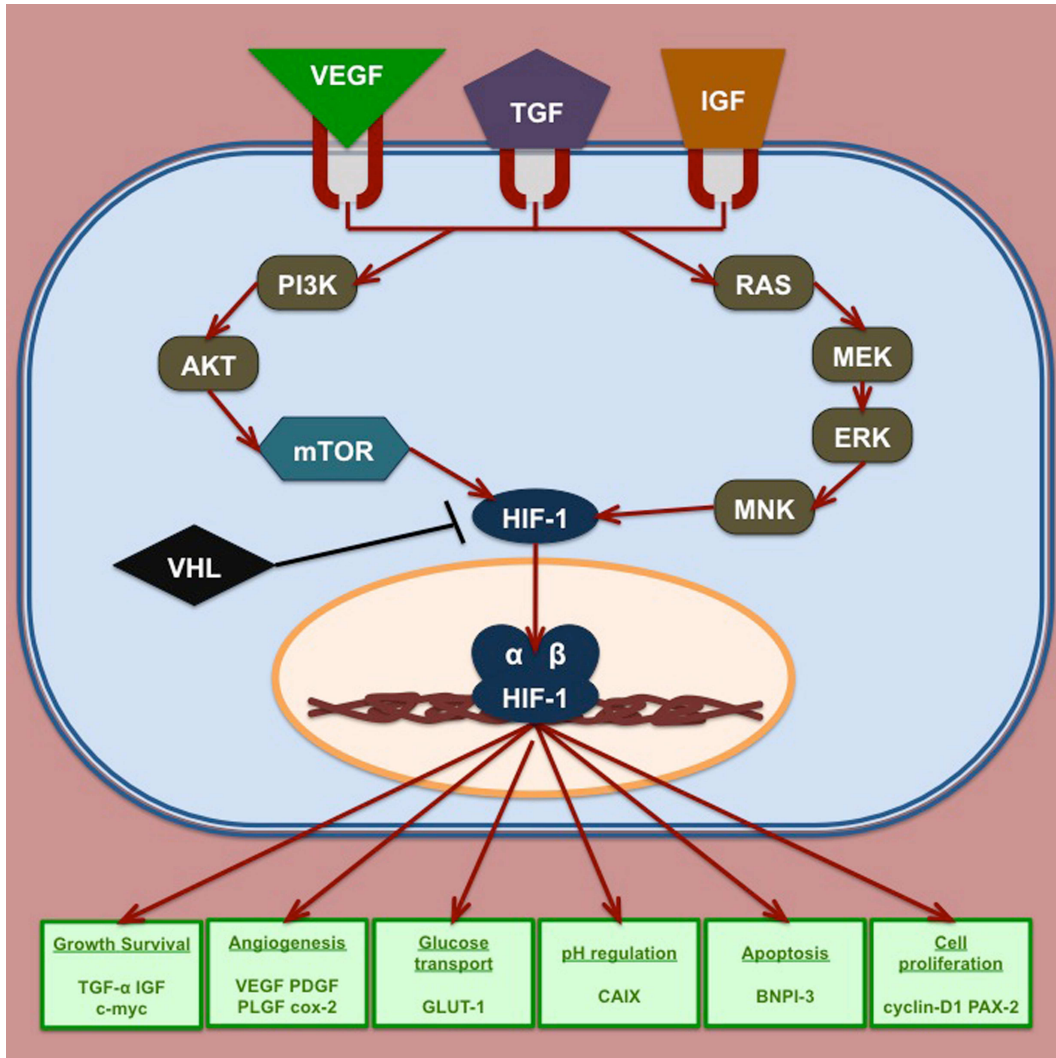


Figura 4. PFS stratificata per trattamento (----- anti-VEGF) (—— anti-mTOR).

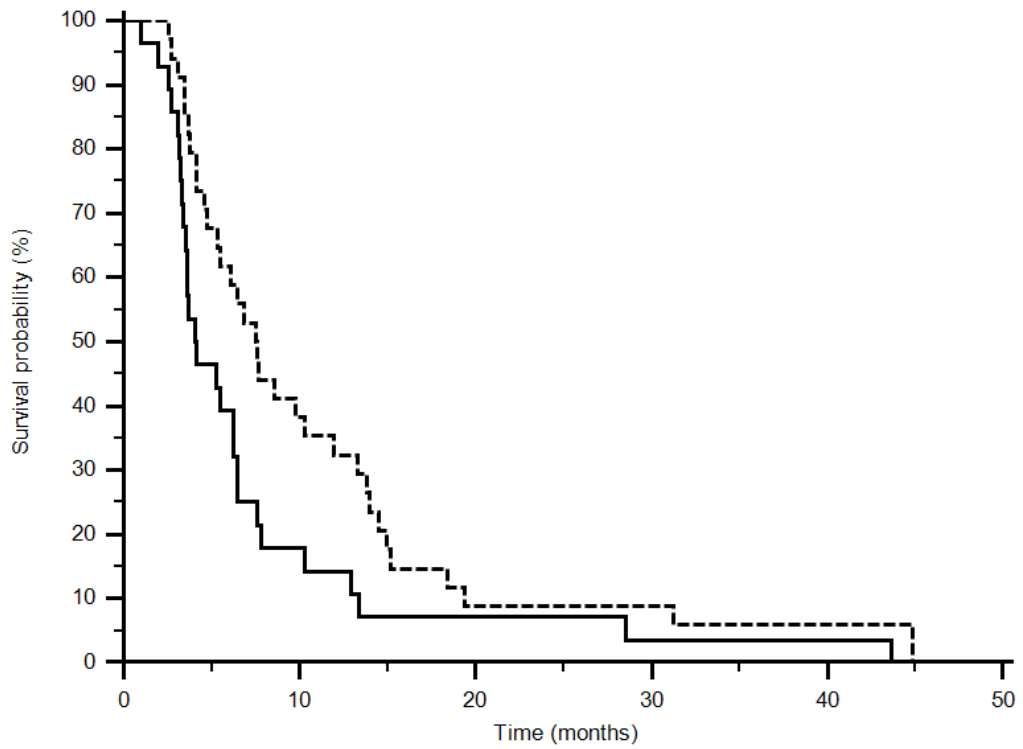


Figura 5. OS stratificata per trattamento (----- anti-VEGF) (—— anti-mTOR).

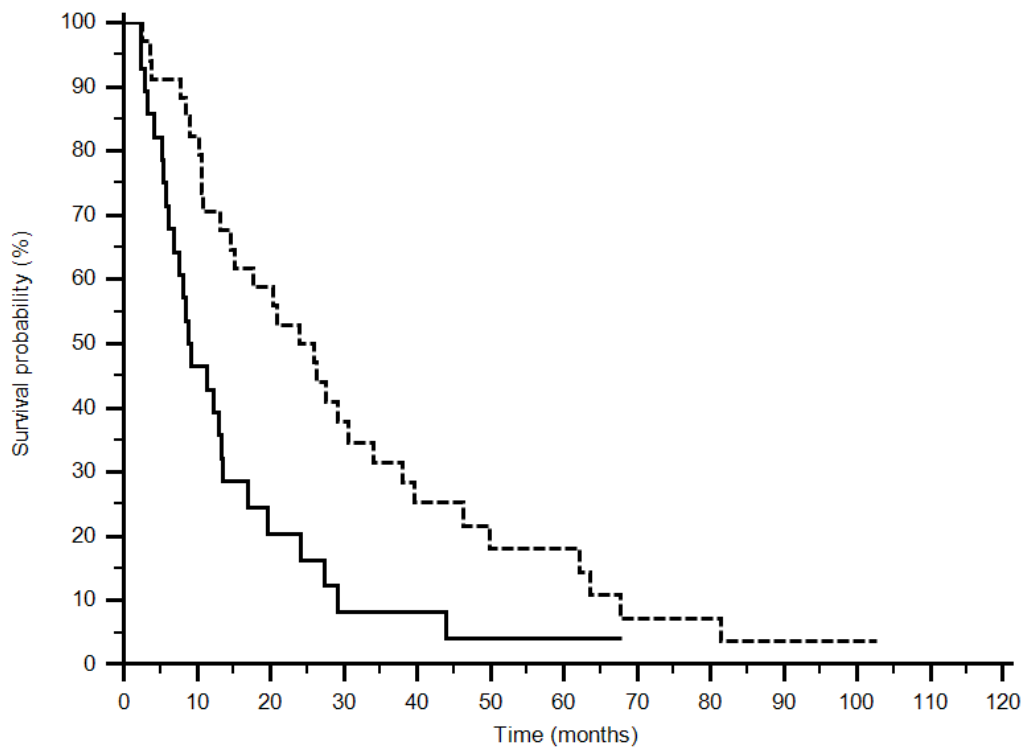


Figura 6. PFS stratificata per rs2010963 e per trattamento (- · - · - GG+GC anti-VEGF) (----- CC anti-VEGF) (······ GG+GC anti-mTOR) (——— CC anti-mTOR)

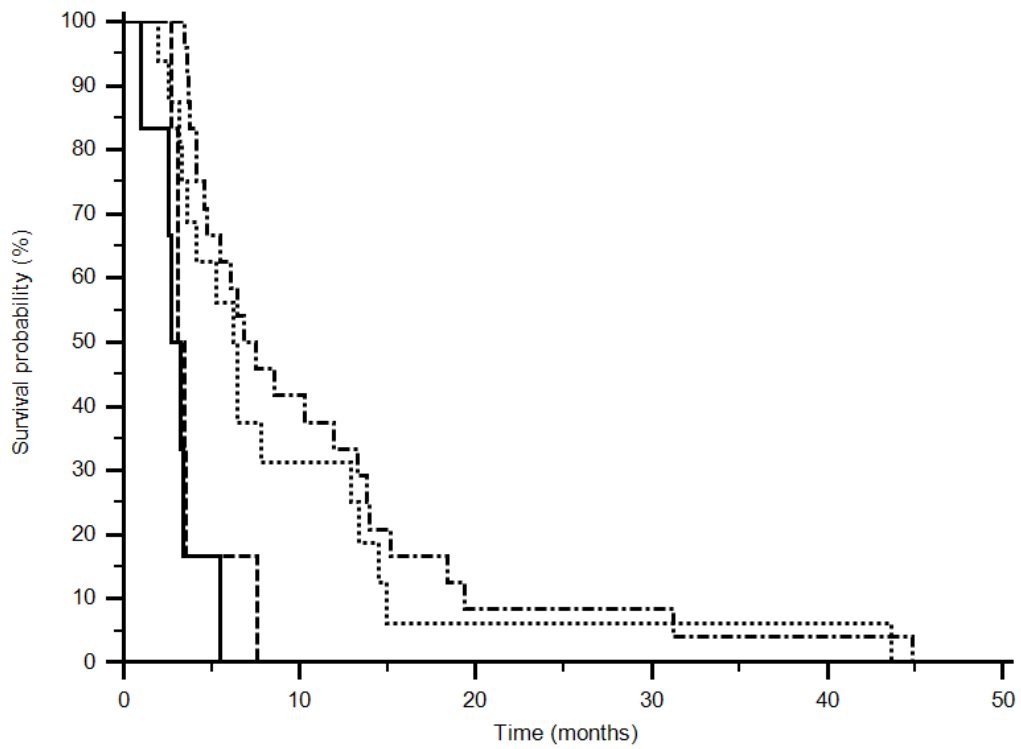


Figura 7. OS stratificata per rs2010963 e per trattamento (- · - · - GG+GC anti-VEGF) (······ CC anti-VEGF) (----- GG+GC anti-mTOR) (———— CC anti-mTOR).

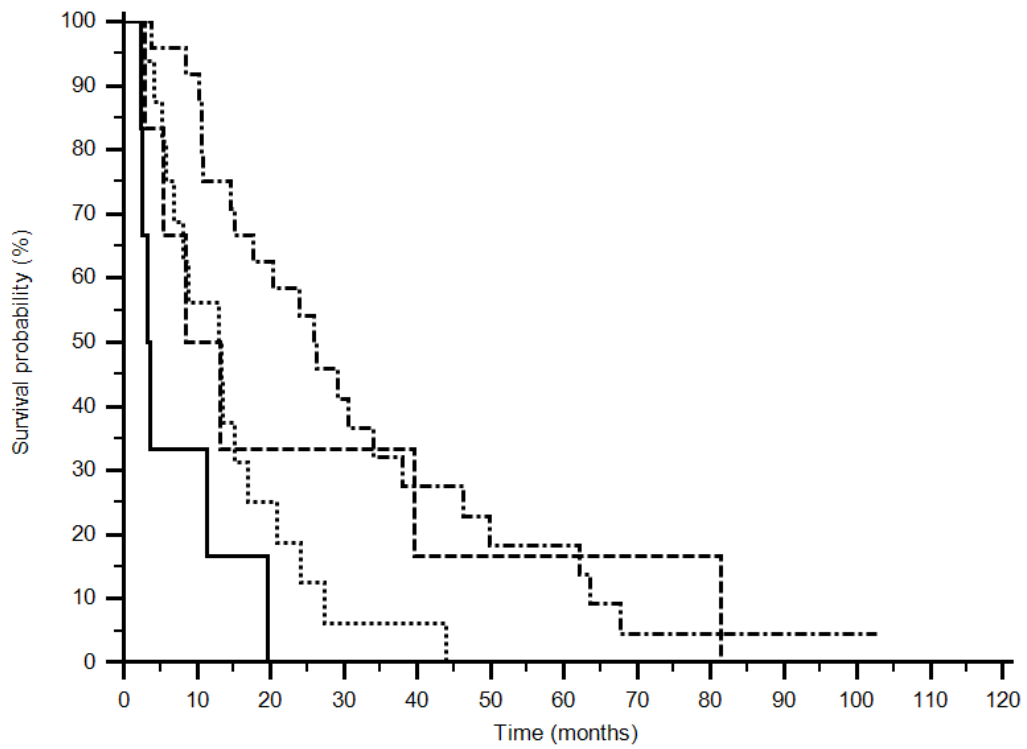


Figura 8. PFS stratificata per rs6877011 e per trattamento (——GG+GC anti-VEGF) (····· CC anti-VEGF) (- · - · - GG+GC anti-mTOR) (----- CC anti-mTOR).

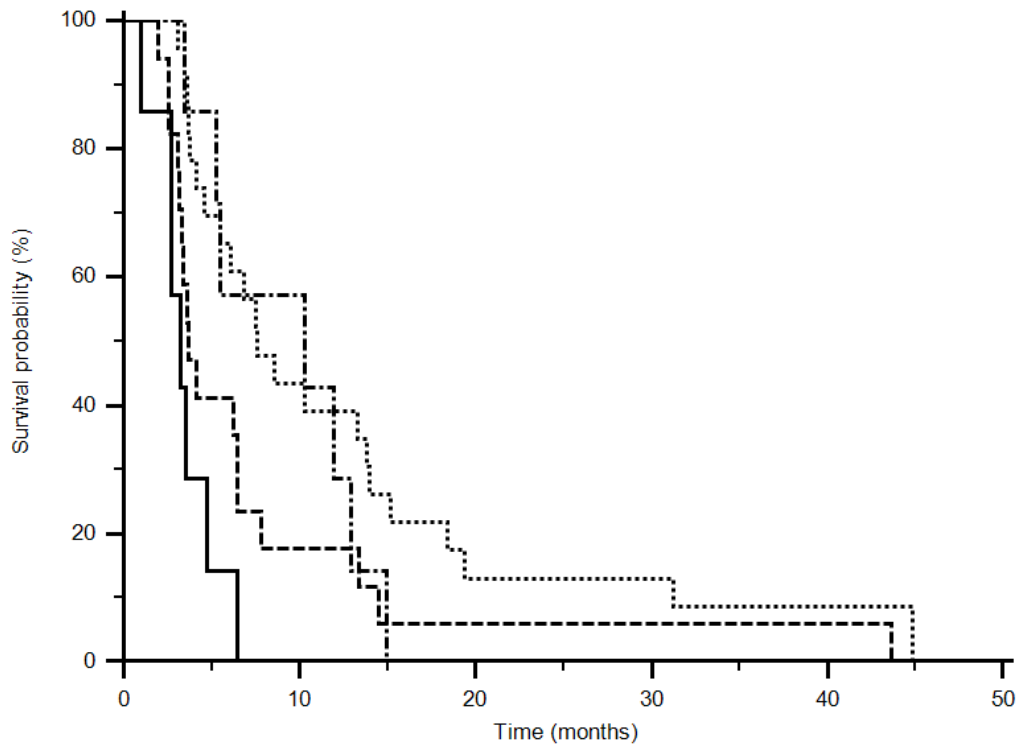
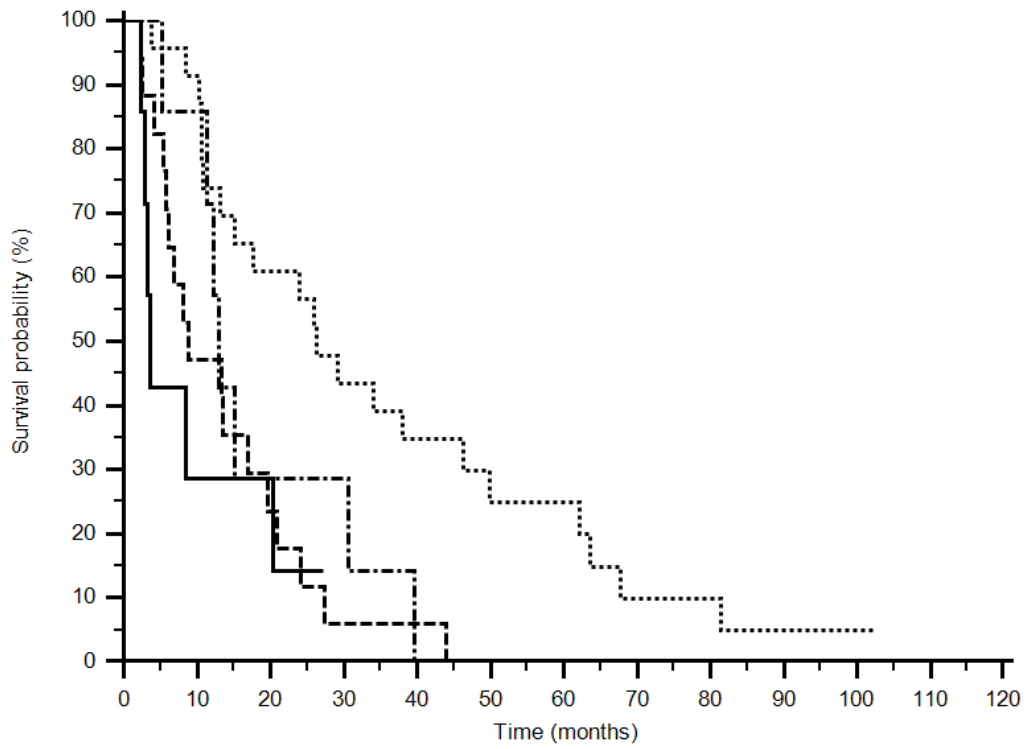


Figura 9. OS stratificata per rs2010963 e per trattamento (——GG+GC anti-VEGF) (····· CC anti-VEGF) (- · - · - GG+GC anti-mTOR) (- - - - - CC anti-mTOR).



7. TABELLE

Tabella 1. Stadiazione del carcinoma renale secondo il sistema TNM del WHO 2009.

T Tumore Primitivo	
Tx	Tumore primitivo non evidenziabile
T0	Nessuna evidenza di primitivo
T1	Tumore ≤ 7 cm in dimensione massima, limitato al rene
T1a	Tumore ≤ 4.0 cm
T1b	Tumore >4.0 cm ma ≤ 7.0 cm
T2	Tumore >7.0 cm in dimensione massima, limitato al rene
T2a	Tumore >7 cm ma ≤ 10 cm
T2b	Tumore >10 cm, limitato al rene
T3	Tumore che si estende nelle vene maggiori o nei tessuti perinefrici ma non nella ghiandola surrenale ipsilaterale e non oltrepassa la fascia di Gerota
T3a	Tumore che si estende nella vena renale o nei suoi rami segmentari, o tumore che invade il grasso perirenale e/o del seno renale ma non oltrepassa la fascia di Gerota
T3b	Tumore che si estende nella vena cava al di sotto del diaframma
T3c	Tumore che si estende nella vena cava al di sopra del diaframma o invade la parete della vena cava
T4	Tumore che oltrepassa la fascia di Gerota [inclusa l'estensione alla ghiandola surrenale ipsilaterale]
N Linfonodi regionali	
Nx	Linfonodi regionali non possono essere accertati
N0	Nessun linfonodo regionale metastatico
N1	Metastasi nei linfonodi regionali
M metastasi a distanza	
cM0	Clinicamente non metastasi
cM1	Clinicamente metastasi
pM1	Metastasi a distanza accertate patologicamente
Stadi	
Stadio I	T1 N0 M0
Stadio II	T2 N0 M0
Stadio III	T3 N0 M0
	T1-3 N1 M0
Stadio IV	T4 ogni N M0
	ogni T ogni N M1

Tabella 2. Polimorfismi dell'angiogenesi selezionati per lo studio.

SNP ID	Gene	Chr	Chr. Position	Position in the gene/Effect	Codon exchange	aa. exchange
rs10434	VEGFA	6	43753212	3'UTR ^[c]	-	-
rs2010963	VEGFA	6	43738350	5'UTR ^[d]	-	-
rs25648	VEGFA	6	43738977	Syn ^[a] ; ESE ^[b]	TCC ⇒ TCT	S [Ser] ⇒ S [Ser]
rs3025039	VEGFA	6	43752536	3'UTR ^[c]	-	-
rs699947	VEGFA	6	43736389	Prom ^[e]	-	-
rs833061	VEGFA	6	43737486	Prom ^[e]	-	-
rs4604006	VEGFC	4	177608775	Intronic	-	-
rs7664413	VEGFC	4	177608707	Intronic	-	-
rs664393	FLT1	13	29071001	3'UTR ^[c]	-	-
rs7993418	FLT1	13	28883061	Syn ^[a] ; ESE ^[b]	TAC ⇒ TAT	Y [Tyr] ⇒ Y [Tyr]
rs1870377	KDR	4	55972974	Missense	CAA ⇒ CAT	Q [Gln] ⇒ H [His]
rs2071559	KDR	4	55992366	Init. Transcrip.	-	-
rs2305948	KDR	4	55979558	Missense	GTA ⇒ ATA	V [Val] ⇒ I [Ile]
rs7667298	KDR	4	55991731	5'UTR ^[d]	-	-
rs307805	FLT4	5	180077487	Prom ^[e] ; TFBS ^[g]	-	-
rs6877011	FLT4	5	180029471	3'UTR ^[c]	-	-
rs307822	FLT4	5	180028717	3'UTR ^[c]	-	-

[a] Syn: Synonymous substitution; *[b]* ESE: Exon Splicing Enhancer; *[c]* 3'UTR: Untranslated Region 3'UTR; *[d]* 5'UTR: Untranslated Region 5'UTR; *[e]* Prom: Promoter region; *[g]* TFBS: Predicted Trascription Factor Binding Site.

Tabella 3. Caratteristiche generali della popolazione di pazienti trattati con anti-VEGF o anti-mTOR.

Farmaco		Anti-VEGF	Anti-mTOR
Numero di pazienti		34	29
Genere	Maschi	24 [70%]	21 [72%]
	Femmine	10 [30%]	8 [28%]
Età mediana [range 47-84]	>65	12 [35%]	13 [45%]
	<65	22 [65%]	16 [55%]
Chirurgia	Si	26 [76%]	23 [79%]
	No	8 [24%]	6 [21%]
Istologia	Cellule chiare	31 [91%]	27 [93%]
	Altro	3 [9%]	2 [7%]
ECOG Performance Status	0	25 [73%]	20 [68%]
	1	6 [17%]	6 [21%]
	2	3 [10%]	3 [11%]
Stadio alla diagnosi [AJCC Cancer Staging Manual. 2010]	I	0 [0%]	1 [3%]
	II	3 [9%]	3 [10%]
	III	17 [51%]	14 [49%]
	IV	14 [41%]	11 [37%]
Risposte obiettive	CR	0 [0%]	0 [0%]
	PR	4 [12%]	3 [10%]
	SD	10 [29%]	8 [27%]
	PD	20 [58%]	18 [62%]

Tabella 5. Risultati dell'analisi univariata.

Polimorfismo	Genotipo	Numero di pazienti		PFS (mesi)		OS (mesi)	
		VEGF	mTOR	VEGF	mTOR	VEGF	mTOR
rs2010963	GG+GC	26 [76%]	20 [68%]	7,5	6,3	26,4	13,2
	CC	8 [24%]	9 [31%]	3,3	2,9	10,8	3,4
				p<0,0001		p=0,0006	
rs6877011	GG+GC	25 [74%]	20 [69%]	3,2	10,3	3,7	12,9
	CC	9 [26%]	9 [31%]	7,6	3,7	26,4	8,9
				p=0,0018		p=0,0045	

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90.
- [2] AIOM/AIRTUM. I numeri del cancro in Italia 2017. *Rene*. 2017;189-199.
- [3] Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinomas: a multicenter experience. *J Clin Oncol* 2005;23:2763–2771
- [4] Algaba F, Akaza H, Lopez-Beltran A et al. Current pathology keys of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2011;60:634–644
- [5] Belldegrun AS. Renal cell carcinoma: prognostic factors and patient selection. *Eur Urol Suppl* 2007;6:477-483
- [6] Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA et al. Renal cell carcinoma guideline. *Eur Urol* 2007;51:1502-10
- [7] Verhoest G, Veillard D, Guillé F et al. Relationship between age at diagnosis and clinicopathologic features of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2007;51:1298-304
- [8] Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH et al. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22(3):454-63
- [9] Heng DY, Xie W, Regan MM, et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2013 Feb;14(2):141-8.
- [10] Ko JJ, Xie W, Kroeger N, et al. The International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium model as a prognostic tool in patients with metastatic renal cell carcinoma previously treated with first-line targeted therapy: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2015 Mar;16(3):293-300.
- [11] Edge S, Byrd DR, Compton CC et al. *AJCC cancer staging manual*. 7th edition. Springer-Verlag, New York 2010.

- [12] Ficarra V, Guille F, Schips L et al. Proposal for revision of the TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;104(10):2116-23
- [13] Frank I, Blute ML, Leibovich BC et al. pT2 classification for renal cell carcinoma. Can its accuracy be improved? *J Urol* 2005;173(2):380-4
- [14] Klatte T, Patard JJ, Goel RH et al. Prognostic impact of tumor size on pT2 renal cell carcinoma: an international multicenter experience. *J Urol* 2007;178(1):35-40
- [15] Ficarra V, Novara G, Iafrate M et al. Proposal for reclassification of the TNM staging system in patients with locally advanced (pT3-4) renal cell carcinoma according to the cancer-related outcome. *Eur Urol* 2007;51:22-29
- [16] Karakiewicz PI, Trinh QD, Bhojani N et al. Renal cell carcinoma with nodal metastases in the absence of distant metastatic disease: prognostic indicators of disease specific survival. *Eur Urol* 2007;51(6):1616-24
- [17] Novara G, Martignoni G, Artibani W et al. Grading systems in renal cell carcinoma. *J Urol* 2007; 177(2):430-6
- [18] Rioux-Leclercq N, Karakiewicz PI, Trinh QD et al. Prognostic ability of simplified nuclear grading of renal cell carcinoma. *Cancer* 2007;109(5):868-74
- [19] Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading System for Renal Cell Carcinoma and Other Prognostic Parameters. *Am J Surg Pathol* 2013;37(10),1490-1504
- [20] Leibovich B, Sheinin Y, Lohse CM et al. Carbonic Anhydrase IX Is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25:4757-4764
- [21] Krambeck AE, Dong H, Thompson RH et al. Survivin and b7-h1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(6):1749-56
- [22] Lam JS, Shvarts O, Pantuck AJ. Changing concepts in the surgical management of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2004;45:692-705
- [23] Blom JH, van Poppel H, Marechal JM et al. Radical nephrectomy with and without lymph node dissection: preliminary results of the EORTC randomized phase III protocol 30881. *Eur Urol* 1999;36:570-575

- [24] Haas NB, Manola J, Uzzo RG, et al. Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *The Lancet* 2016; 10032:2008-16.
- [25] Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. Long term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am* 2000;6:Suppl 1:S55-S57
- [26] McDermott DF, Regan MM, Clark JI et al. Randomized phase III trial of high dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:133-41 [Erratum, *J Clin Oncol* 2005;23:2877]
- [27] Motzer RJ, Murphy BA, Bacik J et al. Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000;18:2972-80
- [28] Negrier S, Escudier B, Lasset C et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1998;338:1272-8
- [29] Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM et al. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3127-32
- [30] Lam JS, Leppert JT, Belldegrun AS et al. Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *World J Urol* 2005;23:202-12
- [31] Rini BI. Sunitinib. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8(14):2359-69
- [32] Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2007;11:356(2):115-24
- [33] Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27(22):3584-90
- [34] Hurwitz H, Dowlati A, Savage S et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of oral administration of GW786034 in pts with solid tumors. *J Clin Oncol* 2005;23:195s. abstr 3012

- [35] Hutson T, Davis I, Machiels J et al. Predictive and prognostic factors in phase II renal cell carcinoma trial with pazopanib (GW786034), a multi-kinase angiogenesis inhibitor. abstract 5780 *Ann Oncol* 2008;19(VIII):187
- [36] Hutson TE, Davis ID, Machiels JH et al. Biomarker analysis and final efficacy and safety results of a phase II renal cell carcinoma trial with pazopanib (GW786034), a multi-kinase angiogenesis inhibitor. *J Clin Oncol* 2008; 26:261s abstr 5046
- [37] Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28:1061-1068
- [38] Sternberg CN, Hawkings RE, Wagstaff J. A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: Final overall survival results and safety update. *Eur J Cancer* 2013;49,1287– 1296
- [39] Motzer RJ, Hutson TE, Cella D et al. Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2013;369,8:722-31
- [40] Rini BI, Escudier B, Tomczak P, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011; 378:1931-9.
- [41] Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356 (2):125-34.
- [42] Hutson TE, Escudier B, Esteban E, et al. Randomized phase III trial of temsirolimus versus sorafenib as second-line therapy after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2014; 32 (8):760-7.
- [43] Choueiri TK, Escudier B, Powles T, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2016; 17 (7):917-27.
- [44] Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. *Cancer* 2010; 116:4256-65.

- [45] Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *NEJM* 2015; 19:1803-13.
- [46] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182–1186
- [47] Kumaran G, Clamp AR, Jayson GC. Angiogenesis as a therapeutic target in cancer. *Clin Med* 2008;8:455-458
- [48] Faivre S, Demetri G, Sargent W et al. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:734–745
- [49] Le TC, Faivre S, Raymond E. New developments in multitargeted therapy for patients with solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2008;34:37–48
- [50] Rini BI, Michaelson MD, Rosenberg JE et al. Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2008;26:3743-3748
- [51] Valtola R, Salven P, Heikkila P et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999;154:1381-1390
- [52] Jia H, Bagherzadeh A, Bicknell R et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGF-A differentially regulate KDR-mediated signaling and biological function in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:36148-36157
- [53] Zhang F, Tang Z, Hou X et al. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:6152-6157
- [54] Stuttfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and Function of VEGF Receptors. *IUBMB Life* 2009;61(9): 915–922
- [55] Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010;29:625-34
- [56] Sun Q, Zhou H, Binmadi NO et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphoring 4D affects tumor growth and vascularity. *J Biol Chem* 2009;284:32066-74

- [57] Kluger HM, Siddiqui SF, Angeletti C et al. Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells. *Lab Invest* 2008;88:962-72
- [58] Pages G, Puysegur J. Transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene - a concert of activating factors. *Cardiovascular Res* 2005;65:564–573
- [59] Pander J, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Pharmacogenetics of EGFR and VEGF inhibition. *Drug Discov Today* 2007;12:1054–1060
- [60] Minchenko A, Salceda S, Bauer T et al. Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:35–39
- [61] Vaziri SAJ, Kim J, Ganapathi MK et al. Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms: Role in Response and Toxicity of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2010;12:102–108
- [62] Schultz A, Lavie L, Hochberg I et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 1999;100:547–552
- [63] Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ et al. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000;12:1232–1235
- [64] Renner W, Kotschan S, Hoffmann C et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000;37:443–448
- [65] Hansen TF, Garm Spindler KL, Andersen RF et al. The predictive value of genetic variations in the vascular endothelial growth factor gene A in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 2011;11:53-60
- [66] Hansen TF, Sørensen FB, Spindler KL et al. Microvessel density and the association with single nucleotide polymorphisms of the vascular endothelial growth factor receptor 2 in patients with colorectal cancer. *Virchows Arch* 2010;456:251-260
- [67] Schneider BP, Wang M, Radovich M et al. Association of vascular

- endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in trial of paclitaxel compared with paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol* 2008;20:4672–4678
- [68] Schultheis AM, Lurje G, Rhodes KE et al. Polymorphisms and clinical outcome in recurrent ovarian cancer treated with cyclophosphamide and bevacizumab. *Clin Can Res* 2008;14:7554–7563
- [69] Steffensen KD, Waldstrom M, Brandslund I et al. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010;117:109–116
- [70] Kim JJ, Vaziri SAJ, Rini BI et al. Association of VEGF and VEGFR2 Single Nucleotide Polymorphisms with Hypertension and Clinical Outcome in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients Treated With Sunitinib. *Cancer* 2012;118(7):1946-1954
- [71] Garcia-Donas J, Esteban E, Leandro-García LJ et al. Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study. *Lancet Oncol* 2011;12(12):1143-1150
- [72] Xu CF, Bing NX, Ball HA et al. Pazopanib Efficacy in Renal Cell Carcinoma: Evidence for Predictive Genetic Markers in Angiogenesis-Related and Exposure-Related Genes. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(18):2557-2564
- [73] Scartozzi M, Bianconi M, Faloppi L, et al. VEGF and VEGFR Polymorphisms affect clinical outcome in advanced Renal Cell Carcinoma patients receiving first line Sunitinib. *Br J Cancer*. 2013 Mar 19;108(5):1126-32.
- [74] Bianconi M, Faloppi L, Loretelli C, et al. Angiogenesis genotyping in the selection of first-line treatment with either sunitinib or pazopanib for advanced renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Jun 21;7(25):37599-37607.
- [75] Iacovelli R, Carteni G, Sternberg CN, et al. Clinical outcomes in patients receiving three lines of targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma: results from a large patient cohort. *Eur J Cancer*. 2013 Jun;49(9):2134-42.

- [76] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58–62
- [77] Deprimo SE, Bello CL, Smeraglia J et al. Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: modulation of VEGF and VEGF-related proteins. *J Transl Med* 2007;5:32–43
- [78] Zhai R, Gong MN, Zhou W et al. Genotypes and haplotypes of the VEGF gene are associated with higher mortality and lower VEGF plasma levels in patients with ARDS. *Thorax* 2007;62:718–722
- [79] Ferrante M, Pierik M, Henckaerts L et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:870–878
- [80] Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M et al. Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2008;14:1382–1387
- [81] Debette S, Visvikis-Siest S, Chen MH et al. Identification of cis- and trans-Acting Genetic Variants Explaining Up to Half the Variation in Circulating Vascular Endothelial Growth Factor Levels. *Circulation Research* 2011;109(5):554-563.