

Ruolo della farmacogenetica nella identificazione della migliore strategia terapeutica per il paziente affetto da carcinoma polmonare non a piccole cellule

Role of pharmacogenetics in choosing the best therapeutic strategy for non-small cell lung cancer patients

Summary

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is a leading cause of cancer death in many countries. The carcinogenesis of this malignancy is characterized by different genetic and epigenetic alterations. Knowledge of the signal transduction pathways specific to neoplastic cells has recently led to the development of a targeted approach, called "target therapy". The aim of this therapeutic strategy is to single out small molecules or monoclonal antibodies directed against molecular targets. Recent findings have revealed EGFR mutations in lung cancer cells and have shown their predictive role in the response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors (EGFR-TKI). These pharmacogenetic approach studies have allowed patients who might benefit from a specific antineoplastic treatment to be selected without the risk of useless severe toxicity.

Danza K, Petriella D; Galetta D, et al. Role of pharmacogenetics in choosing the best therapeutic strategy for non-small cell lung cancer patients. *Trends Med* 2009; 9(4):187-193.

© 2009 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

Katia Danza¹, Daniela Petriella¹, Domenico Galetta², Ettore Fistola², Rosamaria Pinto¹, Brunella Pilato¹, Marianna Martinucci¹, Massimo Bonucci³, Stefania Tommasi¹, Gianmauro Numico⁴, Nicola Silvestris²

¹Laboratorio di Oncologia Sperimentale Clinica, Istituto Tumori "Giovanni Paolo II", Bari

²Unità Operativa di Oncologia Medica e Sperimentale, Istituto Tumori "Giovanni Paolo II", Bari

³Servizio di Anatomia Patologica, Casa di Cura San Feliciano, Roma

⁴Unità Operativa di Oncologia Medica, Ospedale Umberto Parini, Aosta

Key words:

**pharmacogenetics
NSCLC
anti-EGFR
tyrosine-kinase inhibitors**

Nicola Silvestris

Unità Operativa di Oncologia Medica e Sperimentale

Istituto Tumori "Giovanni Paolo II"

Via Hahnemann, 10 - 70126 Bari

Tel.: 080 5555240

E.mail: n.silvestris@oncologico.bari.it

La farmacogenetica studia le variazioni inter-individuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta ai farmaci. L'applicazione pratica delle conoscenze, provenienti dalla ricerca in farmacogenetica, consiste nella possibilità di predire la risposta di un paziente ad un certo farmaco sulla base di un test genetico standard, per arrivare ad un'individualizzazione della terapia: *il farmaco giusto al paziente giusto*.

Il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) rappresenta la principale causa di morte per cancro, sia maschile che femminile, con circa 1,18 milioni di morti su 1,35 milioni di casi diagnosticati¹. Le piccole lesioni pre-neoplastiche che precedono l'insorgenza del NSCLC sono associate a specifiche mutazioni genetiche ed epigenetiche. La presenza di alterazioni micro-

satellitari, studiate anche con metodiche non invasive su esalato condensato, sono specifiche dello stato tumorale ed investono pertanto un ruolo importante nella diagnosi precoce². Nel NSCLC è particolarmente evidente lo stretto rapporto esistente tra la espressione del recettore specifico per l'Epidermal Growth Factor (EGFR) e la risposta ai trattamenti. In particolare modo le mutazioni di EGFR ed un aumento del numero di copie del gene corrispondente, inducono l'attivazione di oncogeni o l'inattivazione di geni oncosoppressori causando, pertanto, una completa trasformazione neoplastica dell'epitelio polmonare³. Alterazioni nell'espressione di EGFR sono state osservate in diversi casi di NSCLC⁴ e sono risultate essere frequentemente correlate ad una prognosi peggiore⁵.

La famiglia dei recettori ErbB

La famiglia di proto-oncogeni del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR)/ErbB comprende almeno quattro glicoproteine distinte, con attività tirosin-chinasica, ligando dipendente e struttura simile: EGFR (noto anche come ErbB1/HER1), ErbB2 (Her2/Neu), ErbB3 (HER3) ed ErbB4 (HER4). Queste molecole, costituite da una singola catena polipeptidica, posseggono un dominio extracellulare in grado di legare EGF o numerosi altri fattori di crescita polipeptidici, un dominio transmembrana ed un dominio intracellulare sede dell'attività tirosin-chinasica, che consente il trasferimento di un gruppo fosfato dall'ATP ad un residuo di tirosina dello stesso recettore o di proteine intracellulari. Tutti i membri della famiglia dei recettori ErbB sono accumulati dalla struttura del dominio ad attività tirosin-chinasica che mostra un elevato grado di omologia, mentre differiscono tra loro nel dominio extracellulare, responsabile della diversa affinità di legame per i ligandi.

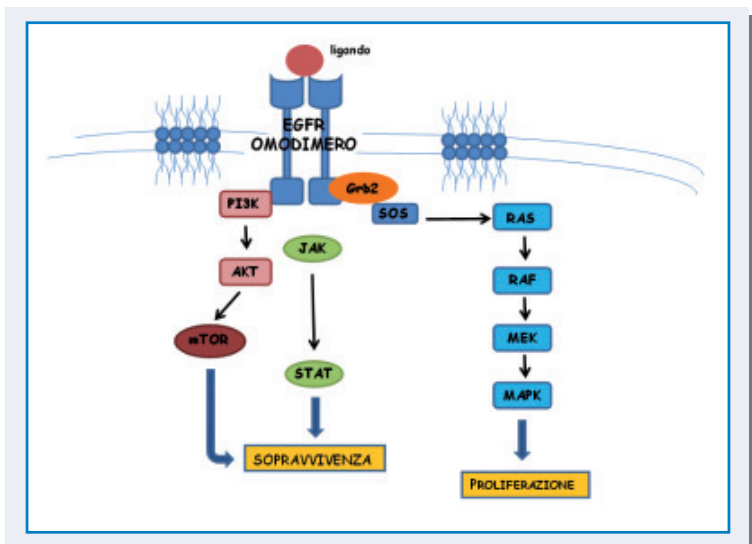
I fattori di crescita della famiglia ErbB prodotti mediante secrezione autocrina o paracrina, si legano al dominio extracellulare dei recettori ErbB, attivandoli. Il legame del ligando con il suo recettore ErbB comporta l'omodimerizzazione o l'eterodimerizzazione tra i recettori, determinando l'autofosforilazione degli stessi recettori e la successiva attivazione della cascata dei *downstream effectors*. Pertanto, la formazione dei dimeri è essen-

ziale per l'attivazione del recettore e per la trasmissione del segnale ad esso associato. L'eterodimerizzazione è favorita rispetto all'omodimerizzazione; per la proteina EGFR, ErbB3 ed ErbB4, il recettore ErbB2 è il partner di eterodimerizzazione preferito. Alla dimerizzazione segue il trasferimento di ATP ad un residuo di tirosina della porzione intracellulare del recettore che coincide, di fatto, con l'inizio della trasduzione del segnale a valle. Tale evento, infatti, consente al recettore di interagire con la proteina Grb2 attraverso il dominio SH2 la quale, a sua volta, recluta il fattore di scambio Sos, presente nel citosol. In conseguenza di questa interazione, il complesso Grb2/Sos viene reclutato in prossimità della membrana dove è localizzata la proteina RAS. L'attivazione di tale proteina determina una sequenza di fosforilazioni definite cascata MAP. Oltre alla via delle MAP kinasi, i recettori ErbB

sono anche in grado di determinare l'attivazione della via PI-3K/Akt e della via JAK-STAT (figura 1). La cascata RAS-RAF-MEK-ERK, la via PI-3K/Akt e la via JAK-STAT svolgono un ruolo chiave nella sopravvivenza, nella proliferazione e nella differenziazione cellulare, oltre che nella trasformazione e progressione tumorale.

L'EGFR inibisce indirettamente l'apoptosi attraverso PI-3 chinasi che, in seguito all'interazione con la proteina RAS, trasloca sulla membrana plasmatica ed attiva la serina-treonina chinasi Akt. Una delle principali funzioni di questa proteina è la regolazione della sopravvivenza cellulare, attraverso l'inattivazione della proteina pro-apoptotica BAD ed attraverso la trascrizione del fattore nucleare kB⁶. Un altro segnale che viene attivato dai recettori tirosin-chinasici è la fosfolipasi C (PLC) che gioca un ruolo chiave nella attivazione di secondi

Figura 1. EGFR pathway: dopo legame del ligando specifico, EGFR si autofosforila e attiva tramite fosforilazione Ras-Raf-MAP kinasi, PI-3K/Akt, e le vie Stat/Jak.



messaggeri, quali la molecola IP3 che induce rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico nel citoplasma con conseguente attivazione della protein kinasi C (PKC), che trasloca dal citosol alla membrana.

Infine EGFR induce l'angiogenesi, aumentando l'espressione di VEGF nelle cellule tumorali e contribuisce al processo di metastatizzazione incrementando l'attivazione delle metalloproteinasi della matrice.

EGFR come bersaglio delle *target therapy* nel NSCLC

L'EGFR è diventato un importante bersaglio di nuove strategie di trattamento per il NSCLC dal momento che, già da alcuni anni, numerosi studi hanno identificato in diverse mutazioni del gene per EGFR una delle principali cause di carcinogenesi⁷.

Il 90% di tutte le mutazioni descritte sinora, e designate come mutazioni classiche, coinvolgono i quattro esoni (18, 19, 20, 21) del gene EGFR che costituiscono la regione tirosin chinasi e ATPasica. Si tratta per la maggior parte, di mutazioni puntiformi nell'esone 18 (G719A/C/S), di brevi delezioni in-frame nell'esone 19 con perdita da quattro a sei amminoacidi a partire dalla posizione 746 (DEL19), di diverse alterazioni a carico dell'esone 20 e di una mutazione puntiforme nell'esone 21 (L858R)⁸. Una maggiore incidenza di mutazioni del gene EGFR è stata osservata nei soggetti non-fumatori, mentre in pazienti fumatori sembra esserci una maggiore frequenza di muta-

zioni a carico del gene che codifica per la proteina K-Ras⁹. Nell'ambito delle molecole anti-EGFR utilizzate nella terapia dei tumori, sono stati sviluppati sia anticorpi monoclonali (*cetuximab*, *panitumumab*) diretti contro il dominio extracellulare del recettore ed in grado di interferire con l'attività dei ligandi sia piccole molecole inibitrici del dominio intracellulare tirosin-chinasi TKI (*gefitinib*, *erlotinib*)^{10,11}.

Le prime ad essere utilizzate sono state proprio le piccole molecole e, tra queste, il capostipite nel NSCLC è stato il *gefitinib*. Questa TKI, pur non impedendo l'interazione ligando-recettore, impedisce l'insorgenza di una risposta biologica all'interno della cellula. Antagonizza competitivamente il legame dell'ATP col suo sito ed impedisce l'autofosforilazione, bloccando pertanto la via effettrice di propagazione del segnale. L'evidenza, negli studi preclinici, dell'attività antitumorale e di un profilo favorevole di tossicità hanno rappresentato il presupposto di studi di fase II in pazienti affetti da NSCLC. A tal riguardo, significativi sono stati gli studi IDEAL-1 (*Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer*) e IDEAL-2^{10,11}. Entrambi gli studi si basavano sull'utilizzo del *gefitinib*, a dosaggi differenti, in pazienti con tumore metastatico pretrattati con una sola linea di chemioterapia a base di cisplatino, nello studio IDEAL-1, e con almeno due linee di terapia nello studio IDEAL-2. I dati ottenuti hanno dimostrato, oltre ad un sorprendente dato in termini di riposte che superava il 10%, anche un netto

miglioramento dei sintomi di circa il 40% ed un miglioramento della qualità di vita dei pazienti responsivi.

Inizialmente, a metà del 2002, questi dati hanno portato le autorità giapponesi ad approvare l'uso di *gefitinib* in seconda linea nel NSCLC e nel maggio 2003 ad approvarne l'uso come trattamento di III linea in pazienti affetti da NSCLC avanzato o metastatico. Tuttavia, i successivi studi INTACT I e II¹² di confronto fra chemioterapia più *gefitinib* verso la sola chemioterapia non mostrarono alcun vantaggio in sopravvivenza dall'aggiunta del farmaco ed un ulteriore studio di fase III di confronto in seconda-terza linea vs placebo ne confermò l'assenza di efficacia. Pertanto l'FDA (*Food and Drugs Administration*) limitò l'uso del farmaco solo a scopi sperimentali o a pazienti che ne avevano già ricavato beneficio.

Gli iniziali dati retrospettivi hanno però consentito di individuare alcune categorie di pazienti in cui il farmaco ha mostrato di essere ancora più efficace ed in questo senso sono stati individuati tali fattori clinici nel sesso femminile, nell'etnia asiatica, nell'istotipo adenocarcinoma e nella condizione di non fumatore. Risultati più incoraggianti si sono, invece, ottenuti da studi randomizzati di II fase in pazienti con età inferiore ai 70 anni e con NSCLC in stadio avanzato¹³.

Tra gli inibitori EGFR tirosin-chinasi, anche l'*erlotinib* è stato ampiamente studiato per la sua attività antitumorale osservata in trials di II fase¹⁴. In particolare, il trattamento con l'*erlotinib* ha consentito

di ottenere un aumento della sopravvivenza in soggetti già chemioterattati. Un primo studio di confronto tra erlotinib e placebo in pazienti pretrattati con NSCLC ha dimostrato un tasso medio di sopravvivenza rispettivamente di 4,7 mesi nel braccio con placebo e di circa 6,7 mesi in pazienti trattati con l'anti-tirosinchinamico¹⁵. La combinazione di erlotinib con la chemioterapia standard in prima linea non ha mostrato, al contrario, benefici in termini di tempo a progressione e risposta obiettiva. Nei due studi di fase III (TALENT e TRIBUTE), disegnati come gli studi INTACT, l'associazione di erlotinib con la chemioterapia di I linea in pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato non ha migliorato i risultati del trattamento standard¹⁶. Al contrario, risultati incoraggianti in termini di sopravvivenza, si sono ottenuti dalla combinazione di gefitinib o erlotinib con il carboplatin ed il paclitaxel in pazienti non fumatori¹⁷. L'altro grande capitolo è quello relativo all'utilizzo clinico degli anticorpi monoclonali. Il **cetuximab** è un anticorpo monoclonale chimerico, murino-umano, di tipo IgG1, che agisce bloccando il dominio extracellulare del recettore EGF nel legame con il ligando, impedendo, in tal modo, la fosforilazione su residui tirosinici. Il complesso recettore-anticorpo è successivamente internalizzato ed il recettore degradato. Molti dati preliminari avevano già rilevato come questa molecola, in associazione alla chemioterapia, fosse in grado di migliorarne i risultati^{18,19}. Questi risultati hanno rappresentato il presupposto di studi di fase III che hanno

mostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza quando il cetuximab è associato alla chemioterapia nel trattamento di prima linea in pazienti con NSCLC.

È stata riscontrata una resistenza al trattamento quando presente una mutazione nel gene K-Ras, che codifica per uno degli effettori del pathway di EGFR.

Tra gli anticorpi monoclonali sono stati presi in esame, in trials di II e III fase, anche il **panitunumab**, un anticorpo monoclonale umanizzato di tipo IgG2 ed il **matuzumab**, un anticorpo monoclonale umanizzato di tipo IgG1. Entrambi hanno come molecola target la proteina EGFR ma epitopi diversi. Il panitunumab, infatti, lega il dominio III di EGFR nello stesso locus di cetuximab, bloccando il legame di qualsiasi altro ligando specifico. Al contrario, matuzumab lega un locus differente del dominio III di EGFR, bloccando stericamente il sito di alta affinità per il ligando ed impedendo la successiva dimerizzazione recettoriale. Trials di fase II e III non hanno riportato risultati soddisfacenti in termini di sopravvivenza²⁰.

Mutazioni del gene EGFR come fattore predittivo di risposta agli inibitori delle TK

Alcune caratteristiche molecolari di EGFR (espressione, amplificazione genica, mutazioni) sono state indicate come potenziali fattori predittivi di risposta ai farmaci TKI⁷. In accordo con questi dati, studi clinici di fase III (TRIBUTE ed INTACT), atti a valutare l'efficacia della combina-

zione di TKI con la chemioterapia standard, hanno dimostrato una maggiore sensibilità al trattamento di prima linea nel braccio di combinazione con TKI, soprattutto in pazienti che presentavano mutazioni del gene per EGFR¹².

Questi risultati mostrano chiaramente il ruolo chiave delle mutazioni del gene che codifica per EGFR nel predire una risposta al trattamento con TKI. In particolare, una maggiore sensibilità al trattamento con gefitinib è stata rilevata in pazienti con delezione nell'esone 19^{21,22}. Inoltre studi in vitro hanno rilevato una stretta associazione tra una delle mutazioni per inserzione a livello dell'esone 20 (D770insNPG) del gene che codifica per EGFR e la resistenza al farmaco erlotinib²³. Recentemente, una mutazione secondaria causata dalla sostituzione dell'amminoacido treonina con l'amminoacido metionina a livello del codone 790 (T790M) nell'esone 20 del dominio tirosino chinasi di EGFR, è stata osservata essere responsabile dell'acquisizione di resistenza verso EGFR-TKI. Utilizzando studi sulla struttura cristallina del recettore per EGF, è stato osservato che la posizione T790 è localizzata nella tasca di legame per l'ATP del dominio catalitico e riveste, pertanto, un ruolo cruciale nell'interazione con i farmaci gefitinib o erlotinib. La sostituzione dell'amminoacido metionina sembra determinare un ingombro sterico che ostacola il legame dei TKI al dominio catalitico di EGFR. Recentemente Pallis AG et al., in uno studio condotto su 86 pazienti affetti da NSCLC, tramite

sequenziamento degli esoni 18, 19 e 21, oltre a confermare le mutazioni classiche maggiormente ricorrenti nel gene per EGFR, hanno identificato nuove mutazioni in 14 pazienti²⁴. A differenza delle mutazioni classiche, le nuove mutazioni non sembrano essere correlate ad una maggiore sensibilità al gefitinib, e ad un miglioramento in termini di sopravvivenza.

Anche il numero di copie del gene per EGFR, attualmente rilevabili tramite la metodica FISH, sembra predire l'efficacia al trattamento con farmaci biologici, in pazienti con NSCLC. L'amplificazione genica, in genere correlata alla iperespressione della proteina EGFR, è spesso un fattore prognostico sfavorevole sebbene non sembrano esserci differenze nella sopravvivenza di pazienti con amplificazione (valutata tramite FISH) rispetto a pazienti senza amplificazione^{4,25}. Studi recenti hanno evidenziato come la polisomia del gene EGFR sia fondamentalmente un evento secondario al processo di cancerogenesi e correlato alla progressione tumorale²⁶.

Cappuzzo et al. hanno dimostrato che un'amplificazione del numero di copie del gene che codifica per EGFR è predittivo di un miglior tasso di sopravvivenza ed efficacia di risposta in pazienti trattati con gefitinib. Risultati simili sono stati recentemente ottenuti dallo studio di pazienti con NSCLC avanzato e trattati con chemioterapia standard associata a cetuximab²⁷ e ad erlotinib²⁸. In conclusione, i dati sinora disponibili pur nella loro non univocità sembrano indicare come mutazioni attivanti il dominio tirosin-

chinasi dell'EGFR e l'amplificazione del gene di EGFR possano essere considerati fattori prognostici e predittivi e di risposta ai TKI²⁹.

ERCC1 come marcatore predittore di resistenza al cisplatino

L'effetto citotossico del cisplatino è principalmente attribuito a varianti geniche, in particolare alla formazione di addotti platino-DNA intracellulare. Il cisplatino ed i farmaci ad esso correlati, inibiscono la proliferazione cellulare attraverso un danno irreversibile al DNA attraverso la formazione di legami crociati intracatena ed intercatena. L'eventuale resistenza a tale farmaco è dovuta alla capacità della cellula neoplastica di riparare il danno del DNA attraverso il sistema NER (*Nucleotide Excision Repair*), di cui elemento fondamentale è il gene ERCC1 (excision repair cross complementation). Quest'ultimo e la RRM1 (subunità regolatrice della ribonucleotide reduttasi) sono marcatori utilizzati per personalizzare e migliorare la risposta al trattamento con cisplatino in pazienti con tumore NSCLC³⁰. Studi recenti hanno mostrato un rapporto inversamente proporzionale tra i livelli di espressione della proteina ERCC1 e la sopravvivenza (maggiore nei casi con bassi livelli di espressione di ERCC1). È stata inoltre osservata l'esistenza di una stretta correlazione tra bassi livelli di espressione della proteina ERCC1 ed una maggiore efficacia dei trattamenti chemioterapici adiuvanti con cisplatino³¹.

RRM1 come marcatore predittivo di risposta al trattamento con gemcitabina: via del metabolismo

Un'altra molecola responsabile dell'insorgenza di effetti collaterali dopo trattamento chemioterapico è la proteina RRM1, subunità regolatoria dell'enzima ribonucleotide reduttasi e bersaglio molecolare della gemcitabina. Questo farmaco inibisce la ribonucleotide reduttasi (RR) e la sintesi del DNA, rispettivamente attraverso il metabolita difosfato dFdCDP e l'incorporazione del metabolita trifosfato dFdCTP durante la fase S del ciclo cellulare³². Il gene per RRM1 è localizzato sul cromosoma 11p15.5 e la perdita di eterozigosi in questa regione è associata ad una minore sopravvivenza dei pazienti affetti da NSCLC. Studi in vitro hanno dimostrato che l'incremento di espressione della proteina RRM1 è correlato con una maggiore resistenza alla gemcitabina³³. Studi di II fase hanno confermato questi dati.

Genotipo CDA come marcatore predittivo di risposta al trattamento con gemcitabina: via del catabolismo

È stato dimostrato come la presenza di polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs) nel gene che codifica per la citidina deaminasi (CDA) è associata ad un aumento della tossicità della gemcitabina. Questa molecola è un profarmaco che richiede la fosforilazione intracellulare al fine di esercitare la sua azione. La citidina deami-

nasi (CDA) è il principale enzima coinvolto nella conversione della gemcitabina nella forma inattiva 2',2'-difluoro-deossiuiridina (dFdU). In numerosi studi sono stati identificati diversi polimorfismi a carico del gene per CDA, dei quali gli SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) 79A>C (Lys27Gln), 435T>C (Thr145Thr) e 208G>A (Ala70Thr) rappresentano i più significativi da un punto di vista funzionale della proteina. A tal riguardo, in uno studio eseguito su pazienti affetti da NSCLC e sottoposti a trattamento combinato gemcitabina-cisplatino, è stata valutata la correlazione tra attività enzimatica di CDA e polimorfismo allelico del gene, in termini di tossicità e risposta clinica. Evidente è che la variante allelica omozigote Lys27Lys è correlata ad un migliore beneficio clinico e ad una comparsa di neutropenia

e trombocitopenia di grado 3. Meno promettenti sono i risvolti clinici correlati al polimorfismo Lys27Gln. Ne consegue che il genotipo CDA è un ottimo fattore di predizione per il trattamento con gemcitabina, dal momento che determina lo status funzionale dell'enzima e, di conseguenza, il tempo di esposizione dei tessuti normali a questo chemioterapico³².

Conclusioni

Negli ultimi anni, sono stati raggiunti significativi traguardi nel trattamento del NSCLC, grazie anche all'impiego di farmaci a bersaglio molecolare comprendenti sia piccole molecole sia anticorpi monoclonali specifici per EGFR. Infatti, l'avanzamento di metodiche di biologia e l'individuazione di geni coinvolti nella risposta ai farmaci antitumorali hanno permes-

so la elaborazione di trattamenti personalizzati, in funzione delle caratteristiche biologiche e cliniche del paziente, al fine anche di minimizzare il rischio di inutile tossicità. Le difficoltà correlate all'identificazione di marcatori molecolari capaci di predire la risposta al trattamento con TKI e conseguentemente di selezionare i pazienti che possano trarne beneficio da questi farmaci, sono insite nell'eterogeneità delle alterazioni molecolari che coinvolgono non solo il recettore per l'EGF ed i suoi livelli di espressione, ma anche gli effettori a valle di questo, responsabili della trasduzione del segnale. In questo contesto la possibilità di utilizzare farmaci capaci di bloccare più target molecolari (*multitarget therapy*) rappresenta una importante speranza per i pazienti affetti da questa neoplasia. **TIM**

Bibliografia

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics 2004. *Ca Cancer J Clin* 2004; 54:8-29.
2. Paradiso A, Tommasi S, Pinto R, et al. Exhaled breath condensate is not suitable to detect EGFR somatic mutations. *Eur Respir J* 2008; 32:1126-1127.
3. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 2006; 118:257-262.
4. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003; 21:3798-3807.
5. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37 (Suppl 4):S9-15.
6. Paradiso A, Mangia A, Azzariti A, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase in breast cancer: where from here? *Clin Cancer Res* 2007; 13:5988-5990.
7. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New Engl J Med* 2004; 350:2129-2139.
8. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, et al. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:587-595.
9. Subramanian J, Govindan R. Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked. *Lancet Oncol* 2008; 9:676-682.
10. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer (the IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol* 2003; 21:2237-2246.
11. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: A randomized trial. *JAMA* 2003; 290:2149-2158.
12. Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, et al. Epidermal Growth Factor Receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analy-

- sis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol* 2005; 23:8081-8092.
13. **Crinò L, Cappuzzo F, Zatloukal P, et al.** Gefitinib versus vinorelbine in chemotherapy-naïve elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer (INVITE): a randomized, phase II study. *J Clin Oncol* 2008; 26:4253-4260.
 14. **Herbst RS, Johnson DH, Mininberg E, et al.** Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:2544-2555.
 15. **Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al.** Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:123-132.
 16. **Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al.** Results of a phase III trial of erlotinib (OSI-774) combined with cisplatin and gemcitabine (GC) chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2004; 22:619s (abstr.7010).
 17. **Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al.** TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:5892-5899.
 18. **Rosell R, Robinet G, Szczesna A, et al.** Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2008; 19:362-369.
 19. **Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al.** Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000; 18:904-914.
 20. **Socinski MA.** Antibodies to the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer: current status of matuzumab and panitumumab. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (Suppl 15):4597-4601.
 21. **Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al.** Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* 2005; 23:2513-2520.
 22. **Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV, et al.** Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3908-3914.
 23. **Greulich H, Chen TH, feng W, et al.** Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med* 2005; 2: e313.
 24. **Pallis AG, Voutsina A, Kalikaki Ar, et al.** "Classical" but not "other" mutations of EGFR kinase domain are associated with clinical outcome in gefitinib-treated patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2007; 97:1560-1566.
 25. **Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al.** Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:643-655.
 26. **Yatabe Y, Takahashi T, Mitsudomi T.** Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Res* 2008; 68:2106-2111.
 27. **Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, et al.** Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2008; 26:3351-3357.
 28. **Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al.** Erlotinib in lung cancer- molecular and clinical predictors of outcome. *New Engl J Med* 2005; 353:133-144.
 29. **Cappuzzo F.** EGFR FISH versus mutation: different tests, different end-points. *Lung Cancer* May 2008; 60:160-165.
 30. **Zheng Z, Chen T, Li X, et al.** DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 356:800-808.
 31. **Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al.** DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355:983-991.
 32. **Danesi R, Altavilla G, Giovannetti E, et al.** Pharmacogenomics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer and other solid tumors. *Pharmacogenomics* 2009; 10:69-80.
 33. **Davidson JD, Liandong Ma, Flagella M, et al.** An increase in the expression of ribonucleotide reductase large subunit 1 is associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2004; 64:3761-3766.

RESTOR *FAST*™

INTEGRATORE ALIMENTARE

a base di Calcio, Magnesio, Vitamina D₃,
L-carnitina e L-leucina