



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Dottorato di Ricerca Internazionale in
“Medicina Sperimentale Clinica e Fisiopatologia Cellulare” – XXVI ciclo
(Coordinatore: Prof. Enzo S. Vicari)

Tesi di Dottorato

**NUOVI TARGETS MOLECOLARI NEL TRATTAMENTO
DELL'EPATOCARCINOMA. REVIEW DELLA LETTERATURA E NOSTRA
ESPERIENZA**

Dott. GIUSEPPE STEFANO CALVAGNO

Tutor

Prof. Gaetano Bertino

Coordinatore

Prof. Enzo Saretto Vicari

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

Introduzione	pag. 1
Epatocarcinogenesi	pag. 3
Patogenesi molecolare dell'HCC	pag. 6
Fattori di crescita e di angiogenesi e loro vie di signaling nell'HCC	pag. 10
Il BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) Staging System	pag. 12
La TACE convenzionale	pag. 14
TACE con microsfere a rilascio farmacologico	pag. 15
La Radioembolizzazione	pag. 16
Chemioterapia citotossica convenzionale per l'HCC avanzato	pag. 17
Terapia molecolare mirata	pag. 18
Agenti antiangiogenetici	pag. 22
Gli inibitori del sistema mTOR	pag. 26
La nostra esperienza	pag. 27
<i>Materiali e metodi</i>	pag. 27
<i>Risultati</i>	pag. 29
Bersagli molecolari immunologici	pag. 31
Immunosoppressione indotta da HBV e HCV	pag. 36
Immunoterapia attuale e futura per l'HCC	pag. 37
Iconografia	pag. 40
Bibliografia	pag. 47

Introduzione.

Nel corso degli ultimi 15 anni, l'incidenza di carcinoma epatocellulare (HCC) è più che raddoppiato. Ogni anno ci sono 500.000 nuovi casi nella sola regione asiatica, principalmente a causa dell'infezione cronica da virus dell'epatite B (HBV). Più del 60% del numero totale di casi di HCC si verificano nella sola Cina, e si stima che 360.000 pazienti residenti in paesi dell'Estremo Oriente, tra cui Cina, Giappone, Corea e Taiwan, muoiano di questa malattia ogni anno. In Giappone l'HCC correlato all'epatite cronica da virus C (HCV) rappresenta il 70% di tutti i casi. Inoltre, negli Stati Uniti e in Europa, una maggiore incidenza di HCV ha portato ad un aumento dell'incidenza di carcinoma epatocellulare. Fattori di rischio rilevanti per l'alta incidenza di steatosi epatica non alcolica nei paesi occidentali sono l'obesità e il diabete, condizioni che possono pertanto favorire lo sviluppo del cancro al fegato. Per una strategia di trattamento corretta ed efficace nei pazienti con cirrosi epatica, è necessario eseguire una ecografia epatica due volte all'anno. Recentemente, il ruolo dei livelli sierici di AFP è stato valutato essere meno utile di quanto precedentemente ipotizzato. Inoltre, in aggiunta alla AFP ci sono altri biomarcatori, ma sappiamo che nessuno di loro è ottimale. Sono pertanto emersi dati scientifici in base ai quali alcuni biomarcatori di HCC come DCP e GPC-3, hanno attività di mitogeni e promuovono l'angiogenesi nell'HCC e sono fattori che contribuiscono alla crescita del tumore. Il ruolo di questi marcatori tumorali è importante per i fenomeni di epatocarcinogenesi e potrebbero rappresentare una grande opportunità di trattamento. Solo il 30-40% dei pazienti con carcinoma epatico al momento della diagnosi iniziale sono ad uno stadio precoce di malattia (0 o A), secondo la classificazione del Barcellona Clinic Liver

Cancer (BCLC) System, che definisce i pazienti che possono essere trattati con ablazione locale, la resezione o il trapianto di fegato. Il trapianto di fegato consente di raggiungere un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 70%, mentre la radiofrequenza, la chemioembolizzazione arteriosa transcatetere (TACE) o la resezione mostrano tassi più bassi (50-60%) a causa dell'alto tasso di recidiva del tumore (fino al 70% entro 5 anni). Per i pazienti allo stadio intermedio (HCC multifocale asintomatico senza invasione vascolare o metastasi; BCLC fase B), la TACE è considerato lo standard di cura, ottenendo risposta parziale (PR) nel 20-50% dei pazienti e un ampliamento della sopravvivenza media fino a 20 mesi. Negli ultimi dieci anni, nessuna terapia sistemica citotossica convenzionale si era dimostrata pienamente efficace, e questo ha contribuito alla prognosi infausta nei pazienti con HCC. Tuttavia, una migliore conoscenza dei meccanismi di epatocarcinogenesi molecolare offre oggi l'opportunità di approntare una terapia mirata. Un miglioramento significativo della sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) per i pazienti con HCC avanzato si è ottenuto grazie all'uso di farmaci come il sorafenib, un inibitore delle chinasi (Nexavar®, Onyx Pharmaceuticals, CA, USA), il primo rimedio efficace dopo anni di opzioni limitate come molti trials come lo SHARP confermano. Sulla base dei dati SHARP, l'EMA e FDA degli Stati Uniti hanno rilasciato l'autorizzazione per il sorafenib ad essere utilizzato come terapia di prima linea nell'HCC avanzato, nell'ottobre 2007. Il sorafenib è stato utilizzato in gran parte per migliorare l'OS negli HCC avanzati, ma recentemente è stato valutato che in pazienti con una PR dopo 3 mesi di trattamento, questo farmaco non sembrava sufficiente a garantire una significativa possibilità di sopravvivenza e un miglioramento della prognosi. L'obiettivo è pertanto quello di sviluppare più efficaci

terapie mirate a migliorare l'OS sulla scorta delle nuove conoscenze dei meccanismi di epatocarcinogenesi. Molte nuove molecole sono state testate, alcune con attività anti-angiogenica, e altre aventi come target, noti fattori di crescita. Nel prossimo futuro, pertanto, la ricerca scientifica dovrà impegnarsi a sviluppare agenti farmacologici mirati contro uno o più aspetti molecolari del meccanismo di crescita e di progressione dell'HCC. Un'altra forma di strategia si basa sulla combinazione di più agenti farmacologici capaci di colpire il processo epatocarcinogenetico su più livelli contemporaneamente. Probabilmente, la strategia per ottenere i migliori risultati sarà infatti la combinazione di diverse molecole in grado di agire su diversi bersagli molecolari, in grado cioè di far fronte ad un maggior numero di "errori molecolari.

Epatocarcinogenesi.

Epatocarcinogenesi è noto per essere un processo a più fasi molto complesso e quasi ogni via molecolare di crescita sembra essere alterata nella cancerogenesi dell'HCC. Pertanto, nessun meccanismo molecolare sembra essere dominante o patognomonico nell'HCC. L'epatocarcinogenesi è considerata un processo originantesi da cellule staminali epatiche (tuttavia, il ruolo delle cellule staminali del fegato come cellule all'origine del carcinoma epatico è in fase di discussione) o da epatociti maturi come evoluzione di una malattia epatica cronica sostenuta da uno stress ossidativo cronico, infiammazione cronica e morte cellulare seguita da proliferazione illimitata / rigenerazione, e fenomeni di rimodellamento permanente dell'architettura tissutale

del fegato. Danno cronico al fegato causato da HBV, HCV, consumo cronico di alcol, steatoepatite non alcolica, emocromatosi ereditaria, cirrosi biliare primitiva e difetto di alfa 1 antitripsina conducono a danni permanenti sugli epatociti cui fa seguito una massiccia proliferazione cellulare compensatoria e la rigenerazione come risposta a stimolo citochinico. Infine, la fibrosi e la cirrosi si sviluppano in questa impostazione di rimodellamento permanente del fegato, guidato dalla sintesi di componenti della matrice extracellulare da parte delle cellule stellate epatiche. In questo ambiente cancerogeno, lo sviluppo di noduli displastici e iperplastici noduli pongono le basi per il processo di crescita dell'HCC. Tuttavia, l'accumulo sequenziale di eventi molecolari rispetto ai diversi stadi di malattia del fegato (normale tessuto epatico, epatite cronica, cirrosi, noduli iperplastici e displastici e cancro) è solo parzialmente compreso. La patogenesi molecolare dell'HCC coinvolge diverse aberrazioni genetiche / epigenetiche e alterazioni di più vie di signaling che portano alla nota eterogeneità della malattia in termini di biologia e comportamento clinico. Evidenze attuali indicano che nell'epatocarcinogenesi, due meccanismi principali sembrano essere coinvolti: la cirrosi e l'associazione con la rigenerazione epatica dopo danno epatico cronico causato da diversi fattori, e l'accumulo di mutazioni del DNA con alterazione dell'equilibrio oncogenesi / oncosoppressione che porta allo sviluppo di cellule neoplastiche. Diverse importanti vie di signaling cellulare sono state osservate essere parte dell' sviluppo di HCC. La conoscenza di queste cascate di signaling apre diversi modi di focalizzare meglio mirati interventi terapeutici, con l'obiettivo di invertire, ritardare o prevenire la tumorigenesi. Le principali vie di signaling nel HCC sono la RAF / MEK / ERK,

PI3K / AKT / mTOR, WNT / b-catenina, IGF, HGF / c-MET e il fattore di crescita angiogenica, come indicato nella figura 1.

La desgamma-carbossi-protrombina (DCP) è una molecola con attività tipo VEGF, avente cioè attività mitogenica e angiogenica nell'HCC. DCP è un protrombina indotta dall'assenza di vitamina K2, e che è aumentata nel siero di pazienti con HCC. Nelle cellule di HCC, alterazioni genetiche, alterazioni di recettori di membrana per l'assorbimento delle lipoproteine a bassa densità, cambiamenti del citoscheletro e alterazioni dei trasferimenti citoplasmatici coinvolti nel metabolismo della vitamina K potrebbero svolgere un ruolo importante nella produzione di rilevabili livelli sierici di DCP. DCP pertanto non è esclusivamente un biomarcatore diagnostico o prognostico per HCC. In pazienti con carcinoma epatico, la produzione DCP è indipendente dalla carenza di vitamina K, anche se dosi farmacologiche di vitamina K possono transitoriamente sopprimere la produzione di DCP in alcuni tumori. In un modello in vitro, la produzione DCP è stata osservata in cellule HepG2 ed è stata inibita introducendo vitamina K2 nelle cellule trattate. Oltre alla riduzione della produzione DCP, vi è stata una riduzione della crescita e dell'invasività delle cellule di HCC. Pertanto, la somministrazione di vitamina K2, associata con altre terapie di provata efficacia, potrebbe essere considerato come un'opzione promettente per il trattamento di HCC. GPC-3 è un proteoglicano eparan solfato. Recenti studi hanno dimostrato che i livelli GPC3 sono aumentati in pazienti con carcinoma epatocellulare. Si pensa che GPC3 stimoli la crescita delle cellule di carcinoma epatico con meccanismo di up-regulation autocrina / paracrina del sistema Wnt. GPC riesce a stimolare anche la migrazione, l'adesione e l'organizzazione del citoscheletro

in cellule tumorali attraverso la modulazione del signaling di Wnt. I principali fattori nello sviluppo di HCC ed epatocarcinogenesi sono le catene di eparan solfato di GPC-3 in combinazione con altri fattori di crescita eparina-binding. Pertanto, GPC-3 potrebbe essere una interessante nuova terapia molecolare. Una nuova terapia potrebbe essere una combinazione di anticorpi anti-GPC-3 e molecole rivolte al signaling molecolare promosso da GPC3, come l'FGFR.

Patogenesi molecolare dell'HCC.

Negli ultimi anni l'identificazione di diverse nuove vie di signaling, in aggiunta a quelle già note, ha portato allo sviluppo di nuovi farmaci. La patogenesi molecolare dell'HCC coinvolge diverse aberrazioni genetiche / epigenetiche e alterazioni multiple di alcune vie di signaling intracellulare che portano alla eterogeneità nota della malattia in termini di biologia e comportamento clinico. Le aberrazioni molecolari più prevalenti nell'HCC sono i seguenti:

- (a) alterazione nell'espressione genica
- (b) mutazioni somatiche
- (c) instabilità genomica
- (d) alterazioni epigenetiche

Tutti possono essere considerati come potenziali bersagli terapeutici.

(a) Alterazioni dell'espressione genica.

Sono emersi diversi geni candidati a promuovere l'epatocarcinogenesi: c-myc (8q), ciclina A2 (4q), cyclinD1 (11q), Rb1 (13q), AXIN1 (16P), p53 (17p), IGFR1 / M6PR (6q), p16 (9p), e-caderina (16q), SOCS (16P), e PTEN (10q). Amplificazioni o soppressioni cromosomiche sono state identificate in quasi tutti i tumori, essendo le amplificazioni più diffuse di 1Q (58% -78%), 6p, 8q, 17q e 20q, e delezioni nel 4 ° trimestre, 8p, 13q, 16q e 17p. Amplificazioni di alto livello sono state rilevate in 11q13 (regioni codificanti per ciclina D1) e 6p21 (regioni codificanti per VEGFA). Sono necessarie ulteriori ricerche per identificare altri oncogeni chiave.

(b) Mutazioni somatiche.

Poche mutazioni somatiche sono state descritte in pazienti con HCC, anche se questa può rappresentare un'area di grande interesse scientifico poiché si prevede nel prossimo futuro un suo potenziamento, grazie all'introduzione della tecnologia su larga scala del sequenziamento genetico. TP53, un gene soppressore del tumore coinvolto nel controllo del ciclo cellulare, la riparazione del DNA, l'apoptosi e la differenziazione, risulta mutata nel 27% dei casi (range 0-67%). L'esposizione in Africa e in Asia all'aflatossina B è associata con una mutazione G-to-T di p53 alla terza posizione del codone 249. Le mutazioni della beta-catenina in esone 3 sono presenti nel 17% dei casi di HCC e nel 60% dei casi di epatoblastoma . Meno frequenti mutazioni somatiche sono state descritte in AXIN1, fosfoinositolo 3-

chinasi A (PI3KA), e K-Ras. Al contrario, le mutazioni prevalenti in altri tipi di tumore, come il fattore di crescita epidermico (EGFR), Her2 / nu fosfatasi e tensina omologo (PTEN), o H-Ras, sono marginali in HCC, mentre non sono state descritte mutazioni germinali.

(c) Instabilità genomica.

Questo fenomeno è associato con l'accorciamento dei telomeri, fenomeni di metilazione aberrante, e aberrazioni in geni implicati nei meccanismi di riparazione di mismatch. L'attività della telomerasi è aumentata in quasi il 90% di HCC umano e è correlata all'integrazione di HBV nel locus telomerasi della trascrittasi inversa (TERT), all'amplificazione del gene che codifica per la componente telomerasi RNA (TERC), o la perdita allelica del cromosoma 10p, una regione che codifica per un repressore telomerasi. Un'alta instabilità genomica è stata associata con la sottoclasse di HCC HBV-correlata.

(d) Alterazioni epigenetiche.

Alterazioni epigenetiche dell'espressione genica avvengono a causa di fenomeni di abnorme e incontrollata metilazione di specifiche regioni genetiche promotrici e/o regolatrici. Il DNA delle cellule tumorali del fegato presentano molte regioni sede di ipermetilazione su uno sfondo di ipometilazione globale. L'ipermetilazione colpisce porzioni geniche localizzate in regioni promotrici di geni oncosoppressori come p16INK4a, E-caderina, NORE1A, RASSF1, IGFR-II / MP6, e BRCA1. Agenti con

capacità di demetilazione permettono una ri-espressione di queste regioni e con essa il ripristino delle loro funzioni antineoplastiche.

Oltre a questi fenomeni che sono comuni al processo di carcinogenesi di altri tessuti e che sono indipendenti dall'eziologia del danno epatico, esistono alcune caratteristiche speciali di epatocarcinogenesi a seconda del tipo di danno epatico cronico. L'HBV codifica per proteine (come HBx) con proprietà oncogeniche, legandosi e inattivando il gene p53, uno dei più noti e potenti geni oncosoppressori e protettori dal danno da stress ossidativo. Inoltre, l'integrazione del genoma HBV è stata associata con elevata instabilità cromosomica. L'epatocarcinogenesi indotta da HCV è particolarmente correlata all'apoptosi e alla successiva rigenerazione dei noduli epatici, sostenuta dalla intensa risposta immunologica di questa forma di epatite cronica. Oltre interazioni dirette con i componenti della proteina chinasi mitogeno-attivata (MAPK) e con p53, un meccanismo ossidativo stress-mediated è certamente coinvolto, come è stato valutato anche nell'epatocarcinogenesi alcol indotta. Infine, l'accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche porta ad una attivazione di oncogeni e inibizione di geni oncosoppressori accompagnati da un aumento dell'instabilità genetica e l'attivazione di vie di signaling legate ai principali promotori del processo di epatocarcinogenesi, vale a dire, la proliferazione cellulare e la neoangiogenesi. Tuttavia, come è noto da studi di espressione genica (analisi di microarray), non esiste una sola via di signaling nell'HCC che abbia carattere dominante o patognomonico, e il concetto di un processo a più fasi spiega perché l'uso di singoli agenti farmacologici mirati non consentano di ottenere tuttavia una risposta completa di guarigione.

Fattori di crescita e di angiogenesi e loro vie di signaling nell'HCC.

Anche se gli HCC sono fenotipicamente e geneticamente tumori eterogenei, diverse vie di signaling, come la via Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK), la fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K)/Akt/bersaglio della rapamicina nei mammiferi (mTOR)/Wnt/beta catenina sono tutti stati più volte identificati come importanti per la proliferazione cellulare dell'HCC e per la promozione dell'angiogenesi. Inoltre sulle cellule di HCC sono stati identificati recettori per fattori di crescita e fattori angiogenici, come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), e il fattore di crescita epidermico (EGF). La via MAPK, spesso sovra regolata nell'HCC, comprende una cascata di fosforilazione delle quattro principali chinasi cellulari, Ras, Raf, la proteina chinasi attivata da mitogeno extracellulare (MEK), e la chinasi regolata da segnale extracellulare (ERK). Diversi membri della famiglia EGF e TGF-alfa hanno dimostrato di svolgere un ruolo cruciale nella proliferazione dell'HCC. EGF (EGFR) è spesso espresso nell'HCC e la sua sovra espressione ha dimostrato essere un fattore prognostico negativo indipendente per recidiva precoce del tumore e per lo sviluppo di metastasi extraepatiche. L'EGFR può essere diretto target di terapia sia con cetuximab, anticorpo monoclonale, che bersaglio di altre molecole che inibiscono la tirosina chinasi intracellulare (erlotinib, gefitinib, e lapatinib). L'EGF, il fattore di crescita epatocitario (HGF), il VEGF, il PDGF sono in grado di attivare questo percorso e indurre la trascrizione dei geni della famiglia AP-1, come c-fos e c-jun coinvolti nella proliferazione e differenziazione dell'HCC. L'agente molecolare attualmente più promettente, attivo all'interno di questo percorso biomolecolare è il sorafenib,

inibitore della Raf chinasi che, in aggiunta, ha come bersaglio le tirosin-chinasi del VEGFR e del PDGFR.

L'HCC è un tumore ipervascolarizzato per cui sia la proliferazione cellulare che la neoangiogenesi contribuiscono alla iniziazione e progressione del tumore. La neoangiogenesi gioca un ruolo cruciale in ogni fase dell'HCC, e fornisce il razionale per l'impiego degli inibitori angiogenetici come nuova classe di farmaci per il trattamento di questa neoplasia. Pertanto, la terapia mirata dell'HCC deve comprendere entrambi gli aspetti e, pertanto, le vie di signaling di VEGF / EGFR e la via della MAPK sono state ben studiate anche in ambito clinico. Il VEGF come mediatore centrale di angiogenesi è spesso espresso nell'HCC e i livelli di VEGF correlano con l'attività angiogenica, la progressione del tumore, e la prognosi infausta. I suoi effetti sono mediati attraverso la sua interazione con i recettori tirosina chinasi, cioè VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1 / Kdr), e VEGFR-3 (Flt-4), che si trovano sulle cellule endoteliali. L'angiogenesi e in particolare la via del VEGFR possono essere bersaglio sia dell'anticorpo monoclonale bevacizumab o essere modulate mediante l'inibizione di altre tirosin-chinasi intracellulari da parte di altre piccole molecole come il sorafenib o il sunitinib.

Altri fattori rilevanti per l'angiogenesi sono fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF), l'HGF e le angiopoietine. La via di signaling PI3k/Akt/mTOR che si trova a valle di vari recettori legati all'attivazione di tirosin-chinasi, sono upregulated nei pazienti con carcinoma epatico e controllano la proliferazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare e la sospensione del fenomeno dell'apoptosi. Sono state identificate altre vie di signaling

potenzialmente responsabili di epatocarcinogenesi: fattore di transizione c-mesenchimale-epiteliale (Met)/HGF, il fattore di crescita insulino-simile, il fattore nucleare-kB (Figura 1).

Il BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) Staging System.

Più opzioni terapeutiche sono attualmente disponibili per il trattamento del carcinoma epatocellulare e, quindi, la valutazione della prognosi e la scelta del trattamento sono passi cruciali nella gestione dei pazienti affetti da questa malattia. Poiché questa neoplasia è di solito associata ad una malattia epatica cronica, qualsiasi tentativo di valutare la prognosi dovrebbe includere non solo informazioni sul tumore, ma anche una valutazione accurata della riserva della funzione epatica. Inoltre, la presenza di sintomi correlati al cancro è stato identificato come un fattore predittivo indipendente di prognosi. La classificazione secondo il Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) System ha definito un sottogruppo di pazienti classificati come HCC di stadio intermedio, che non sono considerati ammissibili al trattamento curativo chirurgico (ablazione, resezione o trapianto), ma possono beneficiare della chemioembolizzazione arteriosa come *standard of care*. Tuttavia, questa popolazione di pazienti rimane eterogenea per quanto riguarda la massa tumorale, la funzionalità epatica e le caratteristiche cliniche. La maggior parte dei criteri di classificazione si basa su un'analisi delle relazioni tra parametri clinici, radiologici o patologici e la sopravvivenza, che alla fine si traducono in un punteggio composito o un'equazione derivata. Alcuni di questi strumenti, come ad esempio il Cancer of the Liver Italian

Program Scoring System (CLIP Score) può essere utile nel predire la prognosi individuale (sia globale che a seconda della opzione di trattamento), in particolare nello stadio avanzato, ma allo stato attuale l'unico algoritmo che stratifica i pazienti in base al risultato e contemporaneamente correla la stadiazione della malattia con l'indicazione al trattamento è il sistema di stadiazione BCLC (Figura 2). Il sistema di classificazione BCLC può predire la prognosi sulla base di una serie di variabili: in primo luogo, quelli relativi al tumore, compreso il numero di noduli epatici e la loro dimensione, la diffusione extraepatica e l'invasione vascolare; in secondo luogo, il grado di impairment della funzione epatica secondo la classificazione di Child-Pugh, i livelli sierici di bilirubina, e la presenza di ipertensione portale; infine, lo stato di salute generale del paziente, sulla base dello status Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Il sistema BCLC riconosce quattro principali gruppi prognostici. La fase molto precoce e precoce (BCLC 0 / A), comprende i pazienti con malattia limitata (una lesione solitaria, o fino a tre noduli ≤ 3 cm) confinati al fegato e la funzione epatica preservata, che sono candidati per trattamenti potenzialmente curativi (resezione, trapianto di fegato e ablazione). La fase intermedia (BCLC B) comprende quei pazienti con tumori di grandi dimensioni multifocali senza invasione vascolare o diffusione extraepatica, e in cui la funzionalità epatica è preservata e sintomi correlati al cancro non sono presenti; questi pazienti sono candidati per la chemioembolizzazione transarteriosa (TACE). La fase avanzata (BCLC C) si riferisce a pazienti con diffusione extraepatica, invasione vascolare e / o sintomi correlati al cancro lievi (ECOG di grado 1-2). Infine, i pazienti con malattia terminale stadio (BCLC D) sono i pazienti con funzionalità epatica scadente (Child-Pugh fase C) che non sono candidati al trapianto di fegato e che presentano un HCC

di grado molto avanzato con severi sintomi correlati alla malattia neoplastica, segno spesso di elevata massa tumorale allo studio radiologico; questi pazienti hanno una prognosi infausta e richiedono cure palliative. Diversi approcci terapeutici potenzialmente efficaci sono stati testati in pazienti con stadio intermedio di HCC. Nonostante varie terapie hanno dimostrato una certa efficacia, la TACE è l'unico trattamento che ha mostrato un beneficio in termini di sopravvivenza in questa popolazione ed è attualmente ampiamente accettato nelle attuali linee guida per il trattamento dell'HCC. LA TACE ed altri trattamenti transcateretere TC o Eco-guidati si basano sulla ricca vascolarizzazione arteriosa dell'HCC rispetto al parenchima epatico circostante. Questo sistema di ricca vascolarizzazione permette l'immissione selettiva di farmaci antineoplastici per via intravascolare (particelle embolizzanti/ischemizzanti, o micro particelle radioattive) all'interno cioè dei vasi arteriosi afferenti al tumore, allo scopo di indurre necrosi.

La TACE convenzionale.

Nella TACE convenzionale si procede all'infusione intra-arteriosa di un agente chemioterapico come la doxorubicina o cisplatino, spesso incorporati in lipiodol ultrafluido come veicolo per aumentare l'esposizione del tumore al farmaco, seguita da embolizzazione del vaso sanguigno con agenti embolici. Questo metodo determina un forte effetto citotossico che si combina con ischemia e quindi morte tissutale tumorale. La TACE è stata ampiamente valutata negli ultimi tre decenni. Questi studi positivi costituiscono la base scientifica per l'accettazione della TACE come il trattamento standard per l'HCC di grado intermedio.

La TACE è operatore-dipendente e l'eterogeneità delle tecniche e degli agenti utilizzati potrebbero spiegare le variazioni nei risultati. Inoltre anche se i benefici in termini di OS con l'impiego della TACE sembrano ormai chiari, è anche vero che non tutti i pazienti con HCC di stadio intermedio possono essere candidati alla chemioembolizzazione. Di conseguenza, la popolazione ideale per la TACE è composta da pazienti asintomatici con un HCC isolato o con HCC multifocali senza invasione vascolare o diffusione extraepatica e con funzione epatica ben conservata (classe Child-Pugh A o B ben compensato).

TACE con microsfere a rilascio farmacologico (Drug-eluting beads, DEBs).

Le microsfere “drug-eluting” hanno la capacità di sequestrare attivamente un farmaco e quindi rilasciarlo lentamente, in modo controllato e costante, dopo l'inserimento all'interno del sistema vascolare del tumore. Lo sviluppo di questa metodologia ha consentito di ridurre la quantità di agente chemioterapico che raggiunge la circolazione sistemica rispetto alle tecniche convenzionali che impiegano la TACE e il lipiodol come veicolo, aumentando notevolmente la concentrazione locale del farmaco e quindi l'efficacia antitumorale. L'efficacia e la sicurezza di DEB-TACE sono state ampiamente valutate in diversi recenti studi. Pubblicati nel 2010, i risultati dello studio multicentrico randomizzato di fase II PRECISION V hanno mostrato che la DEB-TACE con doxorubicina come agente chemioterapico era meglio tollerata della TACE convenzionale con doxorubicina, a causa di una significativa riduzione degli eventi avversi correlati alla doxorubicina ($P = 0,0001$). Malagari et al. hanno dimostrato un significativo aumento della

sopravvivenza globale di 43,8 mesi in 173 pazienti trattati con DEB-TACE, a quattro anni. Gli autori hanno riportato cinque decessi correlati al trattamento (tasso del 2,9%), due associati con ascessi epatici e tre che hanno sviluppato un'insufficienza epatica terminale.

La Radioembolizzazione.

Una nuova frontiera della terapia mini invasiva endovascolare nel distretto epatico è rappresentata dalla radioembolizzazione (TARE). La procedura consiste nell'infusione diretta nelle arterie epatiche, attraverso un apposito catetere, di micro particelle di vetro (TheraSphere, MDS Nordion) o resina (SIR_Spheres, Sirtex Medical Ltd) impregnate con un isotopo, l'Ittrio-90, che le rende radioattive. Sono particelle piccolissime (15-35 μ m di diametro massimo, all'incirca un quarto di un capello) che, una volta iniettate selettivamente nell'arteria epatica, viaggiano all'interno del letto vascolare fino ai rami arteriosi più piccoli che irrorano la lesione neoplastica (le arteriole distali), dove restano "intrappolate": è a questo livello che le β - emissioni dell'isotopo radioattivo irradiano il tumore, in maniera super-selettiva. Rispetto alla radioterapia tradizionale esterna, in cui l'irradiazione coinvolge anche il tessuto epatico sano e la dose massima è limitata (30-40 Gy) per il rischio di sofferenza epatica radio-indotta (epatite post-attinica), con la radioembolizzazione il tessuto tumorale, caratterizzato da una vascolarizzazione maggiore rispetto al parenchima epatico sano circostante, è irradiato direttamente grazie al rilascio intra-arterioso delle microsfeere e può pertanto ricevere una dose maggiore (120 Gy), con

solo minima irradiazione del tessuto sano circostante (la penetrazione media delle radiazioni β all'interno dei tessuti è infatti di soli 2,5 mm). Presentando un diametro inferiore ai 35 μm , le microsfele impiegate nella TARE sono in grado, inoltre, di ridurre l'angiogenesi post-trattamento embolizzando ed inibendo lo sviluppo dei microscopici vasi anastomotici peritumorali. Le ridotte dimensioni di queste micro particelle, punto di forza della procedura, sono, tuttavia, anche responsabili delle eventuali complicanze ad essa correlate: esse possono raggiungere, infatti, anche i vasi terminali dei dotti biliari, determinando complicanze specifiche quali stenosi duttali e colecistiti. A differenza di quanto avviene per le terapie di ablazione locale, la chirurgia e la radioterapia tradizionale, la procedura di radioembolizzazione non è limitata né dal numero, né dalla localizzazione, dalla distribuzione o dal diametro delle lesioni epatiche (a partire da un diametro minimo di 3 mm, fino ad un volume massimo che non ecceda il 70% dell'intero volume epatico): sono candidabili all'intervento tutti quei pazienti non sottoponibili all'intervento chirurgico, che siano in buone condizioni generali e che abbiano un'adeguata riserva funzionale epatica (bilirubina totale $< 2.0 \text{ mg/dL}$, albumina $> 3.0 \text{ mg/dL}$, piastrine $> 50 \times 10^6$) e una funzionalità renale accettabile (creatinina $< 2.0 \text{ mg/dL}$).

Chemioterapia citotossica convenzionale per l'HCC avanzato.

Sebbene la TACE sia considerata l'opzione standard di prima linea per il trattamento dei pazienti con stadio intermedio di HCC, sono state proposte altre terapie con attività antitumorale. Il potenziale beneficio di questi approcci terapeutici alternativi

è stato valutato in studi prospettici controllati. L'utilizzo di tali strategie alternative alla TACE sono solitamente considerate sia quando la malattia è progredita dopo la TACE, sia se questa opzione di trattamento non è percorribile. La gestione dei pazienti con HCC avanzato è stata finora caratterizzata da opzioni terapeutiche limitate a causa della mancanza di efficacia dei tradizionali schemi di chemioterapia citotossica. In realtà, l'HCC è altamente refrattario alla chemioterapia citotossica e, fino ad ora, la chemioterapia sistemica tradizionale non ha fornito tassi di risposta soddisfacenti né portato ad un aumento della sopravvivenza di tali pazienti. Si è visto infatti che i pazienti con HCC hanno bisogno di sedute di chemioterapia più frequenti a causa di meccanismi di resistenza ai farmaci da parte delle cellule tumorali. La resistenza intrinseca farmacologica delle cellule tumorali è mediata da noti meccanismi di *multi drug resistance* (MDR). Inoltre, tale resistenza è determinata anche da mutazioni inattivanti il sistema di p53 e fenomeni di sovra espressione della DNA topoisomerasi II. Inoltre, bisogna considerare che la cirrosi epatica e la disfunzione epatica complicano la somministrazione della chemioterapia sistemica inducendo modifiche nelle farmacocinetiche di tali sostanze.

Terapia molecolare mirata.

La conoscenza dei meccanismi molecolari di epatocarcinogenesi ha notevolmente ampliato l'orizzonte per il trattamento dei pazienti con HCC avanzato. Nel corso degli ultimi anni, diversi agenti aventi bersaglio molecolare sono stati valutati in studi clinici (Figura 3). Nonostante valori modesti di risposta secondo i criteri di

valutazione della risposta nei tumori solidi (RECIST), diversi studi hanno dimostrato incoraggianti risultati in termini di prolungamento del tempo di progressione (TTP), stabilizzazione della malattia (DS) e la sopravvivenza.

Sorafenib

Sorafenib (BAY43-9006) è attualmente l'unico trattamento sistemico non citotossico approvato per l'HCC. E' stato approvato per la terapia dei pazienti asintomatici con HCC e funzione epatica conservata che non siano candidati ai trattamenti potenzialmente curativi, come la resezione chirurgica o il trapianto di fegato, ed è la prima terapia sistemica approvata dalla FDA per i pazienti con HCC di grado avanzato. La sua efficacia e la sicurezza nei pazienti con carcinoma epatocellulare è stata dimostrata nel trial SHARP in un campione di pazienti occidentali. Il sorafenib è un inibitore delle chinasi che mostra proprietà anti-tumorali inibendo la proliferazione cellulare e l'angiogenesi, attraverso l'inibizione della serina/treonina chinasi Raf-1 / B-Raf, e della tirosin-chinasi del VEGFR-2 / -3 e del PDGFR- β . Questo inibitore delle chinasi somministrato per via orale, ha mostrato la capacità di bloccare la neoangiogenesi e di indurre apoptosi in molte linee cellulari tumorali, sebbene i meccanismi non sono completamente compresi. Ci sono sette studi che hanno studiato il sorafenib da solo in mono somministrazione, su un totale di 1.072 pazienti, divisi in due studi di fase I, tre studi di Fase II e due studi di fase III randomizzati, controllati vs placebo. Nel complesso i risultati ottenuti hanno mostrato una gamma di controllo della malattia (DCR) che va dal 26 all'82%. Eventi

avversi importanti (EA, di grado 3 o 4), come la sindrome mano-piede (HFS), diarrea e affaticamento, sono stati descritti in tutte i trials, ma con ampie variazioni nella frequenza di comparsa. HFS variava dal 3% al 27%, la diarrea dallo 0% all'82% e l'astenia dallo 0% al 91%. I due trials maggiori (multicentrici, di fase III, in doppio cieco, controllati con placebo, con pazienti randomizzati, con HCC avanzato che non avevano ancora ricevuto terapia sistemica) sono lo SHARP Trial e il trial Pacific-Asia, i cui risultati sono riassunti nella tabella 1. Quattordici studi hanno valutato sorafenib in combinazione con altri trattamenti su un totale di 470 pazienti, secondo modalità analoghe agli studi sul sorafenib in mono terapia ma con un numero inferiore di pazienti. Questi studi sembrano descrivere migliori risultati in termini di OS, TTP e DCR rispetto a quelli osservati negli studi "sorafenib only", anche se una comparazione diretta tra tutti questi studi sembra difficile da valutare. Il sorafenib in combinazione con altri agenti non mostra maggiore tossicità, ma l'HFS sembra essere molto più frequente, soprattutto in combinazione con il fluorouracile e i suoi derivati.

Sunitinib.

La causa più comune di morte in HCC è dovuta alla recidiva del tumore e alla comparsa di metastasi. L'impiego di inibitori del VEGF non ha mostrato il raggiungimento dei principali outcomes clinici attesi, nonostante i risultati positivi ottenuti negli studi preclinici. Tra questi, solo il sorafenib è ha dimostrato di migliorare la sopravvivenza in modo significativo nei pazienti con carcinoma epatocellulare. Recentemente, un altro inibitore del VEGF, chiamato Sunitinib, ha dimostrato alcuni benefici intermini di sopravvivenza nei pazienti con HCC, ma non

nei pazienti con HCC su infezione cronica da HCV. Il sunitinib (SU11248, Sutent®, Pfizer, NY, USA) è un inibitore orale multichinasico che ha come target alcuni recettori associati a tirosin chinasi, quali VEGF1 / 2 e PDGFRA / b, implicati nella proliferazione e nell'angiogenesi dell'HCC. Inoltre, è stato definito come un inibitore di CKIT, FIT3 e RET. Tuttavia il sunitinib sembra avere effetti collaterali più severi. Nello studio di Huynh et al. , eseguito su modelli animali, gli autori hanno voluto confrontare l'efficacia di sunitinib rispetto al sorafenib. Entrambi sono potenti inibitori delle tirosin chinasi, coinvolte nella crescita tumorale, nell'angiogenesi e nel fenomeno delle metastasi. Tuttavia le proprietà anti-tumorali e gli effetti pro-apoptotici del sorafenib sono maggiore di quelle espresse dal sunitinib. Questi dati sembrano confermare un'apparentemente maggiore efficacia del sorafenib in termini di attività antitumorale, se paragonato al sunitinib. Tuttavia, queste osservazioni devono essere ancora verificate nell'uomo.

Linifanib.

Linifanib (ABT869) è un inibitore della tirosina chinasi multitarget che inibisce più membri del VEGFR e del PDGFR. In un modello di xenotrapianto di HCC, ABT869 riduce significativamente la massa tumorale e mostra valori di TTP mediano di 3,7 mesi e un profilo di sicurezza accettabile.

Tivantinib.

Tivantinib (ARQ 197) è un nuovo inibitore selettivo orale delle chinasi MET che agisce bloccando la crescita e inducendo apoptosi nelle linee cellulari tumorali umane che esprimono MET. MET è un recettore associato a tirosin chinasi coinvolte nello sviluppo del tumore e nella progressione metastatica, che è codificato da un protooncogene MET. Quando si associa a HGF, MET attiva la RAS-MAPK e PI3K. L'attività antitumorale del tivantinib è stata dimostrata in modelli murini e la sua efficacia è stata confermata su linee cellulari di HCC. In ultima analisi, studi preclinici sul tivantinib in combinazione con il sorafenib hanno dimostrato buone opportunità terapeutiche per l'attività sinergica di questi due farmaci, come recentemente confermato da uno studio clinico di fase I. In conclusione, tivantinib può fornire un'opzione per il trattamento di seconda linea in pazienti affetti da HCC avanzato con cirrosi compensata (Child A o B) soprattutto se il tumore esprime MET.

Agenti antiangiogenetici.

Bevacizumab.

Bevacizumab (Avastin, Genentech, CA, USA), un anticorpo monoclonale ricombinante che ha come bersaglio il VEGF, è uno dei farmaci centrali nel

trattamento del tumore del colon-retto, poiché è capace di inibire la crescita del tumore e la progressione delle metastasi. Molti studi di fase II hanno esaminato bevacizumab sia come agente singolo sia in combinazione con chemioterapia convenzionale, come gemcitabina e oxaliplatino o con capecitabina e oxaliplatino. Come agente singolo ha raggiunto livelli di risposta fino al 13% dei pazienti, mentre in combinazione con gemcitabina / oxaliplatino ha mostrato un tasso di risposta del 20%, con un ulteriore 27% dei pazienti con DS. Buoni risultati sono stati ottenuti anche con capecitabina e oxaliplatino (PR: 11%; DS: 78%). Un recente studio condotto da Kaseb et al. ha valutato l'uso di bevacizumab in combinazione con erlotinib in pazienti con HCC avanzato e ha ottenuto risultati incoraggianti. Tuttavia, a parte alcune controindicazioni (malattia cardiovascolare e renale) rispetto ad altri agenti chemioterapici, il rischio di eventi tromboembolici emorragici risulta maggiore e necessita di ulteriori valutazioni. Inoltre, a causa delle piccole dimensioni del campione, la natura non randomizzata e l'impostazione mono braccio in questi studi nessuna raccomandazione pratica per l'uso clinico di routine di bevacizumab può essere confermata al momento. Fang e colleghi hanno eseguito una revisione sistematica della efficacia e la sicurezza del bevacizumab per il trattamento del carcinoma epatocellulare avanzato. La PFS e l'OS riportati in questi studi sono stati valutati con medie comprese tra 5,3 e 9,0 mesi e 5,9 e 13,7 mesi, rispettivamente. L'aumento dei livelli sierici di aspartato transaminasi e alanina transaminasi sono stati frequentemente osservati (13%), così come la fatica (12%), l'ipertensione (10%), la diarrea (8%) e la neutropenia (5%). Il sanguinamento da rottura di varici esofagee è stato osservato nel 30% dei pazienti. Bevacizumab può rappresentare un'opzione di trattamento praticabile per l'HCC avanzato. La sua efficacia sembra

confrontarsi positivamente con quella del sorafenib. In sei degli otto studi di fase II su bevacizumab, è stato segnalato come i tassi di OS mediana sono simili o superiori a quelli riportati nei due maggiori trials per il sorafenib, lo SHARP e l'Asia-Pacifico. Dai dati di questo studio emerge che questi pazienti non possono ricevere alcun beneficio dal trattamento con bevacizumab / erlotinib se sono refrattari a sorafenib, ma è importante considerare che questo processo comprendeva un piccolo numero di pazienti (n = 10) per cui i dati non sono attendibili. Altri studi sono necessari per caratterizzare ulteriormente il profilo di efficacia e sicurezza di bevacizumab, per determinare quali pazienti hanno più probabilità di trarre beneficio dal trattamento e come bevacizumab può essere integrato in modo ottimale tra le strategie di trattamento di HCC.

Brivanib.

Il Brivanib, un selettivo inibitore FGF e VEGF, è stato recentemente descritto avere attività come antineoplastica nell'HCC avanzata. Nello studio open-label di fase II di Finn et al., il brivanib è stato considerato come terapia di seconda linea nei pazienti affetti da HCC avanzato che non erano stati trattati con successo con terapia antiangiogenica precedentemente. In questo studio, brivanib è stato somministrato per via orale alla dose di 800 mg una volta al giorno. Gli endpoints primari erano il tasso di risposta del tumore, il tempo di risposta, la durata della risposta, PFS, OS, DCR, TTP, e la sicurezza e la tollerabilità. Quaranta sei pazienti sono stati trattati. Il tasso di risposta del tumore è stato del 4,3%; la DCR è stata del 45,7%. L'OS

mediana è stata di 9,79 mesi. La TTP mediana era di 2,7 mesi. Gli eventi avversi più comuni sono stati affaticamento, diminuzione dell'appetito, nausea, diarrea e ipertensione. Gli autori concludono che brivanib ha un profilo di sicurezza gestibile ed è uno dei primi agenti a mostrare promettente attività antitumorale nei pazienti con carcinoma epatico avanzato trattati con sorafenib prima. Tuttavia, dati più recenti hanno mostrato che i pazienti con brivanib non ha raggiunto l'endpoint primario.

Ramucirumab.

Il ramucirumab è un anticorpo monoclonale inibitore specifico del VEGFR2. Uno studio di 42 pazienti con epatocarcinoma avanzato e funzionalità epatica conservata (Child – Pugh A) ha mostrato che la monoterapia con ramucirumab ha prodotto un DCR del 50% e una PFS mediana di 4,3 mesi. Questo studio positivo ha incoraggiato l'avvio della fase III (REACH in HCC), che compara ramucirumab con placebo e con sorafenib. Il trial REACH è quindi stato completato, ma i suoi risultati non sono ancora disponibili.

Cabozantinib.

Cabozantinib agisce come un inibitore di cMet e VEGFR2, inibendo l'attività della tirosin-chinasi di RET, MET, VEGFR1, 2 e 3, KIT, TRKB, FLT3, AXL e Tie2. Verslype et al. ne hanno dimostrato la potenziale attività anti-tumorale in uno studio randomizzato di Fase II. È interessante notare che i benefici clinici sono stati osservati a prescindere dal fatto che i pazienti avessero ricevuto un precedente trattamento con sorafenib. Studi di fase III dovrebbero valutare l'efficacia di

Cabozantinib versus placebo, e valutare l'OS in pazienti con HCC avanzato che sono già stati trattati con altri sistemi. L'OS rappresenta anche in questi studi l'endpoint primario, e il tasso di risposta e la PFS secondo il RECIST1.1 erano gli endpoints secondari. Endpoint aggiuntivi: la sicurezza e la tollerabilità di cabozantinib; farmacocinetica; variazione dal basale dei livelli di alcuni biomarcatori tumorali nel siero; la qualità di vita, come valutato dal questionario Euro QoL (quality of life).

Gli inibitori del sistema mTOR (acronimo di mammalian target of rapamycin, bersaglio della rapamicina nei mammiferi).

Temsirolimus ed *Everolimus* sono due inibitori del sistema mTOR. In uno studio di fase 3 Zhu e colleghi hanno valutato l'efficacia e la sicurezza dell'everolimus in pazienti con HCC avanzato progredito durante o dopo il trattamento con sorafenib (EVOLVE-1 NCT01035229). I pazienti con BCLC stadio B o C e Child-Pugh A sono stati randomizzati 2:1 everolimus 7.5 mg vs placebo. Tutti i pazienti hanno ricevuto terapia di supporto. La randomizzazione è stata stratificata per regione (Asia vs resto del mondo) e l'invasione macrovascolare (sì vs no). Il farmaco in studio è stato dato in continuo fino alla progressione della malattia o alla comparsa di fenomeni di tossicità elevata. L'endpoint primario era la sopravvivenza. Endpoint secondario era il TTP. In questo studio l'everolimus non ha migliorato l'OS nei pazienti con HCC avanzato o progredito durante o dopo sorafenib, o che erano intolleranti al sorafenib. Vi è una forte razionale anche nella combinazione tra un inibitore di m-TOR (temsirolimus) e un inibitore del VEGF (bevacizumab) come

trattamento dell'HCC. Entrambe le molecole hanno mostrato una modesta attività in monoterapia. Knox e colleghi hanno partecipato alla sperimentazione di fase II di temsirolimus (TEM) e bevacizumab (BEV) in pazienti con HCC avanzato. Questo studio multicentrico è il primo che associa il BEV al TEM. Nonostante una tossicità gestibile, l'ORR e PFS non superano quelli attesi per il trattamento con BEV in monoterapia. Pertanto ulteriori studi di combinazione BEV / TEM in questa popolazione di pazienti con HCC avanzato non è raccomandato. L'Università della California sta conducendo uno studio di fase II della combinazione di temsirolimus e sorafenib nel carcinoma epatocellulare avanzato. Questo studio di fase II è stato sviluppato a seguito del completamento di un studio di fase I della combinazione di temsirolimus e sorafenib in 25 pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato (da dicembre 2009 ad aprile 2012). La dose massima tollerata (MTD) e dose raccomandata di fase II (RP2D) della combinazione sono temsirolimus 10mg IV settimanale più sorafenib 200 mg (via orale, due volte al giorno).

LA NOSTRA ESPERIENZA

Materiali e metodi.

Durante un periodo di trattamento - osservazione durato 18 mesi, la nostra U.O. di Malattie del Fegato, su una popolazione di 32 soggetti caucasici di età media pari a 65 ± 0.9 , affetti da HCC, ha selezionato un campione di 28 pazienti, 20 di sesso maschile e 8 di sesso femminile ($p < 0.001$), con HCC di grado intermedio / avanzato,

classificato e stratificato secondo i criteri della BCLC Staging System, eleggibili di trattamento farmacologico con sorafenib in monoterapia, come indicato dalle più recenti linee guida. La tabella 2 mostra la distribuzione del nostro campione in rapporto al grado di cirrosi Child A e B. Abbiamo inoltre valutato la coesistenza di malattie sistemiche e alterazioni cronico-degenerative di natura metabolica eventualmente associate, come il diabete mellito e la steatoepatite non alcolica, ossia la presenza di condizioni in grado di influenzare, tramite l'insulina – resistenza, la progressione della malattia tumorale e la risposta al farmaco o di modificare l'aderenza alla terapia, e quindi l'outcome dei pazienti trattati, in ragione di un loro ruolo nel modificare la frequenza e la severità di alcuni eventi avversi registrati durante il periodo di osservazione come l'astenia e l'ipertensione. L'approvazione e l'indicazione all'uso del sorafenib per il trattamento dell'HCC alla dose di 800 mg / die è basata sui dati del noto studio di fase III randomizzato controllato, condotto su un campione di popolazione occidentale, lo SHARP Trial, ed è stata confermata da un altro studio di fase III simile condotto in Asia (Pacific-Asia Trial).

Il sorafenib alla dose di 800 mg / die è lo *standard of care* raccomandato per i pazienti con avanzato HCC. Si raccomanda anche per i pazienti con HCC intermedio che non sono eleggibili di trattamento con TACE o che presentano malattia non responsiva alla TACE. Ad oggi non sono disponibili trials che abbiano confrontato dosaggi di partenza diversi dalla dose attualmente approvata di 800 mg/die. I nostri pazienti sono stati studiati attraverso secondo un pannello standard di valutazioni cliniche, laboratoristiche e strumentali ben codificate (ecografia addome e TC addome contrastografica) al tempo 0 e quindi secondo controlli ravvicinati in

particolar modo durante le prime 4 – 6 settimane di trattamento, poiché è noto che la maggiore incidenza di eventi avversi all’impiego del sorafenib avviene nel corso del primo mese di terapia, per poi presentare generalmente un profilo di progressiva riduzione della loro frequenza di comparsa e della loro severità nella maggior parte dei pazienti.

Risultati.

Oltre alla stratificazione sulla base del grado di HCC e del grado di cirrosi presentato al momento del reclutamento, la tabella 2 riassume la ripartizione del campione rispetto alla dose di partenza di sorafenib al tempo 0 e la percentuale di pazienti per i quali è stata richiesta una riduzione del dosaggio di chemioterapico in associazione alla comparsa di eventi avversi, fra cui principalmente la diarrea e la reazione “*hand-foot skin*” (HFSR), e la percentuale di pazienti che hanno richiesto l’interruzione del trattamento per la comparsa di complicanze maggiori (sanguinamento digestivo gastrointestinale, astenia, ascite, insufficienza epatica). Gli aggiustamenti della dose allo scopo di gestire al meglio gli eventi avversi, che via via possono emergere, rappresentano una valida strategia per evitare, ove possibile, l’interruzione permanente del trattamento con sorafenib, assicurando così che non vengano vanificati i benefici eventualmente raggiunti fino a quel momento. La tabella 3 riassume i dati sull’efficacia e la sicurezza, nonché i tassi di modifica del dosaggio di farmaco e l’eventuale interruzione della sua somministrazione, in rapporto ai dati

presenti nel trial SHARP sul trattamento con sorafenib dell'HCC intermedio - avanzato.

Dai dati in nostro possesso, sebbene il confronto avvenga tra due popolazioni numericamente diverse, i risultati in termini di OS e TTP ottenuti durante il periodo di osservazione considerato non si discostano significativamente ($p=ns$) dai valori validati dai principali trials clinici ad oggi disponibili, tra cui lo SHARP Trial e lo studio SOFIA, mentre sembrerebbero differire, con valori di modesta significatività ($p<0.03$ e <0.05), per alcuni outcomes in ragione della maggior presenza nel nostro campione di pazienti diabetici e obesi con insulino resistenza ($HOMA\ IR >2.5$), e di pazienti con cirrosi avanzata di grado moderato / compensata Child B. Le indagini statistiche si sono basate su analisi di regressione lineare e test di chi quadro.

Lo studio SOFIA ha dimostrato che gli accorgimenti terapeutici di gestione del dosaggio durante la comparsa di eventi avversi, come validato nello SHARP trial, è applicabile anche nella pratica clinica senza ridurre l'OS. In alcuni casi sembrerebbe addirittura controproducente mantenere a tutti i costi un dosaggio di sorafenib a 800 mg, piuttosto che ridurre la dose prolungando invece il periodo complessivo di esposizione al farmaco, tentando cioè di individualizzare la terapia, per quanto possibile, senza tuttavia correre il rischio di effettuare un protocollo off-label.

Nei pazienti con cirrosi Child B e malattia epatica meno compensata il ricorso a dosaggi ridotti di sorafenib è stato necessario. In questa sottopopolazione di pazienti infatti sono più elevati i tassi di complicanza da eventi avversi al sorafenib e la gravità dei singoli eventi, rispetto al gruppo di pazienti in Child A. Mentre l'età

avanzata non sembra essere associata a tassi di dropouts maggiori rispetto ai pazienti con età inferiore, sottoposti allo stesso regime terapeutico.

Sulla scorta dei dati del nostro studio e in pieno accordo ai dati ad oggi presenti in letteratura, il sorafenib continua ad essere una preziosa opzione di prima linea nel trattamento dell'HCC avanzato o intermedio che non sia suscettibile di trattamento con TACE o sia refrattario al trattamento con TACE. Lo scenario futuro vede un potenziale miglioramento dell'uso del sorafenib. Inoltre nuovi studi di associazione tra sorafenib e altri chemioterapici, nonché il riconoscimento di altri nuovi targets farmacologici molecolari, compresi i potenziali targets correlati ai meccanismi immunologici antineoplastici, mantengono viva la speranza di poter migliorare ulteriormente i risultati clinici nei pazienti con HCC.

Bersagli molecolari immunologici.

Il razionale per l'immunoterapia per HCC si basa sulla constatazione che i pazienti con tumori contenenti infiltrato T cellulare presumibilmente tumore-specifico, avevano un rischio ridotto di recidiva dopo trapianto di fegato. Inoltre, la somministrazione di sospensioni di cellule T autologhe anti-CD3 IL-2 attivate, nei pazienti con carcinoma epatico si osserva un aumento del tasso di sopravvivenza libera da recidive, dopo trattamento chirurgico. Questi dati implicano un ruolo centrale delle cellule T nel modulare la progressione del tumore e sono alla base del razionale per l'impiego di farmaci ad attività immunoterapica T mediata. Un'attivazione della risposta immunitaria con infiltrato di cellule T è stata riportata

dopo alcolizzazione percutanea e l'ablazione con radiofrequenza (RFA). Un prerequisito per il successo dello sviluppo di approcci di immunoterapia a base di cellule T è l'identificazione e la caratterizzazione delle risposte immunitarie agli antigeni associati al tumore (TAA). Sono stati identificati sette TAA specifici HCC che sono bersaglio della risposta CD8⁺ T mediata: alfa-fetoproteina (AFP), glypican-3 (GPC3), NY-ESO-1, SSX-2, antigene associato al gene-A del melanoma (MAGE-A), telomerasi trascrittasi inversa (TERT), antigene associato all'epatocarcinoma 519 / xenopus centrosomal kinesin-like protein (HCA519 / Xklp-2).

Alfa-fetoproteina. L'AFP è espressa durante lo sviluppo fetale, ma è trascrizionalmente repressa poco dopo la nascita. Tuttavia, essa è ri-espressa nei pazienti con HCC. Dal momento che si tratta di una proteina endogena, le risposte T cellulari AFP-specifiche vengono normalmente soppresse. Tuttavia, AFP è attualmente il miglior bersaglio antigenico studiato e forse il più promettente target per l'immunoterapia dell'HCC. La Butterfield LH e colleghi identificato un epitopo HLA-A2-restricted di AFP specificamente rivolto alle cellule T CD8⁺ e ha dimostrato la capacità di generare risposte T CD8⁺, sia in colture di linfociti umani che in topi transgenici HLA-A2. Gli autori hanno inoltre identificato quattro epitopi AFP-specifici dominanti e 10 sottodominanti, ognuno dei quali ha indotto una moderata risposta delle cellule T CD8⁺ in PBMC (peripheral blood mononuclear cell) di pazienti con carcinoma epatocellulare. Alcuni autori hanno trovato risposte delle cellule T contro diversi epitopi precedentemente non identificati, indicando che esistono più epitopi AFP-specifici. Questi risultati indicano anche che le cellule

CD8+ T specifiche per l'auto-antigene AFP sono presenti nel normale repertorio cellule T.

Glypican-3. GPC3 è una oncoproteina fetale. Appartiene ad una famiglia di proteoglicani eparan solfato che possono legarsi ad altri fattori di crescita (Wnt, FGF1/2, e VEGF) e promuovere in tal modo la crescita del tumore. GPC3 è risultato essere over-espresso in HCC ed è considerato un antigene bersaglio promettente. Due epitopi HLA-A2- e HLA-24 di GPC3 sono stati mappati in topi e hanno dimostrato essere in grado di suscitare le risposte delle cellule T nei pazienti con carcinoma epatico.

NY-ESO-1. L'espressione di NY-ESO-1 è spesso espressa de novo in HCC e altri tumori come il melanoma, il carcinoma dell'ovaio e della mammella. NY-ESO-1 è associato ad HCC che hanno esito infausto dopo intervento chirurgico, e il meccanismo di questo risultato può essere dovuto al fatto che NY-ESO-1 aumenta la migrazione delle cellule tumorali. NY-ESO-1 è uno dei TAA più immunogenici finora conosciuti, con più epitopi identificati attualmente in fase di sperimentazione come potenziali candidati vaccini per i tumori diversi dall'HCC. Utilizzando approcci diversi, sono stati identificati tre gruppi di risposte T CD8+ NYESO-1-specifiche nel sangue periferico di pazienti con carcinoma epatico verso un epitopo che era già stato identificato in pazienti affetti da melanoma. Nessuna delle risposte T osservate erano tuttavia rilevabili in vivo, suggerendo una tasso relativamente basso di queste cellule in circolazione.

SSX-2. SSX-2 è un antigene del carcinoma del testicolo, che ha dimostrato di essere over-espresso in pazienti con carcinoma epatocellulare. Utilizzando un epitopo di cellule T CD8 precedentemente identificate in pazienti con melanoma, sono stati registrati due gruppi di risposte T CD8+ in una piccola frazione di pazienti con carcinoma epatocellulare dopo espansione in vitro di PBMC e TIL.

Antigeni associati al gene A per il melanoma (MAGE). Antigeni della famiglia dei MAGE-A sono stati inizialmente caratterizzati nel melanoma, ma sono anche ampiamente espresse in altri tumori come il carcinoma mammario, glioma, carcinoma coloretale e l'HCC. Zerbini et al. hanno dimostrato l'induzione in vitro di risposte T CD8+ contro epitopi di MAGE-A1 e MAGE-A3 in linfociti del sangue periferico infiltranti il tumore. Le risposte delle cellule T CD8+ contro MAGE-A10 sono stati descritti da Bricard et al. Pertanto, alcuni epitopi dei MAGE sono stati identificati come potenziali marcatori di malattia e targets per la terapia immunitaria.

Telomerasi della trascrittasi inversa. TERT è un enzima catalitico richiesto per l'allungamento telomerico; l'espressione genomica per questa proteina correla con l'attività stessa della telomerasi. Le cellule tumorali devono conservare la lunghezza dei loro telomeri e la telomerasi con la sua attività contribuisce alla sopravvivenza del tumore proteggendo le estremità telomeriche di molti cromosomi chiave per l'oncogenesi. Quindi, non è sorprendente che l'attività della telomerasi è stata riportata essere attivata al fino al 85% in tutti i tumori umani, inclusi HCC. La TERT è stata proposta come un TAA universale per l'immunoterapia del cancro.

Sistema Antigene 519 associato all'epatocarcinoma (HCA519) e Xenopus centrosomal kinesin-like protein (Xklp-2) . Un antigene HCC-associato è l'HCA519. HCA519, noto anche come proteina target per Xklp-2 (TPX2), è una proteina associata ai microtubuli necessaria per la divisione cellulare. La produzione di TPX2 è stata anche associata con tumori pancreatici e polmonari. Gli studi di Tanaka et al. e Yang et al. mostrano upregulation di TPX2 all'interno di cellule di HCC mediante microarray. Satow et al. Hanno dimostrato un'elevata espressione di HCA519 / TPX2 nel tessuto tumorale di HCC rispetto adiacente tessuto non tumorale. Quindi questo antigene potrebbe svolgere un ruolo chiave nel ciclo di replicazione dell'HCC, dove l'immunoterapia potrebbe avere un effetto biologico antitumorale.

Diversi meccanismi potrebbero contribuire ad una riduzione della risposta delle cellule T CD8+ specifiche per TAA nei pazienti con carcinoma epatico (figura 4).

- (i) le cellule T regolatorie (T regs) sono potenti cellule ad attività suppressor e hanno dimostrato di sopprimere l'immunità tumorale in numerosi studi. I T regs producono la citochina IL-10 ad azione immunosoppressiva; IL-10 sopprime sia CD4+ e CD8+ e, di conseguenza, i T regs svolgono un ruolo importante nella inibizione delle risposte delle cellule T tumore-specifiche in HCC.
- (ii) le cellule suppressor derivate dal midollo (MDSCs) comprendono una miscela di monociti / macrofagi, granulociti e cellule dendritiche (DC) a diversi stadi di differenziazione. Nei pazienti con HCC, le MDSCs hanno recentemente dimostrato la capacità di indurre Foxp3 e IL-10 nelle cellule CD4 + T inibendo l'attività dell'arginasi. Attualmente non esiste farmaco

o anticorpo specifico che colpisca selettivamente MDSCs. Poiché l'inibizione dell'attività dell'arginasi può causare effetti indesiderati, dovuti al ruolo fondamentale di questo enzima nel ciclo dell'urea, sarà importante individuare ulteriori marcatori specifici.

- (iii) alterazione dei processi di trasformazione e presentazione antigenica dei TAA: diversi studi hanno dimostrato che l'espressione di molecole HLA di classe I e molecole co-stimolatorie B7 è inibita nell'HCC.
- (iv) recettori inibitori: molti tumori umani esprimono PD-L1, il ligando per il recettore inibitorio della morte cellulare programmata-1 (PD-1) capace di indurre apoptosi delle cellule T effettrici e quindi di contribuire alla evasione immunitaria delle cellule neoplastiche. Nell'HCC, tumore i CD8⁺ T sono spesso caratterizzati dal presentare un aumento dell'espressione e dell'attività di PD-1. Questi dati suggeriscono che l'inibizione di PD-1 può essere una potenziale strategia nel potenziamento dell'immunità HCC-specifica.
- (v) la mancanza di risposta di cellule T CD4⁺: è noto che la mancanza di CD4⁺ T helper può condurre ad un esaurimento di CD8⁺.

Immunosoppressione indotta da HBV e HCV.

L'epatite cronica da HBV e HCV è nota sia in grado di indurre uno stato pro infiammatorio cronico sia epatico che sistemico associato con effetti immunosoppressivi e immunomodulatori. Nell'HCC si osserva una

immunosoppressione virus-mediata. Disfunzionali risposte delle cellule T a diversi gli antigeni virali sono state osservate nei pazienti con infezione da virus dell'epatite B cronica. L'infezione cronica da virus dell'epatite C regola negativamente sia la risposta immunitaria innata che di memoria. Ci sono molti meccanismi di fuga immunitaria nell'HCC; sangue periferico di pazienti con carcinoma epatocellulare mostrano alterata produzione di IL-12 e ridotta attività immunostimolatoria. Una riduzione della produzione e della attività delle cellule natural killer è stata descritta anche in pazienti con carcinoma epatocellulare.

Immunoterapia attuale e futura per l'HCC.

L'immunoterapia cellulare migliorando lo stato immunitario ha un potenziale ruolo nel migliorare l'outcome terapeutico dei pazienti con carcinoma epatico. Tentativi sono stati eseguiti in vitro secondo il criterio della vaccinazione mediante l'uso di cellule dendritiche processanti antigeni tumorali capaci di indurre una risposta T citotossica e promuovere la regressione del tumore. Tuttavia, nonostante il notevole successo in studi preclinici, il risultato di questo tipo di immunoterapia è ancora deludente quando si passa agli studi clinici, verosimilmente a causa della complessità del meccanismo di fuga immunitaria delle cellule tumorali. In uno studio storico, 150 pazienti sono stati randomizzati a ricevere dopo resezione curativa PBMC attivati da IL-2 e anti-CD3 attivati. I risultati sono stati incoraggianti, sia per quanto riguarda la comparsa di recidiva e la sopravvivenza libera da malattia ($p = 0,09$) con un aumento

di sopravvivenza ad 1 anno (63% vs 10%; $p = 0,038$). Più di recente, in modelli murini si è dimostrato che l'immunoterapia con DC in combinazione con IL-12, che attiva le cellule natural killer T, riduce la percentuale di recidiva. Quindi il sistema delle DC può essere utilizzato come coadiuvante potenziale per la produzione di vaccini tumorali specifici. La FDA statunitense ha approvato ipilimumab per il trattamento del melanoma nel 2011 sulla base di studio randomizzato di fase III che mostra un miglioramento della sopravvivenza globale. Tremelimumab è un anticorpo monoclonale che interferisce con l'attivazione delle cellule T e la loro proliferazione. Tremelimumab ha dato prova di attività antitumorale in un trial di fase II a braccio singolo per il trattamento del mesotelioma maligno. Uno studio di fase II di tremelimumab nei pazienti con carcinoma epatico è stato recentemente riportato (NCT01008358). Lo studio ha arruolato 21 pazienti con epatite C cronica in Child-Pugh A o B e cirrosi avanzata con HCC non suscettibile di ablazione percutanea o embolizzazione transarteriosa. Risposte parziali sono stati viste nel 17,6% dei casi, e il 45% dei pazienti si presentava con malattia stabile per più di 6 mesi. È interessante notare che i pazienti con livelli stabili di interferone (IFN)- γ durante il trattamento hanno mostrato una migliore risposta al trattamento rispetto a coloro che hanno mostrato un calo. Il lambrolizumab induce una regressione del tumore nei pazienti con melanoma avanzato e ha mostrato un profilo di sicurezza favorevole. Lambrolizumab si è dimostrato efficace anche in pazienti che hanno fallito il trattamento con ipilimumab, suggerendo un meccanismo di azione differente. Un altro approccio è stato descritto per superare immunosoppressione onco-mediata, che coinvolge la riattivazione di cellule T tumore-specifiche iporesponsive fornendo loro adeguati fattori di crescita delle cellule T (IL-15 e IL-7) o agonisti co-stimolatori

(anti- 4-1BB e anti-OX40). Altre opzioni di trattamento per quanto riguarda la penetrazione di cellule T effettrici sono in corso di valutazione a causa della correlazione tra infiltrazione delle cellule T delle lesioni di epatocarcinoma e i valori di OS.

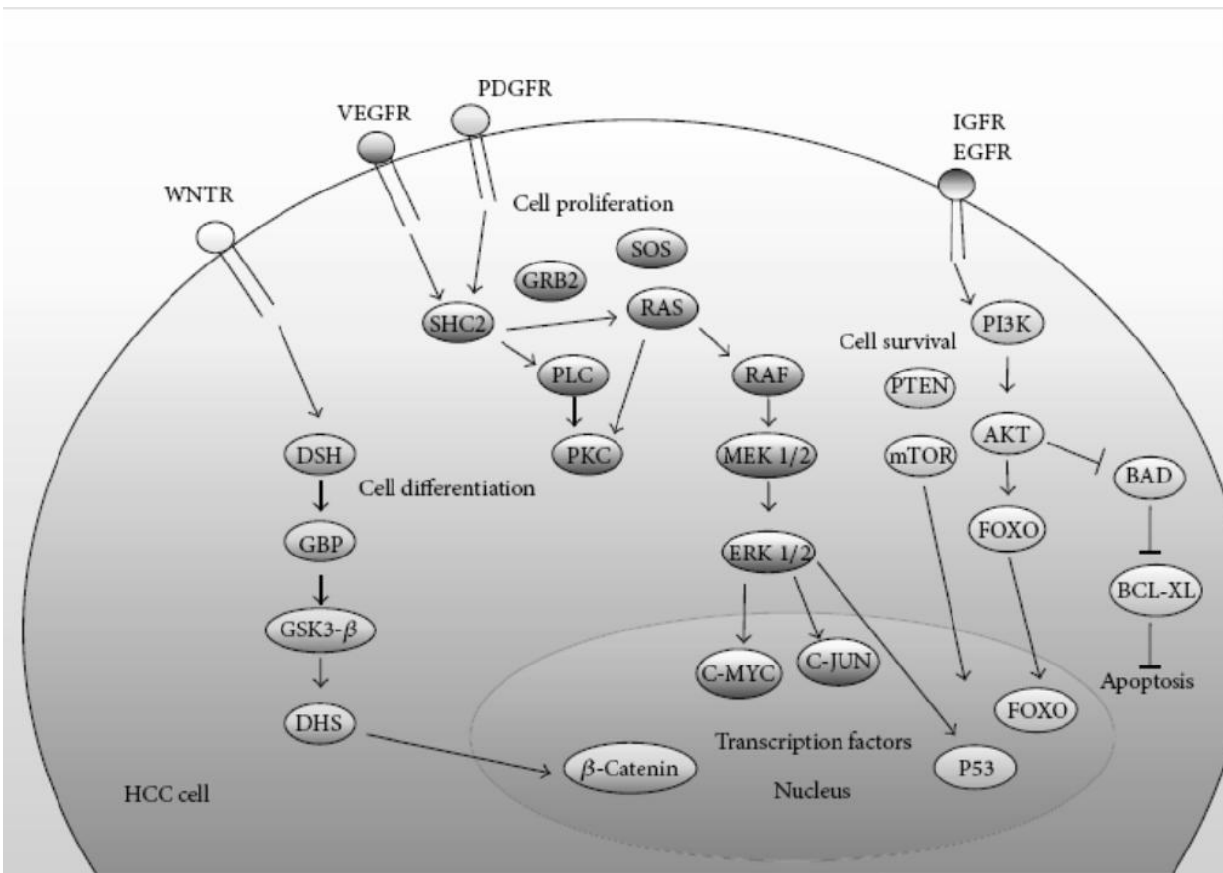


Figura 1. Vie di signaling nell'epatocarcinogenesi.

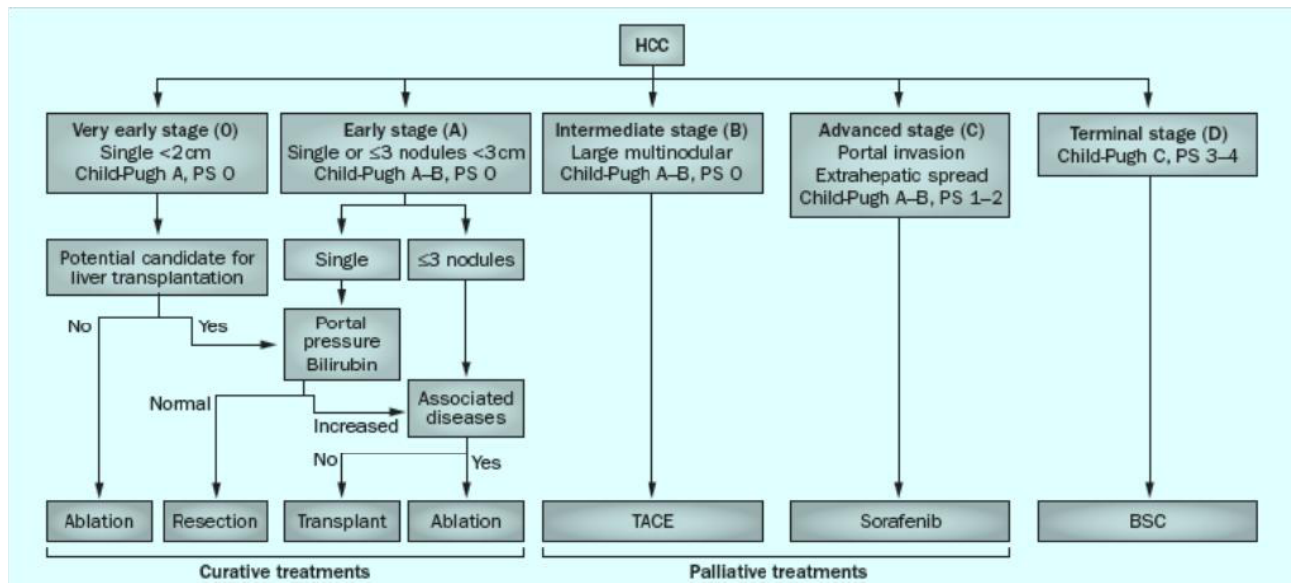


Figura 2. Algoritmo per la stratificazione dei pazienti con HCC e assegnazione alla classe di trattamento secondo il BCLC System.

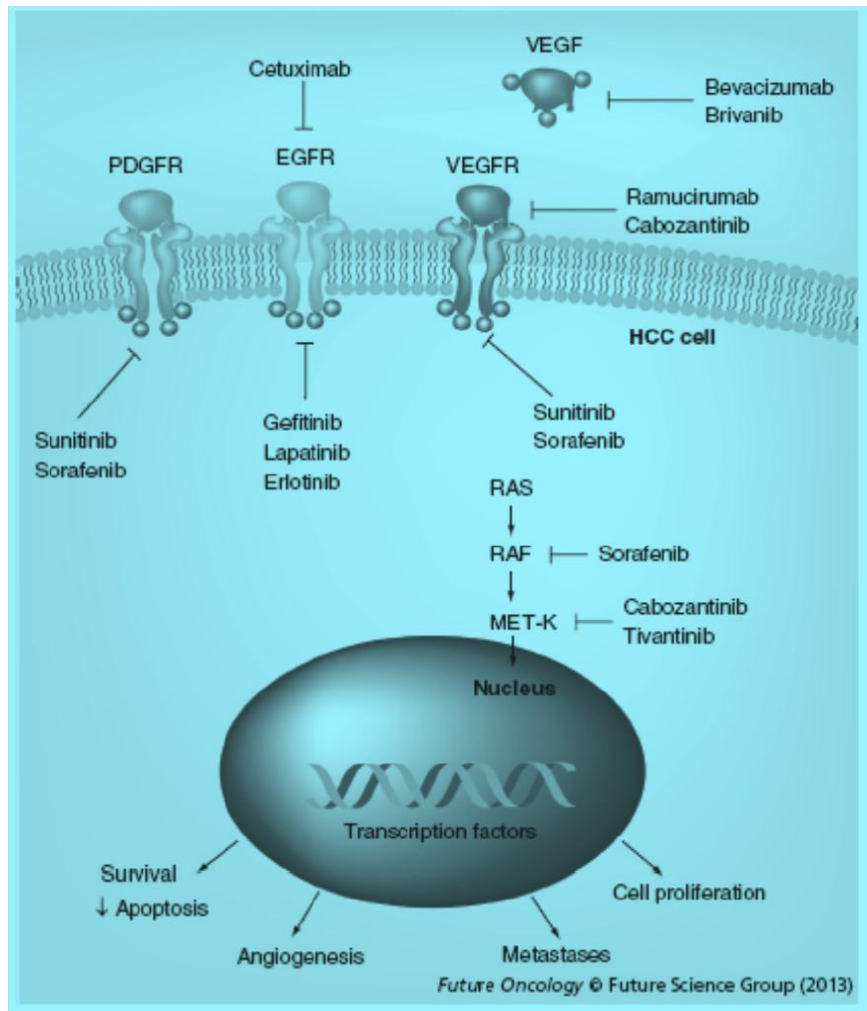


Figura 3. Siti e bersagli della terapia molecolare dell'HCC.

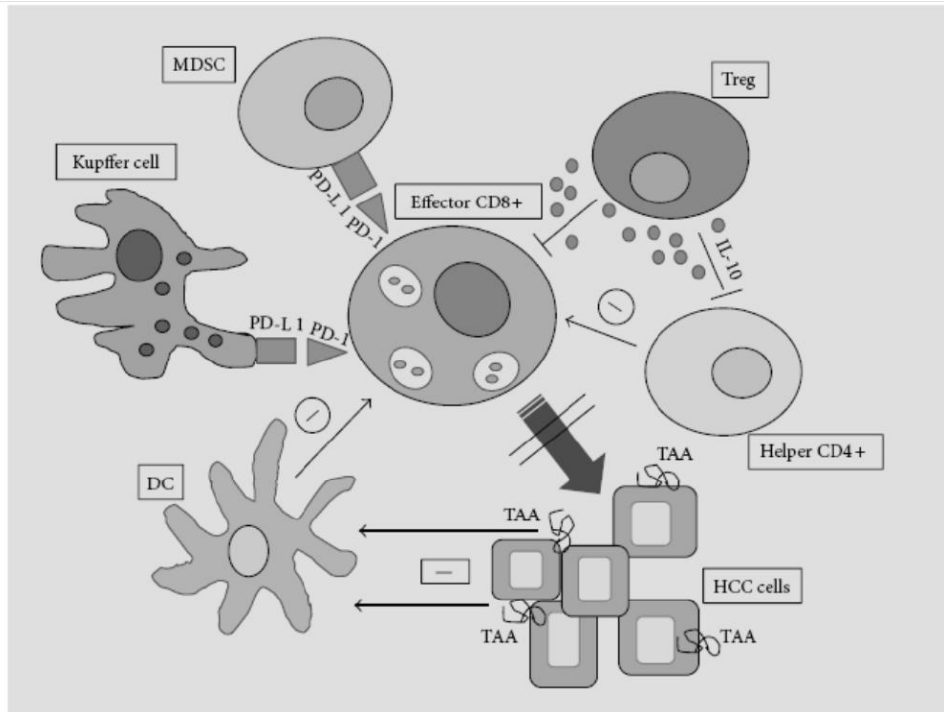


Figura 4. Meccanismi biomolecolari di regolazione e immuno-modulazione della risposta T CD8+ nell'HCC.

Drugs in HCC treatment	Mechanism of action	Target	Phase	Trials (n)	State of trials
Multikinase inhibitors					
Sorafenib	TKI	VEGFR-2/-3, PDGFR- β , Raf-1, B-Raf, Flt-3, c-KIT, RET	I, I-II, II, III, IV	65	Closed
Sunitinib	TKI	VEGFR-1/-2, PDGFR- α and - β , Flt-3, c-KIT, RET	II, III	6	Closed
Linifanib	TKI	VEGFR, PDGFR family	II, III	2	Ongoing
Cabozantinib	TKI	VEGFR2	I, II	2	Ongoing
MET inhibitors					
Tivantinib	Inhibits growth, induces apoptosis in c-MET-positive HCC	c-MET/HGF	I, II	3	Ongoing
Cabozantinib	Inhibits growth, induces apoptosis in c-MET-positive HCC	c-MET	I, II	2	Ongoing
Antiangiogenic agents					
Bevacizumab	MAB	VEGF	I, I-II, II	20	Closed
Brivanib	MAB	FGF, VEGF	I, II, III	6	Ongoing
Ramucirumab	MAB	VEGFR-2	III	1	Ongoing

Tabella 1. Nuovi agenti chemioterapici molecolari per il trattamento dell'HCC: meccanismo d'azione e stato dei trials.

Tabella 2. Distribuzione del campione e comparazione di alcuni outcomes chiave con lo SHARP trial.			
Characteristic/efficacy data	Study Cohort (n=28)	SHARP trial (n = 299)	p value
Baseline HCC stage			
BCLC stage C (%)	74	85	ns
Baseline liver cirrhosis			
Child –Pugh A (%)	82	95	ns
Child –Pugh B (%)	18	5	<0.05
Baseline other comorbidities			
Diabetes (%)	65	-	
Obesity (%)	55	-	
Overall HOMA Index >2.5 (%)	39	-	
Response			
Complete (%)	0	0	
Partial (%)	1	2	
Stable disease (%)	68	71	ns
Disease control rate (%)	39	43	ns
OS			
Median OS, months (95% CI)	9.3 (8.3-12.2)	10.7 (9.4-13.3)	<0.03
TTP			
Median radiologic TTP, months (95% CI)	3.7(2.6-5.5)	5.5 (4.1–6.9)	<0.05
BLCL: Barcellona Clinic Liver Cancer; HOMA: Homeostasis Model Assessement; HCC: hepatocarcinoma; OS: overall survival; TTP: time to progression.			

Tabella 3. Comparazione degli eventi avversi e gestione del dosaggio di sorafenib tra coorte di studio e campione SHARP.

	Study Cohort (n=28)		SHARP trial (n = 299)		p value
Treatment-emergent AE					
All (%)	96		98		ns
Serious (%)	73		54		<0.05
Drug-related AE					
All (%)	71		80		ns
By severity grade	Any grade	severe	Any grade	severe	
HFSR (%)	27	10	21	8	ns
Diarrhea (%)	42	6	39	8	ns
Alopecia (%)	20	0	14	0	ns
Fatigue (%)	39	20	22	4	<0.03
Rash/desquamation (%)	14	1	16	1	ns
Hypertension (%)	35	7	5	2	<0.01
Anorexia (%)	11	1	14	<1	ns
Nausea (%)	9	2	11	<1	ns
Dose reduction					
All (%)	33		26		
HFSR (%)	7		5		ns
Diarrhea (%)	7		8		ns
Discontinuation					
All (%)	47		38		<0.03
Hemorrhage, upper GI (%)	8		6		
Ascites (%)	2		-		
Fatigue (%)	8		5		
Liver dysfunction (%)	7		5		
DoT					
Median DoT, months (range)	6.1 (1.1-15.3)		5.3 (0.2-16.1)		
AE: Adverse event; DoT: Duration of treatment; GI: Gastrointestinal; HCC: Hepatocellular carcinoma; HFSR: Hand-foot skin reaction.					

Bibliografia.

Abou-Alfa G. K., “Sorafenib use in hepatocellular carcinoma: more questions than answers,” *Hepatology*, 2014.

Arizumi T., K. Ueshima, H. Takeda et al., “Comparison of systems for assessment of post-therapeutic response to sorafenib for hepatocellular carcinoma,” *Journal of Gastroenterology*, 2014.

Baffy G., E. M. Brunt, and S. H. Caldwell, “Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace,” *Journal of Hepatology*, vol. 56, no. 6, pp. 1384–1391, 2012.

Bagi C. M., D. F. Gebhard, and C. J. Andresen, “Antitumor effect of vascular endothelial growth factor inhibitor sunitinib in preclinical models of hepatocellular carcinoma,” *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 24, no. 5, pp. 563–574, 2012.

Becker S., V. Ardisson, N. Lepareur et al., “Increased Lipiodol uptake in hepatocellular carcinoma possibly due to increased membrane fluidity by dexamethasone and tamoxifen,” *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 37, no. 7, pp. 777–784, 2010.

Behboudi S., A. Alisa, S. Boswell, J. Anastassiou, A. A. Pathan, and R. Williams, “Expansion of anti-AFPTh1 and Tc1 responses in hepatocellular carcinoma occur in different stages of disease,” *British Journal of Cancer*, vol. 102, no. 4, pp. 748–753, 2010.

Bertino G., A. M. Ardiri, P. M. Boemi et al., “A study about mechanisms of des-gamma-carboxy prothrombin's production in hepatocellular carcinoma,” *Panminerva Medica*, vol. 50, no. 3, pp. 221–226, 2008.

Bertino G., A. M. Ardiri, M. M. Santonocito, and P. M. Boemi, “Some patients with HCC haven't abnormal des-gammarcoxy prothrombin and alpha-fetoprotein levels,” *Panminerva Medica*, vol. 51, no. 2, pp. 133–134, 2009.

Bertino G., A. M. Ardiri, G. S. Calvagno, N. Bertino, and P. M. Boemi, “Prognostic and diagnostic value of des- γ -carboxy prothrombin in liver cancer,” *Drug News and Perspectives*, vol. 23, no. 8, pp. 498–508, 2010.

Bertino G., A. Ardiri, P. M. Boemi et al., “Epoetin alpha improves the response to antiviral treatment in HCV-related chronic hepatitis,” *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 66, no. 10, pp. 1055–1063, 2010.

Bertino G., S. Neri, C.M. Bruno et al., “Diagnostic and prognostic value of alpha-fetoprotein, des- γ -carboxy prothrombin and squamous cell carcinoma antigen immunoglobulin M complexes in hepatocellular carcinoma,” *Minerva Medica*, vol. 102, no. 5, pp. 363–371, 2011.

Bertino G., A. Ardiri, M. Malaguarnera, G. Malaguarnera, N. Bertino, and G. S. Calvagno, “Hepatocellular carcinoma serum markers,” *Seminars in Oncology*, vol. 39, no. 4, pp. 410–433, 2012.

Bertino G., I. Di Carlo, A. Ardiri et al., “Systemic therapies in hepatocellular carcinoma: present and future,” *Future Oncology*, vol. 9, no. 10, pp. 1533–1548, 2013.

Bertino G., A. M. Ardiri, G. S. Calvagno et al., “Carbohydrate 19.9 antigen serum levels in liver disease,” *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 531640, 6 pages, 2013.

Bertino G., A. Ardiri, S. Demma et al., “Rare benign tumors of the liver: still rare?” *Journal of Gastrointestinal Cancer*, vol. 45, no. 2, pp. 202–217, 2014.

Bertino G., S. Demma, N. Bertino, and A. Ardiri, “Management of hepatocellular carcinoma: an update at the start of 2014,” *Journal of Gastrointestinal & Digestive System*, vol. 4, no. 2, pp. 1–7, 2014.

Biondi A., G. Malaguarnera, M. Vacante et al., “Elevated serum levels of Chromogranin A in hepatocellular carcinoma,” *BMC Surgery*, vol. 12, supplement 1, article S7, 2012.

Bolog N., G. Andreisek, I. Oancea, and A. Mangrau, “CT and MR imaging of hepatocellular carcinoma,” *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, vol. 20, no. 2, pp. 181–189, 2011.

Boyault S., D. S. Rickman, A. De Reyni`es et al., “Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets,” *Hepatology*, vol. 45, no. 1, pp. 42–52, 2007.

Breous E. and R. Thimme, “Potential of immunotherapy for hepatocellular carcinoma,” *Journal of Hepatology*, vol. 54, no. 4, pp. 830–834, 2011.

Bricard G., H. Bouzourene, O. Martinet et al., “Naturally acquired MAGE-A10- and SSX-2-specific CD8⁺ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma,” *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 3, pp. 1709–1716, 2005.

Bruix J. and M. Sherman, “American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update,” *Hepatology*, vol. 53, no. 3, pp. 1020–1022, 2011.

Cai L., Z. Zhang, L. Zhou et al., “Functional impairment in circulating and intrahepatic NK cells and relative mechanism in hepatocellular carcinoma patients,” *Clinical Immunology*, vol. 129, no. 3, pp. 428–437, 2008.

Cainap C., S. Qin, W. T. Huang et al., “Phase III trial of Linifanib versus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC),” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31, supplement 4, abstract 249, 2013.

Chao Y., C.-P. Li, G.-Y. Chau et al., “Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin in patients with resectable hepatocellular carcinoma after surgery,” *Annals of Surgical Oncology*, vol. 10, no. 4, pp. 355–362, 2003.

Cheng A.-L., Y.-K. Kang, Z. Chen et al., “Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III

randomised, doubleblind, placebo-controlled trial,” *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 1, pp. 25–34, 2009.

Chiang D. Y., A. Villanueva, Y. Hoshida et al., “Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma,” *Cancer Research*, vol. 68, no. 16, pp. 6779–6788, 2008.

Chou T. and R. S. Finn, “Brivanib: a review of development,” *Future Oncology*, vol. 8, no. 9, pp. 1083–1090, 2012.

Davila J. A., J. R. Kramer, Z. Duan et al., “Referral and receipt of treatment for hepatocellular carcinoma in United States veterans: effect of patient and nonpatient factors,” *Hepatology*, vol. 57, no. 5, pp. 1858–1868, 2013.

Della Corte C. and M. Colombo, “Surveillance for hepatocellular carcinoma,” *Seminars in Oncology*, vol. 39, no. 4, pp. 384–398, 2012.

Desai M. D., B. S. Saroya, and A. C. Lockhart, “Investigational therapies targeting the ErbB (EGFR, HER2, HER3, HER4) family in GI cancers,” *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 22, no. 3, pp. 341–356, 2013.

Di Carlo I., M. Mannino, A. Toro et al., “Persistent increase in alpha-fetoprotein level in a patient without underlying liver disease who underwent curative resection of hepatocellular carcinoma. A case report and review of the literature,” *World Journal of Surgical Oncology*, vol. 10, article 79, 2012.

Di Costanzo G. G., R. Tortora, L. Iodice et al., “Safety and effectiveness of sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma in clinical practice,” *Digestive and Liver Disease*, vol. 44, no. 9, pp. 788–792, 2012.

Elansary M., S. Mogawer, S. A. Elhamidet al., “Immunotherapy by autologous dendritic cell vaccine in patients with advanced HCC,” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 139, no. 1, pp. 39–48, 2013.

Epstein R. J., “VEGF signaling inhibitors: more pro-apoptotic than anti-angiogenic,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 26, no. 3-4, pp. 443–452, 2007.

Farazi P. A., J. Glickman, S. Jiang, A. Yu, K. L. Rudolph, and R. A. DePinho, “Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma,” *Cancer Research*, vol. 63, no. 16, pp. 5021–5027, 2003.

Finn R. S., Y.-K. Kang, M. Mulcahy et al., “Phase II, open label study of brivanib as second-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma,” *Clinical Cancer Research*, vol. 18, no. 7, pp. 2090–2098, 2012.

Finn R., “Emerging targeted strategies in advanced hepatocellular carcinoma,” *Seminars in Liver Disease*, vol. 33, supplement 1, pp. S11–S19, 2013.

Finn R. S., “Overview and description of hepatocellular carcinoma,” *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, vol. 5, no. 4, pp. 4–7, 2013.

Fujiwara K., T. Higashi, K. Nouse et al., “Decreased expression of B7 costimulatory molecules and major histocompatibility complex class-I in human hepatocellular

carcinoma,” *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 19, no. 10, pp. 1121–1127, 2004.

Giunchedi P., M. Maestri, E. Gavini, P. Dionigi, and G. Rassa, “Transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma-agents and drugs: an overview. Part 2,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 10, no. 6, pp. 799–810, 2013.

Gherardi E., W. Birchmeier, C. Birchmeier, and G. V. Woude, “Targeting MET in cancer: rationale and progress,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, no. 2, pp. 89–103, 2012.

Goyal L., M. D. Muzumdar, and A. X. Zhu, “Targeting the HGF/c-MET pathway in hepatocellular carcinoma,” *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 9, pp. 2310–2318, 2013.

Heo J., T. Reid, L. Ruo et al., “Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer,” *Nature Medicine*, vol. 19, no. 3, pp. 329–336, 2013.

Hoda D., C. Catherine, J. Strosberg et al., “Phase II study of sunitinib malate in adult patients with metastatic or surgically unresectable hepatocellular carcinoma,” *Gastrointestinal Cancers Symposium*, abstract 267, 2008.

Hoechst B., L. A. Ormandy, M. Ballmaier et al., “A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells,” *Gastroenterology*, vol. 135, no. 1, pp. 234–243, 2008.

Huang, C., D. Xu, Q. Xia, P. Wang, C. Rong, and Y. Su, "Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of human hepatic cancer cells by Astragaloside II," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 64, no. 12, pp. 1741–1750, 2012.

Hurwitz H., L. Fehrenbacher, W. Novotny et al., "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342, 2004.

Huynh H., T. T. TuyenNguyen, K.-H. Pierce Chow, P. H. Tan, K. C. Soo, and E. Tran, "Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis," *BMC Gastroenterology*, vol. 3, article 19, 2003.

Huynh H., S. P. Choo, H. C. Toh et al., "Comparing the efficacy of sunitinib with sorafenib in xenograft models of human hepatocellular carcinoma: mechanistic explanation," *Current Cancer Drug Targets*, vol. 11, no. 8, pp. 944–953, 2011.

Kayashima H., T. Toshima, S. Okano et al., "Intratumoral neoadjuvant immunotherapy using IL-12 and dendritic cells is an effective strategy to control recurrence of murine hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice," *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 1, pp. 698–708, 2010.

Kee K.M., C. H. Hung, J.H.Wang, and S.N. Lu, "Serial changes of clinical parameters in a patient with advanced hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis achieving complete response after treatment with sorafenib," *OncoTargets and Therapy*, vol. 7, pp. 829–834, 2014.

Knox J. J., R. Qin, and J. R. Strosberg, “A phase II trial of temsirolimus (TEM) and bevacizumab (BEV) in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC),” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, supplement, abstract 4099, 2012.

Komori H., T. Nakatsura, S. Senju et al., “Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma,” *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 9, pp. 2689–2697, 2006.

Kurokohchi K., M. Carrington, D. L. Mann et al., “Expression of HLA class I molecules and the transporter associated with antigen processing in hepatocellular carcinoma,” *Hepatology*, vol. 23, no. 5, pp. 1181–1188, 1996.

Lee W.-C., H.-C.Wang, C.-F. Hung, P.-F. Huang, C.-R. Lia, and M.-F.Chen, “Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial,” *Journal of Immunotherapy*, vol. 28, no. 5, pp. 496–504, 2005.

Lin C.-L. and J.-H. Kao, “Risk stratification for hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma,” *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 28, no. 1, pp. 10–17, 2013.

Llovet J. M., C. Br’u, and J. Bruix, “Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification,” *Seminars in Liver Disease*, vol. 19, no. 3, pp. 329–337, 1999.

Llovet J. M., S. Ricci, V. Mazzaferro et al., “Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma,” *New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 4, pp. 378–390, 2008.

Llovet J. M. and J. Bruix, “Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma,” *Hepatology*, vol. 48, no. 4, pp. 1312–1327, 2008.

Llovet J. M., T. Decaens, J. L. Raoul et al., “Brivanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma who were intolerant to sorafenib or for whom sorafenib failed: results from the randomized phase III BRISK-PS study,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31, no. 28, pp. 3509–3516, 2013.

Lopez P. M., A. Villanueva, and J. M. Llovet, “Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma—an updated analysis of randomized controlled trials,” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 23, no. 11, pp. 1535–1547, 2006.

Malaguarnera G., I. Paladina, M. Giordano, M. Malaguarnera, G. Bertino, and M. Berretta, “Serum markers of intrahepatic cholangiocarcinoma,” *Disease Markers*, vol. 34, no. 4, pp. 219–228, 2013.

Mehta N., J. L. Dodge, J. P. Roberts, R. Hirose, and F. Y. Yao, “Outcome after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma with a low risk of dropout from the transplant waiting list,” *Liver Transplantation*, 2014.

Miroux C., T. Vausselein, and N. Delhem, “Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune

response,” *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 10, no. 11, pp. 1563–1572, 2010.

Mizukoshi E., Y. Nakamoto, Y. Marukawa et al., “Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma,” *Hepatology*, vol. 43, no. 6, pp. 1284–1294, 2006. Ishiguro T., M. Sugimoto, Y. Kinoshita et al., “Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer,” *Cancer Research*, vol. 68, no. 23, pp. 9832–9838, 2008.

Mizukoshi E., Y. Nakamoto, K. Arai et al., “Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma,” *Hepatology*, vol. 53, no. 4, pp. 1206–1216, 2011.

Munshi N., S. Jeay, Y. Li et al., “ARQ 197, a novel and selective inhibitor of the human c-Met receptor tyrosine kinase with antitumor activity,” *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 9, no. 6, pp. 1544–1553, 2010.

Ng S.-A. and C. Lee, “Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis,” *Journal of Gastroenterology*, vol. 46, no. 8, pp. 974–990, 2011.

O'Bryan J. M., J. A. Potts, H. L. Bonkovsky, A. Mathew, and A. L. Rothman, “Extended interferon-alpha therapy accelerates telomere length loss in human peripheral blood T lymphocytes,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 8, Article ID e20922, 2011.

Patel A. and W. Sun, “Molecular targeted therapy in hepatocellular carcinoma: from biology to clinical practice and future,” *Current Treatment Options in Oncology*, 2014.

Pardee A. D., D. McCurry, S. Alber, P. Hu, A. L. Epstein, and W. J. Storkus, "A therapeutic OX40 agonist dynamically alters dendritic, endothelial, and T cell subsets within the established tumor microenvironment," *Cancer Research*, vol. 70, no. 22, pp. 9041–9052, 2010.

Pardee A. D. and L. H. Butterfield, "Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: unique challenges and clinical opportunities," *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 1, pp. 48–55, 2012.

Petrovic D., Z. Stamataki, E. Dempsey et al., "Hepatitis C virus targets the T cell secretory machinery as a mechanism of immune evasion," *Hepatology*, vol. 53, no. 6, pp. 1846–1853, 2011.

Piao W., Y. Wang, Y. Adachi et al., "Insulin-like growth factor-I receptor blockade by a specific tyrosine kinase inhibitor for human gastrointestinal carcinomas," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 7, no. 6, pp. 1483–1493, 2008.

Poon R. T. P., J. W. Y. Ho, C. S. W. Tong, C. Lau, I. O. L. Ng, and S.-T. Fan, "Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma," *British Journal of Surgery*, vol. 91, no. 10, pp. 1354–1360, 2004.

Previdi S., G. Abbadessa, F. Dal'ò, D. S. France, and M. Brogginì, "Breast cancer-derived bone metastasis can be effectively reduced through specific c-MET inhibitor tivantinib (ARQ197) and shRNA c-MET knockdown," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 11, no. 1, pp. 214–223, 2012.

Sakuishi K., L. Apetoh, J. M. Sullivan, B. R. Blazar, V. K. Kuchroo, and A. C. Anderson, "Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 207, no. 10, pp. 2187–2194, 2010.

Santoro A., L. Rimassa, I. Borbath et al., "Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study," *The Lancet Oncology*, vol. 14, no. 1, pp. 55–63, 2013.

Santoro A., C. Porta, L. Rimassa et al., "Metiv-HCC: a phase III clinical trial evaluating tivantinib (ARQ 197), a MET inhibitor, versus placebo as second-line in patients (pts) with MET-high inoperable hepatocellular carcinoma (HCC)," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31, supplement, abstract TPS4159, 2013.

Saxena N. K., D. Sharma, X. Ding et al., "Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells," *Cancer Research*, vol. 67, no. 6, pp. 2497–2507, 2007.

Schmidt N., C. Neumann-Haefelin, and R. Thimme, "Cellular immune responses to hepatocellular carcinoma: lessons for immunotherapy," *Digestive Diseases*, vol. 30, no. 5, pp. 483–491, 2012.

Shang X.-Y., H.-S. Chen, H.-G. Zhang et al., "The spontaneous CD8⁺ T-cell response to HLA-A2-restricted NY-ESO-1b peptide in hepatocellular carcinoma patients," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 20, pp. 6946–6955, 2004.

Shi F., M. Shi, Z. Zeng et al., “PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8+ T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients,” *International Journal of Cancer*, vol. 128, no. 4, pp. 887–896, 2011.

Stroffolini T., A. Spadaro, V. Di Marco et al., “Current practice of chronic hepatitis B treatment in Southern Italy,” *European Journal of Internal Medicine*, vol. 23, no. 5, pp. e124–e127, 2012.

Takayama T., T. Sekine, M. Makuuchi et al., “Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial,” *The Lancet*, vol. 356, no. 9232, pp. 802–807, 2000.

Tanaka S. and S. Aii, “Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma,” *Seminars in Oncology*, vol. 39, no. 4, pp. 486–492, 2012.

Tatsumi T., T. Takehara, K. Katayama et al., “Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma,” *Hepatology*, vol. 25, no. 5, pp. 1108–1114, 1997.

Teramoto K., Y. Ohshio, T. Fujita, J. Hanaoka, and K. Kontani, “Simultaneous activation of T helper function can augment the potency of dendritic cell-based cancerimmunotherapy,” *Journal of Cancer Research and ClinicalOncology*, vol. 139, no. 5, pp. 861–870, 2013.

Thimme R., M. Neagu, T. Boettler et al., “Comprehensive analysis of the α -fetoprotein-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma,” *Hepatology*, vol. 48, no. 6, pp. 1821–1833, 2008.

Toh H. C., P.-J. Chen, B. I. Carr et al., “Phase 2 trial of linifanib (ABT-869) in patients with unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma,” *Cancer*, vol. 119, no. 2, pp. 380–387, 2013.

Umemura T., T. Ichijo, K. Yoshizawa, E. Tanaka, and K. Kiyosawa, “Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan,” *Journal of Gastroenterology*, vol. 44, supplement 19, pp. 102–107, 2009.

Unitt E., S. M. Rushbrook, A. Marshall et al., “Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of Tregulatory cells,” *Hepatology*, vol. 41, no. 4, pp. 722–730, 2005.

Unitt E., A. Marshall, W. Gelson et al., “Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation,” *Journal of Hepatology*, vol. 45, no. 2, pp. 246–253, 2006.

Verhoef C., H. Van Dekken, L. J. Hofland et al., “Somatostatin receptor in human hepatocellular carcinomas: biological, patient and tumor characteristics,” *Digestive Surgery*, vol. 25, no. 1, pp. 21–26, 2008.

Verslype C., A. L. Cohn, R. K. Kelley et al., “Activity of cabozantinib (XL184) in hepatocellular carcinoma: results from a Phase 2 randomized discontinuation trial (RDT),” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, supplement, abstract 4007, 2012.

Villanueva A., P. Newell, D. Y. Chiang, S. L. Friedman, and J. M. Llovet, “Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma,” *Seminars in Liver Disease*, vol. 27, no. 1, pp. 55–76, 2007.

Villanueva A., S. Toffanin, and J.M. Llovet, “Linking molecular classification of hepatocellular carcinoma and personalized medicine: preliminary steps,” *Current Opinion in Oncology*, vol. 20, no. 4, pp. 444–453, 2008.

Wang R., N. Zhao, S. Li et al., “MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2, and CDC42,” *Hepatology*, vol. 58, no. 2, pp. 642–653, 2013.

Wang W., L. Liu, H. Chen et al., “EASL- and mRECIST evaluated responses to combination therapy predict survival in patients with hepatocellular carcinoma,” *Clinical Cancer Research*, 2014.

Wörns M. A., A. Weinmann, M. Schuchmann, and P. R. Galle, “Systemic therapies in hepatocellular carcinoma,” *Digestive Diseases*, vol. 27, no. 2, pp. 175–188, 2009.

Wörns M. A., M. Schuchmann, C. Düber, G. Otto, P. R. Galle, and A. Weinmann, “Sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma after progression under sorafenib treatment,” *Oncology*, vol. 79, no. 1-2, pp. 85–92, 2010.

Xie B., D. H. Wang, and S. J. Spechler, “Sorafenib for treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review,” *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 57, no. 5, pp. 1122–1129, 2012.

Yao F. Y., “Conundrum of treatment for early-stage hepatocellular carcinoma: radiofrequency ablation instead of liver transplantation as the first-line treatment?” *Liver Transplantation*, vol. 20, no. 3, pp. 257–260, 2014.

Yau T., P. Chan, R. Epstein, and R. T. Poon, “Evolution of systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma,” *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 42, pp. 6437–6441, 2008.

Zhao F., F. Korangy, and T. F. Greten, “Cellular immune suppressor mechanisms in patients with hepatocellular carcinoma,” *Digestive Diseases*, vol. 30, no. 5, pp. 477–482, 2012.

Zhong J.-H., L. Ma, L.-C. Wu et al., “Adoptive immunotherapy for postoperative hepatocellular carcinoma: a systematic review,” *International Journal of Clinical Practice*, vol. 66, no. 1, pp. 21–27, 2012.

Zhu A. X., D. V. Sahani, E. di Tomaso et al., “Sunitinib monotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma: insights from a multidisciplinary phase II study,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, supplement, abstract 4521, 2008.

Zhu A. X., D. G. Duda, D. V. Sahani, and R. K. Jain, “HCC and angiogenesis: possible targets and future directions,” *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 8, no. 5, pp. 292–301, 2011.

Zhu A. X., M. Kudo, M. Eric Assenat et al., “EVOLVE-1: phase 3 study of everolimus for advanced HCC that progressed during or after sorafenib,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 32, supplement 3, abstract 172, 2014.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.