



G.O.N.O.

GRUPPO ONCOLOGICO NORD-OVEST



**A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI +
BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-
LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER.**

(TRIBE – ASL608LIOM04)

EUDRACT 2008-001537-10

STUDY STAFF

COORDINATING INVESTIGATOR:

Prof. Alfredo Falcone	U.O. Oncologia Medica Az. USL 6 Dip di Oncologia, dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina Università di Pisa Istituto Toscano Tumori	Tel.: 0586 223458 Fax: 0586 223457 e@mail: a.falcone@med.unipi.it
-----------------------	---	---

PROTOCOL CONTRIBUTORS:

Dr. Gianluca Masi	U.O. Oncologia Medica Az. USL 6 di Livorno	Tel.: 0586 223458 Fax: 0586 223457 e@mail: gl.masi@tin.it
Dr. Enrico Vasile	U.O. Oncologia Medica Az. USL 6 di Livorno	Tel.: 0586 223458 Fax: 0586 223457 e@mail: envasile@tin.it
Dr. Fotios Loupakis	U.O. Oncologia Medica Az. USL 6 di Livorno	Tel.: 0586 223458 Fax: 0586 223457 e@mail: fotiosloupakis@virgilio.it

MEDICAL MANAGEMENT:

Dr. Giacomo Giulio Baldi	U.O. Oncologia Medica Az. USL 6 di Livorno	Tel.: 0586 223458 Fax: 0586 223457 e@mail: baldi.giacomo@infinito.it
Dr. Lorenzo Fornaro	U.O. Oncologia Medica Az. USL 6 di Livorno	Tel.: 0586 223458 Fax: 0586 223457 e@mail: lorenzo.fornaro@gmail.com
Dr.ssa Irene Stasi	U.O. Oncologia Medica Az. USL 6 di Livorno	Tel.: 0586 223458 Fax: 0586 223457 e@mail: stasi.irene@gmail.com

CLINICAL TRIAL ADMINISTRATION, DATA MANAGEMENT AND STATISTICAL ANALYSIS:

Michele Andreuccetti Bejtja Etleva	Ufficio Sperimentazioni Cliniche U.O. Oncologia Medica Az. USL 6 di Livorno	Tel.: 0586 223189 Fax: 0586 223457 e@mail: m.andreuccetti@nord.usl6.toscana.it
Dr Luca Boni	WEB Based Randomization E-CRF, Statistical analysis	Tel.: 0557947553 Fax: e@mail: luca.boni@ittumori.it

PARTECIPATING CENTERS

List of partecipating centers will be provided in a separate paper

TABLE OF CONTENTS

SYNOPSIS	pag. I
1.0 BACKGROUND	pag. 1
1.1 METASTATIC COLORECTAL CANCER.....	pag. 1
1.2 5-FLUOROURACIL IN THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER.....	pag. 1
1.3 IRINOTECAN OR OXALIPLATIN IN COMBINATION WITH 5-FLUOROURACIL IN THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER	pag. 1
1.4 TRIPLE-DRUG COMBINATION IN THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER	pag. 1
1.5 STOP-AND-GO STRATEGIES AND MAINTENANCE CHEMOTHERAPY IN THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER	pag. 3
1.6 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AND CANCER	pag. 4
1.7 BEVACIZUMAB IN THE TREATMENT OF COLORECTAL CANCER.....	pag. 4
1.8 POTENTIAL MOLECULAR SURROGATE MARKERS TO PREDICT THE ACTIVITY OF BEVACIZUMAB	pag. 7
2.0 STUDY RATIONALE	pag. 9
3.0 STUDY OBJECTIVES	pag. 10
3.1 PRIMARY	pag. 10
3.2 SECONDARY	pag. 10
4.0 PATIENTS' SELECTION	pag. 11
4.1 INCLUSION CRITERIA.....	pag. 11
4.2 EXCLUSION CRITERIA.....	pag. 11
5.0 STUDY DESIGN	pag. 12
5.1 TREATMENT REGIMENS.....	pag. 12
5.2 DURATION OF TREATMENT	pag. 12
5.3 STATISTICAL DESIGN AND DATA ANALYSIS	pag. 13
5.4 METHOD OF TREATMENT ALLOCATION	pag. 13
5.5 STUDY DURATION.....	pag. 13
5.6 PARTECIPATING CENTERS.....	pag. 13
6.0 ADDITIONAL EVALUATION	pag. 13
6.1 LOCAL TREATMENT OF METASTASES (RESECTION OF METASTASES)	pag. 14
6.2 POTENTIAL BIOLOGIC MARKERS PREDICTIVE OF TREATMENT BENEFIT	pag. 14
7.0 BASAL, DURING TREATMENT AND AT THE END OF TREATMENT EVALUATIONS	pag. 16
7.1 BASAL EVALUATION.....	pag. 16
7.2 DURING TREATMENT EVALUATION	pag. 16
7.3 RESPONSE EVALUATION.....	pag. 17
7.4 AT PROGRESSION EVALUATION	pag. 17
7.5 AT THE END OF TREATMENT AND EVERY 8 WEEKS	pag. 17
8.0 SAFETY ISSUES	pag. 18
8.1 DOSE REDUCTIONS AND DELAYS	pag. 18
8.2 CONCOMITANT MEDICATIONS.....	pag. 21
9.0 ETHICAL ISSUES	pag. 23
9.1 INFORMED CONSENT.....	pag. 23
9.2 PATIENT PROTECTION.....	pag. 23
9.3 ETHICS COMMITTEE (EC).....	pag. 23
9.4 ADMINISTRATIVE RESPONSIBILITIES	pag. 23
9.5 TRIAL SPONSORSHIP AND FINANCING.....	pag. 24
10.0 DATA COLLECTION AND MONITORING	pag. 25
10.1 DATA COLLECTION AND MONITORING PROCEDURE	pag. 25

10.2 QUALITY ASSURANCE	pag. 25
10.3 RESPONSIBILITIES OF THE INVESTIGATORS	pag. 25
10.4 SOURCE DOCUMENT REQUIREMENTS	pag. 25
10.5 USE AND COMPLETION OF CASE REPORT FORMS (CRFs)	pag. 25
11.0 ADVERSE EVENTS	pag. 27
11.1 DEFINITION OF AN ADVERSE EVENT	pag. 27
11.2 DEFINITION OF SERIOUS ADVERSE EVENT	pag. 27
11.3 DEATH ON STUDY	pag. 27
11.4 REPORTING PROCEDURE	pag. 28
11.5 FOLLOW-UP	pag. 28
REFERENCES	pag. 29
APPENDICES	pag. 33
Appendix I DICHIARAZIONE DI HELSINKI (it vers.)	pag. 35
Appendix II SCALA PER LA VALUTAZIONE DEL PERFORMANCE STATUS (it vers.)	pag. 39
Appendix III CRITERI NCI PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA'	pag. 40
Appendix IV CRITERI RECIST PER LA VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA (it vers.)	pag. 41
Appendix V SYNOPSIS + FLOW CHART (it vers.)	pag. 45
Appendix VI LETTERA INFORMATIVA PER IL PAZIENTE	pag. 54
Appendix VII CONSENSO INFORMATO AL TRATTAMENTO	pag. 60
Appendix VIII LETTERA INFORMATIVA PER IL PRELIEVO DI CAMPIONI DI SANGUE E PER LA RACCOLTA DI PREPARATI ISTOLOGICI PER ANALISI FARMACODINAMICHE E GENETICHE	pag. 61
Appendix IX CONSENSO INFORMATO AL PRELIEVO DI CAMPIONI DI SANGUE E PER LA RACCOLTA DI PREPARATI ISTOLOGICI PER ANALISI FARMACODINAMICHE E GENETICHE	pag. 64
Appendix X LETTERA INFORMATIVA MMG	pag. 65
Appendix XI ADVERSE EVENT FORM	pag. 69
Appendix XII CASE REPORT FORM (fac simile)	pag. 70

SYNOPSIS I/VIII	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER <i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i>
-------------------------------	--

PROTOCOL VERSION:	1.1 May 25 th 2008
SPONSOR	Gruppo Oncologico Nord Ovest (G.O.N.O.) – Italy
PROTOCOL PHASE	III
INDICATION	Metastatic cancer of the colon or rectum
STUDY RATIONALE	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bevacizumab associated either with IFL regimen or with 5-FU/LV is feasible and significantly improves response rate, progression free and overall survival compared to IFL and 5-FU/LV alone in first-line treatment of MCRC pts. ▪ Bevacizumab associated with FOLFOX-4 regimen is feasible and significantly improves response rate (RR), progression free (PFS) and overall (OS) survival over FOLFOX-4 alone in second-line treatment of MCRC pts treated in first-line with chemotherapy. ▪ Two large phase IV trials evaluating a total of about 4000 MCRC pts show that the combination of Bevacizumab with any first-line chemotherapy is safe and effective. ▪ The “GONO” FOLFOXIRI regimen is the first combination demonstrated to be superior to an infusional 5FU containing doublet as FOLFIRI in terms of RR, R0 resections, PFS and OS in metastatic colorectal cancer patients. ▪ Results of a phase II study conducted by the GONO group indicates that the combination of FOLFOXIRI+Bevacizumab is feasible and very active. ▪ The combination of FOLFIRI with bevacizumab is one of the reference first-line combinations in MCRC in Europe. ▪ Clinical development of “molecularly targeted” antiangiogenic drugs suffers from several handicaps including the possibility of identifying those patients more liable to benefit from these agents. ▪ Several studies report that alternative exon splicing of VEGF gene results in the generation of 4 different mRNA, encoding polypeptides of 121, 165, 189 and 206 amino acids. VEGF gene polymorphisms have been associated with variable production of VEGF protein and reported to be involved in susceptibility to several disorders in which angiogenesis may be critical in disease development. Therefore, the identification of VEGF polymorphisms may contribute to the evaluation of those neoplasms that will be resistant to antiangiogenic drugs. ▪ Several genes such as KRAS, BRAF, NF-kB or PML are determinant in the neoplastic progression of colorectal malignancies or in the control of the neoangiogenetic pathways. Their mutations and/or different degree of expression may play a central role in determining the benefit from chemotherapy and/or antiangiogenic drugs.
OBJECTIVES	<p>Primary:</p> <ul style="list-style-type: none"> • To compare the progression free survival of bevacizumab in combination with oxaliplatin, irinotecan and infusional 5FU/LV (“GONO” FOLFOXIRI regimen) to bevacizumab in combination with irinotecan and 5FU/LV (FOLFIRI regimen). <p>Secondary:</p> <ul style="list-style-type: none"> • To evaluate the safety profile including long-term adverse events of bevacizumab in combination with FOLFOXIRI or FOLFIRI. • To compare the overall response rate, duration of response, secondary R0-surgery rates of metastases and overall survival between treatment arms. • To evaluate potential surrogate markers predictive of bevacizumab activity.

<p style="text-align: center;">SYNOPSIS</p> <p style="text-align: center;">II/VIII</p>	<p style="text-align: center;">A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER</p> <p style="text-align: center;"><i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i></p>
<p>STUDY DESIGN</p>	<p>Open-label, two-arms, randomized, comparative, multi-center study</p>
<p>PLANNED SAMPLE SIZE</p>	<p>450 patients</p>
<p>TOTAL NO. OF CENTERS</p>	<p>Approximately 30 centers</p>
<p>SELECTION CRITERIA</p>	<p>Patients with unresectable metastatic cancer of the colon or rectum starting first-line combination chemotherapy.</p>
<p>TREATMENT</p>	<p>Patients will be stratified according to:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ECOG PS (0 vs 1,2) • Previous adjuvant chemotherapy (No vs Yes) • Center <p>And then randomly assigned to receive:</p> <p>FOLFOXIRI:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Irinotecan 165 mg/sqm IV over 1-h, day 1 – Oxaliplatin 85 mg/sqm IV over 2-h, day 1 – I-Leucovorin 200 mg/sqm IV over 2-h, day 1 – 5-fluorouracil 3200 mg/sqm IV 48-h continuous infusion, starting on day 1 <p>In combination with</p> <ul style="list-style-type: none"> – Bevacizumab 5 mg/Kg IV over 30', day 1 <p>or</p> <p>FOLFIRI:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Irinotecan 180 mg/sqm IV over 1-h, day 1 – I-Leucovorin 200 mg/sqm IV over 2-h, day 1 – 5-fluorouracil 400 mg/sqm IV bolus, day 1 – 5-fluorouracil 2400 mg/sqm IV 46-h continuous infusion, starting on day 1 <p>In combination with</p> <ul style="list-style-type: none"> – Bevacizumab 5 mg/Kg IV over 30', day 1 <p>Both regimens will be repeated every 2 weeks.</p>
<p>DURATION OF TREATMENT</p>	<p>Oxaliplatin and irinotecan should be continued until a maximum of 12 cycles, or progressive disease, or unacceptable toxicities or patients' refusal.</p> <p>Bevacizumab and 5-fluorouracil plus I-Leucovorin should be continued until evidence of progression, intolerable toxicity or patient' refusal.</p> <p>Bevacizumab should be continued even if 5-fluorouracil will be stopped until unacceptable toxicities or patients' refusal; continuation after disease progression is allowed upon investigator's judgment if a second-line treatment is initiated</p>
<p>RESECTION OF METASTASES</p>	<p>Surgical radical resection of residual metastases in responsive patients is highly recommended. Radiofrequency ablation of unresectable residual small nodules after surgery is also recommended.</p> <p>Bevacizumab should be stopped at least 5 weeks before the planned day of surgery while chemotherapy will be continued for one other cycle (maximum until 3 weeks before surgery)</p>

SYNOPSIS III/VIII	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10
--	--

RESECTION OF METASTASES <i>CONT.</i>	<p>After at least 4 weeks following resection, patients will restart the experimental treatment to receive a total of 12 cycles of FOLFIRI or FOLFOXIRI including those administered before surgery. Bevacizumab and 5FU/LV will be continued for a maximum of 12 months after resection.</p>
INCLUSION CRITERIA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Histologically proven diagnosis of colorectal cancer ▪ Not resectable metastatic colorectal cancer not previously treated with chemotherapy for metastatic disease ▪ Previous adjuvant therapy containing oxaliplatin or bevacizumab is allowed if more than 12 months have elapsed between the end of adjuvant therapy and first relapse ▪ At least one measurable lesion according to RECIST criteria ▪ Age 18-75 years ▪ ECOG PS ≤ 2 if age ≤ 70 years, ECOG PS = 0 if age = 71-75 years ▪ Life expectancy of at least 12 weeks ▪ Neutrophils $\geq 1.5 \times 10^9/L$, Platelets $\geq 100 \times 10^9/L$, Hgb >9 g/dl ▪ Total bilirubin ≤ 1.5 time the upper-normal limits (UNL) of the Institutional normal values and ASAT (SGOT) and/or ALAT (SGPT) $\leq 2.5 \times UNL$, or $\leq 5 \times UNL$ in case of liver metastases, alkaline phosphatase $\leq 2.5 \times UNL$, $\leq 5 \times UNL$ in case of liver metastases. ▪ Creatinine clearance >50 mL/min or serum creatinine $\leq 1.5 \times UNL$ ▪ Urine dipstick of proteinuria $<2+$. Patients discovered to have $\geq 2+$ proteinuria on dipstick urinalysis at baseline, should undergo a 24-hour urine collection and must demonstrate ≤ 1 g of protein/24 hr. ▪ Written informed consent. ▪ Patients must be accessible for treatment and follow up. Patients registered on this trial must be treated and followed at the participating Center
EXCLUSION CRITERIA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Radiotherapy to any site within 4 weeks before the study. ▪ Untreated brain metastases or spinal cord compression or primary brain tumours. ▪ History or evidence upon physical examination of CNS disease unless adequately treated (e.g., seizure not controlled with standard medical therapy or history of stroke). ▪ Serious, non-healing wound, ulcer, or bone fracture. ▪ Evidence of bleeding diathesis or coagulopathy. ▪ Uncontrolled hypertension. ▪ Clinically significant (i.e. active) cardiovascular disease for example cerebrovascular accidents (≤ 6 months), myocardial infarction (≤ 6 months), unstable angina, New York Heart Association (NYHA) grade II or greater congestive heart failure, serious cardiac arrhythmia requiring medication. ▪ Current or recent (within 10 days prior to study treatment start) ongoing treatment with anticoagulants for therapeutic purposes. ▪ Chronic, daily treatment with high-dose aspirin (>325 mg/day). ▪ Treatment with any investigational drug within 30 days prior to enrolment. ▪ Patients with known allergy to Chinese hamster ovary cell proteins, or any of the components of the study medications. ▪ Other co-existing malignancies or malignancies diagnosed within the last 5 years with the exception of basal and squamous cell carcinoma or cervical cancer in situ. ▪ Major surgical procedure, open biopsy, or significant traumatic injury within 28 days prior to study treatment start, or anticipation of the need for major surgical procedure during the course of the study. ▪ Lack of physical integrity of the upper gastrointestinal tract, malabsorption syndrome, or inability to take oral medication.

SYNOPSIS IV/VIII	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10
---------------------------------------	--

EXCLUSION CRITERIA <i>CONT.</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pregnant or lactating women. Women of childbearing potential with either a positive or no pregnancy test at baseline. Postmenopausal women must have been amenorrheic for at least 12 months to be considered of non-childbearing potential. Sexually active males and females (of childbearing potential) unwilling to practice contraception during the study. ▪ Symptomatic peripheral neuropathy \geq grade 1 according the NCI Common Toxicity Criteria.
MAIN PARAMETERS OF SAFETY	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adverse events, laboratory parameters. ▪ All toxicity will be graded using the NCI common toxicity criteria version 3.0
MAIN PARAMETERS OF EFFICACY	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Complete remission (CR): complete disappearance of all previously detectable disease for a period of at least 28 days, and no new lesions. ▪ Partial remission (PR): more than 30% decrease in the sum of the longest diameters of all target lesions for a period of at least 28 days, and no new lesions. ▪ Stable Disease (SD): neither sufficient shrinkage to qualify for PR nor sufficient increase to qualify for PD. ▪ Progressive disease (PD): an increase of more than 20% in the sum of the longest diameter of target lesions, or the appearance of disease at any sites. ▪ Progression-free survival (PFS) will be measured from the day of randomization until the first observation of disease progression or death due to any cause. ▪ Overall survival (OS) will be defined as the time between the day of randomization and the date of death or the last date the patient was known to be alive.
STUDY PROCEDURE	<p><u>At Baseline:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Complete medical history, ECOG PS, physical examination (including a neurological examination, height, weight) and vital signs (including blood pressure and pulse) ▪ ECG ▪ Complete blood chemistry: bilirubin (total and direct), ASAT, ALAT, alkaline phosphatase, albumin, LDH, serum creatinine, glucose, electrolytes (sodium, potassium, calcium), CEA, CA19.9; pregnancy test (if clinically indicate) ▪ Complete blood count and differential ▪ International normalized ratio (INR)/Activated partial Thromboplastin Time (APTT) ▪ Urinalysis ▪ Chest and Abdominal computer tomography (CT) scan, or Abdomen MRI and Chest X-Ray if CT scan contraindicated ▪ Written informed consent ▪ Collection of 13 ml whole blood sample: 6 ml will be equally divided and collected in 2 labeled plastic tube with EDTA while 7 ml, collected in a specific plastic tube for serological analyses, will be immediately centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes for serum isolation. The obtained samples will be immediately maintained at 0-4°C (not more than 15 min) and then stored at -20°C ▪ Collection of paraffin-embedded samples of primary and/or metastatic tumour for immunohistochemistry: 10 slides (of conventional thickness and polarity) from the primary tumor and/or 10 slides from at least one metastatic lesion will be necessary

<p style="text-align: center;">SYNOPSIS</p> <p style="text-align: center;">V/VIII</p>	<p style="text-align: center;">A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER</p> <p style="text-align: center;"><i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i></p>
<p style="text-align: center;">STUDY PROCEDURE</p> <p style="text-align: center;"><i>CONT.</i></p>	<p><u>During Treatment - Every 2 weeks:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Partial Blood chemistry: total bilirubin, ASAT, ALAT, alkaline phosphatase, serum creatinine ▪ Complete blood count and differential ▪ Dipstick proteinuria ▪ INR/APTT (for patients who are on anticoagulation therapy or at the occurrence of thromboembolic events or hemorrhage) ▪ Toxicity evaluation ▪ ECOG PS, physical examination (including a neurological examination, height, weight) and vital signs (including blood pressure and pulse) <p><u>During Treatment - Every 8 weeks</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tumor evaluation by using the same technique performed at baseline ▪ Complete blood chemistry, CEA, Ca19.9 ▪ Urinalysis <p><u>At progression</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Collection of 7 ml whole blood sample in a specific plastic tube for serological analyses. The sample will be immediately centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes for serum isolation. The obtained serum will be immediately maintained at 0-4°C (not more than 15 min) in a plastic tube and then stored at -20°C ▪ Collection of paraffin-embedded samples of primary and/or metastatic tumour for immunohistochemistry if not already collected at basal, e.g. biopsy or resection after the enrollment for clinical purposes: 10 slides (of conventional thickness and polarity) from the primary tumor and/or 10 slides from at least one metastatic lesion will be necessary <p><u>At the end of treatment and Every 8 weeks</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Complete medical history, ECOG PS, physical examination ▪ Follow-up on any unresolved adverse events ▪ Second-line treatment ▪ Tumor evaluation ▪ Survival
<p style="text-align: center;">TRANSLATIONAL ANALYSIS</p>	<p>Blood sampling and serum extraction will be executed at baseline and at progression for genotyping studies: at baseline 13 ml of whole blood will be drawn and 6 ml equally divided and collected in 2 labeled plastic tube with EDTA while 7 ml, collected in a specific plastic tube for serological analyses, will be immediately centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes for serum isolation. The obtained samples will be immediately maintained at 0-4°C (not more than 15 min) and then stored at -20°C. At progression 7 ml of whole blood will be drawn for serum extraction and storage as previously described.</p> <p>Tumoral sections from paraffin embedded primary and/or metastatic lesions will be collected at baseline or whenever possible for immunohistochemical analyses. Ten slides (of conventional thickness and polarity) from the primary tumor and/or 10 slides from at least one metastatic lesion (if already collected or biopsied/resected after the enrollment for clinical purposes) will be necessary.</p>
<p style="text-align: center;">DURATION OF THE STUDY</p>	<p>From May 2008 to November 2012</p> <p>Accrual period: 36 months</p> <p>Additional Follow up: 18 months</p>

SYNOPSIS VI/VIII	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER <i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i>
---------------------------------------	--

STATISTICAL CONSIDERATIONS	<p>The primary study end-point is progression-free survival, defined as the time from randomization to relapse or death, whichever occurred first.</p> <p>Previously reported trials have shown that the median progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients treated in first-line with bevacizumab in combination with a fluoropyrimidine-based doublet (as FOLFIRI) is about 11 months. With the use of a two-sided, unstratified log-rank test with a type I error of 0.05, we determined that 379 events (disease progression or death from any cause) would be required for an 80% power to detect a hazard ratio for progression of 0.75. With a 1:1 randomization of assignment to study groups and considering a total duration of the study of 54 months (36 months of accrual and 18 months of follow up) we estimated that we would need to enroll 450 patients to observe 379 events.</p> <p>The primary statistical analysis of efficacy will be performed according to the intention-to-treat principle, with the use of a two-sided log-rank test. Hazard ratios and 95 percent confidence intervals will be calculated with the use of the Cox proportional-hazards model. Survival curves will be calculated according to Kaplan–Meier methods.</p>
-----------------------------------	--

DOSE REDUCTIONS and DELAYS: CHEMOTHERAPY

TOXICITY AT THE START OF SUBSEQUENT CYCLES OF THERAPY	GRADE	CPT-11	OXALI	5FU
<i>WBC</i>	$< 3.000/mm^3$	Hold until resolution		
<i>Neutrophils</i>	$< 1.000/mm^3$			
<i>Platelets</i>	$< 100.000/mm^3$			
<i>Diarrohea</i>	≥ 1			
<i>Mucositis</i>	≥ 1			
<i>Any other non-hematological toxicity</i>	≥ 2			
<i>Hand/foot syndrome</i>	3 – 4	100%	100%	STOP
<i>Neurotoxicity</i>	≥ 3	100%	STOP	100%

PREVIOUS TOXICITY (After resolution)	GRADE	CPT-11	OXALI	5FU
<i>Neutropenia >5 days</i>	4	75%	75%	100%
<i>Febrile Neutropenia</i>	4			
<i>Thrombocytopenia</i>	3-4			
<i>Diarrohea</i>	3	75%	100%	75%
<i>Diarrohea</i>	4	50%	100%	50%
<i>Stomatitis</i>	3	100%	100%	75%
<i>Stomatitis</i>	4	100%	100%	50%
<i>Myocardial Ischemia</i>	---	100%	100%	STOP

SYNOPSIS VII/VIII	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER <i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i>
---------------------------------	--

DOSE REDUCTIONS and DELAYS: BEVACIZUMAB

▪ **Dose adjustments for toxicities attributable to BEVACIZUMAB**

Event	Adjustment
Hypertension Grade 3 Grade 4	If not controlled with triple-drug medication, discontinue bevacizumab Discontinue bevacizumab
Hemorrhage Grade ≥2 pulmonary or CNS Grade 3 non-pulmonary and non-CNS Grade 4	Discontinue bevacizumab Hold bevacizumab until all of the following criteria are met: -The bleeding has resolved and haemoglobin is stable -There is no bleeding diathesis that would increase the risk of therapy -There is no anatomic or pathologic condition that significantly increases the risk of hemorrhage recurrence Discontinue bevacizumab
Venous thrombosis Grade 3 or 4	Discontinue bevacizumab
Arterial thromboembolic event-any Grade	Discontinue bevacizumab
Congestive heart failure Grade 3 Grade 4	Hold bevacizumab until ≤ Grade 2 Discontinue bevacizumab
Proteinuria Grade 3 Grade 4	Hold bevacizumab until ≤ Grade 2 Discontinue bevacizumab
GI perforation	Discontinue bevacizumab
Bowel obstruction Grade 1 Grade 2 Grade 3/4	Patients who experience partial obstruction not requiring medical intervention may continue on bevacizumab Hold bevacizumab in patients who experience partial obstruction requiring medical intervention. Resume upon complete resolution Discontinue bevacizumab
Wound dehiscence	Discontinue bevacizumab
Other unspecified bevacizumab-related adverse events Grade 3 Grade 4	Hold bevacizumab until recovery to ≤ Grade 1 Discontinue bevacizumab

In case bevacizumab is discontinued, continuation of chemotherapy should be considered

SYNOPSIS VIII/VIII	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER <i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i>
----------------------------------	--

FLOW CHART

	BASELINE	EVERY CYCLE (2 WEEKS)	EVERY 8 WEEKS	AT THE END OF TREATMENT AND EVERY 8 WEEKS
Informed Consent	X			
Demographic and medical history	X			X
General Physical Examination, ECOG PS, Vital Signs and Physical Measurements (height, body weight, blood pressure, pulse)	X	X		X
Complete blood count and differential	X	X		X
Partial Blood Chemistry (serum creatinine, total bilirubin, ALAT, ASAT, alkaline phosphatase)	X	X		
INR/aPTT	X	X*		
Complete blood chemistry and Markers (serum creatinine, total and direct bilirubin, ASAT, ALAT, alkaline phosphatase, albumin, LDH, glucose, electrolytes (sodium, potassium, calcium), CEA, CA19.9)	X		X	X
Dipstick proteinuria		X		
Urinalysis	X		X	
ECG	X			
Toxicity evaluation NCI CTC v3.0		X		X
Tumour evaluation (CT scan or MRI + X-Ray)	X		X	X

*(for patients who are on anticoagulation therapy or at the occurrence of thromboembolic events or hemorrhage)

1.0 BACKGROUND

1.1 METASTATIC COLORECTAL CANCER

Colorectal carcinoma (CRC) is the second cause of death due to cancer in developed countries. In Italy during the 2000 about 30.000 new cases and over than 15.000 deaths have been recorded. Even if in the 90% of cases a radical resection of the primary tumour is possible, 25% of patients presents at diagnosis with metastatic disease and 50% of patients die for systemic disease (1).

1.2 5-FLUOROURACIL IN THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER

For over than 30 years 5-fluorouracil (5-FU) has been the only standard treatment for patients with metastatic CCR. A metanalysis (2) of various randomized trials has demonstrated that 5-FU alone versus best supportive care improves survival and quality of life of patients. Moreover a randomized trial demonstrated that the advantage is greater when chemotherapy is started early, in asymptomatic patients. (3).

1.3 IRINOTECAN OR OXALIPLATIN IN COMBINATION WITH 5-FLUOROURACIL IN THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER

Irinotecan and oxaliplatin are newer chemotherapeutic agents with antitumor activity in this disease (4). The combinations of irinotecan + 5-FU/leucovorin (LV) (FOLFIRI and IFL) and oxaliplatin + 5-FU/LV (FOLFOX) have demonstrated increased antitumor activity and efficacy compared with 5-FU/LV alone in phase III randomized studies (5,6,7,8). Of interest, phase III studies comparing irinotecan + 5-FU/LV with 5-FU/LV alone suggested that more active treatment upfront could prolong survival, even if active second-line therapies are offered to patients progressing on 5-FU/LV. Furthermore, studies with oxaliplatin + 5-FU/LV have indicated that a highly active first-line chemotherapy regimen may permit, in a small subgroup of initially unresectable metastatic colorectal cancer patients, a radical surgical approach to metastases after response to chemotherapy, and that approximately 30% to 40% of operated patients will survive without evidence of disease for >5 years (9,10). Therefore, these data indicate that, in metastatic colorectal cancer, a more active first-line treatment can be more effective. A meta-analysis of 25 randomized trials of first-line treatment with standard bolus intravenous fluoropyrimidines versus experimental treatments also supports the relationship between tumor response to first-line chemotherapy and survival (11). Furthermore, several data strongly support the use of the progression free survival as a surrogate of overall survival (12,13).

1.4 TRIPLE-DRUG COMBINATION IN THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER

A randomized study by the GERCOR (14) assigned 220 untreated metastatic colorectal cancer patients to receive first-line FOLFIRI [irinotecan 180 mg/m² 90-min intravenously (i.v.) and I-LV 200 mg/m² 2-h i.v. on day 1, followed by 5-FU 400 mg/m² i.v. bolus and 5-FU 2400–3000 mg/m² 48-h i.v. continuous infusion, repeated every 2 weeks] followed by FOLFOX-6 (oxaliplatin 100 mg/m² 2-h i.v. on day 1 and I-LV 200 mg/m² 2-h i.v. on day 1, followed by 5-FU 400 mg/m² i.v. bolus and 5-FU 2400–3000 mg/m² 48-h i.v. continuous infusion, repeated every 2 weeks) at progression (arm A), or the reverse (arm B). Both sequences achieved similar activity and efficacy, and, of interest, median survival was 21.5 months in arm A and 20.6 months in arm B, which are the highest survival times reported up to now in any randomized study of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. This study suggests that the exposure of metastatic colorectal cancer patients to all three most active agents, 5-FU/LV, irinotecan and oxaliplatin, is associated with promising survival. In addition, a study by Goldberg et al. (15), which demonstrates the superiority of the FOLFOX-4 regimen to IFL, suggests the importance of the exposure to all these three agents to achieve prolonged survival, because in the IFL arm only 24% of patients could receive oxaliplatin as second-line treatment, while in the FOLFOX-4 arm 60% of patients were able to receive salvage treatment with irinotecan. Furthermore, in a sequential strategy, not all patients who progress after first-line chemotherapy are able to receive second-line treatment, and therefore not all are exposed to these three active agents. In fact, clinical trials suggest that approximately 20% to 40% of patients, mainly because of deterioration of their performance status and liver function, will not be fit enough to undergo further chemotherapy and will receive only supportive care (5,6,8,15). Moreover, a recent pooled analysis of

seven phase III trials in metastatic colorectal cancer demonstrates that survival is correlated with the proportion of patients who received all the three active drugs in the course of their disease, but not with the proportion of patients who received any second-line therapy (16).

Therefore, a way to further improve the outcome of metastatic colorectal cancer patients could be a more aggressive first line polichemotherapy regimen containing all the three most active agents (LOHP, CPT-11 and 5FU/LV). This regimen, if feasible, could expose the 100% of patients to the three active drugs and, if more active than a standard two drugs combination, could increase the post-chemotherapy resection rate of metastases and the long term control of disease. In fact, a recent analysis conducted by Folprecht and coll. demonstrates a strong correlation between activity of first-line chemotherapy and the post-chemotherapy radical resection rate of metastatic disease (17).

Falcone et al. conducted a phase I-II study in 42 metastatic chemotherapy-naive colorectal cancer patients to test feasibility and activity of the following regimen: CPT-11 125-175 mg/sqm day 1, LOHP 100 mg/sqm day 2, I-LV 200 mg/sqm day 1 and 5-FU 3800 mg/sqm 48h chronomodulated infusion; cycles repeated every 2 weeks (FOLFOXIRI). The combination regimen was feasible with acceptable toxicities: grade 3 diarrhoea and grade 4 neutropenia in 21% and 55% of patients respectively. The regimen also revealed promising results in terms of activity (ORR=71,4%) and efficacy (median PFS/OS 10,4/26,5 months respectively) (18).

Moving from these encouraging results the authors conducted a phase II study with a simplified FOLFOXIRI regimen in order to increase the tolerability and the feasibility of the regimen. Planned doses of CPT-11 and LOHP were 165 mg/sqm e 85 mg/sqm respectively while 5-FU was administered at the dose of 3200 mg/sqm 48 hours flat continuous infusion. Thirty-two patients have been enrolled, all evaluable for activity and toxicity. Main grade 3-4 toxicities observed were: diarrhoea (16% of patients), neutropenia grade 4 (34%), stomatitis grade 3 (6%) and peripheric neurotoxicity (37%). Response rate was 72%, median PFS 10,8 months and median OS 28,4 months. The simplified FOLFOXIRI regimen demonstrated a reduced toxicity while activity and efficacy were still very promising (19).

The combined analysis of the 74 patients enrolled in the two above mentioned studies (18,19) demonstrated that a radical resection of residual metastatic disease after response to chemotherapy was performed in 19 patient (26%). The outcome of these resected patients is very promising, with a 4-years survival rate of 37% (20).

Other groups have evaluated similar three-drug combinations in colorectal and non-colorectal cancer patients, associating irinotecan and oxaliplatin with different schedules of 5-FU/LV. All these studies have confirmed the feasibility of these combinations, with neutropenia and diarrhea being the dose-limiting toxic effects, and showed a promising antitumor activity in metastatic colorectal cancer patients. In particular, Souglakos et al. (21) treated 31 metastatic colorectal cancer patients with first-line irinotecan 150 mg/m² on day 1, oxaliplatin 65 mg/m² on day 2, followed by standard de Gramont schedule LV-modulated bolus plus infusional 5-FU on days 2 and 3, repeated every 2 weeks, and achieved an overall response rate of 58%, and reported grade 3–4 diarrhea and neutropenia in 32% and 45% of patients, respectively. Ychou et al. (22) associated escalating doses of irinotecan and oxaliplatin given at day 1 with the standard de Gramont regimen (LV5FU2) or with the simplified LV5FU schedule given at days 1 and 2, repeated every 2 weeks, in patients with advanced solid tumors. The recommend doses of irinotecan and oxaliplatin are 180 mg/m² and 85 mg/m², respectively; grade 3–4 diarrhea affected 27% of patients, 78% of whom had grade 3–4 neutropenia. Calvo et al. (23) reported a 69% response rate on 26 patients treated with irinotecan 250 mg/m² on day 1, oxaliplatin 120 mg/m² on day 1 and LV 500 mg/m² plus 5-FU 2600 mg/m² over 24 h on days 1 and 15, repeated every 4 weeks. The authors observed grade 3–4 diarrhea in 34% and grade 3–4 neutropenia in 38% of patients. Moreover, Garufi et al. (24) demonstrated the feasibility of this triple drug combination using a chronomodulated infusion of 5-FU and oxaliplatin, and Comella et al. (25) and Goetz et al. (26) using bolus 5-FU. Compared with these previously reported regimens, simplified FOLFOXIRI seems to be particularly convenient for the patient and for the health-care facility, requiring only one or two admissions to the outpatient facility every 2 weeks. Moreover, in the simplified FOLFOXIRI regimen the administration of 5-FU by i.v. bolus is omitted allowing to deliver elevated dose intensities of irinotecan, oxaliplatin and 5-FU continuous infusion (approaching their recommended doses when used as single agent), producing a high response rate and promising progression-free and overall survival, coupled with a relatively low occurrence of non-hematological toxic effects (the incidence of grade 3–4 diarrhea being the lowest reported with this combination).

Finally, neutropenia, which is still relatively frequent, is usually short lasting and rarely complicated. Therefore, prophylactic therapy with G-CSF does not seem to be justified in all patients. However, prophylactic G-CSF should be considered in patients with a previous episode of grade 4 neutropenia or with persistent neutropenia on the day of recycle.

In conclusion, the simplified FOLFOXIRI combination has manageable toxic effects and very promising antitumor activity. While the safety profile seems to be improved in comparison with FOLFOXIRI regimen, the antitumor activity and efficacy seem to be maintained.

Therefore, the Gruppo Oncologico Nord Ovest (G.O.N.O.) compared, in a phase III multicenter randomized trial (27), the simplified FOLFOXIRI regimen to the standard FOLFIRI regimen. A total of 244 patients with measurable, not resectable MCRC and previously untreated with chemotherapy for advanced disease, were randomly assigned to receive: irinotecan 180 mg/sqm d1, I-LV 100 mg/sqm d1+d2, 5FU 400 mg/sqm bolus d1+d2, 5FU 600 mg/sqm 22-h infusion on d1+d2 (FOLFIRI, arm A, n=122) or irinotecan 165 mg/sqm d1, oxaliplatin 85 mg/sqm d1, I-LV 200 mg/sqm d1, 5FU 3200 mg/sqm 48-h infusion starting on d1 (FOLFOXIRI, arm B, n=122). Both treatments were repeated every 2 weeks and after progression to FOLFIRI an oxaliplatin containing regimen was recommended. Patients characteristics were (arm A vs arm B): median age 64 vs 62 yrs, ECOG PS 1-2 39% vs 39%, adjuvant CT 24% vs 24%, multiple sites of metastasis 50% vs 58%, liver metastases 77% vs 75%, liver involvement $\geq 25\%$ 56% vs 53%. Main observed toxicities per patient were (arm A vs arm B): grade 3-4 diarrhea 12% vs 20% (p=NS), grade 3-4 vomiting 2% vs 7% (p=NS), grade 3-4 stomatitis 3% vs 5% (p=NS), grade 2-3 peripheral neurotoxicity 0% vs 18% (p<0.05), grade 3-4 neutropenia 28% vs 49% (p<0.05), febrile neutropenia 3% vs 5% (p=NS). Two patients in each arm died within 60 days, but no toxic deaths have occurred. All the 244 pts enrolled were evaluated for activity and efficacy. Responses, assessed by investigators, were (arm A vs arm B): complete 6% vs 8%, partial 35% vs 58%, stable 33% vs 21% progression 24% vs 11%, not evaluable 2% vs 2%. The response rate (complete + partial) was significantly higher in the FOLFOXIRI arm (66% vs 41%, p=0.0002) and this difference was confirmed after a revision performed by an external panel. This higher activity of FOLFOXIRI produced an increased rate of secondary R0 surgical resection of metastases compared to FOLFIRI (14% vs 6% of patients, p=0.05). At a median follow-up of 36.3 months 225 patients have progressed and median PFS was significantly longer in the FOLFOXIRI arm (9.9 vs 6.9 months, p=0.0009) with an hazard ratio of 0.65 in favor of FOLFOXIRI. Finally the rate of early progressions (within 6 months from treatment onset) was significantly lower in the FOLFOXIRI arm (18% vs 45%, p<0.0001). With regard to overall survival, FOLFOXIRI also significantly improves survival in comparison to FOLFIRI (median 16.7 vs 23.6 months, p=0.04). The authors concluded that the FOLFOXIRI regimen is feasible with manageable toxicities also in a multicenter setting; the incidence of grade 3-4 neutropenia and grade 2-3 peripheral neurotoxicity is increased with FOLFOXIRI, but febrile neutropenia, diarrhea and other toxicities are comparable to FOLFIRI; response-rate, prevention of early progressions, progression-free survival, overall survival and post-CT radical surgical resections are improved with FOLFOXIRI.

Masi et al. (28) recently reported the long-term outcome of 37 unresectable metastatic colorectal cancer patients who underwent to a radical surgical resection of metastases among the 196 patients treated in the FOLFOXIRI studies, confirming that this regimen allows a radical resection in about 20% of initially unresectable not selected patients and that these patients can achieve significant long-term survival with a 40% of patients alive after 5 years.

1.5 STOP-AND-GO STRATEGIES AND MAINTENANCE CHEMOTHERAPY IN THE TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL CANCER

Usually the first-line chemotherapy is administered until disease progression, unacceptable toxicities or patients' refusal, but experimental studies indicate that an alternating treatment could delay the appearance of cell resistance and reduce the therapeutic load for the patients; in order to evaluate this point an Italian group performed a phase III trial with alternating (2 months on and 2 months off) *versus* continuous FOLFIRI in the first-line treatment of advanced colorectal cancer, demonstrating that alternating FOLFIRI could obtain the same survival of the continuous treatment (29).

Moreover, a French group has recently performed two studies evaluating the role of treatment intervals, the OPTIMOX1 (30) comparing FOLFOX4 regimen with a new strategy of intermittent oxaliplatin treatment based on FOLFOX7 with maintenance leucovorin and fluorouracil, and the OPTIMOX2 (31) comparing this last treatment with the complete stop and reintroduction of FOLFOX7; the results of these trials suggest that oxaliplatin can be safely stopped after some months of

treatment and that maintenance 5-fluorouracil plus leucovorin prolongs progression-free survival and overall survival with a good tolerance in metastatic colorectal patients. According to these results, another way to further improve the results of treatment of metastatic colorectal patients could be the use of maintenance treatment after some months of full dose therapy.

1.6 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AND CANCER

The VEGF-related gene family of angiogenic and lymphangiogenic growth factors comprises six secreted glycoproteins referred to as VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, and placenta growth factor (PlGF) -1 and -2, but VEGF-A (also known as vascular permeability factor or just VEGF) appears to be the most important regulator of vasculogenesis and angiogenesis during the carcinogenic process (32). The VEGF-A gene can undergo alternative splicing to yield mature isoforms of 121, 165, 189, and 206 amino acids, with also some less commonly variants identified. VEGF-A exerts its influence through binding principally to the VEGF receptor-2, found predominantly on the surfaces of vascular endothelial cells. This receptor shares many common characteristics with other members of a family of receptors having tyrosine kinase activity, including several extracellular Ig-like domains, a transmembrane region and an intracellular tail with tyrosine kinase activity. Induction of the kinase activity by VEGF binding triggers the phosphorylation of a multitude of proteins that are active in signal transduction cascades. In the pathogenesis of cancer, VEGF has a number of key roles. It stimulates excessive angiogenesis, allowing the tumour to embark upon its exponential growth phase. This vascularisation also provides an exit route for haematogenous metastases and allows them to establish themselves at their final destination. Moreover, many tumors express VEGF receptors so that VEGF can act as a paracrine factor acting directly on the tumor cells themselves.

The critical importance of VEGF during tumorigenesis has been illustrated by a number of observations: VEGF expression is elevated in many solid and haematologic malignancies; a significant correlation has been found between plasma VEGF levels and disease stage or metastasis; VEGF status has proved to be of value in predicting the effectiveness of anti-tumour treatments, as well as the likelihood of relapse, in a variety of cancers; pre-clinical experiments showed that anti-VEGF antibodies inhibited the growth of human tumour cell lines injected into nude mice (33-35).

1.7 BEVACIZUMAB IN THE TREATMENT OF COLORECTAL CANCER

Bevacizumab is a recombinant humanized monoclonal IgG1 antibody that binds to and inhibits the biologic activity of human vascular endothelial growth factor (VEGF) in *in vitro* and *in vivo* assay systems. Bevacizumab contains human framework regions and the complementarity-determining regions of a murine antibody that binds to VEGF (36).

The first phase I trial of bevacizumab began in 1997 (37). Twenty-five patients with measurable or assessable solid tumours (sarcoma = 8, renal cell carcinoma (RCC) = 7, breast cancer = 5, lung cancer = 2) were enrolled and five dose levels were assessed: 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 and 10 mg/kg. Bevacizumab was delivered intravenously over 90 minutes on days 0, 28, 35 and 42. One patient with RCC achieved a minor response with an approximate 25% reduction in the sum of perpendicular diameters of the pulmonary and lymph node metastases. 48% of the remaining patients achieved disease stabilization. Bevacizumab showed a linear pharmacokinetic profile and a terminal half life of 21 days. A phase Ib trial then assessed bevacizumab in combination with a number of standard cytotoxics (doxorubicin, carboplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil/leucovorin). Bevacizumab was administered at 3 mg/kg weekly for 8 weeks. This trial demonstrated that adding the anti-VEGF antibody did not significantly increase the known cytotoxic adverse event rates (38).

Kabbinavar and coll. investigated, in a phase II trial (39), the safety and efficacy of two doses of bevacizumab, plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) versus FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. 104 previously untreated patients with measurable metastatic colorectal cancer were randomly assigned to one of the following three treatment groups: 36 to FU (500 mg/m²)/LV (500 mg/m²) alone, 35 to FU/LV + low-dose bevacizumab (5 mg/kg every 2 weeks), and 33 to FU/LV + high-dose bevacizumab (10 mg/kg every 2 weeks). FU/LV was given weekly for the first 6 weeks of each 8-weeks cycle. Compared with the FU/LV control arm, treatment with bevacizumab (at both dose levels) plus FU/LV resulted in higher response rates [control arm, 17%, (95% confidence interval (CI): 7% to 34%); low-dose arm, 40%, (95% CI: 24% to 58%); high-dose arm, 24%, (95% CI: 12% to 43%)], longer median time to disease progression (control arm, 5.2 months, 95% CI: 3.5 to 5.6 months; low-dose arm, 9.0 months, 95% CI: 5.8 to 10.9 months; high-dose arm, 7.2 months, 95% CI:

3.8 to 9.2 months), and longer median survival [control arm, 13.8 months (95% CI: 9.1 to 23.0 months); low-dose arm, 21.5 months (95% CI: 17.3 to undetermined); high-dose arm, 16.1 months (95% CI: 11.0 to 20.7 months)]. After cross-over, two of 22 patients had a partial response to bevacizumab alone. The incidence and severity of adverse events known to be associated with FU/LV (diarrhea, leucopenia, and stomatitis) was as expected when bevacizumab was added to the regimen. Bevacizumab therapy was associated with fever, headache, rash, epistaxis, and chills; these events were generally mild to moderate in severity. Bleeding, hypertension, and thrombosis have been observed in other clinical trials of bevacizumab and occurred at an increased incidence in the bevacizumab arms in this trial. The most common type of bleeding in this study was transient epistaxis (lasting < 5 minutes), reported in 11% of control patients, 46% of 5-mg/kg patients, and 53% of 10-mg/kg patients. 3 patients in the 10-mg/kg arm had a grade 3 or 4 gastrointestinal hemorrhage. An excess of proteinuria was observed among patients treated with bevacizumab, as determined by routine dipstick analysis. 8 patients in the 5-mg/kg arm and 9 patients in the 10-mg/kg arm either developed proteinuria or experienced worsening proteinuria while on study (compared with 4 patients in the control arm). No patient developed nephrotic syndrome.

Hurwitz et al. have conducted a randomized, double-blind, active-controlled clinical trial (40) evaluating bevacizumab as first-line treatment of metastatic carcinoma of the colon or rectum. Patients were randomized to bolus-IFL (irinotecan 125 mg/mq IV, 5-fluorouracil 500 mg/mq IV, and leucovorin 20 mg/mq IV given once weekly for 4 weeks every 6 weeks) plus placebo (Arm 1), bolus-IFL plus bevacizumab (5 mg/kg every 2 weeks) (Arm 2), or 5-FU/LV plus bevacizumab (5 mg/kg every 2 weeks) (Arm 3). Enrollment in Arm 3 was discontinued, as pre-specified, when the toxicity of bevacizumab in combination with the bolus-IFL regimen was deemed acceptable. Of the 813 patients randomized to Arms 1 and 2, the median age was 60, 40% were female, and 79% were Caucasian. 57% had an ECOG performance status of 0. 21% had a rectal primary and 28% received prior adjuvant chemotherapy. In the majority of patients, 56%, the dominant site of disease was extra-abdominal, while the liver was the dominant site in 38% of patients. The patient characteristics were similar across the study arms. The primary endpoint of this trial was overall survival. The addition of bevacizumab to IFL chemotherapy produced significant improvements in response rate (44.8 versus 34.8%; $p = 0.004$), time to progression (10.6 versus 6.2 months; $p < 0.001$) and median survival (20.3 versus 15.6 months; $p < 0.001$). IFL alone produced grade 3/4 toxicity rates of 30% and 25% for neutropenia and diarrhoea respectively. Adding bevacizumab significantly increased grade 3 hypertension rates (11% versus 2.3%, $p < 0.01$), but interestingly did not impact significantly upon the rates of proteinuria, thrombosis and bleeding. 6 gastrointestinal perforations occurred in patients receiving IFL/bevacizumab. Among the 110 patients enrolled in Arm 3, median overall survival was 18.3 months, median progression-free survival was 8.8 months, overall response rate was 39%, and median duration of response was 8.5 months.

A retrospective analysis conducted on 813 patients enrolled in the previously described trial shows that the clinical benefit associated with bevacizumab treatment is independent from the objective tumor response achieved. In particular, dividing patients into two groups (responders and non-responders), hazard ratios for PFS and OS resulted significantly improved for bevacizumab-treated patients in both groups.

A third study evaluated the efficacy of adding bevacizumab to 5-FU/LV as first-line therapy in patients considered nonoptimal candidates for first-line irinotecan (41). Patients were randomly assigned to FU/LV + placebo ($n = 105$) or FU/LV + bevacizumab 5 mg/kg i.v. every 2 weeks ($n = 104$). Response rates were 26.0% for FU/LV + bevacizumab and 15.2% for the control arm ($p=0.055$). Median progression-free survival was 9.2 months for FU/LV + bevacizumab and 5.5 months for FU/LV + placebo ($p=0.0002$). Median survival was 16.6 months for FU/LV + bevacizumab and 12.9 months for FU/LV + placebo ($p=0.16$). Grade 3 hypertension was more common with bevacizumab treatment (16% vs 3%) but was controlled with oral medication. Two patients, both in the FU/LV + bevacizumab group, experienced a bowel perforation event.

A combined analysis of raw data from three randomized clinical studies that have evaluated bevacizumab in combination with FU/LV alone was performed by Kabbinar and coll. to better assess the efficacy of bevacizumab with FU/LV. The analysis included 241 patients in a combined control group receiving either FU/LV or IFL and 249 patients receiving FU/LV/bevacizumab (5 mg/kg once every 2 weeks). The efficacy data included response rate, progression-free survival, and overall survival. The median duration of survival was 17.9 months in the FU/LV/bevacizumab group, compared with 14.6 months in the combined control group, corresponding to a hazard ratio for death

of 0.74 ($P = .008$). The median duration of progression-free survival was 8.8 months in the FU/LV/bevacizumab group, compared with 5.6 months in the combined control group, corresponding to a hazard ratio for disease progression of 0.63 ($P < \text{or} = .0001$). The addition of bevacizumab also improved the response rate (34.1% v 24.5%; $P = .019$). The authors concluded that the addition of bevacizumab to FU/LV provides a statistically significant and clinically relevant benefit to patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (42).

The combination of bevacizumab with different irinotecan-containing regimens was recently tested in a phase III trial (43) in which 117 patients were randomly assigned to either modified IFL plus bevacizumab or FOLFIRI plus bevacizumab; the median PFS was 11.2 months for patients treated with FOLFIRI plus bevacizumab and 8.3 months for those treated with IFL plus bevacizumab, with a statistically significant difference in overall survival (not reached after a median follow up of 22.6 months in FOLFIRI group *versus* 19.2 months in IFL group).

The combination of FOLFIRI and bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer was evaluated in another phase II study on 41 patients in which the treatment resulted well-tolerated and efficacious with an impressive PFS of 12.6 months (44); these data were confirmed by the results of a phase IV study that enrolled 209 patients reporting a 90% of disease control rate and a 6 months PFS of 82%, superior to that reported in the trial with IFL plus bevacizumab (45), and by the preliminary results of the BEAT and the BRiTE trials, two observational studies evaluating the safety of bevacizumab with various first-line chemotherapy regimens for metastatic colorectal cancer patients. The BEAT trial, an expanded access program, enrolled 1927 patients in 41 countries between June 2004 and February 2006; the most common CT regimens used with bevacizumab were FOLFOX (28% of cases), FOLFIRI (26%), XELOX (18%) and 5-fluorouracil or capecitabine (16%). The median PFS with the combination FOLFIRI-bevacizumab was 11.1 months (46). Severe (grade 3-5) adverse events were unfrequent with a 2.1% bleeding, 1.6% of gastrointestinal perforation; 0.9% arterial thromboembolism, 3.7% hypertension, 0.4% proteinuria, and 0.8% wound healing complications (47). Eighty-one patients enrolled in the BEAT trial reported metastasectomies with minor complications in 23 cases, demonstrating that metastasectomies are feasible after treatment with bevacizumab plus CT (48).

The BRiTE study was a community-based observational registry that enrolled 1968 patients receiving bevacizumab plus first-line chemotherapy in 49 states between February 2004 and June 2005. CT regimens included mainly FOLFOX (55.8%), FOLFIRI (14.1%), and IFL (9.7%). The overall median PFS was 10.3 months (10.9 months in patients receiving FOLFIRI) with an estimated median OS that exceeds two years (49). In BRiTE study, the safety and efficacy of bevacizumab resulted comparable in patients ≥ 65 (45.9% of the total) or < 65 years old (50).

The study NO16966 (51) was the first randomized phase III trial to evaluate the combination of bevacizumab with first-line oxaliplatin-based chemotherapy (FOLFOX4 or XELOX); in particular, in this trial 1401 patients were randomized to receive FOLFOX or XELOX plus bevacizumab or placebo in a 2x2 factorial design. The results of this study showed a significant benefit in terms of PFS with the addition of bevacizumab, with a median PFS of 9.4 months *versus* 8.0 months of patients treated without bevacizumab without major differences in terms of severe toxicities. In this study the addition of bevacizumab didn't obtain a large advantage in PFS as that observed in Hurwitz trial; the main explanation of this fact could be that patients did not continue bevacizumab until progression after the end of chemotherapy (52). The number of patients who underwent to a radical surgical resection of liver metastases was higher in the bevacizumab arms (19.2%) than in the group of patients treated with FOLFOX or XELOX alone (12.9%).

Moreover, in a recent retrospective study in metastatic colorectal cancer patients treated preoperatively with fluoropyrimidine plus oxaliplatin chemotherapy, the addition of bevacizumab didn't appear to increase the incidence and severity of liver toxicity improving the pathologic response (53). The role of bevacizumab plus XELOX was also studied in a phase II trial presented at the last ASCO (American Society of Clinical Oncology) meeting; 54 patients with metastatic colorectal cancer with liver metastases potentially curable by resection were enrolled in the study. Patients received 6 cycles of therapy and then underwent to surgery; the sixth cycle didn't include bevacizumab resulting in a 5 weeks interval between the last bevacizumab dose and surgery; the treatment was restarted 5 weeks after surgery for another 6 courses. There was no increased intra-operative bleeding, perioperative blood transfusion or further surgery in respect to previous studies; postoperative liver function and regeneration were normal. No postoperative mortality occurred and morbidity was encountered in 8 patients, suggesting that bevacizumab can be safely administered until 5 weeks

prior to liver resection in these patients (54).

The combination of FOLFOX4 and bevacizumab was also evaluated by the ECOG E3200, a recently published randomized phase 3 trial (55) in which high-dose bevacizumab (10 mg/kg, IV, biweekly) either alone, or in combination with FOLFOX4 (biweekly administration of: oxaliplatin 85 mg/m², day 1; leucovorin 200 mg/m² IV 2hrs and fluorouracil 400 mg/m² IV bolus followed by fluorouracil 600 mg/m² CIV for 22hrs, days 1 & 2), has been compared to FOLFOX4 alone, in patients with previously treated advanced colorectal cancer. Eligible patients had an ECOG PS of 0-2 and must have been treated with a fluoropyrimidine and an irinotecan-based regimen used either alone or in combination. 829 patients were enrolled. The bevacizumab alone arm of the study was prematurely closed because of lack of efficacy. At a median follow-up of 28 months median PFS was 7.3 months for the FOLFOX4 + bevacizumab arm vs 4.7 months for FOLFOX4 alone ($p < 0.0001$); median OS was 12.9 vs 10.8 months respectively for experimental and control arm ($p = 0.0011$). Bowel perforation was infrequent (1.1%) but occurred only in patients treated with bevacizumab. Incidence of thrombosis/embolism was slightly increased in FOLFOX4 + bevacizumab arm (3.4% vs 2.5%).

The GONO group conducted a phase II trial evaluating the combination of bevacizumab 5 mg/kg on d1 with the GONO-FOLFOXIRI regimen (irinotecan 165 mg/sqm d1, oxaliplatin 85 mg/sqm d1, I-LV 200 mg/sqm d1 and 5FU 3200 mg/sqm 48-h flat continuous infusion starting on d1) repeated every 2 weeks as first-line treatment of initially unresectable mCRC pts. Up today, 40 pts have been enrolled. Main pts characteristics are: M/F = 65%/35%, median age (range) = 61 (41-75) years, ECOG-PS 0/1 = 83%/17%, primary colon/rectum = 72%/28%, primary on site = 10 pts (25%), sites of disease single/multiple = 52%/48%. Among the 38 pts assessable for toxicity the G3-4 observed toxicities per patient were: neutropenia 34% (febrile 3%), diarrhea 8%, nausea 5%, stomatitis 3%, neurotoxicity 3%, deep venous thrombosis 5% and hypertension 8%; G1 bleeding occurred in 12 pts (32%). G-CSF was used only for secondary prophylaxis in 15% of cycles. No toxic deaths have occurred. Up today 29 pts have been evaluated for response and we observed 2 CR, 20 PR (ORR = 76%) and 7 SD (disease control rate = 100%). Five pts (17%) underwent to secondary surgery on liver mts and 4 R0 resections were performed. After a median follow up of 6.5 months, median PFS and OS have not been reached yet (56).

In conclusion the addition of BV to the GONO-FOLFOXIRI regimen is feasible and manageable; the characteristic toxicity of BV and FOLFOXIRI occurs with the expected incidence and there were not unexpected adverse events. Treatment activity is very promising.

1.8 POTENTIAL MOLECULAR SURROGATE MARKERS TO PREDICT THE ACTIVITY OF BEVACIZUMAB

Clinical development of “molecularly targeted” antiangiogenic drugs suffers from several handicaps including the possibility of identifying those patients more liable to benefit from these agents. These problems necessitate the development of specific predictive markers.

Several studies report that alternative exon splicing of VEGF gene results in the generation of four different mRNA, encoding polypeptides of 121, 165, 189 and 206 amino acids. VEGF gene polymorphisms have been associated with variable production of VEGF protein and reported to be involved in susceptibility to several disorders in which angiogenesis may be critical in disease development. Therefore, the identification of VEGF polymorphisms may contribute to the evaluation of those neoplasms that will be resistant to antiangiogenic drugs (57, 58, 59).

K-RAS gene encodes a small protein with intrinsic GTPase activity, involved in transduction of external stimuli via Ras/Raf/MAPK pathway after EGFR activation. K-RAS mutations at codon 12 and 13 are found in about 40% of colon cancers. Mutated Ras protein is constitutively activated and subsequent signalling events are unregulated and independent from control. Patients carrying tumors with k-ras mutations have been reported to have a poorer prognosis and a diminished response to adjuvant chemotherapy. BRAF mutations occur with a frequency of about 10% of CRC and BRAF/KRAS mutations are mutually exclusive. BRAF mutations at exon 15 are found in about 10% of colon cancers.

Ras/Raf pathway signaling has also been reported to increase expression of VEGF and repress negative regulators of angiogenesis, suggesting that aberrations in K-RAS and/or BRAF may influence the response to antiangiogenic therapy.

Nuclear Factor-kB (NF-kB) is a transcription factor governing the expression of many genes involved

in the immune response, cell adhesion, angiogenesis, cell apoptosis, cell cycle progression, and oncogenesis. Different signalling pathways may trigger NF- κ B activation, which is aberrantly or constitutively present in many human cancers. NF- κ B activation has been shown to be responsible for resistance to antineoplastic agents, probably by inhibiting treatment-induced apoptosis in tumor cells (60).

The promyelocytic leukemia (PML) tumor suppressor is essential for a number of proapoptotic and growth-suppressive pathways. PML protein expression is frequently lost in human cancers of various histological origins, and its loss associates with tumor grade and progression in some tumor histotypes (61).

2.0 STUDY RATIONALE

From this background derive the rationale of this study:

- Bevacizumab associated either with IFL regimen or with 5-FU/LV is feasible and significantly improves median OS compared to IFL and 5-FU/LV alone in first-line treatment of MCRC pts.
- Bevacizumab was approved in USA and European Union for first-line treatment of metastatic colorectal cancer in combination with irinotecan and fluorouracil.
- The combination of bevacizumab and FOLFIRI reported similar efficacy data, with at about 11 months of median progression-free survival, and better tolerance than IFL plus bevacizumab and is nowadays one of the reference treatment of metastatic colorectal cancer in Europe.
- Two large trials evaluating approximately 4000 MCRC pts enrolled in 90 countries showed that the combination of Bevacizumab with any first-line chemotherapy is safe.
- A more active first-line chemotherapy regimen allows a higher rate of post-CT radical surgical resection of metastases and resected patients may have long-term survival.
- The “GONO” FOLOFOXIRI regimen is the first chemotherapy combination demonstrated to be superior to an infusional 5FU containing doublet as FOLFIRI in terms of RR, R0 resections, PFS and OS in metastatic colorectal cancer patients..
- Results of a phase II study conducted by the GONO group indicates that the combination of FOLFOXIRI+Bevacizumab is feasible and very active.
- Clinical development of “molecularly targeted” antiangiogenic drugs suffers from several handicaps including the possibility of identifying those patients more liable to benefit from these agents.
- Several studies report that alternative exon splicing of VEGF gene results in the generation of 4 different mRNA, encoding polypeptides of 121, 165, 189 and 206 amino acids. VEGF gene polymorphisms have been associated with variable production of VEGF protein and reported to be involved in susceptibility to several disorders in which angiogenesis may be critical in disease development. Therefore, the identification of VEGF polymorphisms may contribute to the evaluation of those neoplasms which will be resistant to antiangiogenic drugs.
- Several genes such as KRAS, BRAF, NF-kB or PML are determinant in the neoplastic progression of colorectal malignancies or in the control of the neoangiogenetic pathways. Their mutations and/or different degree of expression may play a central role in determining the benefit from chemotherapy and/or antiangiogenic drugs.

3.0 STUDY OBJECTIVES

3.1 PRIMARY

- To compare the progression free survival of bevacizumab in combination with oxaliplatin, irinotecan and infusional 5FU/LV (“GONO” FOLFOXIRI regimen) to bevacizumab in combination with irinotecan and infusional 5FU/LV (FOLFIRI regimen).

3.2 SECONDARY

- To evaluate the safety profile including long-term adverse events of bevacizumab in combination with FOLFOXIRI or FOLFIRI.
- To compare the overall response rate, duration of response, secondary R0-surgery on metastases rate and overall survival between treatment arms.
- To evaluate potential surrogate markers predictive of chemotherapy and bevacizumab activity.

4.0 PATIENTS' SELECTION

4.1 INCLUSION CRITERIA

- ✓ Histologically proven diagnosis of colorectal cancer.
- ✓ Not resectable metastatic colorectal cancer not previously treated with chemotherapy for metastatic disease.
- ✓ Previous adjuvant therapy containing oxaliplatin or bevacizumab is allowed if more than 12 months have elapsed between the end of adjuvant therapy and first relapse
- ✓ At least one measurable lesion according to RECIST criteria.
- ✓ Age 18-75 years.
- ✓ ECOG PS ≤ 2 if age ≤ 70 years, ECOG PS = 0 if age = 71-75 years.
- ✓ Life expectancy of at least 12 weeks.
- ✓ Neutrophils $\geq 1.5 \times 10^9/L$ and Platelets $\geq 100 \times 10^9/L$, Hgb >9 g/dl.
- ✓ Total bilirubin ≤ 1.5 time the upper-normal limits (UNL) of the Institutional normal values and ASAT (SGOT) and/or ALAT (SGPT) $\leq 2.5 \times UNL$, or $\leq 5 \times UNL$ in case of liver metastases, alkaline phosphatase $\leq 2.5 \times UNL$, $\leq 5 \times UNL$ in case of liver metastases.
- ✓ Creatinine clearance >50 mL/min or serum creatinine $\leq 1.5 \times UNL$.
- ✓ Urine dipstick of proteinuria $<2+$. Patients discovered to have $\geq 2+$ proteinuria on dipstick urinalysis at baseline, should undergo a 24-hour urine collection and must demonstrate ≤ 1 g of protein/24 hr.
- ✓ Written informed consent.
- ✓ Patients must be accessible for treatment and follow up. Patients registered on this trial must be treated and followed at the participating Center.

4.2 EXCLUSION CRITERIA

- ✓ Radiotherapy to any site within 4 weeks before the study.
- ✓ Untreated brain metastases or spinal cord compression or primary brain tumours.
- ✓ History or evidence upon physical examination of CNS disease unless adequately treated (e.g., seizure not controlled with standard medical therapy or history of stroke).
- ✓ Serious, non-healing wound, ulcer, or bone fracture.
- ✓ Evidence of bleeding diathesis or coagulopathy.
- ✓ Uncontrolled hypertension.
- ✓ Clinically significant (i.e. active) cardiovascular disease for example cerebrovascular accidents (≤ 6 months), myocardial infarction (≤ 6 months), unstable angina, New York Heart Association (NYHA) grade II or greater congestive heart failure, serious cardiac arrhythmia requiring medication.
- ✓ Current or recent (within 10 days prior to study treatment start) ongoing treatment with anticoagulants for therapeutic purposes.
- ✓ Chronic, daily treatment with high-dose aspirin (>325 mg/day).
- ✓ Treatment with any investigational drug within 30 days prior to enrolment.
- ✓ Patients with known allergy to Chinese hamster ovary cell proteins, or any of the components of the study medications.
- ✓ Other co-existing malignancies or malignancies diagnosed within the last 5 years with the exception of basal and squamous cell carcinoma or cervical cancer in situ.
- ✓ Major surgical procedure, open biopsy, or significant traumatic injury within 28 days prior to study treatment start, or anticipation of the need for major surgical procedure during the course of the study.
- ✓ Lack of physical integrity of the upper gastrointestinal tract, malabsorption syndrome, or inability to take oral medication.
- ✓ Pregnant or lactating women. Women of childbearing potential with either a positive or no pregnancy test at baseline. Postmenopausal women must have been amenorrheic for at least 12 months to be considered of non-childbearing potential. Sexually active males and females (of childbearing potential) unwilling to practice contraception during the study.
- ✓ Symptomatic peripheral neuropathy \geq grade 1 according the NCI Common Toxicity Criteria.

5.0 STUDY DESIGN

This is an open-label, multicenter, randomized phase III study of first-line chemotherapy with FOLFOXIRI + Bevacizumab versus FOLFIRI + Bevacizumab in metastatic colorectal cancer patients

5.1 TREATMENT REGIMENS

FOLFOXIRI:

- **Irinotecan** 165 mg/sqm IV over 1-h, day 1
- **Oxaliplatin** 85 mg/sqm IV over 2-h, day 1
- **I-Leucovorin** 200 mg/sqm IV over 2-h, day 1
- **5-fluorouracil** 3200 mg/sqm IV 48-h continuous infusion, starting on day 1

In combination with

- **Bevacizumab** 5 mg/Kg IV over 30', day 11

OR

FOLFIRI:

- **Irinotecan** 180 mg/sqm IV over 1-h, day 1
- **I-Leucovorin** 200 mg/sqm IV over 2-h, day 1
- **5-fluorouracil** 400 mg/sqm IV bolus day 1
- **5-fluorouracil** 2400 mg/sqm IV 46 h continuous infusion, starting on day 1

In combination with

- **Bevacizumab** 5 mg/Kg IV over 30', day 1

Both regimens will be repeated every 2 weeks.

5.2 DURATION OF TREATMENT

Oxaliplatin and Irinotecan should be continued until:

- A total of 12 Cycles (or more upon investigator's judgment in the best interest for the patient);
- Progressive disease;
- Unacceptable toxicities;
- Patients' refusal.

5-fluorouracil plus leucovorin should be continued until:

- Progressive disease;
- Unacceptable toxicities;
- Patients' refusal.

Bevacizumab should be continued until:

- Progressive disease*;
- Unacceptable toxicities;
- Patients' refusal.

* *Bevacizumab should be continued even if 5-fluorouracil will be stopped. Continuation after progression is allowed, upon investigator's judgment, if a second-line treatment is initiated.*

5.3 STATISTICAL DESIGN AND DATA ANALYSIS

The primary study end-point is progression-free survival, defined as the time from randomization to relapse or death, whichever occurred first.

Previously reported trials have shown that the median progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients treated in first-line with bevacizumab in combination with a fluoropyrimidine-based doublet (as FOLIRI) is about 11 months.

With the use of a two-sided, unstratified log-rank test with a type I error of 0.05, we determined that 379 events (disease progression or death from any cause) would be required for an 80% power to detect a hazard ratio for progression of 0.75. With a 1:1 randomization of assignment to study groups and considering a total duration of the study of 54 months (36 months of accrual and 18 months of follow up) we estimated that we would need to enroll 450 patients to observe 379 events.

The primary statistical analysis of efficacy will be performed according to the intention-to-treat principle, with the use of a two-sided log-rank test. Hazard ratios and 95 percent confidence intervals will be calculated with the use of the Cox proportional-hazards model. Survival curves will be calculated according to Kaplan–Meier methods.

5.4 METHOD OF TREATMENT ALLOCATION

Patients considered eligible and who have provided a written informed consent will be randomly assigned to one of the two treatment arms in a 1:1 ratio to receive first-line bevacizumab plus FOLFOXIRI or FOLFIRI.

Eligible patients will be stratified according to:

- ECOG PS (0 vs 1-2);
- Previous adjuvant chemotherapy (Yes vs No)
- Center

The randomisation will be performed by using an electronic WEB-based system.

The randomization code will consist of a unique identification code. This code must be used on all further documentation and correspondence, including E-CRFs.

It is responsibility of the principal investigator to ensure that the subject is eligible for the study before requiring randomization.

5.5 STUDY DURATION

The planned study duration is 54 months with a planned accrual time of three years and a planned follow-up time after the end of accrual of 18 months. No interim analyses have been planned.

5.6 PARTECIPATING CENTERS

Approximately 20-30 Italian centers.

6.0 ADDITIONAL EVALUATIONS

6.1 LOCAL TREATMENT OF METASTASES (RESECTION OF METASTASES)

The initiation of any non-protocol specific anti-tumour therapy or surgery is at the discretion of the investigator and in the best interest of the patient. In particular surgical radical resection of residual metastases in responsive patients is highly recommended and its feasibility should be evaluated every 2 months. Radiofrequency ablation of unresectable residual small nodules after surgery is also recommended.

In case the patient becomes eligible for curative resection of metastatic disease, bevacizumab treatment should be stopped at least 5 weeks before planned day of surgery while chemotherapy will be continued until 3 weeks before surgery (with one additional cycle of chemotherapy without bevacizumab before surgery). After resection, patients will restart the experimental treatment not before 4 weeks from surgery to receive a total of 12 cycles of FOLFIRI or FOLFOXIRI including those administered before surgery. Bevacizumab and 5FU/LV will be continued until tumor progression, unacceptable toxicity or patient refusal, or for a maximum of 12 months after resection. Bevacizumab will be continued for 12 months after surgery even if 5FU/LV will be stopped.

6.2 BIOLOGICAL SURROGATE MARKERS PREDICTIVE OF TREATMENT BENEFIT

VEGF genotyping. Genomic deoxyribonucleic acid (DNA) will be isolated from whole blood (fresh or frozen samples) by a standard extraction method. Nucleotide sequences containing four VEGF gene polymorphisms (-2578C/A, -1154G/A, -634C/G and 936C/T) will be amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and 50-100 ng of genomic DNA. Genotypes will be determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay. The restriction enzymes which detect -2578C/A, -1154G/A, -634C/G and 936C/T will be BstYI, MnlI, BsmFI and NlaIII, respectively (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), and then electrophoresed on 2% agarose gel. The RFLP results of -1154G/A will be only discernible on 12% polyacrylamide gel.

KRAS mutational analysis

DNA previously extracted and DNA extracted from serum will be amplified by a mutagenic PCR assay. We will use a mismatched upstream primer for codon 12 amplification and a mismatched downstream primer for codon 13 amplification which introduced a BstNI and a HaeIII restriction site in the wild type allele, respectively.

The primers used are as follows:

K-ras/12 (sense) 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3' (nt 99–128) and (antisense) 5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCAGTA-3' (nt 232–260),

K-ras/13 (sense) 5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGATTAA-3' (nt 1–30) and (antisense) 5'-GTATCGTCAAGGCACTCTTGCCTAGG-3' (nt 134–159).

RFLP Analysis: BstNI digestion of wild-type codon 12 allele yields two bands of 133 and 29 bp, while the mutant type remains intact (162 bp). HaeIII digestion of wild-type codon 13 allele yields fragments of 85, 48 and 26 bp while the mutant results in only two fragments of 85 and 74 bp. (A constant HaeIII site at nucleotide 85 yields an 85-bp fragment in all samples).

BRAF mutational analysis

Detection of BRAF mutation by PCR-SSCP and DNA sequencing.

PCR-SSCP screening of BRAF mutations will be performed by amplifying exon 15 according to a standard procedure; briefly, DNA previously extracted and DNA extracted from serum will be used as a template in a 20 µl PCR mixture containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ (pH 8.3), 0.2 mM dNTPs, 8 picomoles of amplimers and 1U of AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, Cetus). PCR primers for the BRAF exon 15 are as follows: 5'(F)-TCCTTT ACTTACTACACCTCAGAT-3' and 5'(R)-AGTGGAAAAATAGCCTCAAT-3'. The amplicon size is 167 bp. Cycling conditions are as follows: initial denaturation (94°C, 5 min), then 35 cycles (denaturation, 94°C for 40 sec; annealing, 55°C for 40 sec; synthesis, 72°C for 40 sec), followed by a final extension

of 5 min. All PCR products will be visualized by electrophoresis in 2% agarose gel and purified using PCR purification kit (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK). Purified products will be then diluted 1:1 with denaturing solution (1% xylene cyanol, 1% bromophenol blue, 0.1 mM EDTA, and 99% formamide), boiled for 5 min and immediately placed in ice to prevent the annealing of single strand products. SSCP screening will be carried out on the GenePhor Electrophoresis Unit using GeneGel Excel 12.5/24 (12.5% T, 2% C), according to manufacturer's instructions (Pharmacia Biotech). Electrophoresis (600V, 25 mA, 15 W) will be performed at 18°C for 100 min. Gels will be stained with PlusOne Silver Staining Kit (Amersham Biosciences, Freiberg, Germany), according to manufacturer's instructions. Altered migration patterns in two or three independent PCR-SSCP runs will be indicative of DNA mutations. Purified PCR products will be then sequenced by an automated sequencer (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystem) using the Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit. DNA sequences will be compared with those of the normal BRAF gene exon 15 by using the Basic Alignment Search Tool (BLAST) software available at the National Center for Biotechnology Information.

VEGF, NF-kB and PML immunohistochemistry

Such analyses will be conducted and results scored according to methods previously described (59-61).

7.0 BASAL, DURING TREATMENT AND AT THE END OF TREATMENT EVALUATIONS

7.1 BASAL EVALUATION

Within 1 months prior to first infusion:

- Complete medical history, ECOG PS, physical examination (including a neurological examination, height, weight) and vital signs (including blood pressure and pulse);
- ECG: a standard electrocardiogram will be performed at screening and as clinically indicated;
- Haematology: Haemoglobin, Platelet count, RBC, WBC including differential (Neutrophiles, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophiles, Basophiles);
- International normalized ratio (INR)/Activated partial Thromboplastin Time (APTT)
- Complete blood chemistry: bilirubin (total and direct), ASAT, ALAT, alkaline phosphatase, albumin, LDH, serum creatinine, glucose, electrolytes (sodium, potassium, calcium), CEA, CA19.9;
- Urinalysis;
- Chest and Abdominal computer tomography (CT) scan, or Abdomen MRI and Chest X-Ray if CT scan contraindicated;
- Written informed consent;
- A serum pregnancy test will be performed within 7 days prior to treatment exposure if childbearing potential cannot be ruled out. In case the sampling date for pregnancy testing exceeds the 7 days time interval before treatment start, a urine test is acceptable for confirmation of the absence of pregnancy;
- Collection of 13 ml whole blood sample: 6 ml will be equally divided and collected in 2 labeled plastic tube with EDTA while 7 ml, collected in a specific plastic tube for serological analyses, will be immediately centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes for serum isolation. The obtained samples will be immediately maintained at 0-4°C (not more than 15 min) and then stored at -20°C;
- Collection of paraffin-embedded samples of primary and/or metastatic tumour for immunohistochemistry: 10 slides (of conventional thickness and polarity) from the primary tumor and/or 10 slides from at least one metastatic lesion will be necessary.

7.2 DURING TREATMENT EVALUATION

At day 1 of every planned cycle:

- Patients will be assessed for treatment toxicity (grading by the common terminology criteria for adverse events (CTCAE version 3.0));
- ECOG PS, physical examination (including a neurological examination, height, weight) and vital signs (including blood pressure and pulse);
- Haematology: Haemoglobin, Platelet count, RBC, WBC including differential (Neutrophiles, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophiles, Basophiles);
- INR/APTT (for patients who are on anticoagulation therapy or at the occurrence of thromboembolic events or hemorrhage);
- Partial Blood chemistry: total bilirubin, ASAT, ALAT, alkaline phosphatase, serum creatinine;
- Dipstick proteinuria.

Additional assessments will be required in the case of hypertension, proteinuria, thrombosis and haemorrhagic events as specified below.

Hypertension: in the case of grade 3/4 hypertension, additional blood pressure measurements should be performed on a weekly basis (for the duration of trial therapy) until resolution of the event.

Proteinuria: a 24 hour urine collection is required in case of a protein \geq 2+ dipstick result.

Thrombosis: in case of grade 3/4 thrombosis a blood sample for the following laboratory values should be taken prior to initiation of treatment for the event: INR, aPTT.

Haemorrhagic events: in case of a hemorrhagic event of grade 2 or higher, a blood sample for the following laboratory values should be taken prior to treatment for the event: platelet count, INR, aPTT.

7.3 RESPONSE EVALUATION

Patients should be evaluated for response every 8 weeks following the RECIST criteria (see appendix), with:

- ✓ Tumor evaluation by using the same technique performed at baseline
- ✓ Complete blood chemistry: bilirubin (total and direct), ASAT, ALAT, alkaline phosphatase, albumin, LDH, serum creatinine, glucose, electrolytes (sodium, potassium, calcium), CEA, CA19.9;
- ✓ Urinalysis

7.4 AT PROGRESSION EVALUATION

- ✓ Collection of 7 ml whole blood sample in a specific plastic tube for serological analyses. The sample will be immediately centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes for serum isolation. The obtained serum will be immediately maintained at 0-4°C (not more than 15 min) in a plastic tube and then stored at -20°C.
- ✓ Collection of paraffin-embedded samples of primary and/or metastatic tumour for immunohistochemistry if not already collected at basal, e.g. biopsy or resection after the enrollment for clinical purposes: 10 slides (of conventional thickness and polarity) from the primary tumor and/or 10 slides from at least one metastatic lesion will be necessary.

7.4 AT THE END OF TREATMENT AND EVERY 8 WEEKS EVALUATION

- ✓ Complete medical history, ECOG PS, physical examination
- ✓ Follow-up on any unresolved adverse events
- ✓ Second-line treatment
- ✓ Tumor evaluation
- ✓ Survival

8.0 SAFETY ISSUES

8.1 DOSE REDUCTIONS AND DELAYS

Toxicities should be evaluated according to CTCAEv3.0 (see appendices).

Once a dose has been reduced it should not be increased at a later time.

- **Dose modifications for toxicities attributable to CHEMOTHERAPY**

TOXICITY AT THE START OF SUBSEQUENT CYCLES OF THERAPY	GRADE	CPT-11	OXALI	5FU
WBC	< 3.000/mm ³	Hold until resolution		
Neutrophils	< 1.000/mm ³			
Platelets	< 100.000/mm ³			
Diarrohea	≥ 1			
Mucositis	≥ 1			
Any other non-hematological toxicity	≥ 2			
Hand/foot syndrome	3 - 4	100%	100%	STOP
Neurotoxicity	≥ 3	100%	STOP	100%

PREVIOUS TOXICITY (After resolution)	GRADE	CPT-11	OXALI	5FU
Neutropenia >5 days	4	75%	75%	100%
Febrile Neutropenia	4			
Thrombocytopenia	3-4			
Diarrohea	3	75%	100%	75%
Diarrohea	4	50%	100%	50%
Stomatitis	3	100%	100%	75%
Stomatitis	4	100%	100%	50%
Myocardial Ischemia	---	100%	100%	STOP

- **Dose modifications for toxicities attributable to BEVACIZUMAB**

EVENT	ADJUSTMENT
Hypertension Grade 3 Grade 4	If not controlled with triple-drug medication, discontinue bevacizumab Discontinue bevacizumab
Hemorrhage Grade ≥ 2 pulmonary or CNS Grade 3 non-pulmonary and non-CNS Grade 4	Discontinue bevacizumab Hold bevacizumab until all of the following criteria are met: -The bleeding has resolved and haemoglobin is stable -There is no bleeding diathesis that would increase the risk of therapy -There is no anatomic or pathologic condition that significantly increases the risk of hemorrhage recurrence Discontinue bevacizumab
Venous thrombosis Grade 3 or 4	Discontinue bevacizumab
Arterial thromboembolic event-any Grade	Discontinue bevacizumab
Congestive heart failure Grade 3 Grade 4	Hold bevacizumab until \leq Grade 2 Discontinue bevacizumab
Proteinuria Grade 3 Grade 4	Hold bevacizumab until \leq Grade 2 Discontinue bevacizumab
GI perforation	Discontinue bevacizumab
Bowel obstruction Grade 1 Grade 2 Grade 3/4	Patients who experience partial obstruction not requiring medical intervention may continue on bevacizumab Hold bevacizumab in patients who experience partial obstruction requiring medical intervention. Resume upon complete resolution Discontinue bevacizumab
Wound dehiscence	Discontinue bevacizumab
Other unspecified bevacizumab-related adverse events Grade 3 Grade 4	Hold bevacizumab until recovery to \leq Grade 1 Discontinue bevacizumab

In case bevacizumab is discontinued, continuation of chemotherapy should be considered.

- **Gastrointestinal Perforation**

Bevacizumab should be permanently discontinued in patients who develop gastrointestinal perforation.

▪ ***Surgical Procedures/Wound Healing Complications***

Bevacizumab therapy should not be initiated for at least 28 days following major surgery or until the surgical wound is fully healed. In patients who experience wound healing complications during bevacizumab treatment, bevacizumab should be withheld until the wound is fully healed. Bevacizumab therapy should be withheld 5 weeks before elective surgery. CVAD placement and complications will be monitored both as an assessment of treatment-related complications. Date of placement of CVAD will be noted in the medical record and recorded in the eCRF. Episodes of CVAD removal or replacement will be recorded. Episodes of CVAD-related thrombosis, infection, or dysfunction will be recorded.

▪ ***Hypertension***

Patients should be monitored for the development or worsening of hypertension via frequent blood pressure measurement. Blood pressure measurements should be taken after the patient has been in a resting position for ≥ 5 minutes. Repeat measurements of blood pressure for verification should be undertaken if the initial reading is ≥ 140 mmHg systolic and/or ≥ 90 mmHg diastolic blood pressure.

- *Grade 1 hypertension*: Asymptomatic, transient (< 24 hrs) increase by > 20 mmHg (diastolic) or to $> 150/100$ mmHg if previously within normal limits. Intervention not indicated.

- *Grade 2 hypertension*: Recurrent or persistent (> 24 hr) or symptomatic increase by > 20 mmHg (diastolic) or to $> 150/100$ mmHg if previously within normal limits. Monotherapy with ACE-inhibitor may be indicated. Once controlled to $< 150/100$ mmHg, patients may continue bevacizumab therapy.

- *Grade 3 hypertension*: Requiring more than one anti-hypertensive or more intensive therapy than previously. Addition of diuretic to ACE-inhibitor may be indicated; if hypertension is not controlled a third anti-hypertensive drug (calcium channel blocker) should be added. Bevacizumab should be withheld for persistent or symptomatic hypertension and should be permanently discontinued if hypertension is not controlled with triple-drug medication.

- *Grade 4 hypertension*: Life threatening consequence (e.g. hypertensive crisis). Occurrence of grade 4 hypertension should lead to permanent discontinuation of bevacizumab. All doses of anti-hypertensive medicines should be recorded at all visits.

▪ ***Proteinuria***

All patients will have a dipstick urinalysis or 24 hour protein determination performed within 48 hours prior to the first bevacizumab dose and thereafter every 8 weeks. Adjustment of bevacizumab administration for proteinuria of ≥ 2 g/24h will occur according to the following guidelines, listed below:

- $< 2+$ (dipstick): no additional evaluation is required.

- $\geq 2+$ (dipstick): Collect 24-hour urine to determine the total protein within 3 days prior to the next scheduled dose:

- 24-hour proteinuria ≤ 2 g: Administer bevacizumab as scheduled.

- 24-hour proteinuria > 2 g: Bevacizumab treatment should be withheld pending next 24 hour total protein.

Repeat 24-hour urine protein ≤ 2 g: Administer bevacizumab as schedule. 24-hour protein should be further monitored prior to each administration of bevacizumab until it has decreased to ≤ 1 g/24 h.

Repeat 24-hour urine protein > 2 g: Bevacizumab dose should be withheld until 24-hour protein has decreased to ≤ 2 g. 24-hour protein should be further monitored prior to each administration of bevacizumab until it has decreased to ≤ 1 g/24 h.

Nephrotic syndrome (Grade 4, CTCAEv3.0): Discontinue bevacizumab treatment

▪ ***Thrombosis/Embolism***

All toxicity will be graded according to CTCAEv3.0 guidelines. For patients who develop thrombosis/embolism the following action is recommended:

Bevacizumab should be permanently discontinued in patients who develop arterial thromboembolic events of any grade and in patients to develop grade 3 or 4 venous thrombosis

▪ ***Haemorrhage***

All toxicity will be graded according to CTCAEv3.0 guidelines.

Patients who develop grade 3 pulmonary or CNS or grade 4 hemorrhage should discontinue bevacizumab treatment.

Patients who develop grade 3 non-pulmonary and non – CNS hemorrhage should hold bevacizumab until all of the following criteria are met:

- The bleeding has resolved and haemoglobin is stable
- There is no bleeding diathesis that would increase the risk of therapy
- There is no anatomic or pathologic condition that significantly increases the risk of hemorrhage recurrence

8.2 CONCOMITANT MEDICATIONS

▪ ***Acute colinergic syndrome***

Atropine sulfate can be used, at the discretion of the investigator, as secondary prophylaxis or therapy of early onset cholinergic syndrome induced by irinotecan. Secondary prophylactic or therapeutic administration of 0.25-1 mg of intravenous or subcutaneous atropine can be considered (unless clinically contraindicated) in patients experiencing rhinitis, increased salivation, miosis, lacrimation, diaphoresis, flushing, abdominal cramping, or diarrhea (occurring during or shortly after infusion of irinotecan).

▪ ***Antiemetic prophylaxis***

To be chosen on the basis of the chemotherapy regimen according to the center's guidelines.

▪ ***Treatment of diarrhoea***

Irinotecan can induce both early and late forms of diarrhea that appear to be mediated by different mechanisms. Early diarrhea (occurring during or shortly after infusion of irinotecan) is cholinergic in nature. It is usually transient and only infrequently is severe. It may be accompanied by symptoms of rhinitis, increased salivation, miosis, lacrimation, diaphoresis, flushing, and intestinal hyperperistalsis that can cause abdominal cramping. Early diarrhea and other cholinergic symptoms may be ameliorated by administration of atropine (0.25 mg SC). Atropine should not be given prophylactically during cycle 1. Late diarrhea (generally occurring more than 24 hours after administration of irinotecan) can be prolonged, may lead to dehydration and electrolyte imbalance, and can be lifethreatening. Patients and patients' caregivers should be carefully informed of possible severe toxic effects such as diarrhea and abdominal cramps. Each patient should be instructed to have loperamide readily available and to begin treatment for late diarrhea (generally occurring more than 24 hours after administration of irinotecan) at the first episode of poorly formed or loose stools or the earliest onset of bowel movements more frequent than normally expected for the patient. The patient should also be instructed to notify the Investigator if diarrhea or abdominal cramps occur. If diarrhea persists for more than 24 hours despite loperamide, the patient should be instructed to take a fluoroquinolone antibiotic and to re-contact the treating Investigator. The patient should be hospitalised for parenteral support and loperamide should be replaced by another anti-diarrheal treatment (e.g. octreotide). Patients should have a supply of fluoroquinolone antibiotic available at home. The recommended dosage

regimen for loperamide previously used in irinotecan clinical trials consists of the following: 4 mg at the first onset of late diarrhea and then 2 mg every 2 hours until the patient is diarrhea-free for at least 12 hours. Note: This dosage regimen exceeds the usual dosage recommendations for loperamide. Premedication with loperamide is not recommended. If diarrhea occurs it is of vital importance that measures are taken to avoid dehydration and electrolyte imbalance. Patients should be supported as clinically indicated. The use of drugs with laxative properties should be avoided because of the potential for exacerbation of diarrhea. Patients should be advised to contact their Investigator to discuss any laxative use. Abdominal cramps should be treated the same as for diarrhea.

▪ ***Extravasation***

No severe extravasation reactions have been observed so far with CPT-11 and Oxaliplatin. As a general recommendation, in the event of extravasation, the following advice should be observed (like for any drug):

1. stop the infusion immediately,
2. do not remove the needle or cannula,
3. aspirate as much infiltrated drug as possible from the subcutaneous site with the same needle,
4. apply ice to the area for 15 to 20 minutes every 4 to 6 hours for the first 72 hours,
5. watch the area closely during the following days in order to determine whether any further treatment is necessary.

▪ ***Hematopoietic growth factors***

G-CSF is not recommended as primary prophylaxis, but it can be used in secondary prophylaxis in case of:

- Precedent febrile neutropenia;
- Precedent grade 4 neutropenia lasting 5 days or more;
- More than 2 delays of the planned therapy due to neutropenia.

9.0 ETHICAL ISSUES

This protocol is in accordance with the principles laid down by the 18th World Medical Assembly (Helsinki, 1964) and amendments laid down by the 29th (Tokyo 1975), the 35th (Venice, 1983), the 41st (Hong Kong, 1989), the 48th (Somerset West, 1996) and the 52nd (Edinburgh, 2000) World Medical Assemblies (see appendices).

9.1 INFORMED CONSENT

The investigator must explain to each patient (or legally authorised representative) the nature of the study, its purpose, the procedures involved, the expected duration, the potential risks and benefits involved and any discomfort it may entail. Each patient must be informed that participation in the study is voluntary and that he/she may withdraw from the study at any time and that withdrawal of consent will not affect her subsequent medical treatment or relationship with physician. The informed consent will be given by means of standard written statement, written in non-technical language. The patient should read and consider the statement before signing and dating it, and should be given a copy of the signed document. If the subject cannot read or sign the document, oral presentation may be made or signature given by the subject's legally appointed representative, if witnessed by a person not involved in the study, mentioning that the patient could not read or sign documents. No patient can enter the study before her informed consent has been obtained. The informed consent is part of the protocol and must be submitted by the investigator with to the local ethical committee.

A copy of the patient's signed written consent will be kept by the center in the proper section of the Investigator Site File.

9.2 PATIENT PROTECTION

The names of patients will not be recorded; a sequential identification number will be attributed to each patient registered in the trial. This number will identify the patient and must be included on all Case Report Forms.

In order to avoid identification errors, patients initials (maximum of 4 letters) and date of birth will also be reported on the Case Report Forms.

Investigators will guarantee that all persons involved in this study will respect the confidentiality of any information concerning the trial subject.

All parties involved in this clinical trial will maintain the strict confidentiality to assure that neither the person nor the family privacy of the patient participating in the trial is violated; appropriate measures shall be taken to avoid the access of non authorized persons to the trial data. The processing of the personal data of patients taking part in the trial, and in particular regarding data concerning consent, shall comply with local law on the privacy (Legge delega 127/2001) and with the European Directive on the Privacy of data (95/46/EC).

9.3 ETHICS COMMITTEE (EC)

The Investigator must submit this protocol to the local Ethics Committee and is required to forward a copy of the written approval to the CRP.

The EC approval must report, the identification of the trial (title, protocol number and version), the documents evaluated (protocol, informed consent material, advertisement when applicable) and the date of their version.

9.4 ADMINISTRATIVE RESPONSIBILITIES

The Coordinating Data Center will be responsible for:

- reviewing the protocol
- generating randomisation procedure
- centralizing databases
- centralizing data validation according to Data Validation Plan
- controlling the quality of the reported data

- emitting Data Query Forms
- generating study program reports
- generating the Statistical Analysis Plan
- perform statistical analysis

9.5 TRIAL SPONSORSHIP AND FINANCING

- The present study is an investigator-initiated trial, carried out by participating clinicians, who have the intellectual ownership of the results.
- The study is sponsored by the cooperative group GONO Gruppo Oncologico del Nord-Ovest, via G Mameli 3 Genova, who will provide the economical support for costs related to data management, statistical analysis and the other activities of central and group coordinating centers.
- The study is economically supported by a unconditionated grant from Roche.
- No funds can be provided to ethical committees and single participating centers.
- The study will be conducted according to the current regulations.

10.0 DATA COLLECTION AND MONITORING

10.1 DATA COLLECTION AND MONITORING PROCEDURE

Data will be collected by using a WEB-Based - Electronic Case Report Form (E-CRFs)

On site monitoring visits will be performed at regular intervals during the study and correspondence between clinical data and CRFs will be assessed.

Data collection, monitoring visits and and data analysis will be coordinated from Ufficio sperimentazioni cliniche U.O Oncologia Medica Livorno Hospital.

10.2 QUALITY ASSURANCE

Each participating Investigator will be responsible for ensuring data quality as planned in the Data Validation Plan document. Each reported information will be systematically checked for consistency, completeness and accuracy by the Coordinating Data Center that will issue Data Query Forms in case of inconsistent data.

Local quality control will be provided by coordinating centers of each participating group, which will be responsible of monitoring the centers belonging to their group

10.3 RESPONSABILITIES OF THE INVESTIGATORS

The Investigator(s) undertake(s) to perform the study in accordance with ICH Good Clinical Practice and Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community (ISBN 92 - 825-9563-3).

The Investigator is required to ensure his compliance to the procedures required by the protocol with respect to the investigational drug schedule and visit schedule. The Investigator agrees to provide all information requested in the Case Report Form in an accurate and legible manner according to the instructions provided.

The Investigator has responsibilities to the Health Authorities to take all reasonable steps to ensure the proper conduct of the study as regards ethics, protocol adherence, integrity and validity of the data recorded on the case report forms. The main duty of the Trial Monitor is to help the Investigator and the Coordinators to maintain a high level of ethical, scientific, technical and regulatory quality in all aspects of the study.

At regular intervals during the study, the center will be contacted, through site visits, letters or telephone calls, to review the study progress, the investigators and subjects adherence to protocol requirements

During each monitoring visits, the following points will be scrutinized:

- subject informed consent
- subject recruitment and follow-up
- study drug allocation
- subject compliance to the study treatment
- study treatment accountability
- Adverse Event documentation and reporting,

10.4 SOURCE DOCUMENT REQUIREMENTS

According to the guidelines on ICH Good Clinical Practice, the monitor of the study will check the case report form entries against the source documents. These personnel, bound by professional secrecy, will not disclose any personal identity or personal medical information.

10.5 USE AND COMPLETION OF CASE REPORT FORMS (CRFS)

It is the responsibility of the Investigator to prepare and maintain adequate and accurate E-CRFs for

each patient enrolled in the study. All CRFs should be completed to ensure accurate interpretation of data; a black ballpoint pen should be used to ensure the clarity of reproduced copy of all CRFs. Should a correction be made, the information to be modified must not be overwritten. The corrected information will be transcribed next to the previous value with the reason for the correction, initialed and dated by the authorized person.

11.0 ADVERSE EVENTS

11.1 DEFINITION OF AN ADVERSE EVENT

Patients will be instructed by the Investigator to report the occurrence of any adverse event. An adverse event is any undesirable event associated with the use of a drug, whether or not considered drug related, and includes any side effect, injury, toxicity, or sensitivity reactions. It also includes any undesirable clinical or laboratory change, which does not commonly occur in the patient, and may:

- results in study withdrawal
- is associated with a serious adverse event
- is associated with clinical signs or symptoms
- is considered by the Investigator to be of clinical significance..

11.2 DEFINITION OF SERIOUS ADVERSE EVENT

A serious adverse event (SAE) is any event that is fatal, life-threatening, requires or prolongs hospitalisation, results in persistent or significant disability or incapacity, a congenital anomaly or birth defect, an important medical event.

- Life-threatening" means that the patient was at immediate risk of death from event as it occurred. It does not include an event that, had it occurred in a more serious form, might have been life threatening (i.e. asymptomatic febrile neutropenia)
- Requires in patient hospitalisation or prolongation of existing hospitalisation" should be defined as hospital admission required for treatment of the adverse event or occurred as a consequence of the event. Hospital admission for scheduled elective surgery would not be a serious adverse event.
- Important medical events" are those which may not resulted in death or be immediately life-threatening or result in patient hospitalisation, but may jeopardize patients and may require intervention to prevent one of the other serious outcomes listed above. Examples of such events are intensive treatment in an emergency room or at home for allergic bronchospasm; blood dyscrasias or convulsions that do not result in hospitalisation; development of drug dependency. A second malignancy or drug overdose or abuse may be considered serious by this criterion.

All adverse events which do not meet any of the criteria for serious should be regarded as non-serious adverse events.

All serious adverse events occurring during the study treatment period must be reported according to the procedure described below. Any late SAE (occurring after this 30 days period) possibly or probably related to the study chemotherapy should follow the same reporting procedure.

Progression of a patient's underlying condition leading to one of the above should not be reported as a serious adverse event.

11.3 DEATH ON STUDY

Any death occurring between the *registration* and 30 days following the *treatment* must be reported to the Sponsor within 24 hours, as a Serious Adverse Event, regardless of the relation to study drug(s). The Sponsor must notify this SAE to *CE coordinating center* by fax within 1 working day. Deaths occurring during the study follow-up period (i.e. later than 30 days after the last infusion) need only to be reported as serious adverse event if it is thought that there is a possible relation to the study drug(s) (possible, probable). All deaths should be reported on the death report form section of the CRF regardless of cause.

11.4 REPORTING PROCEDURE

- **Non-serious adverse events and non-serious adverse drug reactions**

All Adverse Events (AE) and Adverse Drug Reactions (ADR) occurring during the treatment period until the end of the last cycle must be recorded on the toxicity forms.

- **Serious adverse events or serious adverse drug reactions**

All Serious Adverse Events (SAE), related or not to the study treatment, occurring during the treatment period and within 30 days after the last protocol treatment, must be reported. Any late Serious Adverse Drug Reaction (SADR), occurring after this 30-day period, should follow the same reporting procedure.

This must be done by fax within 24 hours of the initial observation of the event on the provided SAE form, to the Sponsor (see appendix)

The investigator will decide if these events are related to the study treatment (i.e. unrelated, unlikely, possible, probable, definitely and not assessable) and the decision will be recorded on the Serious Adverse Event forms.

The assessment of causality is made by the investigator using the following definitions:

11.5 FOLLOW-UP

Patients withdrawn from the study treatment due to any adverse event will be followed at least until the outcome is determined, even if it implies that the follow-up continues after the patients has left the trial, and where appropriate until the end of the planned period of follow-up.

In case of serious adverse event, the patient must be followed until clinical recovery is complete and laboratory results have returned to normal, or until symptoms have stabilized. This may imply that the follow-up will continue after the patient has left the trial.

Further information will be noted on the SAE form, by ticking the box marked “follow-up” and will be sent to the Coordinating Center as information becomes available.

Relationship	Description
UNRELATED	There is no evidence of any causal relationship
UNLIKELY	There is little evidence to suggest there is a causal relationship (e.g. the event did not occur within a reasonable time after administration of the trial medication). There is another reasonable explanation for the event (e.g. the patient’s clinical condition, other concomitant treatments).
POSSIBLE	There is some evidence to suggest a causal relationship (e.g. because the event occurs within a reasonable time after administration of the trial medication). However, the influence of other factors may have contributed to the event (e.g. the patient’s clinical condition, other concomitant treatments).
PROBABLE	There is evidence to suggest a causal relationship and the influence of other factors is unlikely.
DEFINITELY	There is clear evidence to suggest a causal relationship and other possible contributing factors can be ruled out.
NOT ASSESSABLE	There is insufficient or incomplete evidence to make a clinical judgement of the causal relationship.

Details should be documented on the specified Serious Adverse Event Form.

PLEASE FAX OR THE REPORT TO 0586223457

The Sponsor will also send the report to national authorities, Ethic Committees (EC) and investigators as appropriate, according to local regulations

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward e, et al. Cancer Statistics 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:43-66.
2. Jonker DJ, Maroun JA, Kocha W, et al: Survival benefit of chemotherapy in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Cancer* 2000; 82:1789-1794.
3. Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group: Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1992; 10:904-11.
4. Conti JA, Kemeny NE, Saltz LB et al. Irinotecan is an active agent in untreated patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:709–715; Raymond E, Chaney SG, Taama A et al. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 1998; 9:1053–1071.
5. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter randomized trial. *Lancet* 2000; 355:1041–1047.
6. Saltz LB, Cox JV, Blanke C et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 343:905–914.
7. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil–leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:136–147.
8. de Gramont A, Figer A, Seymour M et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:2938–2947.
9. Giacchetti S, Itzhaki M, Gruia G et al. Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Ann Oncol* 1999; 10:663–669.
10. Adam R, Avisar E, Ariche A et al. Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:347–353.
11. Buyse M, Thirion P, Carlson RW et al. Relation between tumour response to first-line chemotherapy and survival in advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Lancet* 2000; 356:373–378.
12. Buyse M, Burzykowski T, Carroll K, et al. Progression-free survival is a surrogate for survival in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5218-5224
13. Tang PA, Bentzen SM, Chen Ex, Siu LL. Surrogate end points for median overall survival in metastatic colorectal cancer: literature-based analysis from 39 renadomized controlled trials of first-lien chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25:4562-4568
14. Tournigand C, Andre T, Achille E et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22:229–237.
15. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:23–30.
16. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM et al. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil–leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004; 22:1209–1214.
17. Folprecht G, Grothey A, Alberts S, Raab HR, Kohne CH. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol* 2005;16:1311-9.
18. Falcone A, Masi G, Allegrini G et al. Biweekly chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan, infusional Fluorouracil, and leucovorin: a pilot study in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:4006-4014.

19. Masi G, Allegrini G, Cupini S et al. First-line treatment of metastatic colorectal cancer with irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOXIRI): results of a phase II study with a simplified biweekly schedule. *Ann Oncol* 2004; 15:1766-72.
20. Masi G, Cupini S, Marcucci L, et al. Treatment with 5-fluorouracil/folini acid, oxaliplatin and irinotecan enables surgical resection of metastases in patients with initially unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2006; 13:58-65.
21. Souglakos J, Mavroudis D, Kakolyris S et al. Triplet combination with irinotecan plus oxaliplatin plus continuous-infusion fluorouracil and leucovorin as first-line treatment in metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 2002; 20:2651–2657.
22. Ychou M, Conroy T, Seitz JF et al. An open phase I study assessing the feasibility of the triple combination: oxaliplatin plus irinotecan plus leucovorin/5-fluorouracil every 2 weeks in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol* 2003; 14:481–489.
23. Calvo E, Cortes J, Rodriguez J et al. Irinotecan, oxaliplatin, and 5-fluorouracil/leucovorin combination chemotherapy in advanced colorectal carcinoma: a phase II study. *Clin Colorectal Cancer* 2002; 2:104–110.
24. Garufi C, Bria E, Vanni B et al. A phase II study of irinotecan plus chronomodulated oxaliplatin, 5-fluorouracil and folinic acid in advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2003; 89:1870–1875.
25. Comella P, Casaretti R, De Rosa V et al. Oxaliplatin plus irinotecan and leucovorin-modulated 5-fluorouracil triplet regimen every other week: a dose-finding study in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Ann Oncol* 2002; 13:1874–1881.
26. Goetz MP, Erlichman C, Windebank AJ et al. Phase I and pharmacokinetic study of two different schedules of oxaliplatin, irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in patients with solid tumours. *J Clin Oncol* 2003; 21:3761–3769.
27. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25:1670-6.
28. Masi G, Bursi S, Loupakis F, et al. Long-term outcome of unresectable metastatic colorectal cancer (MCRC) patients (pts) treated with first-line folfoxiri followed by r0 surgical resection of metastases. *Ann Oncol* 2007; 18(Suppl 7):vii28;PD-0015
29. Labianca R, Floriani I, Cortesi E, et al. Alternating versus continuous “FOLFIRI” in advanced colorectal cancer (ACC): a randomized “GISCAD” trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2006; 24, 18S: abstract 3505
30. Tournigard C, Cervantes A, Figer A, et al. OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-go fashion in advanced colorectal cancer – a GERCOR study. *J Clin Oncol* 2006; 24:394-400.
31. Maindrault-Goebel F, Lledo G, Chibaudel B, et al. Final results of OPTIMOX2, a large randomized phase II study of maintenance therapy or chemotherapy-free intervals (CFI) after FOLOFOX in patients with metastatic colorectal cancer (MRC): a GERCOR study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25:18S; abstract 4013.
32. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-676.
33. Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001; 2:667-673.
34. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438:967-974.
35. Kim KJ, Li B, Winer J et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993; 362:841–844.

36. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57:4593–9.
37. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:843–850.
38. Margolin K, Gordon MS, Holmgren E. Phase Ib trial of intravenous recombinant humanised monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: Pharmacologic and longterm safety data. *J Clin Oncol* 2001; 19: 851–856.
39. Kabbinavar F, Hurwitz H, Fehrenbacher L et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:60–65.
40. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:2335–2342.
41. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M et al Addition of Bevacizumab to Bolus Fluorouracil and Leucovorin in First-Line Metastatic Colorectal Cancer: Results of a Randomized Phase II Trial. *J Clin Oncol* 2005; 23:3697-370.
42. Kabbinavar FF et al. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:3706-12.
43. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bous, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C study. *J Clin Oncol* 2007; 25:4779-4786.
44. Kopetz S, Glover KY, Eng C, et al. Phase II study of infusional 5-fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) plus bevacizumab as first-line treatment for metastatic colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25:18S, abstract 4089.
45. Phase IV study of first-line bevacizumab plus irinotecan and infusional 5-FU/LV in patients with metastatic colorectal cancer: AVIRI. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25:18S, abstract 4068.
46. Kretschmar A, Van Cutsem E, Michael M, et al. Preliminary efficacy of bevacizumab with first-line FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and monotherapy for mCRC: first BEATrial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25;18S, abstract 4072.
47. Van Cutsem E, Michael M, Berry S, et al. Preliminary safety and efficacy of bevacizumab with first-line FOLFOX, XELOX; FOLFIRI, and capecitabine for mCRC: first BEATrial. *Proc Gastrointestinal Cancers Symposium* 2007; abstract 346.
48. Kretschmar A, Cunningham D, Berry S, et al. Feasibility of metastasectomy in patients treated with first-line bevacizumab for mCRC: preliminary results from the first BEAT study. *Proc Gastrointestinal Cancers Symposium* 2007; abstract 343.
49. Kozloff M, Hainsworth J, Badarinath S, et al. Survival of patients (pts) with mCRC treated with bevacizumab in combination with chemotherapy: results from the BRiTE registry. *Proc Gastrointestinal Cancers Symposium* 2007; abstract 375.
50. Sugrue MM, Kozloff M, Hainsworth J, et al. Safety and effectiveness of bevacizumab plus chemotherapy in elderly patients with mCRC: results from the BRiTE registry. *Proc Gastrointestinal Cancers Symposium* 2007; abstract 345.
51. Saltz L, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab (Bev) in combination with XELOX or FOLFOX4: updated efficacy results from XELOX-1/NO16966, a randomized phase III trial in first-line metastatic colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25:18S, abstract 4028.
52. Giantonio BJ, Meropol NJ, Catalano PJ, et al. Magnitude of progression-free survival (PFS) improvement and treatment (Tx) duration in metastatic colorectal cancer (mCRC) for

bevacizumab in combination with oxaliplatin-containing regimnes; an analysis of two phase III studies. Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25:18S, abstract 4073.

53. Ribero D, Wang H, Donadon M, et al. Bevacizumab improves pathological response and protects against hepatic injury in patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases. Cancer 2007; 110:2761-2767.
54. Gruenberger T, Tamandl D, Puhalla H, et al. Bevacizumab plus XELOX as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer. Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25:18S, abstract 4064.
55. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group study E3200. J Clin Oncol 2007; 25:1539-1544.
56. Falcone A, Masi G, Loupakis F, et al. FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin and infusional 5FU/LV) in combination with bevacizumab (BV) in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): a phase II study by the G.O.N.O. group. Proc Am Soc Clin Oncol 2008.
57. Uthoff SM, Duchrow M, Schmidt MH et al. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. Int J Cancer 2002; 101:32-6
58. Pasqualetti G, Danesi R, Del Tacca M, Bocci G. Vascular endothelial growth factor pharmacogenetics: a new perspective for anti-angiogenic therapy. Pharmacogenomics 2007; 8:49-66
59. Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, et al. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2006; 24:217-27
60. Scartozzi M, Bearzi I, Pierantoni C, et al. Nuclear factor-kB tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. J Clin Oncol 2007; 25:3930-5
61. Gurrieri C, Capodiecì P, Bernardi R, et al. Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. J Natl Cancer Inst 2004; 96:269-79



G.O.N.O.

GRUPPO ONCOLOGICO NORD-OVEST



**A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI +
BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-
LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER.**

(TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10)

APPENDICES

APPENDIX I: DICHIARAZIONE DI HELSINKI DELLA ASSOCIAZIONE MEDICA MONDIALE (AMM)

(Traduzione di Antonio G. Spagnolo)

PRINCIPI ETICI PER LA RICERCA MEDICA CHE COINVOLGE SOGGETTI UMANI

Adottata dalla 18° Assemblea Generale dall'AMM a Helsinki, Finlandia, nel giugno 1964 ed emendata dalla 29° Assemblea Generale a Tokyo, Giappone, nell'ottobre 1975, dalla 35° Assemblea Generale a Venezia, Italia, nell'ottobre 1983, dalla - 41ª Assemblea Generale a Hong Kong, nel settembre 1989, dalla 48° Assemblea Generale a Somerset West, Repubblica del Sud Africa, nell'ottobre 1996 e dalla 52° Assemblea Generale a Edimburgo, Scozia, nell'ottobre 2000.

a. Introduzione

1. L'AMM ha elaborato la Dichiarazione di Helsinki come dichiarazione di principi etici che forniscano una guida per i medici e per gli altri partecipanti ad una ricerca medica che coinvolge soggetti umani. La ricerca medica che coinvolge soggetti umani include la ricerca su materiale umano identificabile o su altri dati identificabili.
2. È dovere del medico promuovere e salvaguardare la salute delle persone. Le sue conoscenze e la sua coscienza sono finalizzate al compimento di questo dovere.
3. La Dichiarazione di Ginevra* dell'AMM impegna il medico con le parole «La salute del mio paziente sarà la mia preoccupazione principale», e il Codice Internazionale di Etica Medica** dichiara che «Un medico dovrà agire solo nell'interesse del paziente quando fornisca una cura medica che possa avere l'effetto di indebolire lo stato fisico e mentale del paziente».
4. Il progresso medico è fondato sulla ricerca la quale a sua volta si deve basare in qualche misura su una sperimentazione che coinvolga soggetti umani.
5. Nella ricerca su soggetti umani, le considerazioni correlate con il benessere del soggetto umano devono avere la precedenza sugli interessi della scienza e della società.
6. Lo scopo primario della ricerca medica che coinvolga soggetti umani è quello di migliorare le procedure preventive, diagnostiche e terapeutiche e di comprendere l'eziologia e la patogenesi della malattia. Anche i più comprovati metodi preventivi, diagnostici e terapeutici devono continuamente essere messi in discussione mediante la ricerca sulla loro efficacia, efficienza, accessibilità e qualità.
7. Nella pratica medica corrente e nella ricerca medica, la maggior parte delle procedure preventive, diagnostiche e terapeutiche implicano rischi ed aggravii.
8. La ricerca medica è sottoposta agli standard etici che promuovono il rispetto per tutti gli esseri umani e proteggono la loro salute e i loro diritti. Alcuni soggetti di ricerca sono vulnerabili e richiedono una speciale protezione. Devono essere riconosciuti le particolari necessità di coloro che sono economicamente e medicalmente svantaggiati. Una speciale attenzione e pure richiesta per coloro che non possono dare o che rifiutano il consenso personale, per coloro che possono essere esposti a dare il consenso sotto costrizione, per coloro che non beneficeranno personalmente dalla ricerca e per coloro per i quali la ricerca è associata alla cura.

* Approvata a Ginevra nel 1948 e rivista a Sidney nel 1968 dalla XXII Assemblea Medica Mondiale (N.d.T.)

** Adottato a Londra dalla III Assemblea Generale dell'Associazione Medica Mondiale (N.d.T.)

9. I ricercatori devono essere al corrente dei requisiti etici, giuridici e regolatori della ricerca sui soggetti umani, sia i requisiti nazionali sia quelli internazionali, ove applicabili. Nessun requisito nazionale di natura etica, giuridica o regolatoria deve poter ridurre o eliminare alcuna delle protezioni per i soggetti umani esposte in questa Dichiarazione.

b. Principi basilari per tutta la ricerca medica

10. Nella ricerca medica è dovere del medico proteggere la vita, la salute, la riservatezza e la dignità del soggetto umano.
11. La ricerca medica che coinvolge soggetti umani deve essere conforme ai principi scientifici universalmente accettati e deve essere basata su una approfondita conoscenza della letteratura scientifica, di altre rilevanti fonti di informazione, e su un'adeguata sperimentazione in laboratorio e, ove appropriato, sull'animale.
12. Un'appropriata cautela deve essere posta nella conduzione di ricerche che possano incidere sull'ambiente, e deve essere rispettato il benessere degli animali utilizzati per la ricerca.
13. Il disegno e l'esecuzione di ogni procedura sperimentale che coinvolga soggetti umani devono essere chiaramente descritti in un protocollo di sperimentazione. Tale protocollo deve essere sottoposto ad esame, commenti, orientamenti e, dove previsto, all'approvazione da parte di un comitato etico di revisione appositamente istituito; che deve essere indipendente dal ricercatore, dallo sponsor e da qualsiasi altro tipo di indebita influenza. Questo comitato indipendente deve essere conforme alle leggi ed ai regolamenti della nazione in cui la sperimentazione è condotta. Il comitato ha titolo per monitorare i trial in corso. Il ricercatore ha l'obbligo di fornire le informazioni di monitoraggio al comitato, specialmente quelle relative agli eventi avversi seri. Il ricercatore deve anche sottoporre al comitato, per la revisione, le informazioni relative a finanziamento, sponsor, appartenenze a istituzione, altri potenziali conflitti di interesse e incentivi per i soggetti di sperimentazione.
14. Il protocollo di ricerca deve sempre contenere una esposizione delle considerazioni etiche implicate e deve recare l'indicazione di conformità con i principi, enunciati nella presente Dichiarazione.
15. La ricerca biomedica che coinvolge soggetti umani deve essere condotta solo da persone scientificamente qualificate e sotto la supervisione di un medico competente sul piano clinico. La responsabilità nei confronti del soggetto umano deve sempre ricadere sul personale medico qualificato e mai sul soggetto della ricerca, anche se questi ha dato il proprio consenso
16. Ogni progetto di ricerca medica che coinvolga soggetti umani deve essere preceduto da un'attenta valutazione dei rischi e degli aggravi prevedibili in rapporto ai benefici attesi per il soggetto stesso o per altri. Ciò non preclude la partecipazione di volontarisani ad una ricerca medica. Il disegno di tutti gli studi deve essere pubblicamente disponibile.
17. I medici devono astenersi dall'intraprendere progetti di ricerca che coinvolgano soggetti umani a meno che non siano sicuri che i rischi implicati siano stati adeguatamente valutati e possano essere controllati in modo soddisfacente. I medici devono interrompere ogni ricerca se i rischi si presentano superiori ai potenziali benefici o se si è raggiunta già una prova definitiva di risultati positivi e benefici.
18. La ricerca medica che coinvolga soggetti umani deve essere condotta solo se l'importanza dell'obiettivo prevalga sui rischi e gli aggravi connessi per il

soggetto. Ciò è particolarmente importante quando i soggetti umani siano volontari sani.

19. La ricerca medica è giustificata solo se vi è una ragionevole probabilità che le popolazioni in cui la ricerca è condotta possano beneficiare dei risultati della ricerca.
20. I soggetti devono essere volontari e partecipare informati al progetto di ricerca.
21. Il diritto dei soggetti di sperimentazione alla salvaguardia della loro integrità deve essere sempre rispettato. Deve essere adottata ogni precauzione per rispettare la privacy del soggetto, la riservatezza sulle informazioni relative al paziente e per minimizzare l'impatto dello studio sulla integrità fisica e mentale del soggetto e sulla sua personalità.
22. In ogni ricerca su esseri umani ciascun potenziale soggetto deve essere adeguatamente informato degli scopi, dei metodi, delle fonti di finanziamento, di ogni possibile conflitto di interessi, della appartenenza istituzionale del ricercatore, dei benefici previsti e dei rischi potenziali connessi allo studio, nonché dei fastidi che esso potrebbe comportare. Il soggetto deve essere informato del diritto di astenersi dal partecipare allo studio o della possibilità di ritirare il consenso alla partecipazione in qualsiasi momento senza ritorsioni. Solo dopo essersi assicurato che il soggetto abbia compreso le informazioni, il medico deve ottenere dal soggetto il consenso informato, liberamente espresso, preferibilmente in forma scritta. Se il consenso non può essere ottenuto per iscritto, deve essere formalmente documentato e testimoniato un consenso non scritto.
23. Nell'ottenere il consenso informato al progetto di ricerca, il medico deve essere particolarmente attento quando il soggetto si trovi in una condizione di dipendenza nei suoi confronti o possa sentirsi costretto a dare il consenso. In questo caso il consenso informato deve essere ottenuto da un altro medico che conosca bene la ricerca ma non sia coinvolto in essa e che sia completamente indipendente nella relazione col soggetto.,
24. Per un soggetto di ricerca che sia legalmente, fisicamente o mentalmente incapace di dare il consenso, o per un minore legalmente incapace, il ricercatore deve ottenere il consenso informato dal tutore legale, in accordo con la legislazione specifica. Questi gruppi di soggetti non devono essere inclusi in una ricerca a meno che la ricerca stessa non sia necessaria per promuovere la salute della popolazione rappresentata e tale ricerca non possa essere invece attuata su persone legalmente capaci.
25. Quando un soggetto giudicato legalmente incapace, come un minore, sia capace di dare un assenso alla decisione di partecipare in una ricerca, lo sperimentatore deve ottenere tale assenso in aggiunta a quello del tutore legale.
26. La ricerca su individui dai quali non sia possibile ottenere un consenso, incluso quello rappresentato o anticipato, deve essere attuata solo se la condizione fisica o mentale che impedisce di ottenere il consenso è una caratteristica necessaria della popolazione in studio. Le ragioni specifiche per coinvolgere soggetti di ricerca che si trovino in condizioni tali da renderli incapaci di dare un consenso informato devono essere dichiarate nel protocollo di sperimentazione per l'esame e l'approvazione da parte del comitato di revisione. Il protocollo deve dichiarare che il consenso a rimanere nella ricerca sarà ottenuto non appena possibile da parte dello stesso soggetto o da un rappresentante legalmente autorizzato.
27. Sia gli autori sia gli editori hanno obbligazioni etiche. Nella pubblicazione dei risultati della ricerca gli sperimentatori sono obbligati, a salvaguardare l'accuratezza dei risultati. Sia i risultati negativi sia quelli positivi devono essere

pubblicati o resi in qualche modo pubblicamente disponibili. Le fonti del si devono essere dichiarati nella pubblicazione. Relazioni di sperimentazioni non conformi con i principi fissati in questa Dichiarazione non devono essere accettati per la pubblicazione.

c. Principi aggiuntivi per la ricerca medica associata alle cure mediche

28. Il medico può associare la ricerca medica con le cure mediche solo con il limite che la ricerca sia giustificata da un potenziale valore preventivo, diagnostico o terapeutico. Quando la ricerca medica è associata con le cure mediche si applicano degli standard addizionali per proteggere i pazienti che sono soggetti di ricerca.
29. I benefici, i rischi, gli aggravamenti e l'efficacia di un nuovo metodo devono essere valutati in confronto con quelli dei migliori metodi preventivi, diagnostici e terapeutici attualmente in uso. Ciò non esclude l'impiego di placebo, o l'assenza di trattamento, negli studi dove non esistono metodi comprovati di prevenzione, diagnosi o terapia.
30. A conclusione dello studio, ad ogni paziente entrato nello studio deve essere assicurato l'accesso ai migliori metodi preventivi, diagnostici e terapeutici di comprovata efficacia identificati dallo studio.
31. Il medico deve informare pienamente il paziente di quali aspetti della cura sono correlati con la ricerca. Il rifiuto di un paziente a partecipare in uno studio non deve mai interferire con la relazione medico-paziente.
32. Nel trattamento di un paziente, laddove non esistano comprovati metodi preventivi, diagnostici e terapeutici o questi siano stati inefficaci, il medico, con il consenso informato del paziente, deve essere libero di usare mezzi preventivi, diagnostici e terapeutici non provati o nuovi, se a giudizio del medico essi offrono speranza di salvare la vita, ristabilire la salute o alleviare la sofferenza. Laddove possibile, tali mezzi dovrebbero essere fatti oggetto di una ricerca disegnata per valutare la loro sicurezza ed efficacia. In tutti i casi, le nuove informazioni devono essere registrate e, dove opportuno, pubblicate. Tutte le altre linee-guida di questa Dichiarazione devono essere seguite.

APPENDIX II: SCALA PER LA VALUTAZIONE DEL PERFORMANCE STATUS

Scale di valutazione delle condizioni generali (performance status) (Karnofsky ed ECOG)

ECOG	Karnofsky
0 In grado di svolgere le attività normali senza restrizioni	100% Normale nessun disturbo né evidenza di malattia
	90% In grado di svolgere le attività normali; modesti segni o sintomi di malattia
1 Presenta restrizioni alle attività fisiche strenue, ma deambula ed è in grado di svolgere attività lievi o sedentarie, quali lavori domestici	80% Attività normale con sforzo; alcuni segni o sintomi di malattia
2 Deambula, è autosufficiente, ma non può svolgere attività lavorative; in piedi per più del 50% del tempo	60% Richiede assistenza saltuaria, ma può soddisfare la maggior parte delle sue esigenze
	50% Richiede notevole assistenza e frequenti cure mediche
3 Appena autosufficiente, allettato o seduto per più del 50% del tempo	40% Disabile; richiede particolari cure e assistenza
	30% Gravemente disabile, sono opportuni il ricovero ospedaliero e un trattamento di sostegno efficace; il decesso non è imminente
4 Completamente disabile; non autosufficiente; sempre allettato o seduto	20% molto ammalato; sono necessari il ricovero ospedaliero e un trattamento di sostegno efficace
	10% Moribondo, i processi fatali progrediscono rapidamente
5 Deceduto	0% Deceduto

Per gentile concessione di Karnofsky et al: The use of the nitrogen mustards in the palliation treatment of carcinoma with particular reference to bronchogenic carcinoma, Cancer 1:634-656, 1948, e di Oken MM et al: Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group, Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982.

APPENDIX III: CRITERI NCI PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ

Vedi fascicolo allegato per la versione 3 dei CTCAE

R.response E.valuation C.criteri in S.olid T.umors (sintesi)

ELEGIBILITÀ

- Solamente pazienti con malattia misurabile al momento della valutazione basale dovrebbero essere inseriti in protocolli in cui l'obiettivo primario è la valutazione della risposta obiettiva del tumore.
 - **Malattia misurabile:** si ha quando è presente almeno una lesione misurabile. Se la malattia misurabile è ristretta ad una lesione solitaria, la sua natura neoplastica dovrebbe essere confermata con una indagine istologica/citologica.
 - **Lesioni misurabili:** sono quelle lesioni che possono essere misurate accuratamente in almeno una dimensione e il cui diametro maggiore sia ≥ 20 mm se valutate con le metodiche radiologiche tradizionali o ≥ 10 mm se valutate con la TAC spirale.
 - **Lesioni non-misurabili:** sono tutte le lesioni che non rientrano nel criterio suddetto: lesioni aventi diametro maggiore inferiore a 20 mm se valutate con le metodiche radiologiche tradizionali o inferiore a 10 mm se valutate con la TC spirale, lesioni scheletriche, lesioni meningeae, ascite, versamento pleurico, versamento pericardico, carcinoma infiammatorio della mammella, linfangite carcinomatosa (cutanea o polmonare), lesioni cistiche ed anche masse addominali che non siano state confermate da metodiche di diagnostica per immagini.
- La valutazione delle lesioni deve essere effettuata utilizzando regoli o calibri e le misurazioni devono essere riportate utilizzando il sistema metrico decimale.
- La valutazione basale delle dimensioni di una lesione deve essere fatta entro 4 settimane prima dell'inizio del trattamento chemioterapico.
- Le lesioni dovrebbero essere sempre valutate con la stessa metodica diagnostica durante tutto il trattamento.
- Le lesioni apprezzabili all'esame clinico sono considerate misurabili solo se superficiali (ad es. noduli cutanei e linfonodi palpabili). In caso di lesioni cutanee si raccomanda di allegare documentazione fotografica con scala metrica che permetta una stima del diametro della lesione.

METODI DI MISURAZIONE

- TC e RMN sono attualmente le migliori metodiche disponibili e riproducibili per misurare le lesioni target selezionate per la valutazione della risposta. TC convenzionale e RMN dovrebbero essere effettuate con scansioni contigue ≤ 10 mm. La TC spirale dovrebbe essere eseguita utilizzando un algoritmo di ricostruzione contigua a 5 mm. Queste indicazioni si applicano a tumori del torace, dell'addome e della pelvi. I tumori del distretto testa/collo e quelli delle estremità richiedono di solito specifici protocolli.
- Le lesioni valutate con Rx torace sono accettabili come lesioni misurabili quando sono chiaramente definite e circondate da parenchima polmonare aerato. Comunque la TC è preferibile.
- Quando l'endpoint primario dello studio è la valutazione della risposta obiettiva, l'ecografia non dovrebbe essere utilizzata per misurare le lesioni tumorali. Può comunque essere una possibile alternativa alle misurazioni cliniche di linfonodi palpabili e superficiali, lesioni sottocutanee e noduli tiroidei. L'ecografia può essere utile per confermare la scomparsa completa di lesioni superficiali valutate solitamente con l'esame clinico.
- L'utilizzo di endoscopia e laparoscopia per la valutazione obiettiva di lesioni tumorali non è stata ancora convalidata pienamente ed estesamente. I loro usi in questo specifico contesto richiedono attrezzatura sofisticata ed un livello alto di esperienza che può essere solamente disponibile in alcuni centri. Perciò, l'utilizzo di tali tecniche per la valutazione obiettiva della

risposta tumorale dovrebbe essere ristretta a scopi di conferma in centri specializzati. Comunque, tali tecniche possono essere utili per confermare una risposta completa patologica con biopsie.

- I marcatori tumorali non possono essere usati da soli per valutare la risposta. Se i marcatori sono inizialmente superiori al limite di normalità devono normalizzare perché un paziente possa essere considerato in risposta clinica completa quando tutte le lesioni siano scomparse.
- La valutazione citologica ed istologica in alcuni casi possono essere usate per distinguere una RP da una RC.

VALUTAZIONE BASALE: LESIONI TARGET E NON TARGET

- Tutte le lesioni misurabili fino ad massimo di 5 per organo ed un totale di 10, rappresentative di tutti gli organi interessati dalla malattia vengono identificate come lesioni “*target*” e quindi registrate e misurate nel corso della valutazione basale.
- Le lesioni “*target*” devono essere selezionate in base alla dimensione del diametro maggiore (privilegiare le lesioni con diametro più lungo) e alla possibilità di poterle rivalutare nel corso del trattamento (con tecniche di immagine o clinicamente).
- La somma dei diametri maggiori di *tutte le lesioni target* deve essere calcolata e registrata al momento della valutazione basale ed utilizzata in seguito come riferimento per la valutazione della risposta obiettiva del tumore.
- Tutte le altre lesioni (o sedi di malattia) dovrebbero essere definite come lesioni “*non target*” e possono essere registrate durante la valutazione basale. La loro misurazione non è necessaria ma la loro presenza o scomparsa può essere valutata nel corso del follow-up

VALUTAZIONE DELLE LESIONI TARGET

Risposta Completa (RC)	si osserva la scomparsa di tutte le lesioni “ <i>target</i> ”
Risposta Parziale (RP)	si osserva una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “ <i>target</i> ” prendendo come riferimento la somma dei diametri maggiori calcolata al momento della valutazione basale
Progressione (PD)	si osserva un aumento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “ <i>target</i> ” prendendo come riferimento la somma più piccola dei diametri maggiori osservata dall’inizio del trattamento oppure si osserva la comparsa di una o più nuove lesioni
Stabilità (SD)	non si osserva una ne’ una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “ <i>target</i> ” ne’ un aumento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “ <i>target</i> ”

VALUTAZIONE DELLE LESIONI NON-TARGET

Risposta Completa (CR)	si osserva la scomparsa di tutte le lesioni “ <i>non target</i> ” e la normalizzazione dei livelli sierici dei markers tumorali
Stabilità (SD)	rimangono una o più lesioni “ <i>non target</i> ” e/o i livelli sierici dei markers tumorali restano sopra i valori normali
Progressione (PD)	si osservano una più nuove lesioni e/o un inequivocabile progressione delle pre-esistenti lesioni “ <i>non target</i> ” ¹

¹ sebbene una chiara progressione delle lesioni “*non target*” soltanto sia un evento raro, in alcune circostanze l’opinione del medico può prevalere e la progressione deve poi essere confermata dal comitato revisore o dal coordinatore dello studio.

VALUTAZIONE DELLA MIGLIORE RISPOSTA GLOBALE

La migliore risposta globale è la migliore risposta osservata dall'inizio del trattamento fino a quando non si ha progressione o ripresa della malattia (prendendo come riferimento la somma più piccola dei diametri maggiori osservata dall'inizio del trattamento).

Lesioni <i>Target</i>	Lesioni <i>Non Target</i>	Nuove Lesioni	<i>Risposta Globale</i>
RC	RC	NO	RC
RC	SD	NO	RP
RP	Non PD	NO	RP
SD	Non PD	NO	SD
PD	<i>Qualsiasi risposta</i>	SI - NO	PD
<i>Qualsiasi risposta</i>	PD	SI - NO	PD
<i>Qualsiasi risposta</i>	<i>Qualsiasi risposta</i>	SI	PD

- I pazienti che a causa di peggioramento globale dello status di salute devono interrompere il trattamento senza che si osservi l'evidenza obiettiva di una progressione di malattia dovrebbero essere classificati come pazienti con "deterioramento sintomatico" e dovrà essere fatto ogni sforzo per documentarne la progressione dopo la sospensione del trattamento
- In alcune circostanze può essere difficile distinguere la malattia residua dal tessuto sano. Pertanto quando la valutazione della risposta completa dipende da questa determinazione si raccomanda di indagare la lesione residua con agoaspirato o biopsia per confermare la risposta completa.

CONFERMA

- L'obiettivo principale della conferma della risposta obiettiva è quello di evitare un sovrastima della percentuale di risposte osservate. Nel caso in cui non sia possibile confermare la risposta ciò deve essere chiaramente riportato nei risultati dello studio.
- La risposta parziale (PR) o completa (CR) devono essere confermate eseguendo una rivalutazione delle lesioni non prima di 4 settimane dopo la prima osservazione. Intervalli superiori, se previsti dal protocollo dello studio, possono essere ugualmente appropriati.
- Nel caso di SD questa deve essere confermata almeno in una successiva misurazione da eseguire dopo l'intervallo minimo previsto nel protocollo dello studio (generalmente, non inferiore a 6-8 settimane).

DURATA DELLA RISPOSTA GLOBALE

- La durata della risposta globale è misurata dal momento in cui i criteri di misurazione consentono di definire una RC o RP fino alla prima data in cui sia documentata obiettivamente ripresa di malattia o PD, prendendo come riferimento per la definizione della PD le più piccole misurazioni registrate dall'inizio del trattamento.

DURATA DELLA STABILITÀ DI MALATTIA

- La SD è misurata dall'inizio del trattamento fino a quando i criteri di misurazione permettano di definire una PD prendendo come riferimento le più piccole misurazioni registrate dall'inizio del trattamento.
- L'importanza clinica della durata di una SD può essere diversa per differenti tipi di tumore. E' pertanto di fondamentale importanza che il protocollo specifichi il minimo intervallo di tempo

richiesto tra due misurazioni per la determinazione di una SD. Questo intervallo di tempo dovrebbe prendere in considerazione l'aspettato beneficio clinico che tale status può portare alla popolazione in studio.

REVISIONE DELLE RISPOSTE

- Per studi in cui l'obiettivo primario sia la percentuale di risposte si raccomanda fortemente che tutte le risposte siano verificate e confermate da uno o più esperti indipendenti al momento del completamento dello studio. La revisione simultanea delle cartelle dei pazienti ed delle immagini radiologiche è l'approccio migliore.

PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

- Tutti i pazienti inseriti nello studio devono essere valutati per la risposta al trattamento, anche se si siano verificate violazioni importanti del protocollo o se il paziente sia risultato ineleggibile. Ciascun paziente sarà classificato in una delle categorie seguenti: 1) risposta completa, 2) risposta parziale, 3) malattia stabile, 4) progressione di malattia, 5) decesso precoce per la malattia maligna, 6) decesso precoce per tossicità, 7) decesso precoce per altre cause, o 9) sconosciuto (dati non valutabili, insufficienti).
- Tutti i pazienti che hanno soddisfatto i criteri di eleggibilità dovrebbero essere inclusi nell'analisi della percentuale di risposta. I pazienti la cui risposta rientri nelle categorie 4-9 dovrebbero essere considerati come non responsivi al trattamento (progressione di malattia). Un errore nella scheda di trattamento o nella somministrazione di un farmaco non determina l'esclusione dalla valutazione della risposta. La definizione precisa delle categorie 4-9 deve essere specificata nel protocollo.
- Tutte le conclusioni dovrebbero essere basate sull'analisi di tutti i pazienti eleggibili.
- Le analisi su sottogruppi di pazienti possono essere effettuate escludendo i pazienti in cui si siano verificate importanti violazioni del protocollo (es., decesso precoce per altre cause, precoce interruzione del trattamento, significative deviazioni dal protocollo ecc.). Comunque, queste subanalisi non possono essere utilizzate come base per trarre conclusioni riguardo all'efficacia del trattamento, e le ragioni per cui i pazienti sono stati esclusi dall'analisi devono essere riportate chiaramente.
- Devono essere riportati gli intervalli di confidenza al 95%.

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

<p align="center">SYNOPSIS</p> <p align="center">I/IX</p>	<p align="center">A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER</p> <p align="center"><i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i></p>
<p>VERS. PROTOCOLLO</p>	<p>1.1 – 25 Maggio 2008</p>
<p>SPONSOR</p>	<p>Gruppo Oncologico Nord Ovest (G.O.N.O.) – Italia</p>
<p>FASE PROTOCOLLO</p>	<p>III</p>
<p>INDICAZIONI</p>	<p>Carcinoma del colon o del retto metastatico</p>
<p>RAZIONALE DELLO STUDIO</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ L'associazione di Bevacizumab con il regime IFL o con 5-FU/LV è fattibile ed aumenta significativamente la sopravvivenza mediana rispetto al solo regime IFL o al solo 5-FU/LV nel trattamento di prima linea di pazienti con carcinoma coloretale metastatico. ▪ L'associazione di Bevacizumab con il regime FOLFOX-4 è fattibile ed aumenta significativamente la sopravvivenza mediana rispetto al solo regime FOLFOX-4 nel trattamento di seconda linea di pazienti con carcinoma coloretale metastatico trattati in prima linea con sola chemioterapia.. ▪ Due ampi studio in cui sono stati valutati circa 4000 pazienti arruolati in 90 differenti nazioni hanno dimostrato che la combinazione di Bevacizumab con qualunque trattamento chemioterapico di prima linea è fattibile e sicura. ▪ Il regime FOLFOXIRI studiato dal GONO è la prima combinazione che ha dimostrato essere efficace rispetto ad una doppietta contenente 5-FU come FOLFIRI in termini di RR, PFS, resezioni R0 e OS in pazienti con carcinoma colo rettale metastatico. ▪ I risultati di uno studio di fase II condotto dal GONO mostrano come l'associazione di FOLFOXIRI con Bevacizumab è un regime maneggevole e con una attività elevata. ▪ La combinazione di FOLFIRI con Bevacizumab è uno dei regimi di riferimento in Europa per il trattamento di prima linea del carcinoma colo rettale metastatico ▪ Lo sviluppo clinico di farmaci antiangiogenetici a bersaglio molecolare risente di alcuni problemi tra cui l'impossibilità di identificare i pazienti che possano beneficiare maggiormente da queste terapie ▪ Il gene VEGF può essere trascritto in 4 forme differenti con 121, 165, 189 e 206 aminoacidi per un meccanismo di splicing alternativo. Polimorfismi del gene VEGF sono stati associati a diversa produzione di VEGF e sono risultati implicati nella suscettibilità a diverse patologie in cui l'angiogenesi ha un ruolo cruciale. Pertanto, l'identificazione di tali polimorfismi potrebbe contribuire a valutare quali neoplasie risultano resistenti a farmaci antiangiogenetici. ▪ Molti geni come KRAS, BRAF, NF-kB o PML sono determinanti nel processo tumorigenico dei carcinomi colo rettali. Loro mutazioni o un diverso grado di espressione potrebbe avere un ruolo nel determinare un beneficio dal trattamento
<p>OBIETTIVI</p>	<p>Primario:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Confrontare la sopravvivenza libera da progressione di una chemioterapia di prima linea con FOLFOXIRI + Bevacizumab verso FOLFIRI + Bevacizumab. <p>Secondari:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Valutare il profilo di tossicità anche a lungo termine della combinazione di Bevacizumab con FOLFIRI o FOLFOXIRI • Confrontare il tasso di risposte globali, la durata delle risposte, il tasso di resezioni chirurgiche R0 nonché la sopravvivenza globale dei due regimi di trattamento. • Valutare il potenziale ruolo di fattori predittivi di attività del bevacizumab o delle chemioterapia..

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

<p align="center">SYNOPSIS</p> <p align="center">II/IX</p>	<p align="center">A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER</p> <p align="center"><i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i></p>
<p>DISEGNO DELLO STUDIO</p>	<p>Studio comparativo multicentrico randomizzato a due bracci in aperto</p>
<p>NUMEROSITÀ DEL CAMPIONE</p>	<p>450 pazienti</p>
<p>CENTRI PARTECIPANTI</p>	<p>Circa 30 centri italiani</p>
<p>CRITERI DI SELEZIONE</p>	<p>Pazienti con tumore coloretale metastatico che devono iniziare un trattamento chemioterapico di combinazione in prima linea</p>
<p>TRATTAMENTO IN STUDIO</p>	<p>I pazienti saranno stratificati in base a :</p> <ul style="list-style-type: none"> • ECOG PS (0 vs 1,2) • Precedente chemioterapia adiuvante (No vs SI) • Centro <p>E successivamente assegnati per randomizzazione a ricevere:</p> <p>FOLFOXIRI:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Irinotecano 165 mg/mq ev in 1-h, al giorno 1 – Oxaliplatino 85 mg/mq ev in 2-h, al giorno 1 – I-Leucovorin 200 mg/mq ev in 2-h, al giorno 1 – 5-fluorouracile 3200 mg/mq ev in infusione continua di 48-h, iniziando al giorno 1 <p>In combinazione con</p> <ul style="list-style-type: none"> – Bevacizumab 5 mg/Kg ev 30', al giorno 1 <p>oppure</p> <p>FOLFIRI:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Irinotecano 180 mg/mq ev in 1-h, al giorno 1 – I-Leucovorin 200 mg/mq ev in 2-h, al giorno 1 – 5-fluorouracile 400 mg/mq ev in bolo, al giorno 1 – 5-fluorouracile 2400 mg/mq ev in infusione continua di 46-h, iniziando al giorno 1 <p>In combinazione con</p> <ul style="list-style-type: none"> – Bevacizumab 5 mg/Kg ev 30', al giorno1 <p>Entrambi I trattamenti saranno ripetuti ogni 2 settimane. Oxaliplatino e irinotecano saranno proseguiti per un massimo di 12 cicli. Bevacizumab e 5-fluorouracile/I-Leucovorin saranno proseguiti.</p>
<p>DURATA DEL TRATTAMENTO</p>	<p>L'oxaliplatino e l'irinotecan saranno proseguiti fino a un massimo di 12 cicli oppure fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile o rifiuto del paziente a proseguire. Il trattamento con bevacizumab e 5-fluorouracile associato al leucovorin sarà proseguito fino a fino a progressione di malattia, tossicità inaccettabile o rifiuto del paziente. Il bevacizumab sarà proseguito anche in caso di interruzione del 5-fluorouracile fino a tossicità inaccettabile o rifiuto del paziente. La prosecuzione di bevacizumab alla progressione di malattia è consentita su scelta dello sperimentatore se viene iniziata una seconda linea di trattamento.</p>

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

<p align="center">SYNOPSIS</p> <p align="center">III/IX</p>	<p align="center">A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER</p> <p align="center"><i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i></p>
<p align="center">RESEZIONE DELLE METASTASI</p>	<p>La resezione chirurgica di metastasi residue in pazienti responsivi è altamente raccomandata, come anche la termoablazione con radiofrequenza di piccoli noduli non resecabili residui dopo chirurgia.</p> <p>Il trattamento con bevacizumab deve essere interrotto almeno 5 settimane prima dell'intervento chirurgico mentre il trattamento chemioterapico verrà proseguito fino a 3 settimane prima della chirurgia.</p> <p>Dopo almeno 4 settimane dall'intervento chirurgico, i pazienti riprenderanno il trattamento fino a ricevere 12 cicli totali di FOLFIRI o FOLFOXIRI (inclusi quelli somministrati prima dell'intervento). Il bevacizumab e il 5FU/LV saranno proseguiti per un periodo massimo di 12 mesi dopo la resezione chirurgica.</p>
<p align="center">CRITERI DI INCLUSIONE</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diagnosi confermata istologicamente di adenocarcinoma del colon-retto ▪ Malattia metastatica non resecabile e non precedentemente trattata con chemioterapia per lo stadio metastatico ▪ Precedente terapia adiuvante contenente oxaliplatino o bevacizumab è consentita solo se sono trascorsi almeno 12 mesi tra il termine della terapia adiuvante e la prima ripresa di malattia ▪ Presenza di almeno una lesione misurabile secondo i criteri RECIST ▪ Età compresa tra 18 e 75 anni ▪ ECOG PS ≤ 2 se età < 71 anni ▪ ECOG PS = 0 se età compresa tra 71 e 75 anni ▪ Aspettativa di vita superiore a 12 settimane ▪ Adeguata funzionalità midollare: Neutrofili ≥ 1.5 x 10⁹/L; Piastrine ≥ 100 x 10⁹/L, Emoglobina >9 g/dl ▪ Adeguata funzionalità epatica: bilirubinemia ≤ 1.5 x valore normale; fosfatasi alcalina e transaminasi ≤ 2.5 x valore normale (in presenza di metastasi epatiche < 5 x valore normale) ▪ Creatininemia ≤ 1.5 x valore normale o clearance della creatinina > 50 mL/min ▪ Dipstick Urine per proteinuria < 2+. Se proteinuria ≥ 2+, la proteinuria all'esame urine nelle 24 ore deve risultare ≤ 1 g ▪ Consenso informato scritto ▪ Semplicità di accesso al centro partecipante allo studio per il trattamento e il follow up
<p align="center">CRITERI DI ESCLUSIONE</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Radioterapia in qualsiasi sede nelle 4 settimane precedenti l'ingresso in studio ▪ Metastasi cerebrali non trattate o compression del midollo spinale o presenza di tumori cerebrali primitivi ▪ Anamnesi positiva o evidenza all'esame clinico di patologie del sistema nervoso centrale non adeguatamente trattate ▪ Presenza di ferite severe non cicatrizzate, ulcere in atto o fratture ossee ▪ Evidenza di diatesi emorragica o coagulopatie ▪ Ipertensione arteriosa non controllata ▪ Malattia cardiovascolare clinicamente significativa. Ad esempio accidenti cerebrovascolari (entro 6 mesi dall'inizio del trattamento), infarto del miocardio (entro 6 mesi dall'inizio del trattamento), angina instabile, scompenso cardiaco ≥ grado 2 (Scala NYHA), aritmia non controllata ▪ Terapia in atto o recente (negli ultimi 10 giorni prima dell'inizio del trattamento in studio) con anticoagulanti a dosaggio terapeutico ▪ Trattamento cronico quotidiano con acido acetilsalicilico a dosaggio >325 mg/die ▪ Trattamento con qualsiasi terapia sperimentale entro 30 giorni dall'arruolamento

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

<p align="center">SYNOPSIS</p> <p align="center">IV/IX</p>	<p align="center">A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER</p> <p align="center"><i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i></p>
<p>CRITERI DI ESCLUSIONE (cont.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pazienti con nota allergia alle proteine ovariche del criceto cinese o ad altri componenti del trattamento in studio ▪ Anamnesi positiva per neoplasie maligne diverse dal carcinoma coloretale negli ultimi 5 anni ad eccezione di basalioma/epitelioma cutaneo o di carcinoma in situ della cervice curati radicalmente ▪ Interventi chirurgici maggiori, biopsie a cielo aperto o traumi significativi nei 28 giorni precedenti al trattamento o prevista necessità di interventi chirurgici maggiori durante lo studio ▪ Mancanza di integrità del tratto gastrointestinale alto, sindrome da malassorbimento o impossibilità ad assumere farmaci per via orale ▪ Gravidanza o allattamento. Donne in età fertile con un test di gravidanza positivo o che non abbiano effettuato il test al momento dell'ingresso in studio. Le donne in postmenopausa devono essere in amenorrea da almeno 1 anno per essere considerate non fertili. Uomini sessualmente attivi e donne in età fertile che non accettino di sottoporsi ad adeguate misure contraccettive. ▪ Neuropatia periferica sintomatica (≥ grado 1 secondo i Criteri NCIC-CTC)
<p>PRINCIPALI PARAMETRI DI SICUREZZA</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Eventi avversi, esami di laboratorio. ➤ Ogni tossicità sarà valutata secondo i criteri "NCI Common Terminology Criteria" versione 3.0
<p>PRINCIPALI PARAMETRI DI EFFICACIA</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Remissione completa (CR): scomparsa completa di tutte le lesioni prima riscontrabili per un periodo di almeno 28 giorni in assenza di nuove lesioni. ✓ Remissione parziale (PR): riduzione di oltre il 30% della somma dei diametri maggiori di tutte le lesioni target per un periodo di almeno 28 giorni in assenza di nuove lesioni. ✓ Malattia stabile (SD): assenza di regressione tumorale tale da ottenere una PR e di incremento tale da indicare una progressione di malattia. ✓ Progressione di malattia (PD): incremento di oltre il 20% della somma dei diametri maggiori di tutte le lesioni target o comparsa di nuove lesioni in qualsiasi sede. ✓ La sopravvivenza libera da progressione (PFS) sarà calcolata dalla data di randomizzazione fino alla prima evidenza di progressione di malattia o morte dovuta a qualsiasi causa o alla data dell'ultimo follow up. ✓ La sopravvivenza globale (OS) sarà valutata come il tempo intercorso tra la data di randomizzazione e la data del decesso oppure dell'ultimo follow up
<p>PROCEDURE DELLO STUDIO</p>	<p><u>Basalmente:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – Anamnesi completa, ECOG PS, esame obiettivo completo (incluso un esame neurologico e la valutazione del peso e altezza) e valutazione dei segni vitali (incluse pressione arteriosa e frequenza cardiaca) – ECG – Esami ematici completi di chimica clinica: bilirubina (totale e diretta), AST, ALT, fosfatasi alcalina, albumina, LDH, creatinina, glucosio, elettroliti (sodio, potassio, calcio), CEA, CA19.9, test di gravidanza (se clinicamente indicato) – Esame emocromocitometrico completo con formula – International normalized ratio (INR)/Activated partial Thromboplastin Time (aPTT) – Esame chimico-fisico delle urine

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

<p align="center">SYNOPSIS</p> <p align="center">V/IX</p>	<p>A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER</p> <p align="center"><i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i></p>
<p>PROCEDURE DELLO STUDIO (cont.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - TC torace/addome o RMN addome e Rx torace se la TC è controindicata - Consenso informato scritto - Raccolta di 13 ml di sangue intero, 6 dei quali da dividere in 2 provette contenenti EDTA, mentre 7 verranno centrifugati a 15000 giri/minuto per 15 minuti per l'isolamento del siero. I campioni saranno conservati a -20°C. - Raccolta di 10 vetrini paraffinati del tumore primitivo e/o di almeno un sito metastatico <p><u>Durante il Trattamento - Ogni 2 settimane:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Esami ematici parziali di chimica clinica: bilirubina totale, AST, ALT, fosfatasi alcalina, creatinina - Esame emocromocitometrico completo con formula - Dipstick proteinuria - INR/APTT (solo per i pazienti che assumono terapia anticoagulante o in caso di eventi tromboembolici o emorragici) - Valutazione delle tossicità - Esame obiettivo e segni vitali <p><u>Durante il Trattamento – Ogni 8 settimane:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Valutazione della malattia usando la stessa metodica utilizzata basalmente - Esami ematici completi di chimica clinica, CEA, CA19.9 - Esame chimico-fisico delle urine <p><u>Al momento della progressione:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Raccolta di 7 ml di sangue intero, da centrifugare a 15000 giri/minuto per 15 minuti per l'isolamento del siero e conservare a -20°C. - Raccolta di 10 vetrini paraffinati del tumore primitivo e/o di almeno un sito metastatico, se non raccolti al momento basale. <p><u>Alla fine dello studio e ogni 2 mesi:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Anamnesi completa, ECOG PS, esame obiettivo completo - Follow-up di ogni evento avverso non risolto - Valutazione di trattamenti di seconda linea - Valutazione di malattia - Valutazione dello stato in vita
<p>ANALISI TRASLAZIONALI</p>	<p>Ai pazienti, che avranno espresso il loro consenso all'esecuzione di analisi per l'espressione di potenziali marker biologici predittivi della risposta al trattamento, verranno prelevati 2 campioni di sangue uno al momento della visita basale (13 ml) e uno alla progressione (7 ml) e agli sperimentatori sarà richiesto di fornire una campionatura di sezioni in paraffina del tessuto tumorale prelevato nel corso dell'intervento dal primitivo (10 vetrini) e/o dalle metastasi o da eventuali biopsie (10 vetrini). Tutti i campioni saranno sottoposti a codifica singola mediante attribuzione di codici alfanumerici</p>

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

<p align="center">SYNOPSIS</p> <p align="center">VI/IX</p>	<p align="center">A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER</p> <p align="center"><i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i></p>
<p>ANALISI TRASLAZIONALI <i>(cont.)</i></p>	<p>Al termine del periodo di follow-up, i dati clinici dei pazienti e il corrispondente materiale biologico (tessuto e acidi nucleici) saranno anonimizzati, mediante attribuzione di un secondo codice alfanumerico casuale</p>
<p>DURATA DELLO STUDIO</p>	<p>Da Maggio 2008 ad Novembre 2012 Periodo di arruolamento: 36 mesi Follow up ulteriore: 18 mesi</p>
<p>CONSIDERAZIONI STATISTICHE</p>	<p>L'obiettivo primario dello studio è la sopravvivenza libera da progressione, definita come l'intervallo di tempo tra la randomizzazione e la ripresa di malattia o il decesso, quale dei due intercorra prima.</p> <p>Precedenti studi di trattamento di prima linea con bevacizumab in combinazione con fluorouracile e irinotecano (come FOLFIRI) nel carcinoma coloretale metastatico hanno riportato una PFS mediana di circa 11 mesi.</p> <p>Usando un log-rank test a due code non stratificato con un errore di I tipo del 0.05, sarà necessario osservare 379 eventi (progressione di malattia o decesso per qualsiasi causa) per dimostrare con una potenza dell'80% un hazard-ratio per la progressione dello 0.75. Con una randomizzazione 1:1 nei due gruppi di studio e considerando una durata totale dello studio di 54 mesi (36 per l'arruolamento e 18 di follow up addizionale) sarà necessario arruolare 450 pazienti per osservare 379 eventi.</p> <p>L'analisi statistica di efficacia sarà eseguita secondo i principi dell'intention-to-treat, usando un log-rank test a due code. Gli hazard ratios e gli intervallo di confidenza al 95% saranno calcolati mediante l'utilizzo del modello di Cox. Le curve di sopravvivenza saranno stimate secondo il metodo di Kaplan-Meier.</p>

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

SYNOPSIS VII/IX	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER <i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i>
--------------------------------------	--

RIDUZIONI DI DOSE E RINVI: CHEMIOTERAPIA

TOSSICITA' IN CORSO AL GIORNO 1 DEL CICLO PREVISTO	GRADO	CPT-11	OXALI	5-FU
Globuli bianchi	< 3.000/mcl	Rinvia il trattamento fino a risoluzione		
Neutrofili	< 1.000/mcl			
Piastrine	< 100.000/mcl			
Diarrea	≥ 1			
Mucosite	≥ 1			
Qualunque altra tossicità	≥ 2			
Hand/foot syndrome	3 – 4	100%	100%	STOP
Neurotossicità	≥ 3	100%	STOP	100%

TOSSICITA' PREGRESSA	GRADO	CPT-11	OXALI	5-FU
Neutropenia > 5 giorni	4	75%	75%	100%
Neutropenia febbrile	4			
Piastrinopenia	3-4			
Diarrea	3	75%	100%	75%
Diarrea	4	50%	100%	50%
Stomatite	3	100%	100%	75%
Stomatite	4	100%	100%	50%
Ischemia del miocardio	---	100%	100%	STOP

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

SYNOPSIS VIII/IX	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER <i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i>
---------------------------------------	--

RIDUZIONI DI DOSE E RINVI: BEVACIZUMAB

EVENTO	AZIONE
Ipertensione arteriosa Grado 3 Grado 4	Se non controllata con terapia antipertensiva con 3 farmaci, interrompere bevacizumab Interrompere bevacizumab
Emorragia Grado ≥2 a livello polmonare o del SNC Grado 3 non-polmonare e non al SNC Grado 4	Interrompere bevacizumab Sospendere bevacizumab fino a che non siano presenti tutte le condizioni riportate: -Emorragia risolta ed emoglobina stabile -Assenza di diatesi emorragica che possa aumentare il rischio della terapia -Assenza di condizioni anatomiche o patologiche che possano aumentare il rischio di nuovi episodi emorragici interrompere bevacizumab
Trombosi venosa grado 3 o 4	Interrompere bevacizumab
Evento tromboembolico arterioso, di qualsiasi Grado	Interrompere bevacizumab
Insufficienza cardiaca Grado 3 Grado 4	Sospendere bevacizumab fino a tossicità ≤ Grado 2 Interrompere bevacizumab
Proteinuria Grado 3 Grado 4	Sospendere bevacizumab fino a tossicità ≤ Grado 2 Interrompere bevacizumab
Perforazione gastro-intestinale	Interrompere bevacizumab
Occlusione intestinale Grado 1 Grado 2 Grado 3/4	I pazienti che presentano occlusioni parziali che non richiedano intervento medico possono continuare bevacizumab Sospendere bevacizumab in pazienti che presentino occlusioni parziali che richiedano intervento medico. Riprendere la terapia dopo completa risoluzione Interrompere bevacizumab
Deiscenza di ferita	Interrompere bevacizumab
Altri eventi avversi non specificati correlate al bevacizumab Grado 3 Grado 4	Sospendere bevacizumab fino a tossicità ≤ Grado 1 Interrompere bevacizumab

Nel caso in cui Bevacizumab sia interrotto la chemioterapia può essere proseguita.

APPENDIX V: SYNOPSIS (IT. VERSION)

SYNOPSIS IX/IX	A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER <i>TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10</i>
-------------------------------------	--

FLOW CHART

	BASALE	OGNI CICLO (2 SETTIMANE)	OGNI 8 SETTIM.	ALLA FINE DELLO STUDIO E OGNI 3 MESI
Consenso Informato	X			
Anamnesi completa	X			X
Esame obiettivo completo, ECOG PS, Valutazione Segni Vitali e Parametri (altezza, peso, pressione, frequenza)	X	X		X
Esame emocromocitometrico completo	X	X		
Esami parziali di chimica clinica (creatinina, bilirubina totale, ALT, AST, fosfatasi alcalina)	X	X		
INR/aPTT	X	X*		
Esami parziali di chimica clinica e Marcatori tumorali (creatinina, bilirubina totale e diretta, AST, ALT, fosfatasi alcalina, albumina, LDH, glucosio, elettroliti (sodio, potassio, calcio), CEA, CA19.9)	X		X	
Dipstick per proteinuria		X		
Esame chimico-fisico delle urine	X		X	
ECG	X			
Valutazione della Tossicità NCI CTC v3.0		X		X
Valutazione strumentale di malattia (TAC torace-addome o RMN addome + Rx torace)	X		X	X

**(solo per pazienti che assumono terapie anticoagulanti o in caso di eventi tromboembolici o emorragici)*

APPENDIX VI: LETTERA INFORMATIVA PER IL PAZIENTE

A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER

TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10

Egregio Sig.re/ra,

Le stiamo chiedendo la disponibilità a partecipare ad uno studio clinico randomizzato che utilizza un trattamento innovativo. Lei è affetto da una patologia tumorale del grosso intestino in stadio avanzato e non è mai stato trattato con un trattamento chemioterapico per la malattia di cui Lei è affetto oppure ha già effettuato e terminato un trattamento chemioterapico a scopo precauzionale. Nella presente lettera Le verranno spiegati i benefici che può dare un trattamento chemioterapico nella malattia di cui Lei è affetto/a, le modalità di attuazione del trattamento oggetto di studio ed i possibili effetti collaterali che si potranno presentare con le relative precauzioni da osservare.

RUOLO DELLA CHEMIOTERAPIA CON BEVACIZUMAB NEL TRATTAMENTO DEI TUMORI DEL COLON-RETTO

In quest'ultimi anni sono stati compiuti molti progressi nel trattamento della Sua malattia grazie all'introduzione di nuovi farmaci antitumorali quali l'irinotecano, l'oxaliplatino ed il bevacizumab, un anticorpo monoclonale che inibisce l'azione di un fattore di crescita per i vasi sanguigni (VEGF) e quindi il processo di neoangiogenesi tumorale impedendo la crescita tumorale. E' stato inoltre dimostrato che il miglior controllo della Sua malattia si ottiene utilizzando tutti i farmaci attivi a disposizione.

E' ormai chiaramente dimostrato che l'associazione del 5-fluorouracile, farmaco utilizzato da circa trent'anni nella pratica clinica, con l'irinotecano o con l'oxaliplatino offre un notevole miglioramento nel controllo della Sua malattia rispetto al trattamento con il solo 5-fluorouracile. Inoltre è stato evidenziato che la combinazione di bevacizumab con 5-fluorouracile e irinotecano oppure con 5-fluorouracile e oxaliplatino ha maggiore efficacia nel trattamento della Sua malattia rispetto ai soli 5-fluorouracile e irinotecano od oxaliplatino.

Alla luce di questi dati negli ultimi anni è stato studiato un trattamento chemioterapico che prevedeva l'associazione di 5-fluorouracile, oxaliplatino e irinotecano e i dati ottenuti sembrano dimostrare un miglioramento ulteriore nel controllo della Sua malattia con effetti collaterali accettabili.

Inoltre, un recente studio clinico ha dimostrato un'elevata attività e una buona tolleranza di un trattamento di combinazione dei tre chemioterapici, 5-fluorouracile, irinotecano e oxaliplatino, con l'anticorpo monoclonale bevacizumab.

Abbiamo quindi deciso di condurre uno studio clinico in cui i pazienti con la Sua stessa malattia potranno ricevere un trattamento chemioterapico che prevede l'associazione di irinotecano,

oxaliplatino, 5-fluorouracile e bevacizumab oppure l'associazione ritenuta attualmente di riferimento di irinotecano, 5-fluorouracile e bevacizumab.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del presente studio è infatti di confrontare due diversi trattamenti per verificare se la combinazione di tre chemioterapici al bevacizumab possa migliorare l'efficacia del trattamento con bevacizumab, 5-fluorouracile e irinotecano. Per poter fare ciò è necessario trattare metà dei pazienti inseriti nello studio con il primo trattamento e l'altra metà con il secondo. Per poter valutare quale dei due trattamenti sia più efficace, è necessario inserire circa 450 pazienti in circa tre anni. Se deciderà di aderire a questo studio, il medico non potrà decidere a quale dei due trattamenti sottoporla ma la scelta sarà casuale con una procedura chiamata di randomizzazione. Questa è la procedura che viene comunemente impiegata in questo tipo di studi.

SCHEMA DI TRATTAMENTO E VALUTAZIONE DELLO STATO DI MALATTIA

Se deciderà di partecipare a questo studio, Lei verrà sottoposto ad un trattamento chemioterapico, con bevacizumab in associazione a 5-fluorouracile e irinotecano (FOLFIRI) oppure a 5-fluorouracile, irinotecano e oxaliplatino (FOLFOXIRI) ogni due settimane e il tipo di trattamento Le verrà assegnato tramite un processo chiamato randomizzazione. Questo tipo di terapia verrà ripetute per un massimo di 12 volte.

Il trattamento con il 5-fluorouracile e/o il bevacizumab potrà essere continuato fino a che non si verificheranno tossicità ad essi riferibili o in base all'andamento della Sua malattia.

Prima di eseguire ogni trattamento Lei sarà visitato dal medico e dovrà eseguire degli esami del sangue. Inoltre, prima di iniziare ogni ciclo di chemioterapia, Le verranno somministrati dei farmaci per cercare di prevenire l'insorgenza precoce di nausea o vomito.

Prima di iniziare il trattamento sarà sottoposto/a ad una serie di accertamenti strumentali decisi dal medico, come ad esempio una TAC, una radiografia del torace, una ecografia dell'addome, ed esami del sangue per valutare la sua funzionalità epatica o renale, per poter valutare adeguatamente il Suo stato di malattia. Tali esami saranno quindi ripetuti ogni 4 cicli per poter valutare l'attività del trattamento.

All'inizio del trattamento e al momento dell'interruzione dello stesso le sarà chiesto di poter effettuare un prelievo ematico per la raccolta di campioni di sangue da utilizzare allo scopo di approfondire le conoscenze sui meccanismi che regolano lo sviluppo della patologia tumorale da cui lei è affetto/a e sull'attività del trattamento a cui le è stato proposto di sottoporsi.

L'eventuale interruzione del trattamento prima del completamento dei 12 cicli previsti sarà valutata dal medico in base alla Sua volontà, alle Sue condizioni generali, agli effetti tossici che possono essere insorti e in base all'andamento della Sua malattia.

Ogni decisione presa durante tutta la durata del trattamento oggetto di studio sarà discussa con Lei.

EFFETTI TOSSICI DEL TRATTAMENTO

Cercheremo di spiegarLe adesso i possibili effetti collaterali dei farmaci che Le verranno somministrati. Le associazioni di chemioterapici e bevacizumab sono già state utilizzate in centinaia di pazienti affetti da tumore in tutto il mondo, e gli effetti collaterali e la loro gestione sono ben noti. Generalmente gli effetti tossici sono controllabili a domicilio osservando dei semplici consigli che le verranno dati. Le verrà inoltre consegnato un modulo dove sono riportati i nomi dei medicinali da assumere per controllare questi effetti tossici.

5-Fluorouracile: può provocare diarrea, stomatite, eritema e desquamazione del palmo delle mani e dei piedi, diminuzione dei globuli bianchi.

Oxaliplatino: può provocare diarrea, nausea e vomito, riduzione dei globuli bianchi e delle piastrine. A differenza degli altri effetti tossici che si manifestano tra un ciclo di terapia e il successivo, il trattamento con oxaliplatino può causare la comparsa di una tossicità neurologica periferica che si manifesta con formicolii alle estremità delle mani e dei piedi esacerbati dalle basse temperature. Questa tossicità tende gradualmente a peggiorare durante il trattamento e generalmente regredisce dopo l'interruzione della terapia.

Irinotecano: può provocare diarrea, nausea e vomito, perdita dei capelli, riduzione dei globuli bianchi e delle piastrine. A volte può accadere che proprio durante l'infusione dell'irinotecano insorgano disturbi quali crampi addominali con alcune scariche di diarrea, salivazione e lacrimazione profuse e un calo della pressione arteriosa. Questi effetti non La devono allarmare in quanto il quadro recede rapidamente sospendendo per qualche minuto l'infusione del farmaco e somministrando 0.25 mg di atropina sotto cute (che poi verrà somministrata preventivamente nei cicli successivi).

Bevacizumab: può provocare aumento della pressione arteriosa, trombosi, sanguinamento (più frequentemente epistassi), emorragie digestive, proteinuria (presenza di proteine all'analisi delle urine).

Come descritto un evento che può manifestarsi durante il trattamento è una diminuzione dei globuli bianchi. Anche se il calo dei globuli bianchi è di solito di breve durata, questo può comportare una maggior predisposizione alle infezioni. La comparsa di una infezione si manifesta generalmente con la febbre. Sarà importante che, qualora comparisse febbre, Lei ci avverta immediatamente per poterle darle i consigli più appropriati.

COSA FARE IN CASO DI COMPARSA DEGLI EFFETTI TOSSICI

Prima di iniziare il trattamento chemioterapico Le sarà consegnato un elenco su cui sono riportati i provvedimenti da adottare nel caso in cui dovessero insorgere gli effetti collaterali sopra descritti.

Nel caso di comparsa della diarrea dovrà assumere una dieta semiliquida, assumere dei liquidi con l'aggiunta di sali minerali per riequilibrare gli elettroliti persi ed assumere delle compresse di

loperamide (una compressa dopo ogni scarica di diarrea da continuare fino a 12 ore l'ultima scarica in caso di terapia con irinotecano).

In caso di nausea o vomito dovrà assumere metoclopramide compresse per bocca o fiale intramuscolo o assumere dei farmaci antiserotoninergici sempre per bocca o fiale intramuscolo.

In caso di stomatite dovrà tenere la bocca ben pulita effettuando degli sciacqui con acqua e bicarbonato. Nel caso in cui dovesse insorgere una infezione micotica, Le consiglieremo un antifungino in sospensione liquida che dovrà assumere durante il giorno.

In caso di febbre superiore a 38°C dovrà iniziare un trattamento antibiotico per bocca ed eseguire immediatamente un emocromo con formula per escludere che la febbre sia causata da una diminuzione dei globuli bianchi.

In caso di tossicità cutanea le verranno consigliati dei prodotti topici.

In caso di trombosi, emorragia, ipertensione o di qualunque altro evento avverso dovrà far riferimento ad un medico del nostro reparto.

COSA FARE IN CASO DI GRAVIDANZA

Non può prendere parte a questo studio se è incinta o sta allattando. Un test di gravidanza verrà effettuato prima di entrare nello studio, per verificare che Lei non sia incinta. Se Lei è in età fertile, deve acconsentire ad usare un metodo di controllo delle nascite concordato con il Suo medico mentre partecipa a questo studio.

Lei non dovrà iniziare una gravidanza durante lo studio perché è noto che la chemioterapia può causare danni al feto. Anche i rischi del trattamento sperimentale sul feto e sul neonato non sono conosciuti.

Se Lei dovesse rimanere incinta, deve immediatamente avvertire il medico sperimentatore della Sua gravidanza, il trattamento con il farmaco sperimentale verrà interrotto e lo sperimentatore potrà chiedere di essere informato sull'andamento della gravidanza.

COSA SUCCEDERE SE DECIDE DI NON PARTECIPARE ALLO STUDIO

Lei è libero/a di non partecipare allo studio. In questo caso, il medico che La segue discuterà con Lei altre possibilità di terapia previste per la Sua malattia.

INTERRUZIONE DELLO STUDIO

La Sua adesione a questo programma di ricerca è completamente volontaria e Lei si potrà ritirare dallo studio in qualsiasi momento.

Allo stesso modo, se il medico constaterà che Lei non ha tratto alcun giovamento o che sono intervenuti effetti non desiderati potrà decidere che per Lei sia meglio interrompere la sperimentazione.

In questo caso Lei sarà tempestivamente informata circa ulteriori trattamenti validi per la Sua malattia e potrà discuterne con il medico.

TUTELA DELLA PRIVACY

Le informazioni relative al suo stato di salute saranno gestite in maniera strettamente riservata sia dal medico responsabile della ricerca, che dal suo gruppo di collaboratori. Tali informazioni saranno utilizzate e divulgate in accordo a quanto stabilito nella "Nota informativa per la tutela dei dati personali" (Allegato 1 alla lettera informativa).

INFORMAZIONI CIRCA I RISULTATI DELLO STUDIO

Se Lei lo richiederà, alla fine dello studio potranno esserLe comunicati i risultati dello studio in generale ed in particolare quelli che La riguardano.

Non esiti a rivolgere al medico che La segue qualunque domanda riguardo lo studio e la terapia farmacologica proposta. Consideri anche l'idea di discutere l'argomento con un familiare o un amico.

Qualora la partecipazione allo studio dovesse comportare dei danni a Suo carico, correlati alla partecipazione, Lei sarà risarcito/a in accordo con la normativa vigente: lo Sponsor ha stipulato a tal fine un'idonea copertura assicurativa con la compagnia _____ (n° polizza _____) di cui è conservata una copia presso il centro dove viene seguito/a e di potrà prendere visione presso il centro dove viene seguito/a qualora lo ritenga opportuno. La copertura assicurativa copre inoltre il costo di eventuali trattamenti medici, anche successivi 'alla sua partecipazione, qualora si verificassero delle complicanze causate dallo studio stesso.

ULTERIORI INFORMAZIONI

Se ha altre domande relative al farmaco o allo svolgersi dello studio, o se insorgono dei problemi durante lo studio, può contattare i seguenti medici:

Dr.....

Tel.....

Dr.....

Tel.....

APPENDIX VI: LETTERA INFORMATIVA PER IL PAZIENTE

A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER

TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10

ALLEGATO 1 ALLA LETTERA INFORMATIVA PER IL PAZIENTE

NOTA INFORMATIVA PER LA TUTELA DELLA RISERVATEZZA DEI DATI PERSONALI

Ogni informazione, dato personale comune o sensibile che La riguardi (nome e cognome o loro iniziali, informazioni anagrafiche, dati clinici o altri dati sensibili atti a rivelare lo stato di salute) ed il cui trattamento risulti connesso e indispensabile alla Sua partecipazione al presente studio clinico, sarà trattato con modalità idonee a garantire l'assoluta riservatezza, confidenzialità e sicurezza degli stessi, in conformità alle Norme di Buona Pratica Clinica (D.M. 15/07/97) nonché a quelle per la tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali (D. Lgs. 30/06/03, n. 196).

Il **Titolare** (la persona fisica, giuridica, la pubblica amministrazione, enti pubblici, associazioni o qualsiasi tipo di organismo cui competono le decisioni in ordine alle finalità e modalità del trattamento dei dati personali compreso il profilo della sicurezza) del trattamento dei Suoi dati personali è l'Azienda Sanitaria/Dipartimento/Istituto presso la quale si svolge la sperimentazione, legalmente rappresentata dal Direttore Generale.

Il **Responsabile** (la persona fisica, giuridica, la pubblica amministrazione, enti pubblici, associazioni o qualsiasi tipo di organismo preposti dal titolare del trattamento dei dati personali) del trattamento è lo Sperimentatore principale, nella persona di

I Suoi dati personali, comuni e sensibili, saranno raccolti e trattati dallo sperimentatore responsabile dello studio **e/o** dai suoi collaboratori autorizzati, per le esclusive finalità connesse all'espletamento del presente studio clinico e alla verifica dello stato di avanzamento dello stesso. I dati personali non saranno resi accessibili e disponibili a terzi, ad eccezione degli addetti al monitoraggio e alla verifica (monitor e Quality Assurance), del Comitato Etico locale e delle Autorità sanitarie italiane e/o internazionali; dette Autorità potranno, altresì, richiedere di verificare la Sua cartella clinica, con lo scopo di valutare la correttezza dei dati raccolti e con modalità tali da garantire la riservatezza e la confidenzialità dei dati.

Lo **Sponsor** dello studio utilizzerà questi dati a scopo di ricerca, per valutare la sicurezza e/o l'efficacia del farmaco o del trattamento cui si fa riferimento nel modulo per il consenso informato, nonché per meglio comprendere le patologie oggetto dello studio o per migliorare il disegno di studi futuri. I suoi dati potranno essere conservati e processati tramite computer e potranno essere trasferiti anche all'estero, in forma strettamente anonima. In ogni caso, anche l'eventuale diffusione all'esterno dei dati tramite pubblicazioni scientifiche e/o presentazioni in congressi, convegni e seminari, avverrà esclusivamente a seguito di un'elaborazione statistica degli stessi e, quindi, in forma assolutamente anonima.

In qualità di soggetto interessato al trattamento dei dati personali (Art. 4, lettera i) Lei potrà in qualunque momento avvalersi della facoltà e dei diritti a Lei attribuiti ai sensi dell'Art. 7 del D.Lgs.n. 196 del 30/06/2003.

APPENDIX VII: CONSENSO INFORMATO AL TRATTAMENTO

A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER

TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10

Il/La sottoscritto/a: _____ nato/a a: _____
in data _____

Dichiaro che il Dr. _____ mi ha spiegato le finalità e le procedure dello studio clinico a cui mi è stato chiesto di prendere parte.

Inoltre Dichiaro che

- Ho letto e compreso il foglio di informazioni che mi è stato consegnato.
- Sono stato/a informato/a riguardo i possibili benefici che potrei trarre dal partecipare allo studio e che comunque verrò sottoposto/a ad un trattamento ritenuto altamente attivo per la malattia di cui sono affetto.
- Sono stato informato anche dei possibili rischi correlati sia al trattamento ritenuto standard sia correlati al nuovo regime .
- Ho inoltre avuto il tempo sufficiente per decidere.
- Ho avuto l'opportunità di porre delle domande e di riflettere sulle risposte date.
- Comprendo che la partecipazione allo studio è volontaria e che mi posso ritirare dallo studio stesso in qualsiasi momento lo voglia e che, se lo farò, il medico mi proporrà un trattamento alternativo.
- Comprendo che il presente consenso ha validità anche ai sensi e per gli effetti del D.Lgs 196/03 "Codice in materia di tutela dei dati personali" ed acconsento quindi alla verifica ed inserimento dei miei dati personali nelle banche dati concernenti lo studio predetto da parte di personale dedicato che tratterà i dati suddetti in modo strettamente confidenziale e senza alcun riferimento personale e violazione della riservatezza. Se i risultati dello studio saranno pubblicati, la mia identità non sarà mai rivelata
- Prendo atto che i dati oggetto della presente ricerca potranno essere trattati e/o comunicati ai delegati del Titolare del Trattamento, alle Autorità Ministeriali ed ai Comitati Etici sempre con i criteri di riservatezza e di sicurezza descritti nell'informativa e solamente per le finalità per le quali il presente consenso è stato rilasciato
- Sono stato informato che potrò rivolgermi in qualunque momento al Responsabile del Trattamento dei Dati per esercitare i diritti di cui all'Art.7 del D.Lgs.196/03; - Il Titolare del trattamento dei Suoi dati personali è l'Azienda Sanitaria presso la quale si svolge la sperimentazione, legalmente rappresentata dal Direttore Generale. Il Responsabile del trattamento è lo Sperimentatore principale, nella persona del Dr: _____
- ✓ Pertanto dò liberamente il mio consenso a prendere parte allo studio clinico La firma su questo modulo non verrà ad incidere sui miei diritti legali.
- ✓ Confermo che mi è stata consegnata una copia del Foglio informativo/Consenso informato datato e firmato.
- ✓ In caso di ulteriori domande farò riferimento al Dr.: _____

Firma del Paziente: _____ Data: _____

(o dell'eventuale rappresentante legalmente riconosciuto)

Confermo di aver spiegato la natura di questo studio clinico al/alla paziente di cui sopra e che egli/ella ha capito le spiegazioni.

Firma del Medico: _____ Data: _____

APPENDIX VIII: LETTERA INFORMATIVA PER IL PRELIEVO DI CAMPIONI DI SANGUE PER LA RACCOLTA DI PREPARATI ISTOLOGICI PER ANALISI FARMACODINAMICHE GENETICHE

A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER

TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10

Egregio Sig.re,

Le stiamo chiedendo la sua disponibilità a partecipare ad un progetto Condotta dalla U.O. di Oncologia Medica dell'Ospedale di Livorno per la raccolta di campioni di sangue e di preparati istologici di campioni tumorali conservati in paraffina da utilizzare allo scopo di approfondire le conoscenze sui meccanismi che regolano lo sviluppo della patologia tumorale da cui lei è affetto/a e sull'attività del trattamento a cui le è stato proposto di sottoporsi. Studi recenti hanno dimostrato come la crescita tumorale possa essere inibita non solo attraverso l'utilizzo di farmaci chemioterapici che agiscono direttamente sulle cellule tumorali ma anche attraverso l'inibizione della neovascolarizzazione tumorale. Per valutare l'effetto antivascolare del trattamento verrà sottoposta a due prelievi di sangue per estrazione di DNA genomico e di siero per l'analisi genica della famiglia del VEGF, bersaglio del farmaco bevacizumab e dei geni KRAS, BRAF e delle proteine NF-kB e PML al fine di verificare la presenza di eventuali mutazioni che potrebbero alterarne il funzionamento e quindi modulare l'efficacia della terapia.

PROCEDURE DELLO STUDIO

Se darà il Suo consenso alla partecipazione al Progetto, Le verrà prelevato in due occasioni un campione di sangue di circa 10 ml (una tazzina di caffè, circa). Il prelievo verrà effettuato nello stesso momento in cui avrà luogo una delle visite previste dallo studio. Le verrà inoltre chiesto di provvedere al recupero dei preparati istologici di Suoi campioni tumorali presso il centro di Anatomia Patologica in cui sono conservati o, se del caso, di autorizzarne la raccolta da parte dei medici sperimentatori che l'avranno in cura. I campione di sangue prelevati saranno immagazzinati e mantenuti in appositi freezer fino al momento delle analisi e, così come i preparati istologici, saranno conservati fino al momento dell'analisi presso il Centro Coordinatore dello studio, l'U.O. di Oncologia Medica dell'Ospedale di Livorno.

TEMPO RICHIESTO

Dato che il campione di sangue verrà prelevato nel corso di una delle visite programmate dallo studio, non sarà necessario fare ulteriori viaggi per partecipare al Progetto per la raccolta dei campioni di sangue e non Le sarà richiesto un ulteriore impegno in termini di tempo.

RISCHI ED EFFETTI COLLATERALI

E' possibile che durante il prelievo Lei avverta un leggero dolore, dovuto all'ago che Le verrà inserito nel braccio. La sensazione è simile a quella avvertita nel corso di un qualsiasi prelievo di sangue. La procedura comporta un minimo rischio di sanguinamento, tumefazione o (raramente) infezione nel sito di iniezione.

RISERVATEZZA DEI DATI PERSONALI

Ai sensi dell'art. 13 del D. Lgs 196/2003, in vigore dal 1° Gennaio 2004 ("Codice in materia di protezione dei dati personali"), La informiamo che i Suoi dati personali verranno raccolti ed archiviati e saranno utilizzati esclusivamente per scopi di ricerca scientifica.

Lei ha il diritto di conoscere quali informazioni saranno memorizzate e di aggiornare o modificare dati erranei.

Per queste ragioni il Suo campione di tessuto tumorale sarà reso anonimo, cioè non sarà possibile risalire alla Sua identità attraverso il codice presente sulla provetta. Il campione di DNA estratto dal tessuto al termine delle analisi previste dal protocollo sarà conservato presso U.O. Oncologia Medica – Livorno a -80°C in appositi contenitori etichettati con la dicitura dove sarà riportato l'indicazione dello studio clinico cui fanno riferimento, in questo caso "TRIBE".

Ciascun campione sarà etichettato con il codice attribuito al paziente e potrà essere identificato per la durata massima di 5 anni; durante tale periodo, il paziente potrà richiedere in qualsiasi momento la distruzione del proprio campione. Al termine dei 5 anni il campione sarà reso totalmente anonimo mediante attribuzione di un nuovo codice alfanumerico composto da tre lettere e tre numeri alternati, (ad es. C2X3R5) in modo da rendere impossibile l'identificazione di un particolare paziente. Quindi da quel momento in poi non sarà più possibile procedere alla distruzione dei campioni, ma ciò assicurerà che il materiale e le informazioni correlate possano essere impiegate per studi futuri. Il dr Fotios Loupakis sarà il responsabile della corretta conservazione dei campioni di materiale genetico.

Pertanto la distruzione del campione in base alla volontà del paziente sarà possibile entro 5 anni dall'arruolamento, cioè prima che il nuovo codice venga attribuito al materiale biologico (campione di DNA/RNA e di tessuto paraffinato) e alle eventuali schede di raccolta dati, siano esse elettroniche o cartacee.

L'accesso a tali dati sarà protetto dallo sperimentatore. Autorità regolatorie, personale medico ed addetti al monitoraggio e alla verifica delle procedure potranno ispezionare l'archivio.

Firmando il modulo di consenso informato, Lei autorizzerà l'accesso ai suoi dati. Le informazioni ricevute durante lo studio saranno conservate in un archivio ma il Suo nome non comparirà.

NUOVE SCOPERTE E RISULTATI DEI TEST GENETICI

Tutte le informazioni raccolte durante questo studio sono confidenziali e le informazioni derivate dai test genetici non verranno divulgate. I risultati di queste analisi saranno analizzati nell'ambito di tutta la

popolazione del campione e non del singolo individuo. Sarà possibile ricavare informazioni utili relative al trattamento della patologia della quale Lei è affetto solo a distanza di tempo, quando saranno stati eseguiti diversi studi di questo genere. **Per questo motivo è importante che Lei comprenda e che sia disposto ad accettare questa condizione.** I risultati dello studio potranno essere utilizzati per redigere rapporti o pubblicazioni scientifiche, nei quali comunque la Sua identità non verrà mai svelata. L'accesso a tali dati sarà protetto dallo sperimentatore. Autorità regolatorie, personale medico ed addetti al monitoraggio e alla verifica delle procedure potranno ispezionare l'archivio. Firmando il modulo di consenso informato Lei autorizzerà l'accesso ai suoi dati. Le informazioni ricevute durante lo studio saranno conservate in un archivio ma il Suo nome non comparirà. Solamente il medico che La segue saprà che le informazioni sono correlate a Lei.

I risultati dello studio potrebbero essere pubblicati su riviste scientifiche, ma la Sua identità non sarà rivelata.

PREMESSE DI PARTECIPAZIONE ALLO STUDIO

La Sua partecipazione a questo studio è volontaria. Lei può rifiutare di partecipare al Progetto oppure rinunciare successivamente, in qualsiasi momento nel corso dello studio clinico. **Nel caso in cui Lei dovesse decidere di ritirarsi dallo studio o decidesse altrimenti in merito al presente consenso, i Suoi campioni di mRNA e DNA genomico verranno distrutti;** una volta terminato lo studio, non sarà più possibile eliminare il Suo campione, né le informazioni a Lei relative. Tuttavia, i campioni di mRNA e DNA saranno comunque distrutti dopo 10 anni dalla fine dello studio. La rinuncia di partecipare al Progetto non influenzerà la Sua adesione allo studio, nè modificherà in alcun modo l'assistenza medica nei Suoi confronti da parte del Suo medico.

INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI

Lei è libero di fare domande in qualsiasi momento durante lo studio. Qualora avesse problemi o altre domande relativamente allo studio o ai Suoi diritti di paziente potrà rivolgersi al Dr..... Tel.....

APPENDIX IX: CONSENSO AL PRELIEVO DI CAMPIONI DI SANGUE PER LA RACCOLTA DI PREPARATI ISTOLOGICI PER ANALISI FARMACODINAMICHE GENETICHE

A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER

TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10

Il/La sottoscritto/a: _____

nato/a a: _____ Prov di ____ il ___/___/_____

Residente a: _____ Via/P.zza : _____ n°: _____

CAP: _____ Prov di ____ tel: _____

In qualità di: Soggetto partecipante allo studio

Rappresentante del soggetto: Familiare , Legale rappresentante

Dichiaro

di aver ricevuto dal Dr. _____ una dettagliata informazione sugli aspetti genetici dello studio e di aver compreso l'utilità dell'analisi genetica che verranno effettuate sui campioni; ho avuto inoltre modo di porre tutte le domande che ho ritenute opportune ed ho ricevuto risposte che considero esaurienti. Pertanto **ACCONSENTO** all'esecuzione dei test di farmacogenomica relativi allo studio proposto:

A tal proposito chiedo di

- Volere NON volere essere informato circa i risultati delle analisi
- Volere NON volere rendere partecipi i miei familiari circa i risultati delle analisi
- Volere NON volere rendere partecipe dei risultati delle analisi di farmacogenomica il mio medico di famiglia, il Dott. _____

Firma del Paziente o suo Rappresentante : _____ Data: _____

Dichiaro inoltre specificamente di

- Volere NON volere essere informato di eventuali nuove possibilità diagnostiche derivanti dai suddetti studi e da ricerche future
- Volere NON volere che il mio campione biologico conservato presso la sede designata venga distrutto dopo 5 anni
- Volere NON volere che il mio campione biologico conservato presso la sede designata entro i 5 anni dalla firma del presente venga utilizzato per altri studi di farmacogenomica senza uno specifico consenso scritto relativo allo studio che verrebbe condotto
- Volere NON volere che il mio campione biologico venga conservato con la garanzia dell'anonimato presso il presso la sede designata oltre il termine dei 5 anni riportato nel protocollo per essere impiegato nell'ambito di altri studi di farmacogenomica

Mi impegno infine, a comunicare tempestivamente ogni eventuale cambiamento di opinione in merito a quanto dichiarato.

Firma del Paziente o suo Rappresentante : _____ Data: _____

Nome e Firma del medico che ha raccolto il consenso _____

APPENDIX X: LETTERA INFORMATIVA MMG

A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB VERSUS FOLFIRI + BEVACIZUMAB AS FIRST-LINE TREATMENT FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER

TRIBE – ASL608LIOM04 - EUDRACT 2008-001537-10

Egregio Collega,

il/la Suo/a assistito ha accettato di partecipare ad uno studio clinico in cui si valuta il possibile vantaggio offerto dall'associazione di 5-fluorouracile, oxaliplatino, irinotecano e bevacizumab nel trattamento di prima linea di pazienti affetti da carcinoma del colon-retto metastatico con età compresa tra i 18 e i 75 anni che non abbiano già ricevuto un precedente trattamento chemioterapico per la malattia metastatica. Nella presente lettera Le verranno spiegati i benefici che può dare tale trattamento in questa patologia, le modalità di attuazione del trattamento oggetto di studio ed i possibili effetti collaterali che si potranno presentare con le relative precauzioni da osservare.

RUOLO DELLA CHEMIOTERAPIA CON BEVACIZUMAB NEL TRATTAMENTO DEI TUMORI DEL COLON-RETTO

In quest'ultimi anni sono stati compiuti molti progressi nel trattamento del carcinoma del colon-retto grazie all'introduzione di nuovi farmaci antitumorali quali l'irinotecano, l'oxaliplatino ed il bevacizumab, un anticorpo monoclonale che inibisce l'azione di un fattore di crescita per i vasi sanguigni (VEGF) e quindi il processo di neoangiogenesi tumorale impedendo la crescita tumorale. E' stato inoltre dimostrato che il miglior controllo della malattia si ottiene utilizzando tutti i farmaci attivi a disposizione.

E' ormai chiaramente dimostrato che l'associazione del 5-fluorouracile, farmaco utilizzato da circa trent'anni nella pratica clinica, con l'irinotecano o con l'oxaliplatino offre un notevole miglioramento nel controllo della malattia rispetto al trattamento con il solo 5-fluorouracile. Inoltre è stato evidenziato che la combinazione di bevacizumab con 5-fluorouracile e irinotecano oppure con 5-fluorouracile e oxaliplatino ha maggiore efficacia nel trattamento del carcinoma coloretale rispetto ai soli 5-fluorouracile e irinotecano od oxaliplatino.

Alla luce di questi dati negli ultimi anni è stato studiato un trattamento chemioterapico che prevedeva l'associazione di 5-fluorouracile, oxaliplatino e irinotecano e i dati ottenuti sembrano dimostrare un miglioramento ulteriore nel controllo della malattia con effetti collaterali accettabili.

Inoltre, un recente studio clinico ha dimostrato un'elevata attività e una buona tolleranza di un trattamento di combinazione dei tre chemioterapici, 5-fluorouracile, irinotecano e oxaliplatino, con l'anticorpo monoclonale bevacizumab.

Abbiamo quindi deciso di condurre uno studio clinico in cui i pazienti con carcinoma colo rettale metastatico potranno ricevere un trattamento chemioterapico che prevede l'associazione di

irinotecano, oxaliplatino, 5-fluorouracile e bevacizumab oppure l'associazione ritenuta attualmente di riferimento di irinotecano, 5-fluorouracile e bevacizumab.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del presente studio è infatti di confrontare due diversi trattamenti per verificare se la combinazione di tre chemioterapici al bevacizumab possa migliorare l'efficacia del trattamento con bevacizumab, 5-fluorouracile e irinotecano. Per poter fare ciò è necessario trattare metà dei pazienti inseriti nello studio con il primo trattamento e l'altra metà con il secondo. Per poter valutare quale dei due trattamenti sia più efficace, è necessario inserire circa 450 pazienti in circa tre anni. Se il Suo assistito deciderà di aderire a questo studio, il medico non potrà decidere a quale dei due trattamenti sottoporla ma la scelta sarà casuale con una procedura chiamata di randomizzazione. Questa è la procedura che viene comunemente impiegata in questo tipo di studi.

SCHEMA DI TRATTAMENTO E VALUTAZIONE DELLO STATO DI MALATTIA

Se il Suo assistito deciderà di partecipare a questo studio, verrà sottoposto ad un trattamento chemioterapico, con bevacizumab in associazione a 5-fluorouracile e irinotecano (FOLFIRI) oppure a 5-fluorouracile, irinotecano e oxaliplatino (FOLFOXIRI) ogni due settimane e il tipo di trattamento Le verrà assegnato tramite un processo chiamato randomizzazione. Questo tipo di terapia verrà ripetute per un massimo di 12 volte.

Il trattamento con il 5-fluorouracile e/o il bevacizumab potrà essere continuato fino a che non si verificheranno tossicità ad essi riferibili o in base all'andamento della malattia.

Prima di eseguire ogni trattamento il Suo assistito sarà visitato dal medico e dovrà eseguire degli esami del sangue. Inoltre, prima di iniziare ogni ciclo di chemioterapia, gli verranno somministrati dei farmaci per cercare di prevenire l'insorgenza precoce di nausea o vomito.

Prima di iniziare il trattamento il Suo assistito sarà sottoposto/a ad una serie di accertamenti strumentali decisi dal medico, come ad esempio una TAC, una radiografia del torace, una ecografia dell'addome, ed esami del sangue per valutare la sua funzionalità epatica o renale, per poter valutare adeguatamente il suo stato di malattia. Tali esami saranno quindi ripetuti ogni 4 cicli per poter valutare l'attività del trattamento.

All'inizio del trattamento e al momento dell'interruzione dello stesso sarà chiesto al Suo assistito di poter effettuare un prelievo ematico per la raccolta di campioni di sangue da utilizzare allo scopo di approfondire le conoscenze sui meccanismi che regolano lo sviluppo della patologia tumorale da cui lui/lei è affetto/a e sull'attività del trattamento proposto.

L'eventuale interruzione del trattamento prima del completamento dei 12 cicli previsti sarà valutata dal medico in base alla volontà del Suo assistito, alle sue condizioni generali, agli effetti tossici che possono essere insorti e in base all'andamento della malattia.

Ogni decisione presa durante tutta la durata del trattamento oggetto di studio sarà discussa con il Suo assistito.

EFFETTI TOSSICI DEL TRATTAMENTO

Cercheremo di spiegarLe adesso i possibili effetti collaterali dei farmaci che verranno somministrati. Le associazioni di chemioterapici e bevacizumab sono già state utilizzate in centinaia di pazienti affetti da tumore in tutto il mondo, e gli effetti collaterali e la loro gestione sono ben noti. Generalmente gli effetti tossici sono controllabili a domicilio osservando dei semplici consigli che verranno dati al Suo assistito, a cui verrà inoltre consegnato un modulo dove sono riportati i nomi dei medicinali da assumere per controllare questi effetti tossici.

5-Fluorouracile: può provocare diarrea, stomatite, eritema e desquamazione del palmo delle mani e dei piedi, diminuzione dei globuli bianchi.

Oxaliplatino: può provocare diarrea, nausea e vomito, riduzione dei globuli bianchi e delle piastrine. A differenza degli altri effetti tossici che si manifestano tra un ciclo di terapia e il successivo, il trattamento con oxaliplatino può causare la comparsa di una tossicità neurologica periferica che si manifesta con formicolii alle estremità delle mani e dei piedi esacerbati dalle basse temperature. Questa tossicità tende gradualmente a peggiorare durante il trattamento e generalmente regredisce dopo l'interruzione della terapia.

Irinotecano: può provocare diarrea, nausea e vomito, perdita dei capelli, riduzione dei globuli bianchi e delle piastrine. A volte può accadere che proprio durante l'infusione dell'irinotecano insorgano disturbi quali crampi addominali con alcune scariche di diarrea, salivazione e lacrimazione profuse e un calo della pressione arteriosa. Questi effetti non devono allarmare in quanto il quadro recede rapidamente sospendendo per qualche minuto l'infusione del farmaco e somministrando 0.25 mg di atropina sotto cute (che poi verrà somministrata preventivamente nei cicli successivi).

Bevacizumab: può provocare aumento della pressione arteriosa, trombosi, sanguinamento (più frequentemente epistassi), emorragie digestive, proteinuria (presenza di proteine all'analisi delle urine).

Come descritto un evento che può manifestarsi durante il trattamento è una diminuzione dei globuli bianchi. Anche se il calo dei globuli bianchi è di solito di breve durata, questo può comportare una maggior predisposizione alle infezioni. La comparsa di una infezione si manifesta generalmente con la febbre. Sarà importante che, qualora comparisse febbre, il Suo assistitoci avverta immediatamente per poterle darle i consigli più appropriati.

COSA FARE IN CASO DI COMPARSA DEGLI EFFETTI TOSSICI

Prima di iniziare il trattamento chemioterapico al paziente sarà consegnato un elenco su cui sono riportati i provvedimenti da adottare nel caso in cui dovessero insorgere gli effetti collaterali sopra descritti.

Nel caso di comparsa della diarrea si consiglia di assumere una dieta semiliquida, assumere dei liquidi con l'aggiunta di sali minerali per riequilibrare gli elettroliti persi ed assumere loperamide (una compressa dopo ogni scarica di diarrea da continuare fino a 12 ore l'ultima scarica in caso di terapia con irinotecano).

In caso di nausea o vomito si consiglia di assumere metoclopramide in compresse o in fiale intramuscolo o assumere dei farmaci antiserotoninergici sempre per bocca o intramuscolo.

In caso di stomatite si raccomanda di eseguire sciacqui del cavo orale con acqua e bicarbonato. Nel caso in cui dovesse insorgere una infezione micotica, si consiglia di assumere un antifungino in sospensione liquida.

In caso di febbre superiore a 38°C si raccomanda di eseguire un esame emocromo urgente, di visitare il paziente e di contattare un medico del reparto per iniziare una adeguata terapia antibiotica.

In caso di tossicità cutanea sono consigliati dei prodotti topici.

In caso di trombosi, emorragia, ipertensione o di qualunque altro evento avverso il paziente dovrà far riferimento ad un medico del nostro reparto.

RESPONSABILITÀ DELLO SPERIMENTATORE

Se il/la paziente firmerà il consenso, significherà che è d'accordo a partecipare allo studio. Il consenso scritto non avrà conseguenze sui suoi diritti legali. Se durante lo studio emergeranno informazioni che potrebbero incidere sulla volontà del paziente a proseguire lo studio, verrà tempestivamente informato.

Se ha altre domande relative al farmaco o allo svolgersi dello studio, o se insorgono dei problemi durante lo studio, può contattare i seguenti medici:

Dr.....

Tel.....

Dr.....

Tel.....

APPENDIX XI: ADVERSE EVENT FORM

The SAE form will be provided in a separate booklet

APPENDIX XII: CASE REPORT FORM

The Case Report Form fac-simile will be provided in a separate booklet