

Κεφάλαιο 54

Διφωσφονικά

N. Μυλωνάκης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι οστικές μεταστάσεις είναι συνήθεις σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα, πολλαπλούν μυέλωμα κλπ. Στους συμπαγείς όγκους η εμφάνιση των οστικών μεταστάσεων συνήθως υποδηλώνει κακή πρόγνωση με μικρό προσδόκιμο επιβίωσης. Όμως, οι ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του μαστού ή του προστάτη εμφανίζουν πολλές ιδιαιτερότητες στον θεραπευτικό χειρισμό τους^{1,2}. Περίπου το 70% αυτών των ασθενών θα εμφανίσει οστικές μεταστάσεις³ αποτελώντας το 80% του συνόλου των περιστατικών με καρκίνο και οστικές μεταστάσεις έχοντας όμως την μακρύτερη επιβίωση. Οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα θα εμφανίσουν οστικές μεταστάσεις σε ένα ποσοστό περίπου 40%.

Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού και οστικές μεταστάσεις αποτελούν την ομάδα με την πιο υψηλή οστική νοσηρότητα. Ως οστική νοσηρότητα ορίζουμε τις επιπλοκές των οστικών μεταστάσεων οι οποίες περιλαμβάνουν τον πόνο, ο οποίος πολλές φορές απαιτεί παρηγορητική ακτινοβολία, τα παθολογικά κατάγματα, τη συμπίεση του νωτιαίου μυελού και τέλος την επικίνδυνη για τη ζωή του αρρώστου υπερασβεστιαμία της νόσου. Εάν λάβουμε υπόψιν ότι ο μέσος χρόνος επιβίωσης των γυναικών με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού είναι 18 με 26 μήνες καταλαβαίνουμε εύκολα γιατί αποτελούν τον πληθυσμό με την συχνότερη εμφάνιση οστι-

κή νοσηρότητα. Σε μια τυχαίοποιημένη μελέτη στην οποία οι ασθενείς υποβάλλονταν σε θεραπεία με διφωσφονικά ή placebo, στο σκέλος του placebo παρατηρήθηκε ότι το 70% των αρρώστων εμφάνισε τουλάχιστον ένα οστικό συμβάν στη διατία και το 50% υπέστη παθολογικό κάταγμα⁴. Ασθενείς με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης οστική νοσηρότητα είναι και οι ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του προστάτη, του πνεύμονα και πολλαπλούν μυέλωμα.

Όλες οι προαναφερθείσες επιπλοκές είναι το αποτέλεσμα του αυξημένου οστικού μεταβολισμού, με προεξάρχουσα την οστική απορρόφηση, που χαρακτηρίζει την δραστηριότητα των οστικών μεταστάσεων επί του υγιούς οστού^{5,6,7}. Έτσι, η θεραπεία της πρόληψης και αντιμετώπισης των επιπλοκών των οστικών μεταστάσεων πρέπει να επικεντρωθεί στην αναστολή της οστικής απορρόφησης. Αναστολή της οστικής απορρόφησης και ελάττωση των οστικών συμβάντων και του πόνου είναι το χαρακτηριστικό της χρήσης των διφωσφονικών^{8,9}.

Τα διφωσφονικά είναι ανάλογα των ενδογενών πυροφωσφορικών οξέων στα οποία το κεντρικό άτομο οξυγόνου έχει αντικατασταθεί από ένα άτομο άνθρακα. Η δυνατότητα τους να αναστέλλουν την λειτουργία των οστεοκλαστών και τελικά την οστική απορρόφηση διεύρυνε τους θεραπευτικούς τους ορίζοντες. Σε μη ογκολογικούς ασθενείς τα διφωσφονικά χρησιμοποιούνται στην πρόληψη

και τη θεραπεία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης αφού έχουν δείξει ότι αυξάνουν την οστική μάζα και ελαττώνουν κατά το ήμισυ τον κίνδυνο καταγμάτων των σπονδύλων, των ισχίων κλπ^{10,11}. Στη ενεργό νόσο Paget μειώνουν σημαντικά τον πόνο και προφυλάσσουν τον άρρωστο σε βάθος χρόνου από τις επιπλοκές της^{12,13}. Επίσης χρησιμοποιούνται και στην προφύλαξη της οστεοπόρωσης από τη μακροχρόνια χρήση της κορτιζόλης¹⁴.

Τα τελευταία χρόνια τα διφωσφονικά άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως και σε ογκολογικούς ασθενείς με οστικές μεταστάσεις ιδίως από το πολλαπλούν μυέλωμα, τον καρκίνο του μαστού και του προστάτη¹⁵⁻¹⁷. Κλινικές μελέτες σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από πολλαπλούν μυέλωμα και σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού έδειξαν ότι ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης τους μειώνουν την οστική νοσηρότητα κατά 50% περίπου. Η υπερασβεστιαμία της νόσου ανεξαρτήτως της τοπικής οστεολυτικής ή χυμικής της αιτιολογίας είναι το τελικό αποτέλεσμα της υπερδραστηριότητας των οστεοκλαστών και ως εκ τούτου και σε αυτήν την κλινική οντότητα τα διφωσφονικά είναι το φάρμακο εκλογής με εντυπωσιακά αποτελέσματα¹⁸. Πρόσφατες μελέτες προσδίδουν στα διφωσφονικά και άμεσες αντινεοπλασματικές ιδιότητες.

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω τα διφωσφονικά είναι χημικές ενώσεις με δομή παρόμοια αυτής των ανόργανων πυροφωσφορικών οξέων στα οποία το κεντρικό άτομο οξυγόνου έχει αντικατασταθεί από ένα άτομο άνθρακα (P-C-P). Οι δυο φωσφορικές ομάδες των διφω-

σφονικών είναι συνδεδεμένες με ισχυρούς υδρόφοβους δεσμούς. Το κεντρικό άτομο του άνθρακα σχηματίζει δυο επιπλέον ισοσθενείς δεσμούς. Οι δυο πλάγιες αλυσίδες που σχηματίζονται από αυτούς τους συνδέσμους συμβολίζονται με R₁ και R₂ και αποτελούν τους ρυθμιστές των φαρμακευτικών ιδιοτήτων των διφωσφονικών. Ένα μεγάλο μέρος τους είναι υπεύθυνο για την στενή τους συγγένεια με δισθενή ιόντα όπως είναι τα ιόντα ασβεστίου και τελικά με τα οστά. Επιπλέον όταν η R₁ πλάγια αλυσίδα τους αποτελείται από υδροξυομάδα αυξάνεται η συνδεσιμότητα τους με τα ιόντα ασβεστίου.

Το πρώτο διφωσφονικό περιείχε μεθυλομάδα στην R₁ αλυσίδα και υδροξύλιο στην R₂ (etidronate). Όταν η μεθυλομάδα μετατέθηκε στην αλυσίδα R₂ και το μήκος της R₂ άρχισε να μεγαλώνει με την αντικατάσταση της απλής μεθυλομάδας από μακρύτερες αλκυλομάδες δημιουργήθηκαν πιο δυναμικές χημικές ενώσεις¹⁹. Μια αύξηση του μεγέθους της R₂ κατά 1.000 φορές επιτεύχθηκε με την προσθήκη αμινοομάδας στην R₂ σχηματίζοντας τα αμινοδιφωσφονικά (aledronate, pamidronate και neridronate)²⁰.

Τα αμινοδιφωσφονικά με δυο αμινοομάδες (incadronate) καθώς επίσης και με τρεις αμινοομάδες (olpadronate) είναι ακόμη πιο αποτελεσματικά και σχεδόν αγγίζουν την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όταν το τρίτο άζωτο περικλείεται σε δακτύλιο στην R₂ πλάγια αλυσίδα (risedronate και zoledronic acid)^{21,22}.

Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Τα διφωσφονικά έχουν δείξει ξεκάθαρα ότι μειώνουν την οστεόλυση της νεοπλασματικής αιτιολογίας και ως εκ τούτου την οστική καταστροφή¹⁵⁻¹⁷. Η απο-

τελεσματικότητα τους οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αναστολή της δράσης των οστεοκλαστών με ποικίλους τρόπους όπως της αναστολής του σχηματισμού των οστεοκλαστών, της απορροφητικής τους ικανότητας και της επιβίωσης τους²³⁻²⁵. Οι οστεοκλάστες αποτελούν τα κύτταρα του οστού στα οποία συσσωρεύονται οι μεγαλύτερες ποσότητες του φαρμάκου, πιθανώς μέσω ενδοκυττώσεως²⁶. Μετά την είσοδο του φαρμάκου στον οστεοκλάστη επέρχονται σημαντικές αλλαγές στην μορφολογία του τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (απώλεια της κυματοειδούς παρυφής, διαταραχή του κυτταρικού σκελετού καθώς επίσης και απώλεια των δακτυλίων της ακτίνης)²⁷⁻²⁹. Από μόνες τους οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε μείωση της δραστηριότητας του με αποτέλεσμα την ικανοποιητική αναστολή της οστικής απορρόφησης.

Σε μερικές μελέτες φάνηκε ότι τα διφωσφονικά οδηγούν τους οστεοκλάστες σε απόπτωση καθώς και ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους, γεγονός που ίσως να αποτελούν τους κυριότερους παράγοντες της δραστηριότητας τους. Τέλος, δείχνουν ότι δρουν και στην αμφίδρομη σχέση οστεοκλαστών-οστεοβλαστών. Έχει φανεί ότι οι οστεοβλάστες που έχουν εκτεθεί στα διφωσφονικά αναστέλλουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα³⁰.

Η δράση των διφωσφονικών σε μοριακό επίπεδο δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως. Η δράση τους διαφέρει λόγω της δομής τους (αμινοδιφωσφονικά και μη αμινοδιφωσφονικά) και της διαφορετικής ενδοκυττάριας δράσης τους. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδοκυττάρια δράση των μη αμινοδιφωσφονικών χαρακτηρίζεται από την γλυκό-

λυση, την οξειδωση των λιπαρών οξέων και την παραγωγή γαλακτικού^{31,32}. Τα μη αμινοδιφωσφονικά μεταβολίζονται σε τοξικά υδρόφοβα³³ ανάλογα ATP που περιέχουν μεθυλένιο και καταβολίζονται από μέλη της οικογένειας της τύπου 2 aminoacyl-tRNA συνθετάσης³⁴ και παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση. Τα τοξικά υδρόφοβα ανάλογα ATP που σχηματίζονται με την είσοδο των διφωσφονικών στον οστεοκλάστη αναστέλλουν μεταβολικά ένζυμα όπως οι φωσφατάσες και οι πυροφωσφατάσες οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, στην διαφοροποίηση και στη λειτουργία του οστεοκλάστη^{35,36}.

Αντίθετα, τα αμινοδιφωσφονικά έχουν εντελώς διαφορετική δράση. Δεν μεταβολίζονται σε ανάλογα ATP αλλά αναστέλλουν το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος³⁷. Αυτό το μονοπάτι είναι ένα βιοσυνθετικό μονοπάτι από το οποίο εξαρτάται η σύνθεση της χοληστερόλης, και των ισοπρενοειδών (isoprenoid) λιπιδίων όπως είναι το isopentenylidiphosphate (IPP), το farnesyl diphosphate (FPP) και το geranylgeranyldiphosphate (GGPP). Τα FPP και GGPP χρειάζονται για την πρενυλίωση των μικρών GTPάσων όπως οι Ras, Rho και Ra, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που ενεργοποιούν διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς.

Η αναστολή της πρενυλίωσης των GTPάσων λόγω της αναστολής του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος είναι υπεύθυνη για την ανεπαρκή δράση τους³⁸. Έτσι τα αμινοδιφωσφονικά αναστέλλοντας την παραγωγή της farnesyl pyrophosphate συνθετάσης ή άλλων ενζύμων οδηγούν το κύτταρο σε δυσλειτουργία και τελικά στον κυτταρικό θά-

νατο. Αυτός ο μηχανισμός επιβεβαιώνεται και από την ικανότητα των geranylgeraniol και farnesol να προστατεύουν τον οστεοκλάστη από τις ανασταλτικές ιδιότητες των αμινοδιφωσφονικών^{39,40}.

Η ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ

Τα διφωσφονικά στην ογκολογία χρησιμοποιούνται αποκλειστικά και μόνο στη θεραπεία των οστικών μεταστάσεων. Η δράση τους παλαιότερα αποδιδόταν στην αναστολή της διαφοροποίησης των ανώριμων πρόδρομων οστεοκλαστών ή στην αναστολή της απορρόφησης λόγω της αποπτωτικής τους δράσης στους ώριμους οστεοκλάστες⁴¹. Πρόσφατες μελέτες προσδίδουν αντινεοπλασματική δράση στα διφωσφονικά σε αρκετούς τύπους καρκινικών κυττάρων όπως του πολλαπλού μυελώματος^{42,43}, του μαστού⁴⁴, του προστάτη⁴⁵ και του παγκρέατος⁴⁶. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι η αποτελεσματικότητα τους στην οστική μεταστατική νόσο μπορεί να οφείλεται σε άμεση αντινεοπλασματική δράση επί των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων.

Οι σκέψεις αυτές ενισχύονται και από τη γνωστή ανασταλτική τους δράση στη σύνθεση της FPP και της GGPP. Όμως ο ακριβής μοριακός στόχος των διφωσφονικών δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί ούτε ώστε να καθορίσουμε τα ακριβή οφέλη από τη χρήση τους.

Στόχο των διφωσφονικών μπορεί να αποτελούν πολλά ισοπρενοειδή μόρια τα οποία να εμπλέκονται σε διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες όπως στην απόπτωση και στη διαταραχή του κυτταρικού κύκλου καθώς επίσης στη διηθητική και στην αγγειογενετική τους ικανότητα.

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Όλες οι εργαστηριακές μελέτες που προσπάθησαν να βρουν τον μηχανισμό μέσω του οποίου επέρχεται η απόπτωση ή η διαταραχή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είχαν ως κοινό παρονομαστή την απόδειξη της απόπτωσης αλλά όχι και του υπεύθυνου μηχανισμού. Μερικοί ερευνητές λαμβάνοντας υπόψιν ότι το ras εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* προσπάθησαν να το συσχετίσουν με τα διφωσφονικά. Απέδειξαν *in vitro* ότι τα διφωσφονικά προκαλούν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων παρατηρώντας μια ταυτόχρονη καταστολή του σήματος του ras και των μονοπατιών των Erk και Akt με συνοδό ενεργοποίηση της caspase 3. Σε αυτή τη μελέτη φάνηκε ότι η σύνθεση των ισοπρενοειδών μορίων κατέχει σημαντική θέση στα βιολογικά και βιοχημικά αποτελέσματα της χρήσης των διφωσφονικών αφού η προσθήκη farnesol στα καρκινικά κύτταρα, η οποία επαναφέρει την farnesylation, ανταγωνίσθηκε την επερχόμενη απόπτωση⁴⁷. Σε μια άλλη μελέτη φάνηκε ότι η έκφραση του p53 δεν παίζει κανέναν ρόλο στην σχέση διφωσφονικών-απόπτωσης⁴⁸.

Αντίθετα άλλοι ερευνητές εμπλέκουν την geranylgeranylation του ras αντί για την farnesylation του χρησιμοποιώντας και αυτοί μεθόδους επαναφοράς της geranylgeranylation (geranyl-geranol)⁴⁹. Εκ διαμέτρου αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών οι οποίοι μελέτησαν την σχέση των διφωσφονικών με το ενεργό κλάσμα του ras και βρήκαν ότι δεν συσχετιζόταν με την απόπτωση καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η geranylgeranylation ενός άγνωστου υπο-

στρώματος μέχρι σήμερα είναι υπεύθυνη για την απόπτωση⁵⁰. Άλλες μελέτες έρχονται να απενοχοποιήσουν πλήρως την genarylgeranylation. Σε ότι αφορά τη σχέση των διφωσφονικών με τον κυτταρικό κύκλο, συγκέντρωση του zoledronic acid μεγαλύτερη από 100μM απέφερε in vitro την καταστολή της ανάπτυξης σε ορμονοεξαρτώμενο και μη καρκίνο του προστάτη κατά 75% περίπου με συνοδό ανταπόκριση και στα επίπεδα του PSA⁵¹. Σε αυτή τη μελέτη φάνηκε μια συσσώρευση των κυττάρων στην G1 φάση.

Αντίθετα όταν δοκιμάστηκε η επίδραση των aledronate και risedronate σε φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα η συσσώρευση παρατηρήθηκε στη φάση S⁵². Από τα αποτελέσματα όλων των μελετών συμπεραίνουμε ότι τα διφωσφονικά προκαλούν την απόπτωση και την διαταραχή του κυτταρικού κύκλου χωρίς να είναι όμως γνωστοί ακόμη οι ακριβείς στόχοι του φάρμακου.

ΑΝΤΙΔΗΘΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Έχει παρατηρηθεί in vitro ότι τα διφωσφονικά μπορούν να ελαττώσουν την διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων. Από όλα τα διφωσφονικά μόνο το zoledronic acid έδειξε να έχει αντιδιηθητικές ιδιότητες σε συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν in vivo (1 μM). Όμως όπως προαναφέρθηκε, σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν επιτυγχάνεται και η απόπτωση των κυττάρων. Πολλοί ερευνητές έστρεψαν το ενδιαφέρον τους προς την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών και των μονοπατιών τους που εμπλέκονται στις αντιδιηθητικές ιδιότητες των διφωσφονικών.

Τελικά φαίνεται ότι η επεξήγηση του φαινομένου αυτού είναι η αναστολή της πρωτεϊνικής geranylgeranylation^{52,53}. Πιο συγκεκριμένα το zoledronic acid σε χα-

μηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει τη σηματοδότηση του RhoA αλλά όχι και των άλλων υποομάδων της Rho οικογένειας. Έτσι μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι η αντιδιηθητική δράση των διφωσφονικών είναι το αποτέλεσμα της αναστολής της σηματοδότησης του RhoA. Αυτό υποστηρίχθηκε και από το γεγονός ότι το zoledronic acid σε χαμηλές συγκεντρώσεις αποτρέπει την μετατόπιση του RhoA από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη.

Η αναστολή της δράσης του RhoA δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αφού στις συγκεντρώσεις του zoledronic acid στις οποίες επιτυγχάνεται η αναστολή του RhoA και της διηθητικής ικανότητας των κυττάρων δεν παρατηρείται καμία διαταραχή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Λαμβάνοντας υπόψιν αυτά τα δεδομένα μπορούμε να πούμε ότι η αναστολή της ισοπρενυλίωσης των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών μπορεί να είναι το αίτιο της δραστηριότητας των διφωσφονικών με την ras να εμπλέκεται στην απόπτωση και την RhoA στην διήθηση.

ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τόσο in vitro όσο και in vivo τα διφωσφονικά έχουν δείξει αντιαγγειογενετικές ιδιότητες. Σε πειραματικό επίπεδο σε ποντίκια έχει αποδειχθεί ότι το zoledronic acid σε δόση 3 μg/Kg αναστέλλει την προκληθείσα από υποδόριο εμπότισμό με bFGF αγγειογένεση σε ποσοστό 50%⁵⁴. Επίσης σε πειραματικά μοντέλα αναστέλλει και την αγγειογένεση των οστικών μεταστάσεων του μελανώματος⁵⁵. In vivo, σχεδόν όλα τα διφωσφονικά ελάττωσαν την επαναγγείωση του προστάτη σε ευνοησιμμένα ποντίκια που έπαιρναν τεστοστερόνη⁵⁶.

Η ανασταλτική δράση των διφωσφο-

νικών στην συγκόλληση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνεται να συμβαίνει τουλάχιστον επί μέρους από τη ρύθμιση των integrins (e.g. $\alpha\upsilon\beta_3$ and $\alpha\upsilon\beta_5$) οι οποίες εμπλέκονται στην αγγειογένεση. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν η $\alpha\upsilon\beta_3$ integrin η οποία, πρώτον, χρειάζεται στους οστεοκλάστες για την προσκόλληση τους στο οστό και την έναρξη της απορρόφησης του και δεύτερον, όταν εκφράζεται αυξάνει την οστική μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων⁵⁷. Έτσι το αποτέλεσμα της επίδρασης των διφωσφονικών στη $\alpha\upsilon\beta_3$ μπορεί να είναι πλειοτροπικό τόσο σε ότι αφορά την οστική απορρόφηση όσο και στην μεταστατικότητα του.

Τέλος πρόσφατα ανακοινώθηκε ότι το zoledronic acid έχει ρυθμιστικό χαρακτήρα και στους αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες όπως ο VEGF και ο bFGF⁵⁸. Όλες οι μελέτες τελικά δείχνουν ότι τα διφωσφονικά παρεμβαίνουν σε μια σειρά διαφορετικών μηχανισμών της αγγειογένεσης.

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ – ΑΠΟΔΕΙΞΕΙΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ

Οι οστικές επιπλοκές σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο και οστικές μεταστάσεις αποτελούν καθημερινό πρόβλημα στην κλινική πράξη. Τα διφωσφονικά έχουν προεξάρχουσα θέση αφού ελαττώνουν την οστική νοσηρότητα και τον πόνο. Από όλα τα διφωσφονικά το pamidronate 90mg iv και το zoledronic acid 4mg iv κάθε 3-4 εβδομάδες έχουν να επιδείξουν τα καλύτερα κλινικά αποτελέσματα. Σε ασθενείς με λυτικές οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού το zoledronic acid και το pamidronate δείχνουν να είναι ισοδύναμα με το zoledronic acid να υπερέχει όμως σε με-

ρικά επιμέρους σημεία.

Στους ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του προστάτη, του νεφρού, του πνεύμονα και άλλων συμπαγών όγκων η κατάσταση είναι διαφορετική αφού το zoledronic acid είναι το μόνο διφωσφονικό που έχει δείξει σημαντικά κλινικά οφέλη. Λόγω του καθυστερημένου οφέλους (3-6 μήνες) που έχει φανεί να έχει η χρήση των διφωσφονικών στις οστικές μεταστάσεις σε διάφορους τύπους καρκίνου, θα λέγαμε ότι η θεραπεία θα πρέπει να ξεκινάει σχετικά νωρίς στην πορεία της νόσου.

Το προφίλ ασφαλείας των διφωσφονικών είναι υψηλό. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που έχουν παρατηρηθεί είναι της οξείας φάσης (πυρετός κατά την έγχυση κλπ), κόπωση, αρθραλγία, σπανίως νεφρική ανεπάρκεια και οστεονέκρωση της κάτω γνάθου έχουν παρατηρηθεί από τη χρήση του zoledronic acid και τέλος δυσπεπτικά ενοχλήματα για τα σκευάσματα που λαμβάνονται από το στόμα.

Έχουν γίνει πολλές κλινικές μελέτες για να καθορίσουν το κλινικό όφελος από τη χρήση των διφωσφονικών. Ως πρώτοι στόχοι είχαν καθοριστεί ο αριθμός και ο χρόνος εμφάνισης των οστικών συμβάντων της οστικής νοσηρότητα. Η Food and Drug Administration των Η.Π.Α. προτείνει ως πρώτο στόχο στις μελέτες τον χρόνο μέχρι την εμφάνιση του 1^{ου} οστικού συμβάντος, γεγονός όμως που τυγχάνει συζητήσεως μεταξύ των ερευνητών λόγω της πολυμορφικής εμφάνισης και συμπεριφοράς της οστικής νόσου.

ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Το 2003 ο Rosen και οι συνεργάτες του⁵⁹ σύγκριναν σε ασθενείς με οστικές

μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού ή πολλαπλού μυελώματος το pamidronate που αποδεδειγμένα είχε καλά αποτελέσματα με το zoledronic acid.

Στην υποομάδα των ασθενών με καρκίνο του μαστού εντάχθηκαν 377 ασθενείς στο σκέλος του zoledronic acid και 389 στο σκέλος του pamidronate. Ο πρώτος στόχος ήταν το ποσοστό των ασθενών που θα εμφάνιζαν >1 οστικά συμβάντα, όπου τελικά δεν φάνηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο φαρμάκων (46% vs 49% για το σκέλος του pamidronate). Αντιθέτως, φάνηκε ελάττωση κατά 20% του κινδύνου εμφάνισης οστικού συμβάντος στο σκέλος του zoledronic acid από ότι στο σκέλος του pamidronate (risk ratio=0.799; p=0.025), ειδικά στις ασθενείς με λυτικές μεταστάσεις το zoledronic acid με την ανάλυση Andersen–Gill έδειξε ελάττωση κατά 30% (p=0.010).

Σε μια πρόσφατη μελέτη συγκρίθηκε το zoledronic acid (4 mg σε έγχυση 15 λεπτών κάθε 4 εβδομάδες για 1 χρόνο) με placebo σε 227 Ιαπωνίδες γυναίκες με οστεολυτικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού⁶⁰.

Σε αυτή τη μελέτη διαπιστώθηκε μείωση κατά 39% της συχνότητας της εμφάνισης οστικών συμβάντων και στατιστικά σημαντική ελάττωση του αριθμού των ασθενών που θα αναπτύξουν οστικά συμβάντα (31% vs 52% για το placebo; p=0,001) και σημαντική παράταση του χρόνου μέχρι την εμφάνιση του πρώτου συμβάντος (ο μέσος χρόνος δεν έχει καθοριστεί ακόμη στο σκέλος του zoledronic acid ενώ στο σκέλος του placebo ήταν 360 ημέρες, p=0,004). Το ποσοστό κινδύνου ανάπτυξης οστικού συμβάντος ελαττώθηκε κατά 44% (p=0,009) στο σκέλος του zoledronic acid. Η σπουδαιό-

τητα της μελέτης αυτής είναι ότι φάνηκε το zoledronic acid να υπερέχει έναντι των άλλων διφωσφονικών επί του ίδιου χρόνου θεραπείας. Στην μακροχρόνια χορήγηση του zoledronic acid δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες παρενέργειες.

Παγκοσμίως το zoledronic acid πήρε έγκριση για την θεραπεία των οστικών μεταστάσεων σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού μέσω της μελέτης των Rosen και συνεργατών.

ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Στον καρκίνο του προστάτη η χρήση του clodronate και του pamidronate δεν είχαν επιδείξει σημαντικό όφελος όπως στον καρκίνο του μαστού. Αντίθετα πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς με ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτη έδειξαν ότι το zoledronic acid έχει θέση στην αντιμετώπιση των οστικών συμβάντων σε αυτούς τους ασθενείς, μειώνοντας στατιστικά σημαντικά την συχνότητα εμφάνισης τους καθώς επίσης και την ένταση του πόνου. Στην μελέτη που δοκιμάστηκε το zoledronic acid εντάχθηκαν 643 άρρωστοι^{61,62}. Μετά από δυο χρόνια θεραπείας με zoledronic acid τα αποτελέσματα έδειξαν ελάττωση του ποσοστού των ασθενών που ανέπτυξαν >1 οστικά συμβάντα (38% vs 49% για το σκέλος του placebo, p=0.028) και σαφώς μικρότερο ποσοστό εμφάνισης όλων των τύπων των οστικών συμβάντων, κυρίως των παθολογικών καταγμάτων.

ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΙ

Τα διφωσφονικά έχουν δοκιμαστεί και σε περιπτώσεις οστικής καταστροφής από μεταστάσεις άλλων συμπαγών όγκων πέραν του καρκίνου του μαστού

και του προστάτη καθώς επίσης και σε περιπτώσεις οστικής καταστροφής από τοξικής ιατρογενούς οστεοπόρωσης προκληθείσας κατά την αντιμετώπιση νεοπλασμάτων (πρόωρη εμμηνόπαυση λόγω χημειοθεραπείας, ωθηκεκτομή, αναστολείς της αρωματάσης κλπ). Το όφελος από την χορήγηση των διφωσφονικών στην πλειοψηφία αυτής της ομάδας ασθενών δεν μπορεί να καθοριστεί με ασφάλεια λόγω του μικρού προσδόκιμου επιβίωσης τους.

Σε μια μελέτη που ανακοινώθηκε το 2004 σε 773 ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου το zoledronic acid (zoledronic acid vs placebo) φάνηκε να υπερέχει έναντι των άλλων διφωσφονικών⁶³. Το 49% των αρρώστων είχαν μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και το υπόλοιπο ποσοστό απαρτιζόταν από περισσότερους από 20 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Βέβαια αν και αυτή η ομάδα ασθενών είχε φτωχή πρόγνωση (περί τους 6 μήνες, λαμβάνοντας κατά μέσο όρο 4 εγχύσεις zoledronic acid) η Andersen-Gill multiple event ανάλυση έδειξε ότι στο σκέλος του zoledronic acid η πιθανότητα ανάπτυξης ενός οστικού συμβάντος μειώθηκε κατά 31% (HR=0,693; p=0,003) και ο μέσος χρόνος μέχρι την εμφάνιση του πρώτου συμβάντος παρατάθηκε στις 236 ημέρες vs 155 ημέρες σε σύγκριση με το σκέλος του placebo (p=0,009).

Οι ασθενείς με οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του νεφρού έχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρού οστικού συμβάντος. Στοιχεία για την δράση των διφωσφονικών σε αυτήν την ομάδα αρρώστων έχουμε μόνο από την επιμέρους ανάλυση που έγινε στην προαναφερθείσα μελέτη σε 46 αρρώστους με καρκίνο του νεφρού⁶⁴. Τα αποτελέσματα έδειξαν

μικρότερη συχνότητα εμφάνισης οστικού συμβάντος κατά 41% (p=0,011), παράταση του μέσου χρόνου εμφάνισης των οστικών συμβάντων κατά 1 χρόνο περίπου (p=0,007) και κατά 58% μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης οστικού συμβάντος (p=0,010) έναντι του σκέλους του placebo. Σημαντικό να αναφέρουμε είναι το γεγονός ότι οι άρρωστοι που έλαβαν zoledronic acid εμφάνισαν σημαντικές ανταποκρίσεις στις οστικές βλάβες καθώς επίσης και παράταση του χρόνου επιδείνωσης των οστικών βλαβών (μέσος χρόνος 256 ημέρες έναντι 89 στο σκέλος του placebo, p=0,014).

Συνοψίζοντας βλέπουμε ότι οι οστικές μεταστάσεις σε ασθενείς με καρκίνο του νεφρού έχουν επιθετική συμπεριφορά (το 80% θα εμφανίσει οστικό συμβάν στα 2 χρόνια περίπου) αλλά ο κίνδυνος επιπλοκών από τις μεταστάσεις μειώνεται σημαντικά με τη χορήγηση zoledronic acid.

Στην κατηγορία των ασθενών που αναπτύσσεται οστεοπόρωση λόγω των χειρισμών για την αντιμετώπιση διάφορων νεοπλασμάτων, τα διφωσφονικά και ιδιαίτερα το zoledronic acid δείχνουν να προφυλάσσουν των ασθενή από την οστική απορρόφηση.

Σε αυτήν την κατεύθυνση σχεδιάστηκε η μελέτη Z-FAST⁶⁵ στην οποία μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς οι οποίες ελάμβαναν επικουρική θεραπεία με letrozole, τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν προφυλακτική θεραπεία με zoledronic acid (4mg κάθε 6 μήνες) ή χορήγηση zoledronic acid όταν θα εγκαθίστατο η οστεοπόρωση. Τα πρόδρομα αποτελέσματα (ανά δωδεκάμηνο μέτρηση της οστικής πυκνότητας) έδειξαν ότι το zoledronic acid συντηρεί την οστική πυκνότητα. Τα τελικά αποτελέσματα της

μελέτης θα δείξουν εάν αυτοί οι ασθενείς θα έχουν όφελος από την προφυλακτική χορήγηση των διφωσφονικών.

ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ

Στο ερώτημα εάν μπορούμε να γνωρίζουμε από νωρίς ποιοι ασθενείς θα έχουν όφελος κατά τη χορήγηση των διφωσφονικών ήρθε να απαντήσει ο Coleman και οι συνεργάτες του μελετώντας την σχέση μεταξύ του οστικού μεταβολισμού και της θεραπείας με τα διφωσφονικά⁶⁶. Τον οστικό μεταβολισμό τον αξιολόγησε με τη μέτρηση της αποβολής στα ούρα του N-telopeptide σε 1824 ασθενείς που ήταν υπό θεραπεία με διφωσφονικά. Αυτός ο δείκτης οστικής απορρόφησης δείχνει να είναι σημαντικός προβλεπτικός παράγοντας αφού τα υψηλά επίπεδα του στα ούρα συνδυάστηκαν με 4 έως 6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης οστική νοσηρότητα. Ίσως στο μέλλον να μπορούμε να προβλέψουμε ποιοι ασθενείς θα έχουν όφελος και ποιοι όχι από τη συνέχιση της θεραπείας με διφωσφονικά.

Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η αντινεοπλασματική δράση των διφωσφονικών είναι υπό μελέτη. Λόγω της πιθανής αποπτωτικής, αντιδιηθητικής και αντιαγγειογενετικής τους δράσης υπάρχει η σκέψη για συγχορήγηση τους με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ως άμεση αντινεοπλασματική θεραπεία. Το μέλλον θα δείξει εάν κάποιες αλλαγές στην δομή τους τα κάνει πιο αποτελεσματικά προς αυτήν την κατεύθυνση.

Ένας από του πιο σημαντικούς περιο-

ριστικούς παράγοντες που κάνουν την αντικαρκινική τους δράση δύσκολη να αποδειχθεί in vivo είναι το φαρμακοκινητικό τους προφίλ. Μελέτες που αναφέρονται στην φαρμακοκινητική του zoledronic acid δείχνουν ότι μετά από μια χορήγηση του zoledronic acid στην ενδεδειγμένη δόση παρατηρείτε μια ξαφνική αύξηση των επιπέδων στο αίμα η οποία φθάνει σε μια μέγιστη συγκέντρωση, περίπου του 1μM, η οποία είναι 10 έως 100 φορές μικρότερη από αυτήν που έχει δείξει in vitro ότι χρειάζεται για να έχει αποπτωτικές και ανασταλτικές του πολλαπλασιασμού ιδιότητες.

Αντίθετα οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται in vivo έχουν αντιδιηθητικές ιδιότητες. Επιπροσθέτως περίπου το 55% του φαρμάκου δεσμεύεται από τα οστά και απελευθερώνετε με αργούς ρυθμούς μέσα σε διάστημα αρκετών ημερών⁶⁷. Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι από τη συνολική δόση του φαρμάκου μόνο το 5% δεσμεύεται από άλλους ιστούς μη οστικούς και σχεδόν σε 1 ώρα έχει απελευθερωθεί και κατόπιν θα δεσμευθεί και αυτό από τα οστά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι μη οστικοί ιστοί να εκτίθενται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις του φαρμάκου και για πολύ λίγη ώρα μειώνοντας τις όποιες αντικαρκινικές επιδράσεις του φαρμάκου σε αυτούς τους ιστούς.

Αυτές οι σκέψεις ενισχύονται και από το γεγονός ότι οι όγκοι που βρίσκονται στα οστά ανταποκρίνονται στη χορήγηση των διφωσφονικών. Τελευταία γίνεται προσπάθεια να δημιουργηθούν λιποσωμιακά διφωσφονικά για να παραταθεί ο χρόνος ημίσειας ζωής τους στο πλάσμα και ως εκ τούτου και ο χρόνος έκθεσης των εξωοστικών όγκων στο

φάρμακο. Με τα πρώτης γενεάς λιποσωμιακά διφωσφονικά δεν σημειώθηκαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Αντίθετα μετά την επιτυχή δοκιμασία των δεύτερης γενεάς λιποσωματίων που εφαρμόστηκαν στη δοξορουβικίνη (λιποσωμιακή δοξορουβικίνη), οι ελπίδες εναποτίθενται στα δεύτερης γενεάς λιποσωμάτια τα οποία θα βοηθήσουν στην παραγωγή λιποσωμιακών διφωσφονικών δεύτερης γενεάς με πολύ μακρύ χρόνο ημίσειας ζωής και αυξημένη πρόσληψη από τους εξωοστικούς όγκους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997;80: 1588–1594
2. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treatment Review* 2001;27:165–176
3. Coleman RE, Rubens RD. The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 1987;55:61–66
4. Lipton A, Theriault RL, Hortobagyi GN, Simeone J, Knight RD, Mellars K, Reitsma DJ, Heffernan M & Seaman JJ. Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases: long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer* 2000;88: 1082–1090
5. Taube T, Elomaa I, Blomqvist C, Beneton MNC, Kanis JA. Histomorphometric evidence for osteoclast-mediated bone resorption in metastatic breast cancer. *Bone* 1994;15:161–166
6. Boyde A, Macconnachie E, Reid SA, Delling G, Mundy GR. Scanning electron microscopy in bone pathology: review of methods, potential and applications. *Scan Electron Microsc* 1986;4:1537–1554
7. Clarke NW, McClure J, George NJ: Osteoblast function and osteomalacia in metastatic prostate cancer. *Eur Urol* 1993;24: 286–290
8. Ross JR, Saunders Y, Edmonds PM, Patel S, Broadley KE & Johnston SR. Systematic review of role of bisphosphonates on skeletal morbidity in metastatic cancer. *British Medical Journal* 2003;327: 1–7
9. Russell RG, Rogers MJ: Bisphosphonates: From the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999;25:97–106
10. Watts NB, Harris ST, Genant HK et al. Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1990; 323: 73–79
11. Harris ST, Watts NB, Jackson RD et al. Four-year study of intermittent cyclic etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis: three years of blinded therapy followed by one year of open therapy. *Am J Med* 1993; 95: 557–567
12. Roux C, Gennari C, Farrerons J et al. Comparative prospective, double-blind, multicenter study of the efficacy of tiludronate and etidronate in the treatment of Paget's disease of bone. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 851–858
13. Miller PD, Brown JP, Siris ES et al. A randomized, double blind comparison of risedronate and etidronate in the treatment of Paget's disease of bone. *Page's Risedronate/Etidronate Study Group. Am J Med* 1999; 106: 513–520
14. Reid IR, King AR, Alexander CJ, Ibbertson HK. Prevention of steroid-induced osteoporosis with (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate (APD). *Lancet* 1988; 1: 143–146
15. Paterson AHG, Powles TJ, Kanis JA et al. Double-blind controlled trial of oral clodronate in patients with bone metastases from breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 59–65
16. Berenson J, Lichtenstein A, Porter L et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. *Myeloma Aredia Study Group. N Engl J Med* 1996; 334: 488–493
17. Hortobagyi GN, Theriault RL, Porter L et al. Efficacy of pamidronate in reducing

- skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *N Engl J Med* 1996; 335: 1785–1791
18. Fleisch H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991; 42: 919–944
 19. Shinoda H, Adamek G, Felix R et al. Structure–activity relationship of various bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 87–99
 20. Schenk R, Egli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new amino-bisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 1986; 38: 342–349
 21. Sietsema WK, Ebetino FH, Salvagno AM, Bevan JA. Antiresorptive dose–response relationship across three generations of bisphosphonates. *Drugs Exp Clin Res* 1989; 15: 389–396
 22. Green JR, Muller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 1994;9: 745–751
 23. Hughes DE, Mac Donald B, Russell RGG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 1989; 83: 1930–1935
 24. Hughes DE, Wright KR, Uy HL et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1478–1487
 25. Sato M, Grasser W. Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 31–40
 26. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 133–138
 27. Flanagan AM, Chambers TJ. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 407–415
 28. Murakami H, Takahashi N, Sasaki T et al. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 1995; 17: 137–144.
 29. Selander K, Lehenkari P, Vaananen HK. The effects of bisphosphonates on the resorption cycle of isolated osteoclasts. *Calcif Tissue Int* 1994; 55: 368–375
 30. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H et al. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993; 91: 2004–2011
 31. Fast DK, Felix R, Dowse C et al. The effects of diphosphonates on the growth and glycolysis of connective-tissue cells in culture. *Biochem J* 1978; 172: 97–107
 32. Felix R, Fleisch H. Increase in fatty acid oxidation in calvaria cells cultured with diphosphonates. *Biochem J* 1981; 196: 237–245
 33. Rogers MJ, Ji X, Russell RG et al. Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 1994; 303–311
 34. Rogers MJ, Brown RJ, Hodkin V et al. Bisphosphonates are incorporated into adenine nucleotides by human aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224: 863–869.
 35. Felix R, Graham R, Russell RGG, Fleisch H. The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1976; 429: 429–438
 36. Shimdt A, Rutledge SJ, Endo N et al. Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3068–3073
 37. Van Beek E, Pieterman E, Cohen L et al. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing

- bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 108–111
38. Marshall CJ. Protein prenylation: a mediator of protein–protein interactions. *Science* 1993; 259: 1865–1866
 39. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 581–589
 40. Van Beek E, Lowik C, Van der Pluijm G, Papapoulos S. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: a clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 722–729
 41. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR & Boyce BF. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* 1995;10: 1478–1487.
 42. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG & Croucher PI *British Journal of Haematology* 1997;98: 665–672.
 43. Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J & Lichtenstein A In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia* 1998;12: 220–229.
 44. Senaratne SG, Mansi JL & Colston KW. The bisphosphonate zoledronic acid impairs Ras membrane localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. *British Journal of Cancer* 2002; 86: 1479–1486
 45. Lee MV, Fong EM, Singer FR & Guenette RS. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Research* 2001;61: 2602–2608.
 46. Tassone P, Tagliaferri P, Viscomi C, Palmieri C, Caraglia M, D’Alessandro A, Galea E, Goel A, Abbruzzese A, Boland CR & Venuta S. Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. *British Journal of Cancer* 2003;88: 1971–1978.
 47. Caraglia M, D’Alessandro AM, Marra M, Giuberti G, Vitale G, Viscomi C, Colao A, Del Prete S, Tagliaferri P, Tassone P, Budillon A, Venuta S & Abbruzzese A. The farnesyl transferase inhibitor R115777 (Zarnestra) synergistically enhances growth inhibition and apoptosis induced on epidermoid cancer cells by Zoledronic acid (Zometa) and Pamidronate. *Oncogene* 2004;23: 6900–6913
 48. Kuroda J, Kimura S, Segawa H, Sato K, Matsumoto S, Nogawa M, Yuasa T, Kobayashi Y, Yoshikawa T, Ottmann OG & Maekawa T. p53-independent antitumor effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid. *Cancer Science* 2004;95: 186–192
 49. Coxon JP, Oades GM, Kirby RS & Colston KW. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU International* 2004;94: 164–170
 50. Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Kuroda J, Segawa H, Sato K, Yokota A, Koizumi M & Maekawa T. Zoledronic acid mediates Ras-independent growth inhibition of prostate cancer cells. *Oncology Research* 2005;15:1–9
 51. Corey E, Brown LG, Quinn JE, Poot M, Roudier MP, Higano CS & Vessella RL. Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2003;295: 295–306
 52. Lerner EC, Qian Y, Blaskovich MA, Fossum RD, Vogt A, Sun J, Cox AD, Der CJ, Hamilton AD & Sebti SM. Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras–Raf complexes. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270: 26802–26806
 53. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM & Clezardin P. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma

- tate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Research* 2000;60: 2949–2954
54. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V & Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002;302: 1055–1061
 55. Croucher PJ, De Hendrik R, Perry MJ, Hijzen A, Shipman CM, Lippitt J, Green J, Van Marck E, Van Camp B & Vanderkerken K. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003;18: 482–492
 56. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M & Clezardin P. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Research* 2002;62: 6538–6544
 57. Pécheur I, Peyruchaud O, Serre CM, Guglielmi J, Volland C, Bourre F, Margue C, Cohen-Solal M, Buffet A, Kieffer N & Clezardin P. Integrin $\alpha v \beta 3$ expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB Journal* 2002; 16: 1266–1268
 58. Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, Gavasci M, Rocci L, Tirindelli MC, Altomare V, Tocchini M, Bonsignori M & Tonini G. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2003;9: 2893–2897
 59. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, Howell A, Belch A, Mackey J, Apffelstaedt J, Hussein MA, Coleman RE, Reitsma DJ et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma: a randomized, double-blind, multicenter, comparative trial. *Cancer* 2003;98: 1735–1744
 60. Kohno N, Aogi K, Minami H, Nakamura S, Asaga T, Iino Y, Watanabe T, Goessl C, Ohashi Y & Takashima S. Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23: 3314–3321
 61. Zekri J, Ahmed N, Coleman RE & Hancock BW. The skeletal metastatic complications of renal cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 2001;19: 379–382
 62. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Zheng M et al. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96: 879–882
 63. Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, Pawlicki M, De Souza P, Zheng M, Urbanowitz G et al. A Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer* 2004;100:2613–2621
 64. Lipton A, Seaman J & Zheng M. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in patients with bone metastases from renal cell carcinoma. What is new in bisphosphonates? In *Seventh Workshop on Bisphosphonates – From the Laboratory to the Patient*, 2004; Davos, Switzerland Poster Number 28
 65. Brufsky A, Harker WG, Beck JT, Carroll R, Tan-Chiu E, Seidler C, Lacerna L, Thomas E & Perez E, The Z-FAST Study Group. Zoledronic acid (ZA) effectively inhibits cancer treatment-induced bone loss

- (CTIBL) in postmenopausal women (PMW) with early breast cancer (BCa) receiving adjuvant Letrozole (Let): 12 mos BMD results of the Z-FAST trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, 23(16S) 533
66. Coleman RE, Major P, Lipton A, Brown JE, Lee KA, Smith M, Saad F, Zheng M, Hei YJ, Seaman J and Cook R. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23:4925–4935
67. Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Glichick A, Goodin S, LoRusso P, Ma P, Ravera C, Deckert F, Schran H, Seaman J & Skerjanec A Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *Journal of Clinical Pharmacology* 2002;42:1228–1236