

Cechy kliniczne i przebieg choroby u chorych na BRCA1-zależnego raka jajnika

Clinical features and disease course in patients with BRCA1-dependent ovarian cancer

Blecharz Paweł¹, Szatkowski Wiktor¹, Bodzek Maciej², Łuczyńska Elżbieta³

¹ Klinika Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Kraków, Polska

² Oddział Ginekologiczno-Położniczy, Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie sp. z o.o., Polska

³ Zakład Diagnostyki Obrazowej, Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Kraków, Polska

Streszczenie

Wprowadzenie: Rak jajnika (RJ) stanowi wyzwanie współczesnej ginekologii onkologicznej ze względu na złe rokowanie i wzrastającą liczbę zachorowań. Około 10% przypadków RJ ma podłoże dziedziczne związane z mutacją genu BRCA1. Według niektórych autorów cechy kliniczne pacjentek z mutacją i bez niej różnią się, podobnie jak przebieg choroby nowotworowej i rokowanie.

Cel pracy: Celem pracy jest analiza cech klinicznych i przebiegu RJ u chorych na BRCA1-zależnego RJ w materiale Centrum Onkologii, Oddział Kraków.

Materiał i metody: W latach 2004-2008 u 66 (100%) chorych leczonych na RJ stwierdzono germinálną mutację genu BRCA1. Wszystkie pacjentki poddane były pierwotnemu leczeniu operacyjnemu z następową, uzupełniającą chemioterapią opartą na pochodnych platyny. Efekt leczenia oceniano na podstawie badania klinicznego i badań obrazowych po zakończeniu leczenia. Następnie 29 (43,9%) chorych zostało poddanych ponownemu zabiegowi operacyjnemu po zakończeniu chemioterapii uzupełniającej. W sytuacji stwierdzenia całkowitej remisji pozostawały pod kontrolą Ambulatorium Kliniki Ginekologii Onkologicznej. W sytuacji stwierdzenia choroby przetrwałej lub wznowy, pacjentki poddawane były dalszemu leczeniu chemioterapią.

Wyniki: W grupie 66 (100%) chorych stwierdzono 31 (47%) mutacji C61G (ekson 5), 21 (31,8%) mutacji 5382insC (ekson 20), 6 (9,1%) mutacji 185delAG (ekson 2), 8 (12,1%) innych mutacji (ekson 11), średni wiek chorych wynosił 48 lat. Jedynie 7 (10,6%) chorych była w I i II stopniu zaawansowania wg FIGO, 58 (87,9%) chorych w stopniu III, 1 (1,5%) w stopniu IV. U 25 (37,9%) chorych zabieg pierwotny był doszczętny makroskopowo.

U 31 (46,9%) chorych uzyskano całkowitą remisję kliniczną choroby, u 30 (45,5%) częściową remisję a u 5 (7,6%) progresję choroby w trakcie leczenia. Czterdzieści chorych (60,6%) otrzymało chemioterapię z powodu progresji lub przetrwałej choroby nowotworowej. Średni czas obserwacji wyniósł 65 miesięcy. Spośród 66 obserwowanych chorych z powodu RJ zmarło 41 (62,1%) chorych.

Wnioski: Cechy kliniczne i przebieg raka jajnika u chorych z mutacją BRCA1 w analizowanej grupie chorych nie odbiegały od tych opisywanych w literaturze.

Słowa kluczowe: rak jajnika / mutacja BRCA1 / cechy kliniczne /

Adres do korespondencji:

Paweł Blecharz
Klinika Ginekologii Onkologicznej
Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Kraków,
31-115 Kraków, ul. Garncarska 11, Polska
tel. 12-422 99 00 wew. 331
e-mail: pawel.blecharz@interia.pl

Otrzymano: 10.03.2012
Zaakceptowano do druku: 20.04.2012

Abstract

Introduction: Ovarian cancer (OC) remains a challenge for gynecologic oncologists due to poor prognosis and increasing morbidity. About 10% of cases is hereditary and BRCA1 gene mutation-dependant. Some authors claim that clinical features, the course of the disease and prognosis of BRCA1-dependent OC vary between sporadic cases.

Aim of the study: To analyze clinical features and disease courses of BRCA1-dependent OC in the material from Center of Oncology, Cracow Branch.

Material and methods: Between 2004 and 2008, 66 mutations of BRCA1 gene were found in patients with OC. All patients were treated with primary surgery followed by platinum-based chemotherapy. Outcomes were assessed by means of clinical examination and imaging tests. Patients with complete response were followed up in the outpatient office. Secondary chemotherapy was administered if persistent or progressive disease was diagnosed.

Results: In the analyzed group of 66 (100%) patients, the following mutations of BRCA1 gene were found: in 31 (47%) – C61G (exon 5), in 21 (31,8%) – 5382insC (exon 20), in 6 (9,1%) – 185delAG and in 8 (12,1%) – other (exon 11). Mean patient age was 48. FIGO stage I and stage II were diagnosed in 7 (10,6%), stage III in 58 (89,9%) and stage IV in 1 patient (1,5%). Twenty five (37,9%) patients underwent complete macroscopic primary cytoreduction. Platinum-based chemotherapy was administered to all 66 patients after surgery. Complete response (CR), partial response (PR) and progressive disease (PD) was achieved in 31 (46,9%), 30 (45,5%) and 5 (7,6%) patients, respectively. Secondary surgery was performed in 29 (43,9%) of patients after completion of adjuvant therapy. Second-line chemotherapy was administered in 40 (60,6%) patients due to residual or progressive disease. Mean time of follow-up was 65 months. Forty one (62,1%) patients died due to OC progression.

Conclusions: Clinical features and disease courses in BRCA1-dependent OC patients in the analyzed group were similar to other results reported in the literature.

Key words: **ovarian cancer / BRCA1 mutation / clinical features /**

Wstęp

Rak jajnika (RJ) jest obecnie jednym z największych wyzwań ginekologii onkologicznej w krajach wysokorozwiniętych z powodu wzrastającej liczby zachorowań i złego rokowania. Jest nowotworem żeńskich narządów płciowych obarczonym największym odsetkiem zgonów [1]. Ryzyko życiowe zachorowania na RJ wynosi 1,5-1,7% [2, 3]. Ponieważ nie istnieją skuteczne badania przesiewowe większość przypadków RJ jest wykrywanych w III i IV wg FIGO stopniu zaawansowania co zmniejsza szanse chorych na przeżycie 5 lat do 20-30% [4].

Część przypadków RJ stanowią chore z terminalną mutacją w genach *BRCA1* i *BRCA2*. W populacji polskiej około 1/300 osób jest nosicielem takiej mutacji; stanowi ona również przyczynę 10-15% przypadków RJ. [5, 6]. Takie przypadki określa się mianem rodzinnego raka jajnika lub *BRCA1*-zależnego raka jajnika (*BRCA1*-RJ). Znaczna część doniesień naukowych wskazuje na odmienną odpowiedź *BRCA1*-RJ na leczenie, w porównaniu ze sporadycznym RJ [7-11]. Różnica ta widoczna jest zwłaszcza w reakcji na chemioterapię stosowaną jako standartowe leczenie uzupełniające, jakim są pochodne platyny w połączeniu z paklitakselem. Podobne zjawisko, dotyczące chemioterapii indukcyjnej opisano w rodzinnym raku piersi związanym z mutacją *BRCA1* [12, 13].

Obecnie w piśmiennictwie zaczyna przeważać pogląd, że *BRCA1*-zależne raki jajnika roją lepiej, nierzadko obserwuje się nawet 10-letnie przeżycia w zaawansowanych stadiach [14]. Powyższe zagadnienia wskazują, że rodzinny RJ stanowi odrębną podjednostkę wśród nowotworów ginekologicznych [15].

Cel pracy

Celem poniższej pracy jest omówienie wybranych cech populacyjnych, klinicznych, patologicznych oraz przebiegu choroby nowotworowej u pacjentek z *BRCA1*-RJ na podstawie analizy własnego materiału.

Materiał i metody

W latach 2004-2009 w Klinice Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii, Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział Kraków leczono 545 chorych na raka jajnika. U chorych wykonywano badanie w kierunku nosicielstwa mutacji w genie *BRCA1*. Do poszukiwania mutacji zastosowano techniki: dHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) oraz sekwencjonowanie. Badano eksony 2, 5, 11'O, 11'P i 20. Wszystkie chore, u których stwierdzono mutację *BRCA1* przebyły jako leczenie pierwotne zabieg laparotomii, z intencją całkowitej cytoredukcji. Następnie, niezależnie od efektu zabiegu przebyły leczenie chemioterapią oparte na pochodnych platyny (cisplatyna lub karboplatyna), w połączeniu z taksanami (schemat PT), cyklofosfamidem i adriamycyną (schemat PAC) lub samym cyklofosfamidem (schemat PC).

Chore otrzymały 4-9 serii chemioterapii, efekt leczenia skójarzonego oceniano badaniami obrazowymi, poziomem markera CA125 i badaniami ginekologicznym. Efekt leczenia na podstawie badań obrazowych oceniano według kryteriów RECIST 1.1. Chore z efektem całkowitej remisji (CR) były dalej obserwowane lub poddawane zabiegowi *second-look*, chore z efektem częściowej remisji (CR) były poddawane kolejnemu zabiegowi operacyjnemu lub leczone dalej chemioterapią. Chore z progresją choroby (PD) były leczone chemioterapią wg innego niż dotychczasowy schematu. U chorych, u których w trakcie powtórnego zabiegu stwierdzono obecność choroby resztkowej, kontynuowano chemioterapię. Leczenie chemiczne drugiego rzutu polegało na podaniu kolejnych 4-6 serii chemioterapii.

Po zakończeniu leczenia chore pozostawały pod kontrolą Ambulatorium Kliniki Ginekologii Onkologicznej co najmniej przez 5 lat lub do progresji lub zgonu. Leczenie nawrotu choroby polegało we wszystkich przypadkach na chemioterapii z zastosowaniem topotekanu, gemcytabiny, liposomalnej doksorubicyny

Cechy kliniczne i przebieg choroby u chorych na BRCA1-zależnego raka jajnika.

lub vepesidu a także schematów PT, PAC i PC w zależności od czasu jaki upłynął do wystąpienia progresji.

Wyniki

Terminalną mutację genu *BRCA1* stwierdzono u 66 chorych na raka jajnika leczonych w Klinice Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii O/Kraków. W grupie 66(100%) chorych stwierdzono 31(47%) mutacji C61G (ekson 5), 21(31,8%) mutacji 5382insC (ekson 20), 6(9,1%) mutacji 185delAG (ekson 2) oraz 8(12,1%) innych mutacji (ekson 11). W tej grupie 21(31,8%) chorych na *BRCA1*-RJ poddanych było pierwotnemu zabiegowi w Klinice Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii O/Kraków, a 45(68,2%) chorych w szpitalach rejonowych. U 25(37,9%) chorych przeprowadzono zabieg optymalnej cytoredukcji zaś u 41(62,1%) pozostawiono resztki nowotworu w jamie otrzewnej. Następnie wszystkie chore poddane zostały uzupełniającej chemioterapii w wyżej wymienionej Klinice. Średni wiek chorych wynosił 48 lat; dziewięć (13,6%) chorych leczonych było uprzednio z powodu raka piersi.

Jedynie 7(10,6%) chorych było w I i II stopniu zaawansowania wg FIGO, 58 (87,9%) chorych w stopniu III, 1 (1,5%) w stopniu IV. Wszystkie chore przebyły leczenie chemioterapią oparte na pochodnych platyny (cisplatyna lub karboplatyna). Średnia ilość serii chemioterapii uzupełniającej wyniosła 6 (4-9).

Po zakończeniu leczenia skojarzonego u 31 (46,9%) chorych uzyskano całkowitą remisję (CR) kliniczną choroby, u 30 (45,5%) częściową remisję (PR) a u 5(7,6%) progresję choroby (PD). Średni poziom markera Ca125 w surowicy krwi przed leczeniem chemicznym wynosił 481U/ml, po zakończeniu leczenia – 98U/ml. Całkowitą remisję markerową po zakończeniu chemioterapii uzupełniającej (poziom markera <35U/ml) stwierdzono u 44 (66,6%) chorych.

Spośród 31 chorych, u których stwierdzono całkowitą remisję choroby, u 8 wykonano zabieg sprawdzający *second-look*; w 3 przypadkach stwierdzono obecność choroby resztkowej. U 22 (33,3%) chorych, z efektem częściowej remisji, wykonano zabieg powtórnej cytoredukcji. U wszystkich chorych, u których podczas wtórnej operacji stwierdzono chorobę resztkową zastosowano kontynuację dotychczasowej chemioterapii lub drugi rzut leczenia chemicznego.

Następnie wszystkie 66 chorych obserwowanych było w Ambulatorium Kliniki Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii O/Kraków co najmniej 5 lat lub do progresji lub zgonu. Łącznie 40 (60,6%) chorych otrzymało więcej niż 1 rzut chemioterapii, zaś 18 (27,3%) chorych – więcej niż 2 rzuty chemioterapii. Średni czas obserwacji wyniósł 65 m-cy. W trakcie obserwacji z powodu raka jajnika zmarło 41 (62,1%) chorych. Żadna chora nie zmarła z powodu progresji raka piersi. Wyniki analizy materiału klinicznego przedstawiono w tabeli I.

Dyskusja

Chore na *BRCA1*-RJ wydają się stanowić grupę kliniczną o nieco odmiennych cechach choroby i różnym przebiegu. W większości przypadków stwierdzenie mutacji genu *BRCA1* u chorych na raka jajnika następuje w trakcie lub dopiero po zakończeniu leczenia, dlatego spotykane w piśmiennictwie dotychczasowe obserwacje kliniczne tej grupy chorych są retrospektywne [7-10].

Tabela I. Obraz kliniczny 66 chorych na BRCA1-zależnego raka jajnika.

Cechy BRCA1-zależnego raka jajnika	Liczba chorych No. %	
Liczba chorych z mutacją genu BRCA1	66	100
Rodzaj mutacji genu BRCA1:		
– 5382insC	21	31,8
– 189delAG	6	9,1
– C61G	31	47
– inne	8	12,1
Miejsce zabiegu pierwotnego		
– Klinika Ginekologii Onkologicznej Centrum Onkologii O/Kraków	21	31,8
– szpital rejonowy	45	68,2
Współistniejący rak piersi	9	13,6
Zakres cytoredukcji		
– całkowita	25	37,9
– częściowa	41	62,1
Stopień zaawansowania wg FIGO 2009		
– I	4	6,1
– II	3	4,5
– III	58	87,9
– IV	1	1,5
Stopień zróżnicowania histologicznego		
– G1	2	27
– G2	18	27,3
– G3	46	70
Typ histologiczny raka		
– surowiczny	25	37,9
– endometrialny	17	25,8
– śluzowy	10	15,2
– inny	14	21,1
Chemioterapia uzupełniająca		
– PT	48	72,7
– PC	7	10,6
– PAC	5	7,6
– karboplatyna	6	9,1
Odpowiedź na leczenie		
– CR	31	46,9
– PR	30	45,5
– SD	0	0
– PD	5	7,6
Cechy BRCA1-zależnego raka jajnika	Liczba chorych No. %	
Zabieg second-look	8	12,1
Wtórna cytoredukcja	22	33,3
Progresja choroby	40	60,6
Liczba rzutów chemioterapii		
– 1	26	39,4
– 2	22	33,3
– >2	18	27,3
Zgon z powodu raka jajnika	41	62,1

W analizowanej grupie chorych dominowały typowe dla populacji polskiej mutacje genu *BRCAl* w eksonach 5 i 20. Typowa z kolei była również obecność u 13,6% chorych współistniejącego raka piersi, który we wszystkich przypadkach poprzedzał wystąpienie raka jajnika. Średnia wieku zachorowania na *BRCAl*-zależnego raka piersi jest około 10 lat niższa niż zachorowania na *BRCAl*-RJ, co tłumaczy obserwowaną sytuację [15, 18].

U niemal 90% chorych stwierdzono raka jajnika w III i IV stopniu zaawansowania wg FIGO, co prawdopodobnie spowodowało znaczny (60,6%) odsetek progresji w obserwowanej grupie chorych. Należy jednak zauważyć, że spośród tych 40 chorych, u 29 progresja wystąpiła po upływie roku od zakończenia leczenia, co potwierdza lepszą niż w przypadku sporadycznego raka jajnika odpowiedź na leczenie chemiczne i dłuższe okresy remisji w grupie chorych na *BRCAl*-RJ [19, 20].

Trudno ocenić wpływ mutacji *BRCAl* na zakres pierwotnej cytoredukcji ze względu na niejednorodność i trudność do analizy zmienne wpływające na efekt operacji – różne szpitale, różni operatorzy o różnych umiejętnościach itd. Generalnie odsetek całkowitych cytoredukcji – 37,9% – nie odbiega od wyników spotykanych w literaturze, choć należy ten wynik uznać za przeciętny. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę, że aż 90% chorych było w III i IV stopniu zaawansowania, wynik wydaje się zadowalający [21, 22].

Cechy mikroskopowe raka jajnika w analizowanej grupie nie odbiegają od innych serii opisywanych w literaturze [23, 24]. Potwierdza się także wysoki odsetek odpowiedzi na uzupełniające leczenie chemioterapią – całkowity odsetek odpowiedzi (CR+PR) wyniósł 92,4%, zaś odsetek odpowiedzi całkowitych (CR) – 46,9%. Jest to zgodne z wynikami innych autorów sugerującymi lepszą odpowiedź *BRCAl*-RJ na leczenie chemioterapią w porównaniu ze sporadycznym RJ.

Należy zauważyć, że 25 (37,9%) chorych z *BRCAl*-RJ w czasie analizy pozostawało bezobjawowych, co biorąc pod uwagę średni czas obserwacji wynoszący 65 miesięcy oraz wysoki odsetek zaawansowanych przypadków wydaje się wynikiem co najmniej dobrym. Dlatego, choć nie poddany analizie statystycznej, czas przeżycia chorych na *BRCAl*-RJ w analizowanej grupie chorych wydaje się być, podobnie jak w piśmiennictwie, dłuższy od przypadków sporadycznych [7-10].

Wnioski

Stwierdzone w analizowanej grupie na *BRCAl*-zależnego raka jajnika cechy kliniczne i przebieg choroby nie odbiegają od wyników innych obserwacji spotykanych w literaturze.

Analiza naszego materiału wydaje się potwierdzać większy odsetek zaawansowanych przypadków w tej grupie chorych, lepszą odpowiedź na leczenie chemiczne i dłuższe okresy remisji po zakończeniu uzupełniającej chemioterapii. Biorąc pod uwagę fakt bardziej zaawansowanej choroby i dobrej odpowiedzi na leczenie chemiczne wydaje się, że chore na *BRCAl*-RJ mogą odnosić większą niż sporadyczne przypadki RJ korzyść z indukcyjnej chemioterapii, co wymaga dalszych badań. Warta analizy wydaje się także ewentualna różnica w reakcji na różne schematy chemioterapii, obserwowana wcześniej w *BRCAl*-zależnym raku piersi.

Piśmiennictwo

1. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, [et al.]. EUROCORE Working Group. EUROCORE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer*. 2009, 45, 931-991.
2. Russo A, Calo V, Bruno L, [et al.]. Hereditary ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009, 69, 28-44.
3. Prat J, Ribe A, Gallardo A. Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol*. 2005, 36, 861-870.
4. Harmandayan G, Gao F, Mutch D, [et al.]. Ovarian cancer patient surveillance after curative-intent initial treatment. *Gynecol Oncol*. 2010, 120, 205-208.
5. Risch H, McLaughlin J, Cole D, [et al.]. Prevalence and penetrance of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet*. 2001, 68, 700-710.
6. Pal T, Permuth-Wey J, Betts J, [et al.]. *BRCA1* and *BRCA2* mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*. 2005, 104, 2807-2816.
7. Cass I, Baldwin R, Varkey T, [et al.]. Improved survival in women with *BRCA*-associated ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003, 97, 2187-2195.
8. Majdak E, Debnjak J, Milczek T, [et al.]. Prognostic impact of *BRCA1* pathogenic and *BRCA1/BRCA2* unclassified variant mutations in patients with ovarian carcinoma. *Cancer*. 2005, 104, 1004-1012.
9. Quinn J, James C, Stewart G, [et al.]. *BRCA1* mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007, 13, 7413-7420.
10. Quinn J, Carser J, James C, [et al.]. *BRCA1* and implications for response to chemotherapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009, 113, 134-142.
11. Blecharz P, Karolewski K, Urbański K. Hereditary ovarian cancer. The role of *BRCA1* gene dysfunction in response to chemotherapy. *Ginekol Pol*. 2011, 82, 214-220.
12. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, [et al.]. Polish Hereditary Breast Cancer Consortium. Response to neo-adjuvant chemotherapy in women with *BRCA1*-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2008, 108, 289-296.
13. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, [et al.]. Pathologic complete response rates in young women with *BRCA1*-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2010, 28, 375-379.
14. Vencken P, Kriege M, Hoogwerf D, [et al.]. Chemosensitivity and outcome of *BRCA1* and *BRCA2*-associated ovarian cancer patients after first line chemotherapy compared with sporadic ovarian cancer patients. *Ann Oncol*. 2011, 22, 1346-1352.
15. Majdak E, Debnjak J, Emerich J. Hereditary ovarian cancer as a separate clinical entity. *Ginekol Pol*. 2003, 74, 557-564.
16. Gorski B, Byrski T, Huzarski T, [et al.]. Founder mutations in the *BRCA1* gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet*. 2000, 66, 1963-1968.
17. Menkiszak J, Gorski B, Jakubowska A, [et al.]. Clinical characteristics of hereditary ovarian cancer (HOC) in Poland. *Ginekol Pol*. 2002, 73, 733-739.
18. Gronwald J, Byrski T, Huzarski T, [et al.]. Hereditary breast and ovarian cancer. *J Hered Cancer Clin Pract*. 2008, 6, 88-98.
19. Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Ben-David Y, [et al.]. Effect of *BRCA1/2* mutations on long-term survival of patients with invasive ovarian cancer: the national Israeli study of ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2008, 26, 20-25.
20. Tan D, Rothermundt C, Thomas K, [et al.]. *BRCA* syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *J Clin Oncol*. 2008, 26, 5530-5536.
21. Wright J, Lewin S, Deutsch I, [et al.]. Defining the limits of radical cytoreductive surgery for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011, 123, 467-473.
22. Cibula D, Verheijen R, Lopes A, Dusek L. Current clinical practice in cytoreductive surgery for advanced ovarian cancer: a European survey. *Int J Gynecol Cancer*. 2011, 21, 1219-1224.
23. Boyd J, Sonoda Y, Federici M, [et al.]. Clinicopathologic features of *BRCA*-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA*. 2000, 283, 2260-2265.
24. Lakhani S, Manek S, Penault-Llorca F, [et al.]. Pathology of ovarian cancers in *BRCA1* and *BRCA2* carriers. *Clin Cancer Res*. 2004, 10, 2473-2481.