

RECEPTOR PRO EPIDERMÁLNÍ RŮSTOVÝ FAKTOR A JEHO ÚLOHA V RADIOTERAPII

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR AND RADIOTHERAPY

SIRÁK I.¹, HATLOVÁ J.², PETERA J.¹, VOŠMIK M.¹, RYŠKA A.², VOŠMIKOVÁ H.³

¹KLINIKA ONKOLOGIE A RADIOTERAPIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE V HRADCI KRÁLOVÉ, LF UK, HRADEC KRÁLOVÉ

²FINGERLANDŮV ÚSTAV PATOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE V HRADCI KRÁLOVÉ, LF UK, HRADEC KRÁLOVÉ

³ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A DIAGNOSTIKY, FAKULTNÍ NEMOCNICE V HRADCI KRÁLOVÉ, LF UK, HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, buněčné proliferace, diferenciaci a buněčného přežívání epidermálních tkání. Aberantně zvýšená exprese EGFR pak může zahájit nekontrolovanou buněčnou proliferaci, jejíž výsledkem je vznik epiteliálních prekanceróz až karcinomů. Řadou autorů byla prokázána korelace mezi zvýšenou nádorovou expresí EGFR a sníženou citlivostí nádorů k ionizujícímu záření. Inhibice EGFR za účelem zvýšení radiosenzitivity se zdá být slibnou strategií, která může mít velký potenciál v léčbě řady epiteliálních nádorů. Logické odůvodnění inhibice EGFR v kombinaci s ionizujícím zářením vychází z výsledků radiobiologických studií, které EGFR připisují kritickou úlohu v cytoprotektivní a pro-proliferativní odpovědi lidských nádorových buněk, která je indukovaná iradiací. Výsledkem této odpovědi je akcelerace nádorové repopulace, která následně působí kontraproduktivně k léčbě zářením. Předložený přehledový článek se zabývá nejen obecnou rovinou EGFR a jeho funkcí ve zdravé a nádorové tkáni, ale také jeho vztahem k ionizujícímu záření; možnostmi léčebného ovlivnění funkce EGFR v kombinaci s radioterapií a jejich rozvíjejícímu se klinickému uplatnění.

Klíčová slova: receptor pro epidermální růstový faktor, radioterapie.

Summary

Epidermal growth factor receptor (EGFR) plays an important role in cell-cycle regulation, proliferation, differentiation, and surviving of epithelial tissues. Aberrant overexpression of EGFR can initiate uncontrolled cell proliferation with subsequent formation of epithelial carcinomas. Correlation between EGFR overexpression and increased resistance of tumor tissues to ionizing radiation has been described by many authors. Strategy of tumor radiosensitization by EGFR inhibition seems to have a great potential in the treatment of epithelial cancers. Rationale for EGFR inhibition in combination with ionizing radiation arises from published results of many radiobiological studies, which describe the role of EGFR in cytoprotective and pro-proliferative reactions of human tumor cells, induced by irradiation. These reactions result in accelerated tumor repopulation, which is subsequently counter-productive to the effect of radiotherapy. Presented article is an overview of EGFR and its function in healthy and tumor tissues; likewise, it describes the relation of EGFR to ionizing radiation; therapeutic approaches to EGFR function modulation in combination with radiotherapy in preclinical and clinical use.

Keywords: epidermal growth factor receptor, radiotherapy.

Úvod

Růstové faktory mají nezastupitelnou roli v regulaci buněčného cyklu a v udržování tkáňové homeostázy. Narušení exprese a aktivity receptorů pro růstové faktory může vést k alteraci proliferační rovnováhy s následnou iniciací nádorového růstu. V posledních letech se zjišťuje, že narušení exprese těchto receptorů může ovlivnit i citlivost nádorové tkáně k cytotoxické léčbě, zvláště pak k ionizujícímu záření [1,2]. Dominantní zájem v této oblasti vzbuzuje receptor pro epidermální růstový faktor, jehož nemalá úloha v mediaci nádorové radiorezistence předurčuje velkou snahu o inhibici jeho funkce za účelem zvýšení radiokurability nádorových onemocnění.

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR)

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR, HER1, erbB-1) je 170-kD vážící a 1186-aminokyselin dlouhý transmembránový glykoprotein. Jeho produkce je kódovaná genem EGFR1 na chromozomu 7. EGFR je jedním ze čtyř známých členů rodiny erbB tyrozinkinázových receptorů, do které řadíme také HER2 (erbB-2), HER3 (erbB-3) a HER4 (erbB-4). Tyto receptory se skládají z extracelulární domény sloužící pro vazbu ligandu, transmembránové lipofilní domény a intracelulární cytoplazmatické domény, která vykazuje tyrozinkinázovou aktivitu [3,4]. Přírodními aktivačními ligandy pro EGFR je zejména epidermální růstový faktor (EGF) a transformující růstový faktor alfa (TGF α), ale také am-

phiregulin, epiregulin, betacellulin, heparin-binding EGF (HB-EGF) a neuregulin G2-beta [5-8].

Po vazbě ligandu na receptor dojde k homodimerizaci dvou extracelulárních EGFR domén, nebo k heterodimerizaci domény EGFR s jiným z členů erbB rodiny. Poté dochází k internalizaci vzniklých dimerů a následná autofosforylace intracelulární C-terminální tyrozinkinázové domény vede k aktivaci cytoplasmatických transdukčních proteinových kaskád, jejichž prostřednictvím se informace přenesou až k buněčnému jádru [9-13]. Nejdůležitější signální cestou je Ras/Raf/MAPK, jejíž aktivace vede k zvýšení proliferační aktivity a akceleraci buněčné populace; dále pak signální cesta PI3K/Akt, jejíž aktivace má zejména cytoprotektivní antiapoptotický účinek. Další důležitou signální cestou je JAK/STAT, jejíž aktivace způsobuje zvýšenou expresi genů v rámci buněčné proliferace, a dále pak cesta PLC γ /PKC, která zodpovídá za zvýšení intracelulárního metabolismu vápníku. EGFR může být také translokován do jádra, kde působí jako transkripční faktor, koreluje s vysokou proliferační aktivitou [14-16].

Funkce EGFR

EGFR hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, buněčné proliferace, diferenciaci a buněčného přežívání epidermálních tkání. Aktivace receptoru a jemupřiléhajících nitrobuněčných systémů vede k nastartování proliferace tkání epidermálního původu. EGFR je klíčovým faktorem zachování normální funkce a reparace zdravých epidermálních tkání, ve kterých je jeho exprese přísně regulována. Aberantně zvýšená exprese EGFR pak může zahájit nekontrolovanou buněčnou proliferaci, jejíž výsledkem je vznik epitelálních prekanceróz až karcinomů.

Kromě podpory buněčné proliferace je EGFR zapojen do řady dalších buněčných procesů. Expese EGFR například zvyšuje motilitu nádorových buněk [17] a podmiňuje vznik velkých a rychle metastazujících nádorů [18]. Zvýšená invazivita a metastatický potenciál nádorových buněk koreluje s přítomností EGFR v experimentálních [19,20] i klinických [21] studiích. Několik studií prokázalo, že vazba EGF na receptor nádorových buněk vede k zablokování apoptózy po vystavení buněk smrtícím faktorům [22-27]. Tento proces je zejména důležitý v situacích, kdy je overexpese EGFR provázena zvýšenou produkcí jeho ligandů [28,29], výsledkem čehož je nastartování antiapoptotických mechanismů k zachování nádorové viability.

Nádorová exprese EGFR

Existuje několik mechanismů, jak dochází ke zvýšení aktivity EGFR u nádorových buněk. Hlavním je overexpese receptoru, která zvyšuje hustotu extracelulárních domén a usnadňuje tak jejich dimerizaci po aktivaci ligandem. Dalším mechanismem je nadměrná aktivace receptoru přirozeným ligandem při jeho zvýšené produkci, genová amplifikace EGFR1 (pravá či spojená s nadměrnou prezentací genu při polyzomii chromozomu 7), přítomnost aktivační mutace EGFR s neregulovanou signalizací receptoru, nebo ztráta negativních intracelulárních regulačních mechanismů.

Overexpese EGFR je považována za stěžejní mechanismus vzniku některých epitelálních nádorů a byla již popsána u karcinomu plic, prsu, žaludku, jícnu, prostaty, hlavy a krku, kolorekta, vaječníku, dělohy, děložního čípku, močového měchýře a multiformního glioblastomu [30-40]. Navzdory tomu, že můžeme expresi EGFR zachytit téměř u všech typů solidních nádorů, nelze zatím přesně určit jeho prognostickou hodnotu pro daný histologický typ onemocnění.

Výsledkem aktivace EGFR na povrchu nádorových buněk je progresse buněčného cyklu, urychlení buněčné proliferace, nádorového růstu, diferenciaci a angiogeneze, prodloužení buněčného přežívání inhibicí apoptózy a snížení senzitivity nádorových buněk k cytotoxické léčbě. Zvýšené expresi EGFR se připisuje korelace s vyšším stadiem onemocnění, zvýšenou agresivitou onemocnění, zhoršeným přežíváním, rozvojem vzdálených metastáz, horším stupněm nádorové diferenciaci a sníženou citlivostí k cytostatické léčbě a radioterapii [41-46]. Přesný mechanismus tohoto fenoménu však doposud není přesně definován, navíc existují další studie, ve kterých prognostický vliv overexpese EGFR prokázán nebyl [47-53].

EGFR a radioterapie

Co se týče vlivu EGFR na citlivost onemocnění k radioterapii, nepanuje zde jednotný konsensus. Výsledky některých studií připisují EGFR úlohu při stanovení prognózy onemocnění po prodělané radioterapii [45,46,54,55], jiné zase prediktivní roli léčebné odpovědi k radioterapii [56-58], další studie pak zkoumají možnosti funkční modulace aktivity EGFR ve snaze o zvýšení účinnosti radioterapie [59,60]. Signifikantní korelace mezi expresí EGFR, kratší dobou do rekurence onemocnění a zkrácením celkového přežití již byla zjištěna u karcinomu vaječníku, laryngu, prsu, nemalobuněčného karcinomu plic a u multiformního glioblastomu [41,61-64]. Nežádoucí dopad zvýšené exprese EGFR na lokální kontrolu onemocnění po frakcionované radioterapii je pak nejlépe doložen u nádorů, u kterých je radikální radioterapie užívaná jako jediná léčebná modalita, tj. u karcinomů děložního hrdla, hlavy a krku a u glioblastomů [41,46,55,65-69]. Přesto že se korelace mezi expresí EGFR a špatnou klinickou prognózou zdá být přesvědčivá, kauzalita a efekt tohoto vztahu zůstává nadále otázkou. Je pravděpodobné, že pouhá aritmetická kvantifikace EGFR není tolik důležitá, jako specifická závislost buněčné linie či nádorové tkáně na EGFR zprostředkované růstové aktivitě.

EGFR a radiorezistence

Jistou aritmetickou závislost radiorezistence na expresi EGFR naznačily výsledky *in vitro* studie, jejíž autoři nejprve provedli genovou transfekci EGFR do nádorových buněčných linií karcinomu vaječníku (OCA-I), které se jinak vyznačují velmi nízkou expresí EGFR, a následně pak metodou klonogenního přežívání měřili citlivost takto vzniklých buněčných linií k ionizujícímu záření. Výsledky jejich měření prokázaly 1.6x zvýšení radiorezistence u linií s vysokou expresí EGFR, 1.37x zvýšení radiorezistence u linií se středně vysokou expresí EGFR a konečně 1.28x zvýšení radiorezistence

u linií s nízkou expresí EGFR [70]. Tato studie navíc díky svému unikátnímu provedení prokázala, že i uměle navozená exprese EGFR zvyšuje rezistenci nádorových buněk k radioterapii. Stejní autoři poté vystavili transfekované linie OCA-I působení monoklonální protilátky proti EGFR (IMC-C225), což mělo za následek snížení exprese tohoto receptoru, snížení fosforylace jeho cytoplazmatických signálních cest (jako je Akt a MAPK) a zablokování dříve navozené rediorezistence. Tento experiment tak předkládá přímé důkazy o radiorezistenci podmíněné expresí EGFR a prokazuje možnost její inhibice prostřednictvím blokace receptorové aktivity.

EGFR a nádorová repopulace

Publikované radiobiologické studie shodně připisují EGFR kritickou úlohu ve zprostředkování cytoprotektivních a pro-proliferativních reakcí nádorových buněk po expozici ionizujícímu záření. Přesný mechanismus jak EGFR zprostředkovává rezistenci k radiační terapii je stále zkoumán. Jak *in vitro*, tak *in vivo* studie shodně popisují schopnost ionizujícího záření imitovat roli aktivačního ligandu EGFR. Bylo zjištěno, že klinicky významné dávky radioterapie v rozmezí 1 – 5 Gy dokáží v průběhu několika minut a bez rozdílu aktivovat všechny ErbB receptory exprimované nádorovou buněčnou populací. Aktivace EGFR je zde popisována několikanásobným nárůstem fosforylace tyrozinu, která není odlišitelná od aktivace příslušným růstovým faktorem [71-74]. Navíc opakovaná expozice nádorové tkáně radiační dávkou 2 Gy vede ke zvýšení buněčné exprese EGFR, která má za následek dávkově závislé zvýšení proliferace odpovědi nádoru jak po jednorázové, tak po opakované iradiaci [76,77].

Na základě těchto nálezů lze učinit závěr, že se radiací indukovaná exprese EGFR z velké části vztahuje právě k akcelerované nádorové repopulaci [9,10,78,79]. Zvýšení nádorové proliferace v průběhu radioterapie vede k zvýšené obnově nádorových klonogenních populací [78,80,81], čímž působí kontraproduktivně vůči samotné léčbě zářením [10]. Tvrzení, že aktivita EGFR významně přispívá k nádorové repopulaci se opírá také o *in vivo* studie, ve kterých byla prokázána závislost akcelerované repopulace nádorových tkání na hladině exprese EGFR [68,69,82,83]. Aktivace transdukčních kaskád závislých na EGFR v průběhu buněčné iradiace vede k aktivaci biosyntetických pochodů, které v případech úspěšné reparace radiací indukovaného poškození zapříčiní nádorovou proliferaci [9,76,84].

EGFR a reparace radiačního poškození DNA

Zvýšená biosyntetická aktivita rychle proliferujících buněk může současně zvyšovat kapacitu procesu reparace DNA. Vliv EGFR na zvýšení reparace radiací poškozené DNA potvrzuje pozorování, že během inhibice EGFR dochází taktéž ke snížení reparace DNA. Na buněčné linii SCC-13Y, která byla inkubována s IMC-C225 po dobu 8 hodin a více v intervalu mezi dvěmi frakcemi ozáření o dávce 3 Gy, byla nalezena redukovaná reparace subletálního poškození DNA oproti kontrolní linii bez inhibitorů EGFR, což platilo i pro reparaci potenciálně

letálního poškození DNA po iradiaci nádorových linií jednotlivou dávkou radioterapie [85]. Kritickou roli EGFR v procesu reparace DNA potvrzuje nález, že na každé úrovni cytoprotektivní signalizace závisí aktivace transdučních kaskád právě na aktivaci EGFR [84]. Role EGFR v iniciaci cytoprotektivní odpovědi lidských nádorových buněk po expozici ionizujícímu záření naznačuje, že funkční inhibice EGFR v průběhu radioterapie může této reakci předcházet, s výsledným zvýšením nádorové radiosenzitivity.

EGFR a angiogeneze

Některá publikovaná data podporují hypotézu, že exprese EGFR souvisí také s nádorovou angiogenezí. Důkazů pro toto tvrzení však není doposud mnoho. Experimentálně byla například prokázána inhibice angiogeneze po inkubaci nádorové tkáně s monoklonální protilátkou IMC-C225, která blokuje funkci EGFR [85]. V této studii byla po aplikaci inhibitoru EGFR zaznamenána redukce imunohistochemického záchytu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který je za nádorovou angiogenezi zodpovědný. Formace nových cév byla v této studii redukována zejména po současně aplikaci inhibitoru EGFR a ionizujícího záření, zatímco po aplikaci obou léčebných modalit samostatně byla signifikantně nižší. Další studie po podání cetuximabu zaznamenala u epidermoidních karcinomů nejen inhibici produkce VEGF a redukcí tvorby cévních struktur [86], ale také snížení exprese interleukinu 8 (IL-8) a růstového faktoru fibroblastů (FGF), za současné involuce již existujících cév [87]. Taktéž inkubace lidských endoteliálních buněk s inhibitorem tyrozinkinázy EGFR (ZD-1839) vedla *in vitro* k zastavení formování cévních tubulů a ke ztrátě spojení mezi jednotlivými buňkami [88]. Podobně byla prokázána redukce vaskularizace *in vivo* poté, co byla myším s lidskými nádorovými xenografty aplikována molekula ZD-1839 [88]. Antiangiogenní vlastnost inhibitorů EGFR a tedy i jejich schopnost navodit nádorovou hypoxii však může mít na výsledek radioterapie jak pozitivní tak i negativní dopad [89].

EGFR a frakcionace radioterapie

Klinická data naznačují, že vysoké hodnoty exprese EGFR mohou být asociovány s vyšším výskytem lokálních recidiv nádorů po frakcionované radioterapii. Zejména zmíněná frakcionace pak může v této problematice sehrát významnou roli. V Ericksonově studii, v rámci projektu DAHANCA 6 a 7, byla zkoumána prediktivní role exprese EGFR na léčebné výsledky radioterapie karcinomů hlavy a krku v závislosti na odlišné frakcionaci [56]. Výsledky prokázaly, že karcinomy s vysokou expresí EGFR odpovídají signifikantně lépe na akcelerovanou radioterapii než na standardní frakcionaci, zatímco u nádorů s nízkou expresí rozdíl v účinnosti signifikantní není. Tento poznatek naznačuje, že overexprese EGFR je s největší pravděpodobností spojena s rychlejší klonogenní repopulací nádoru, což nakonec potvrzují výsledky další studie [69]. Vysoká exprese EGFR v nádorové tkáni by tak mohla indikovat rapidní repopulaci nádorových buněk a selektovat tak pacienty, kteří by měli větší

přínos z akcelerované frakcionace. Jinými slovy lze říci, že zvýšená exprese EGFR snižuje účinnost radioterapie tím více, čím delší je celková doba léčby. Vliv exprese EGFR na klonogenní repopulaci nádoru během frakcionované radioterapie již byl prokázán také experimentálně *in vitro* a *in vivo* na myších xenograftech lidského dlaždicobuněčného karcinomu [90].

Bohužel zvýšená hladina exprese proteinu EGFR nemusí jistě znamenat skutečnou zvýšenou aktivitu receptoru v klonogenní repopulaci nádoru. Navíc výše zmíněná evidence jasně prokazuje, že exprese EGFR v nádorové tkáni v průběhu frakcionované radioterapie stoupá. Výchozí hodnota receptorové exprese tak zřejmě není dostačujícím parametrem pro volbu alternativní frakcionace radioterapie. Rozumnějším postupem než akcelerovat radioterapii by zřejmě bylo nalézt vhodný postup inhibice funkce EGFR v průběhu léčby.

Možnosti inhibice EGFR

Prvním autorem, který popsal inhibici buněčné proliferace *in vitro* po aplikaci monoklonálních protilátek proti EGFR, byl Schreiber et al. v roce 1981 [91]. Na jeho studii navázala řada dalších autorů s obdobnými výsledky [92-96]. Tyto *in vitro* experimenty se shodují s nálezy zpomaleného růstu nádorů po aplikaci inhibitorů EGFR *in vivo* [88,97-103]. V jedné studii byla po aplikaci monoklonální protilátky proti EGFR dokonce zaznamenána úplná eradikace nádorových buněk bez použití další cytotoxické terapie [104]. Z dosavadních znalostí o vlastnostech EGFR tak logicky vyplývá, že se stal nadějným terčem výzkumu cílené biologické terapie. Inhibice funkce EGFR by mohla poskytnout významný klinický přínos pro pacienty s různými typy nádorů exprimujících EGFR [34]. V průběhu komplexního procesu signalizace, od navázání ligandu na receptor až po aktivaci transdukčních cest a alteraci genové exprese v jádře, existuje mnoho příležitostí k cílené terapeutické intervenci (Tabulka č. 1).

Jednu strategii představují monoklonální protilátky namířené proti extracelulární receptorové doméně EGFR. Dvě takové protilátky (M225 a M528) prokázaly schopnost soutěžit s EGF při vazbě na receptor, inhibovat fosforylaci závislou na intracelulární tyrozin kináze a současně snižovat počet EGFR navozením jejich zvýšené internalizace. Vzniklý komplex protilátka-receptor je po internalizaci degradován. Dochází tak k inhibici signálních cest EGFR, což přispívá k trvalé blokádě jeho funkce [105]. Nadějným inhibitorem se stala zejména molekula M225 [106], která byla posléze chimerizována do konstantního regionu lidského IgG1, za vzniku chimérické monoklonální protilátky IMC-C225, známé jako „cetuximab“ (Erbix[®], ImClone Systems Incorporated, New York, USA). „Polidštěná“ IMC-C225 má vyšší vazebnou kapacitu na extracelulární doménu EGFR než M225 (tj. asi 5x vyšší afinitu k EGFR než jeho přirozené ligandy) a má také delší biologický poločas v séru [107,108]. V únoru 2004 byl cetuximab ve své první klinické indikaci schválen FDA k léčbě kolorektálních karcinomů rezistentních k léčbě irinotekanem. Do stejné skupiny humanizovaných monoklonálních inhibitorů EGFR patří „pani-

tumumab“ (Vectibix[®], ABX-EGF, Amgen Inc., Thousand Oaks, Kalifornie, USA); „matuzumab“ (EMD72000, Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA); a „nimituzumab“ (TheraCIM, YM Biosciences Inc., Mississauga, Ontario, Kanada), u kterého byla prokázána bezpečnost použití v monoterapii u pacientů s pokročilými karcinomy hlavy a krku v kombinaci s radioterapií [109,110].

Druhou možností inhibice aktivity EGFR představuje podání syntetických inhibitorů cytoplazmatické tyrozin kinázy (tyrosine kinase inhibitors, TKI). Jedná se o inhibitory o malé molekule, které soutěží s molekulou ATP (adenosin trifosfát) při vazbě na kinázovou doménu [111]. TKI jsou dosud neúspěšnějšími látkami používanými k zacílení EGFR a v současnosti rychle narůstá jejich počet v různé fázi klinického i preklinického vývoje (tabulka č.1). Klinické využití již našly perorální reverzibilní TKI „gefitinib“ (Iressa[®], ZD1839, Astra Zeneca, Macclesfield, Velká Británie), který byl FDA schválen pro monoterapii chemorezistentních nemalobuněčných karcinomů plic [112]; a „erlotinib“ (Tarceva[®], OSI-774, OSI Pharmaceuticals, Melville, New York, USA) s vysokou specificitou k EGFR [113], který našel uplatnění v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) a adenokarcinomu pankreatu.

Třetí možností inhibice EGFR je genová terapie vektorem nesoucím dominantně negativní mutantu tohoto receptoru. Tato metoda, popsaná v experimentech a zkoumaná v klinických studiích, užívá adenovirového vektoru s mutací označenou jako EGFR-CD553. Tato mutanta postrádá kompletní cytoplazmatickou doménu o 553 aminokyselinách a nepřevádí tudíž žádnou transformační nebo proliferativní aktivitu [114,115]. Vzniklé dominantně negativní EGFR uplatňují svou aktivitu také na proteinové úrovni, formováním nefunkčních receptorových komplexů s ostatními receptory z rodiny ErbB [71,74,114].

Jako doposud poslední popsanou možností inhibice EGFR je nádorová vakcína, zkoumaná zejména u NSCLC. Způsob vakcinace spočívá ve využití ligandu EGF napojeného na nosný protein tak, aby se zabránilo navázání ligandu na receptor díky indukci protilátek s aktivitou proti EGF. Kubánský výzkumný tým léčil přes 100 pacientů s pokročilým NSCLC, z nichž si více než 60% vytvořilo protilátky proti EGF. Pacienti s vysokým titrem protilátek vykazovali lepší přežití než jedinci s nízkým titrem. Na výsledky randomizované studie fáze II se ještě čeká [116,117].

Inhibice EGFR v radioterapii

Od cílené inhibice EGFR probíhající současně s radioterapií lze tedy očekávat synergický účinek [9,118]. Radioterapie navíc představuje klíčovou léčbu u mnoha epiteliálních nádorů. Modulace funkce EGFR jako strategie ovlivnění léčebného efektu radioterapie tak v současnosti nabývá na důležitosti [119]. Význam kombinace cílené biologické léčby a radioterapie navíc podporuje nezvratný fakt, že samotná biologická léčba u solidních nádorů obvykle nedokáže přinést definitivní kurativní efekt. Naopak samotná radioterapie sice představuje vysoce účinnou metodu k dosažení eradikace

klonogenních nádorových populací, avšak je známo, že rekurence nádoru často vzniká jen z jedné či několika málo přeživších klonogenních buněk [120,121]. Pokud by novodobá biologická léčba dokázala zničit byť jen omezený počet klonogenů, mohla by být její kombinace s radioterapií dostačující k signifikantnímu zvýšení lokální kontroly onemocnění. Ke stejnému výsledku by mohl vést i samotný senzitivizační efekt biologické léčby k radioterapii.

Monoklonální protilátky

Jako první byla v průběhu radioterapie zkoumána inhibice EGFR na receptorové úrovni. Autoři studie, která zkoumala lokální iradiaci lidských nádorových xenograftů (A431) implantovaných do myši za současné aplikace IMC-C225, popsali 1.6x násobné zvýšení radiosenzitivity po aplikaci jedné dávky IMC-C225 a 3.6x násobné zvýšení radiosenzitivity po aplikaci tří dávek této protilátky s časovým odstupem [122]. Aplikace IMC-C225 záhy po iradiaci zlepšila lokální kontrolu nádoru také v další studii u nádorové linie FaDu [123] a dále také ve studii u nádorové linie A431 [124]. Zatímco linie A431 vykazuje vysokou overexpresi EGFR [125] a značnou závislost postradiačního antiproliferativního účinku na počtu aplikací IMC-C225 [123], u FaDu linie je tento efekt vyjádřen v mnohem menší míře [124]. Další autoři současně publikovali preklinické studie, potvrzující signifikantní zvýšení klinického účinku kombinace radioterapie a IMC-C225 u širokého spektra epiteliálních lidských nádorových xenograftů [85,94-96,126-128]. Zajímavé je zjištění, že interakce mezi IMC-C225 a iradiací je významnější v *in vivo* studiích, než bylo předpokládáno z výsledků *in vitro* testů. *In vivo* tak nejspíše sehrávají roli i jiné faktory než pouhá inhibice proliferativního růstu [118,124]. Mezi tyto faktory nejspíše patří IMC-C225 indukovaná inhibice reparace poškozené DNA, zvýšení radiosenzitivity vyplývající ze specifického narušení distribuce fází buněčného cyklu, posílení radiací indukované apoptózy, inhibice angiogeneze, nebo snížení migrační a invazivní kapacity nádoru [129]. Během výzkumu se ukázalo, že EGFR ovlivňuje molekulu DNA-dependentní proteinkinázy (DNA-PK) [130], a že léčba IMC-C225 může zapříčinit redistribuci DNA-PK z jádra do cytosolu, což má za následek snížení reparace poškozené DNA [85]. Navíc aplikace IMC-C225 signifikantně snižuje tvorbu nových cév v místě inokulace nádorových buněk linie A431, což svědčí o jejím přímém inhibičním vlivu na nádorovou angiogenezi, nejspíše na podkladě inhibice mRNA a proteosyntézy angiogenních faktorů [87,122]. Mechanismus jakým IMC-C225 funguje na molekulární úrovni není doposud zcela znám.

Inhibitory tyrozinkinázy

V kombinaci s radioterapií byly zkoumány také nízko-molekulární inhibitory cytoplasmatické tyrosinkinázy EGFR, nejvíce pak molekuly ZD-1839, OSI-774 a CI-1033. Stejně jako u IMC-C225 existují preklinická data o zvýšení radiosenzitivity v *in vitro* a *in vivo* studiích také pro ZD-1839 a CI-1033 [88,131-134]. ZD-1839 je perorálně dostupný inhibitor EGFR, jehož schopnost zvýšit cytotoxicitu ionizujícího záření již byla prokázána

u širokého spektra nádorů, včetně karcinomu plic, pankreatu, tračnicku, glioblastomu a karcinomu hlavy a krku [133,135-137]. U myších xenograftů lidského karcinomu tračnicku přinesla kombinace ZD-1839 a radioterapie 1.6x vyšší účinnost léčby než u radioterapie samotné [133,138]. Kombinace ZD-1839 a radioterapie navíc prokázala synergistický účinek na inhibici buněčného růstu u lidských dlaždicobuněčných karcinomů [88]. CI-1033 inhibuje tyrozinkinázovou aktivitu všech čtyř členů rodiny ErbB receptorů. Preklinické studie u ErbB overexprimujících karcinomů prsu prokázaly supraaditivní efekt kombinace CI-1033 s fracionovanou radioterapií [132].

Genová terapie

Třetím zkoušeným postupem inhibice aktivity EGFR je modifikace genomu nádorových buněk za použití vektoru dominantně negativního EGFR, který je zprostředkován adenovirovým genovým transferem. Overexprese geneticky upravené molekuly EGFR-CD533 narušuje funkci celého systému ErbB tyrozinkináz skrze proteinové interakce, čímž je schopna funkční inhibice radiací aktivované ErbB signalizace [71,74,76]. Tento mechanismus genové terapie prokazatelně zvyšuje radiosenzitivitu u různých typů lidských nádorů, nezávisle na značné odlišnosti exprese EGFR a jiných ErbB receptorů [74]. Navíc bylo *in vitro* prokázáno, že užití EGFR-CD533 blokuje radiací indukovanou signalizaci a snižuje přežívání klonogenních nádorových buněk u xenograftů lidského karcinomu prsu (MDA-MB-231). Transdukcí nádorů cestou EGFR-CD533 přináší 1.85x zvýšenou radiosenzitivitu ve srovnání s kontrolními nádory. Zajímavé je, že toto zvýšení cytotoxicity ionizujícího záření vykazují zejména nádory s nízkou počáteční expresí EGFR. Navzdory prokazatelnému přínosu EGFR-CD533 naráží tato léčba na úskalí techniky genové terapie, zejména na nízkou úspěšnost infekce vektorovým přenašečem.

Rozporuplnost výsledků jednotlivých studií

Přežívání klonogenních nádorových buněk po inkubaci s různými inhibitory EGFR však ne vždy vykazuje jednotné výsledky. Radiosenzitivizační efekt inhibitoru ZD-1839 byl prokázán u nádorových linií HSC2 a HSC3 [98] a dále u linií SCC-1 a SCC-6 [88]. Radiosenzitivizační efekt protilátky C225 byl prokázán také u linie SCC-13Y [95]. Oproti tomu byla popsána minimální změna radiosenzitivity u linie FaDu při inkubaci s inhibitorem tyrozinkinázy BIBX1382BS [97], nebo u linie A431 po inkubaci s IMC-C225 [94] a ZD-1839 [139]. Část těchto diskrepancí může být způsobena odlišnými experimentálními podmínkami, například rozdílnou koncentrací inhibitorů během inkubace, rozdílnou inkubační dobou, nebo odlišným časem ukončení celého experimentu, ve kterém byla antiproliferační aktivita zkoumaných látek vyhodnocena. Navíc existuje jistá heterogenita účinku inhibitorů EGFR mezi jednotlivými typy nádorů [60]. Dalším významným faktorem, který ovlivňuje rozdílný účinek inhibitorů EGFR na různé nádorové linie, je přítomnost specifických mutací EGFR [140,141]. Rozdílné nálezy jednotlivých experimentů tedy nejsou v kontextu radioterapie rozhodujícím elementem. Navíc ne

všechny studie používají stejné metody pro hodnocení radiosenzitivity nádorových buněk.

Metody stanovení radiosenzitivity nádorových buněk
Cílem kurativní radioterapie je především inaktivace a zničení všech klonogenních nádorových buněk. Nejlepší metodou preklinických experimentů v radioterapii je proto stanovení frekvence lokální kontroly nádoru (např. TCD₅₀), která měří přežívání klonogenních nádorových buněk *in vivo*. Metody sledující zmenšení či růst nádoru, které jsou také v preklinických experimentech často užívány, jsou dostačující pro odhad přínosu nových postupů v paliativní radioterapii, nicméně vzhledem k poznatku že klonogenní buňky v samotném nádoru tvoří jen velmi malou frakci ve srovnání s buňkami neklonogenními, jsou tyto metody v rozvoji kurativní radioterapie nevýznamné [59,142]. Metody sledující oddálení nádorového růstu mohou přinést stejně významné výsledky jako metody měřící TCD₅₀, ale stejně jako u TCD₅₀ musí mít tyto studie přesně definované podmínky, rozsáhlou kohortu experimentů, musí sledovat různé hladiny měřených dávek záření a musí počítat s korekcí rozdílů nádorového růstu v různých pokusných skupinách [143].

Klinický přínos inhibice EGFR v radioterapii

Doposud prezentované preklinické poznatky prokazují racionalitu inhibice EGFR v radioterapii, avšak pouze klinická data mohou prokázat její nezvratný léčebný prospěch.

První klinické studie sledující interakci modulátorů EGFR s radioterapií se začaly objevovat teprve v posledních letech. U mnoha molekul, včetně IMC-C225 a ZD-1839, již byla prokázána dobrá tolerance při kombi-

naci s radioterapií nebo chemoradioterapií [144] a slibné výsledky této léčby již byly publikována pro karcinomy hlavy a krku a pro NSCLC [145,146].

Prozatím nejvýznamnější a nejslibnější výsledky přinesla mezinárodní randomizovaná studie srovnávající samostatnou radioterapii a radioterapii v kombinaci s týdenní aplikací cetuximabu v radikální léčbě lokálně pokročilých dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku [147]. Do obou ramen bylo zařazeno více než 200 pacientů a u obou skupin byla hodnocena celkově dobrá tolerance léčby. U nemocných s kombinovanou léčbou bylo prokázáno jak signifikantní prodloužení trvání lokoregionální kontroly onemocnění, tak i signifikantní prodloužení celkového přežití. Přidáním cetuximabu bylo dosaženo snížení rizika progresse onemocnění a smrti až o 30%. Až na akneiformní kožní vyrážku, která je při léčbě cetuximabem častější, nebyl mezi skupinami nalezen žádný signifikantní rozdíl v akutní toxicitě. Tato studie představuje určitý milník v léčebné kombinaci radioterapie a biologické léčby.

Ve strategické léčbě inhibitory EGFR zůstává přes veškerý vývoj řada nezodpovězených otázek. Neví se například, zda tato léčba působí pouze na nádory nadměrně exprimující EGFR; navíc doposud neznáme nejlepší metodu ani vhodný systém hodnocení exprese tohoto receptoru. Také není jasné, zda je zapotřebí kompletní inaktivace EGFR ke zprostředkování maximální radiosenzibilizace nádoru, či zda zde hrají roli interakce EGFR z jinými z členů ErbB receptorové rodiny. Nadále také zůstává otázkou optimální dávkování modulátorů EGFR v kombinaci s frakcionovanou radioterapií, aby bylo dosaženo maximálního synergického účinku.

Literatura

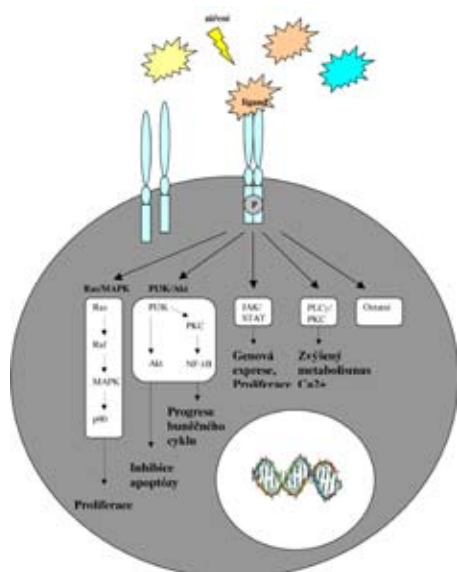
- Kasid U, Pirolo K, Dritschilo A, et al. Oncogenic basis of radiation resistance. *Adv Cancer Res* 1993;61:195-233.
- Haimovitz-Friedman A. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res* 1998;150:S102-S108.
- Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 1987;56:881-914.
- Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37(Suppl 4):S3-S8.
- Watanabe T, Shintani A, Nakata M, et al. Recombinant human betacellulin. Molecular structure, biological activities, and receptor interaction. *J Biol Chem* 1994;269:9966-9973.
- Chrysogelos SA, Dickson RB. EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. *Breast Cance Res Treat* 1994;29:29-40.
- Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Morimoto S. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 1997;326:69-75.
- Wells A. EGF receptor. *Int J Bioch Cell Biol* 1999;31:637-643.
- Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, et al. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 2000;153:245-257.
- Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Dent P, et al. Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. *Radiat Oncol Investig* 1999;7:321-330.
- Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.
- Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 2003;284:78-88.
- Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:21-26.
- Lin SY, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:802-808.
- Waugh MG, Hsuan JJ. EGF receptors as transcription factors: ridiculous or sublime?. *Nat Cell Biol* 2001;3:E209-E211.
- Oksvold MP, Huitfeldt HS, Stang E, Madhus I. Localizing the EGF receptor. *Nat Cell Biol* 2002;4:22.
- Verbeek BS, Andriaansen-Slot SS, Vroom TM, et al. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* 1998;425:145-150.
- Turner T, Chen P, Goodly LJ, Wells A. EGF receptor signaling enhances *in vivo* invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:409-418.
- Damstrup L, Rude Voldberg B, Spang-Thomsen M, et al. *In vitro* invasion of small-cell lung cancer cell lines correlates with expression of epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 1998;78:631-640.
- Xie H, Turner T, Wang MH, et al. *In vitro* invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells is modulated by EGF receptor-mediated signals. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:407-419.
- Prakash I, Mathur RP, Kar P, et al. Comparative evaluation of cell proliferative indices and epidermal growth factor receptor expression in gastric carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 1997;40:481-490.
- Gibson S, Tu S, Oyer R, et al. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J Biol Chem* 1999;274:17612-17618.
- Leu CM, Chang C, Hu C. Epidermal growth factor (EGF) suppresses

- staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 2000;19:1665-1675.
24. Payne SG, Brindley DN, Guilbert LJ. Epidermal growth factor inhibits ceramide-induced apoptosis and lowers ceramide levels in primary placental trophoblasts. *J Cell Physiol* 1999;180:263-270.
 25. McClellan M, Kievit P, Auersperg N, et al. Regulation of proliferation and apoptosis by epidermal growth factor and protein kinase C in human ovarian surface epithelial cells. *Exp Cell Res* 1999;246:471-479.
 26. Lan L, Wong NS. Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C are required for the inhibition of caspase activity by epidermal growth factor. *FEBS Lett* 1999;444:90-96.
 27. Caraglia M, Abbruzzese A, Leardi A, et al. Interferon-alpha induces apoptosis in human KB cells through a stress-dependent mitogen activated protein kinase pathway that is antagonized by epidermal growth factor. *Cell Death Differ* 1999;6:773-780.
 28. Di Marco M, Pierce JH, Fleming TP, et al. Autocrine interaction between TGF-alpha and the EGF receptor: Quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 1992;4:831-838.
 29. Morishige K, Kurachi H, Amemiya K. Evidence for the involvement of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor autocrine growth mechanism in primary human ovarian cancers in vitro. *Cancer Res* 1991;51:5322-5328.
 30. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183-232.
 31. Hu G, Liu W, Mendelsohn J, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and human papillomavirus E6/E7 proteins in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1271-1276.
 32. Walker RA, Dearing SJ. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:167-176.
 33. Ekstrand AJ, James CD, Cavanaugh WK, et al. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 1991;51:2164-2172.
 34. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;19:6550-6565.
 35. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37 (Suppl 4):S9-S15.
 36. Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 2002;94:1593-1611.
 37. Arteaga CL. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.
 38. Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, et al. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996;78:1284-1292.
 39. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001;92:1331-1346.
 40. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res* 1997;3:515-522.
 41. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:1253-1257.
 42. Wells A. Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 2000;78:31-101.
 43. Dickstein BM, Wosikowski K, Bates SE. Increased resistance to cytotoxic agents in ZR75B human breast cancer cells transfected with epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1995;110:205-211.
 44. Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824-832.
 45. Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D, Brankovic-Magic M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer, from early stages to advanced disease. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:347-355.
 46. Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:7350-7356.
 47. McKay JA, Murray LJ, Curran S, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002;38:2258-2264.
 48. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003;21:3798-3807.
 49. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005;16:102-108.
 50. Meert AP, Martin B, Delmotte P, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J* 2002;20:975-981.
 51. Lee JC, Wang ST, Chow NH, et al. Investigation of the prognostic value of coexpressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Cancer* 2002;38:1065-1071.
 52. Leong JL, Loh KS, Putti TC, et al. Epidermal growth factor receptor in undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Laryngoscope* 2004;114:153-157.
 53. Leung TW, Cheung AN, Cheng DK, et al. Expressions of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor and pan-ras proto-oncogenes in adenocarcinoma of the cervix: correlation with clinical prognosis. *Oncol Rep* 2001;8:1159-1164.
 54. Giral J, de las Heras M, Cerezo L, et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005;74:101-108.
 55. Demiral AN, Sarioglu S, Birlik B, et al. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004;31:417-424.
 56. Eriksen JG, Steiniche T, Overgaard J. The influence of epidermal growth factor receptor and tumor differentiation on the response to accelerated radiotherapy of squamous cell carcinomas of the head and neck in the randomized DAHANCA 6 and 7 study. *Radiother Oncol* 2005;74:93-100.
 57. Barker FG, Simmons ML, Chang SM, et al. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:410-418.
 58. Giral J, Eraso A, Armengol M, et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1460-1465.
 59. Krause M, Joiner MC, Baumann M. Ultrafractionation in human malignant glioma xenografts. *Int J Cancer* 2003;107:333.
 60. Toulany M, Dittmann K, Baumann M, Rodemann HP. Inhibition of AKT/protein kinase b but not mitogen activated protein kinase/ERK modulates radiation response by EGFR antagonist. *Radiother Oncol* 2003;67:S20.
 61. Fisher-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, et al. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Aticancer Res* 1997;17:613-619.
 62. Klijn JG, Look MP, Portengen H, et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:73-83.
 63. Selvaggi G, Novello S, Torri V, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:28-32.
 64. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 2003;63:6962-6970.
 65. Zhu A, Shaeffer J, Kolm P, El-Mahdi AM. Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *Int J Radiat Oncol Phys* 1996;34:809-815.
 66. Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK. Tumour-proliferative fraction

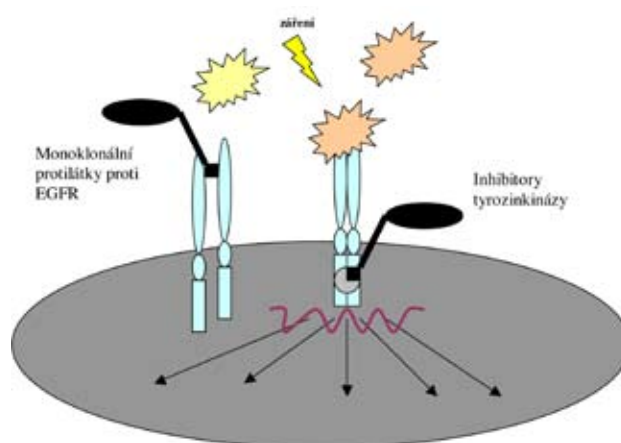
- and growth factor expression as markers of tumour response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124:456-461.
67. Chua DT, Nicholls JM, Sham JS, Au GK. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:11-20.
 68. Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J, et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:561-566.
 69. Atasoy BM, Bentzen SM, Trott KR. The epidermal growth factor receptor is involved in accelerated repopulation in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Exp Strahlenther Klin Strahlenbiol* 2004;13:39-41.
 70. Liu TF, Tatter SB, Willingham MC, et al. Growth factor receptor expression varies among high-grade gliomas and normal brain: epidermal growth factor receptor has excellent properties for interstitial fusion protein therapy. *Mol Cancer Ther* 2003;2:783-787.
 71. Bowers G, Reardon D, Hewitt T, et al. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:1388-1397.
 72. Contessa JN, Reardon DB, Todd D, et al. The inducible expression of dominant-negative epidermal growth factor receptor-CD533 results in radiosensitization of human mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:405-411.
 73. Reardon DB, Contessa JN, Mikkelsen RB, et al. Dominant negative EGFR-CD533 and inhibition of MAPK modify JNK1 activation and enhance radiation toxicity of human mammary carcinoma cells. *Oncogene* 1999;18:4756-4766.
 74. Lammering G, Lin PS, Contessa JN, et al. Adenovirus-mediated overexpression of dominant negative epidermal growth factor receptor-CD533 as a gene therapeutic approach radiosensitizes human carcinoma and malignant glioma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:775-784.
 75. Berkovcová J, Hajdúch M, Dziechciarková M, et al. Predikce účinnosti tyrozinkinázových inhibitorů Egrf1 v léčbě nemalobuněčných plicních karcinomů. *Klinická Onkologie* 2006;19:171-176.
 76. Contessa JN, Hampton J, Lammering G, et al. Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21:4032-4041.
 77. Kavanagh BD, Lin PS, Chen P, Schmidt-Ullrich RK. Radiation-induced enhanced proliferation of human squamous cancer cells in vitro: a release from inhibition by epidermal growth factor. *Clin Cancer Res* 1995;1:1557-1562.
 78. Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 1988;27:131-146.
 79. Baumann M, Petersen C, Eicheler W, et al. Mechanisms of repopulation in experimental squamous cell carcinoma. In: Kogelnik HD, Lukas P, Sedlmayer F. *Progress in radiation-oncology*, vol. 7. Bologna, Monduzzi; 2002, p.417-422.
 80. Begg AC. Prediction of repopulation rates and radiosensitivity in human tumours. *Int J Radiat Biol* 1994;65:103-108.
 81. Fowler JF. Rapid repopulation in radiotherapy: a debate on mechanism. The phantom of tumor treatment--continually rapid proliferation unmasked. *Radiother Oncol* 1991;22:156-158.
 82. Milas L, Akimoto T, Hunter NR, et al. Relationship between cyclin D1 expression and poor radioresponse of murine carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:514-521.
 83. Milas L, Yamada S, Hunter N, et al. Changes in TCD50 as a measure of clonogen doubling time in irradiated and unirradiated tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21:1195-1202.
 84. Amorino GP, Hamilton VM, Valerie K, et al. Epidermal growth factor receptor dependence of radiation-induced transcription factor activation in human breast carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:2233-2244.
 85. Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:2166-2174.
 86. Vilorio-Petit A, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997;151:1523-1530.
 87. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999;5:257-265.
 88. Huang SM, Li J, Armstrong EA, Harari PM. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res* 2002;62:4300-4306.
 89. Zips D, Baumann M. Anti-VEGF strategies in combination with radiotherapy. In: Nieder C, Milas L, Ang K. *Modification of radiation response*, Berlin, Springer; 2003, p.179-188.
 90. Petersen C, Eicheler W, Frommel A, et al. Proliferation and micro-milieu during fractionated irradiation of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *Int J Radiat Biol* 2003;79:469-477.
 91. Schreiber AB, Lax I, Yarden Y, et al. Monoclonal antibodies against receptor for epidermal growth factor induce early and delayed effects of epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7535-7539.
 92. Masui H, Kawamoto T, Sato JD, et al. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984;44:1002-1007.
 93. Modjahedi H, Affleck K, Stubberfield C, Dean C. EGFR blockade by tyrosine kinase inhibitor or monoclonal antibody inhibits growth, directs terminal differentiation and induces apoptosis in the human squamous cell carcinoma HN5. *Int J Oncol* 1998;13:335-342.
 94. Saleh MN, Raisch KP, Stackhouse MA, et al. Combined modality therapy of A431 human epidermoid cancer using anti-EGFR antibody C225 and radiation. *Cancer Biother Radiopharm* 1999;14:451-463.
 95. Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* 1999;17:259-269.
 96. Bianco C, Torota G, Bianco R, et al. Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with selective epidermal growth factor receptor - tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin Cancer Res* 2002;8:3250-3258.
 97. Baumann M, Krause M, Zips D, et al. Selective inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by BIBX1382BS and the improvement of growth delay, but not local control, after fractionated irradiation in human FaDu squamous cell carcinoma in the nude mouse. *Int J Radiat Biol* 2003;79:547-559.
 98. Shintani S, Li C, Mihara M, et al. Enhancement of tumor radioreponse by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer. *Int J Cancer* 2003;107:1030-1037.
 99. Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, et al. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2000;6:4885-4892.
 100. Prewett M, Rothman M, Waksal H, et al. Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1998;4:2957-2966.
 101. Overholser JP, Prewett MC, Hooper AT, et al. Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer* 2000;89:74-82.
 102. Gutowski MC, Briggs SL, Johnson DA. Epidermal growth factor receptor-reactive monoclonal antibodies: xenograft antitumor activity alone and as drug immunoconjugates. *Cancer Res* 1991;51:5471-5475.
 103. Aboud-Pirak E, Hurwitz E, Pirak ME, et al. Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice. *J Nat Cancer Inst* 1988;80:1605-1611.
 104. Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, et al. Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res* 1999;59:1236-1243.
 105. Thomas SM, Grandis JR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. *Cancer Treat Rev* 2004;30:255-268.

106. Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 1997;3:2703-2707.
107. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1:1311-1318.
108. Bos M, Mendelsohn J, Bowden C et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) chimeric monoclonal antibody C225 in patients with EGFR overexpressing tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996;15:443a.
109. Brade AM, Magalhaes J, Siu L, et al. A single agent, phase I pharmacodynamic study of nimotuzumab (TheraCIM-h-R3) in patients with advanced refractory solid tumors [abstrakt]. *J Clin Oncol* 2007;25: abstrakt 14030.
110. Crombet T, Osorio M, Cruz T, et al. Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. *J Clin Oncol* 2004;22:1646-1654.
111. Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, et al. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* 1994;265:1093-1095.
112. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* 2004;10:1212-1218.
113. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999;82:241-250.
114. Kashles O, Yarden Y, Fischer R, et al. A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Mol Cell Biol* 1991;11:1454-1463.
115. Redemann N, Holzmann B, von Rüden T, et al. Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Mol Cell Biol* 1992;12:491-498.
116. Gonzales G, Crombet T, Torres T, et al. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Ann Oncol* 2003;14:461-466.
117. Garcia B, Neninger E, de la Torre A, et al. Effective inhibition of the epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor binding by anti-epidermal growth factor antibodies is related to better survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with the epidermal growth factor cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 2008;14:840-846.
118. Harari PM, Huang SM. Radiation response modification following molecular inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Semin Radiat Oncol* 2001;11:281-289.
119. Lammering G. Molecular predictor and promising target: will EGFR become a star in radiotherapy? *Radiother Oncol* 2005;74:89-91.
120. Baumann M, Dubois W, Suit HD. Response of human squamous cell carcinoma xenografts of different sizes to irradiation: relationship of clonogenic cells, cellular radiation sensitivity in vivo, and tumor rescuing units. *Radiat Res* 1990;123:325-330.
121. Steel GG. Cell survival as a determinant of tumor response. In: Steel GG. *Basic clinical radiobiology*, 3rd ed. London, Arnold; 2002, p. 52-63.
122. Milas L, Mason K, Hunter N, et al. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 2000;6:701-708.
123. Baumann M, Krause M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiother Oncol* 2004;72:257-266.
124. Nasu S, Ang KK, Fan Z, et al. C225 antiepidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiocurability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:474-477.
125. Wrann MM, Fox CF. Identification of epidermal growth factor receptors in a hyperproducing human epidermoid carcinoma cell line. *J Biol Chem* 1979;254:8083-8086.
126. Balaban N, Moni J, Shannon M, et al. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:147-156.
127. Buchsbaum DJ, Bonner JA, Grizzle WE, et al. Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine, and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1180-1193.
128. Raben D, Buchsbaum DJ, Gillespie Y. Treatment of human intracranial gliomas with chimeric monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor increases survival of nude mice when treated concurrently with irradiation. *Proc Am Assoc Cancer* 1999;40:A1224.
129. Harari PM, Huang SM. Epidermal growth factor receptor modulation of radiation response: preclinical and clinical development. *Semin Radiat Oncol* 2002;12:21-26.
130. Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, et al. Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998;273:1568-1573.
131. Raben D, Helfrich D, Chan D, et al. The effects of ZD1839 on cell signaling processes and its growth effects with radiation and chemotherapy in human non-small cell lung cancer cells in vitro. *Clin Cancer Res* 2001;7:3805s.
132. Rao GS, Murray S, Ethier SP. Radiosensitization of human breast cancer cells by a novel ErbB family receptor tyrosine kinase inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1519-1528.
133. Williams KJ, Telfer BA, Stratford IJ, Wedge SR. ZD1839 ("Iressa"), a specific oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, potentiates radiotherapy in a human colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer* 2002;86:1157-1161.
134. She Y, Lee F, Chen J, et al. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 selectively potentiates radiation response of human tumors in nude mice, with a marked improvement in therapeutic index. *Clin Cancer Res* 2003;9:3773-3778.
135. Raben D, Bianco C, Milas L, Ang KK. Targeted therapies and radiation for the treatment of head and neck cancer: are we making progress? *Semin Radiat Oncol* 2004;14:139-152.
136. Stea B, Falsey RR, Carey SS, Martinez JD. Growth inhibition and radiosensitization of glioblastoma multiforme by the tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002;43:787.
137. Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett M, et al. Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by ZD1839 ("Iressa") in vitro and in vivo in A431 cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002;43:1002.
138. Williams KJ, Telfer BA, Stratford IJ, Wedge SR. ZD1839 ("Iressa"), a specific oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, potentiates radiotherapy in a human colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer* 2002;86:1157-1161.
139. Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett M, et al. EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:713-723.
140. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
141. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-2139.
142. Krause M, Baumann M, Thames HD. In regard to Solomon et al.: EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. *IJROBP* 2003;55:713-723. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:300-301.
143. Kallman RF, editor. *Rodent tumor models in experimental cancer therapy*. New York, Pergamon; 1987, 310 pp.
144. Cohen RB, Falsey JW, Paulter VJ et al. Safety profile of the monoclonal antibody (MOAB) IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) used in the treatment of EGFR-positive tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:A1862.
145. Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, et al. Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3234-3243.
146. Vokes EE, Choy H. Targeted therapies for stage III non-small cell lung cancer: integration in the combined modality setting. *Lung Cancer* 2003;41:S115-S121.
147. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354:567-578.

přehled



Obrázek č.1.: Schématické znázornění aktivace EGFR ligandem nebo ionizujícím zářením; následné homodimerizace receptorů; fosforylace tyrozinkinázy a aktivace signálních cest směrem k jádru.



Obrázek č.2.: Schématické znázornění možností inhibice EGFR.

Tabulka č.1. Možnosti inhibice EGFR ve vývoji a v praxi		
Název látky	Cíl	Stádium vývoje
protilátky proti EGFR		
cetuximab (IMC-C225)	EGFR	v klinické praxi
panitumumab (ABX-EGF)	EGFR	fáze I/II
matuzumab (EMD72000)	EGFR	fáze I
nimotuzumab (TheraCIM)	EGFR	fáze I
inhibitory tyrozinkinázy		
erlotinib (OSI-774)	EGFR	v klinické praxi
gefitinib (ZD1839)	EGFR	v klinické praxi
EKB-569	EGFR	fáze I
CL-3877785	EGFR	preklinické
HKI-272	EGFR, HER2	fáze I
BIBW-2992	EGFR, HER2	fáze I
PKI-166	EGFR, HER2	fáze I
lapatinib (GW-572016)	EGFR, HER2	fáze II
CI-1033	EGFR, HER2, HER4	fáze II
PF-00299804	EGFR, HER2, HER4	fáze I
vandetanib (ZD6474)	EGFR, VEGF, RET	fáze II
XL647	EGFR, HER2, VEGF	fáze II
AEE788	EGFR, HER2, VEGF	fáze I
dominantně negativní mutanty		
EGFR-CD533	EGFR	fáze I/II
vakcína proti EGF	EGFR	fáze I/II

Tabulka č.1.: Možnosti inhibice EGFR ve vývoji a v praxi.

Korespondenční adresa:
 Sirák Igor, Klinika onkologie a radioterapie,
 Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Sokolská 581,
 500 05, Hradec Králové,
 email. sirak@fnhk.cz, tel. 495 832 176

Došlo / Submitted: 20. 8. 2008
 Přijato / Accepted: 7. 9. 2008

Auři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
 The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
 The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.