

## PREDIKCE ÚČINNOSTI TYROZINKINÁZOVÝCH INHIBITORŮ EGFR1 V LÉČBĚ NEMALOBUNĚČNÝCH PLICNÍCH KARCINOMŮ.

## PREDICTION OF RESPONSE IN NON-SMALL CELL LUNG CANCERS TREATED WITH EGFR1 TYROSINE KINASE INHIBITORS.

BERKOVCOVÁ J.<sup>1#</sup>, HAJDŮCH M.<sup>1\*#</sup>, DZIECHCIARKOVÁ M.<sup>1</sup>, TROJANEC R.<sup>1</sup>, JANOŠTÁKOVÁ A.<sup>1</sup>, WIECEK S.<sup>1</sup>, GRYGÁRKOVÁ I.<sup>2</sup>, KOLEK V.<sup>2</sup>, VORLÍČEK J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, DĚTSKÁ A ONKOLOGICKÁ KLINIKA LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY PALACKÉHO A FN V OLOMOUCI

<sup>2</sup> KLINIKA PLICNÍCH NEMOCÍ A TUBERKULÓZY, LF UNIVERZITY PALACKÉHO A FN V OLOMOUCI

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

# OBA AUTOŘI SE NA PRÁCI PODÍLELI STEJNOU MÍROU

### Souhrn

Plicní nádory jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí na maligní onemocnění. Standardní terapie nemalobuněčných plicních karcinomů (NSCLC) využívá běžných platinových derivátů v kombinaci s dalšími cytostatiky. Nové možnosti pacientům nabízí léčba s použitím nízkomolekulárních inhibitorů hyperaktivovaného tyrozinkinázového receptoru pro epidermální růstový faktor (Egfr1). Ke zvýšené aktivaci Egfr1 dochází patologickým nárůstem exprese *egfr1*, na které se podílí amplifikace genu *egfr1* v genomu nádorové buňky. Rovněž aktivující jsou mutace tyrozinkinázové domény *egfr1* (exon 18 - 21), které zapříčiňují spuštění signální transdukce bez vazby ligandu k vazebné doméně receptoru. Při volbě vhodné terapie napomáhají vyšetření Egfr1 na molekulární úrovni. Zatím nevyřešeným problémem však zůstává otázka častých rezistencí k tomuto druhu cílené léčby. Jedná se o nedostatečnou primární odpověď na působení inhibitorů (např. při mutaci genu *k-ras*). Rezistence se však může rozvinout i díky přidruženým genetickým změnám v průběhu úspěšné terapie.

**Klíčová slova:** EGFR1, bodové mutace, nízkomolekulární inhibitory tyrozinkináz, gefitinib, erlotinib, nemalobuněčné plicní karcinomy, *k-ras*

### Summary

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide. Standard therapy of non-small cell lung cancer (NSCLC) includes platinum-based chemotherapy in combination with other anticancer drugs. Novel effective agents recently introduced into clinics are small molecule tyrosine kinase inhibitors of the epidermal growth factor receptor (Egfr1). Egfr1 is frequently constitutively activated in majority of human cancers. Up-regulation of the Egfr1 signaling is associated with overexpression of *egfr1*, which may be due to amplification of *egfr1* gene in the tumors cells. Likewise, somatic mutations in the kinase domain of *egfr1* (exons 18-21) result in ligand-independent transduction, particularly in NSCLCs. Molecular analysis of Egfr1 status is useful indicator for prediction of tumor sensitivity or resistance to Egfr1 tailored therapy. The limitations of the targeted therapy are the intrinsic resistance (frequently due to *k-ras* mutations) and induction of drug resistance during therapy associated with secondary (epi)genetic alterations.

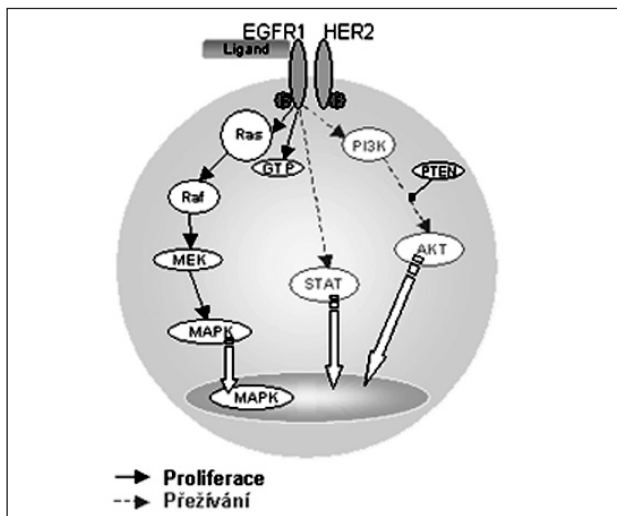
**Key words:** Egfr1, point mutations, tyrosine kinase, gefitinib, erlotinib, non-small cell lung cancer, *k-ras*

### Úvod:

U buněk řady solidních nádorů epiteliálního původu byla popsána zvýšená aktivace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR1, ErbB/Her-1). Ten se ukazuje jako vhodná molekula k cílenému léčebnému ovlivnění různými typy inhibitorů. V prvé řadě se jedná o inhibitory vysokomolekulárního charakteru - protilátky (př. Cetuximab) zaměřené proti extracelulární doméně receptoru, užívané především při léčbě kolorektálního karcinomu. (1) Druhou skupinou preparátů jsou nízkomolekulární inhibitory (př. Iressa, Tarceva) pronikající přes cytoplaz-

matickou membránu a ovlivňující aktivitu receptoru vazbou na jeho intracelulární část, obvykle do ATP vazebného místa.

Protein Egfr1 patří do společné rodiny s ErbB2 (Her2/neu), ErbB3 a ErbB4. Po navázání příslušného ligandu na vazebné místo v extracelulární části receptoru dochází k dimeřizaci a následné fosforylaci proteinu, která nastartuje přenosovou kaskádu uvnitř buňky. Aktivovaný protein Egfr1 je zapojen do signálních drah (**obr. 1**) ovlivňujících přežívání (PI3K/AKT, STAT dráha) a proliferaci nádorových buněk (MAPK dráha). (2)



**Obr. 1:** Signální transdukcí proteínu Egfr1. Egfr1 je zahrnut především do signální dráhy AKT a STAT, která vede k expresi genů ovlivňujících přežívání buněk, a do signální dráhy MAPK, která zajišťuje expresi genů zodpovědných za proliferaci buněk.

### ErbB rodina receptorů a jejich ligandů

Protein Egfr1 je membránový receptor s tyrozinkinázovou aktivitou. Jeho strukturu tvoří glykozylovaná extracelulární ligand- vazebná doména, jednoduchá hydrofobní transmembránová oblast a intracelulární část s tyrozinkinázovou aktivitou. Podobnou strukturu mají všechny čtyři receptory z ErbB rodiny. Pro všechny jsou charakteristické vysoce homologní kinázové domény, k odlišnostem dochází v extracelulárním regionu a na COOH konci. Tyto receptory jsou široce exprimované ve všech tkáních, kde mají důležitou úlohu při regulaci řady funkcí zahrnující mitogenezu, diferenciaci a buněčné přežívání. Několik různých ligandů a rozdílné mezireceptorové proteinové interakce přispívají k rozmanité buněčné signalizaci ErbB rodiny (**tab. 1**). (3)

**Tabulka č. 1:** Různorodost buněčné signalizace ErbB rodiny sestává z velké variability na několika úrovních. Doposud bylo popsáno 12 rozdílných ligandů, které interagují s vazebnou doménou jednotlivých receptorů. Pouze v případě receptoru Her2/neu nebyl zatím identifikován žádný ligand. Naopak u receptoru ErbB3 nebyla popsána narůstající tyrozinkinázová aktivita po aktivaci ligandem. V tabulce jsou dále zaznamenány receptorové dimery, které vznikají po vazbě ligandu. U receptoru Her2/neu byla prokázána pouze homodimerizace receptorů.

	ErbB receptor			
	Egfr1 (Her1, ErbB1)	Her2/neu (ErbB2)	ErbB3 (Her3)	ErbB4 (Her4)
<b>Ligandy</b>	EGF TGF $\alpha$ Amphiregulin Heparin-binding EGF $\beta$ -cellulin Epiregulin		Heregulinyl/ Neuregulinyl NRG1,2	NRG1,2,3,4 Heregulinyl/ Neuregulinyl Heparin-binding EGF $\beta$ -cellulin Epiregulin
<b>Fosforylace tyrozinyých zbytků</b>	+	+	-	+
<b>Partner pro tvorbu dimeru</b>	homo-:Egfr1 hetero-: ErbB2 ErbB3 ErbB4	homo-: ErbB2 hetero-: -	homo-: ErbB3 hetero-: ErbB2	homo-:ErbB4 hetero-: ErbB2

Po navázání ligandu na extracelulární část receptoru dochází ke změně konformace receptoru, která se projeví dimerizací. Takto aktivovaný receptor každého monomeru asociovaný v dimeru pak fosforyluje na tyrozinyých zbytkách svého

monomerního partnera. Při interakcích receptorů vznikají buď homodimery všech členů rodiny nebo 5 rozdílných heterodimerů. Zatím bylo popsáno asi 12 různých ligandů pro ErbB receptory. Ligandy z EGF rodiny obsahují EGF-like doménu a tři disulfidické můstky v intramolekulární smyčce. Jsou exprimovány v podobě membránových proteinů s extracelulární doménou. Jejich koncentrace v mezibuněčném prostoru je regulována proteolyticky, kdy je produkován růstový faktor (GF) o délce 49-85 aminokyselin. (4)

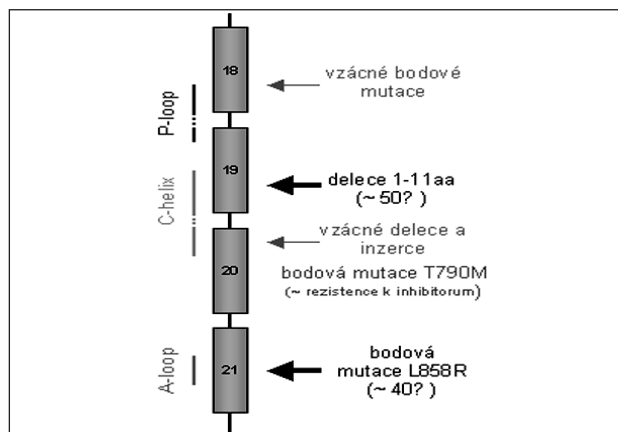
### Patologická aktivita Egfr1 v nádorových buňkách

Zvýšená exprese Egfr1 a jeho ligandů (především TGF- $\alpha$ ) může být detekovaná již v premaligních lézích, kde zapřičiňují autokrinní signalizaci časného stádia formování nádoru. Na mechanismu zvýšené exprese Egfr1 se spolupodílí jak narůstající transkripční aktivita, tak amplifikace genu. (5) Podobně další zástupce ErbB rodiny je možné detekovat v premaligních lézích, kde se rovněž uplatňují v procesu karcinogeneze. Typickým příkladem je vysoká exprese Her2/neu, která bývá společně detekována s amplifikací genu *Her2/neu* u karcinomu prsu. Obě vyšetření jsou dnes již rutinně prováděny před cílenou léčbou trastuzumabem (Herceptin) - protilátkou zaměřenou proti Her2/neu. (6)

**Tabulka č. 2:** Frekvence Egfr1 exprese v lidských nádorech – volně upraveno z práce Grandis *et Sok* (2004).

Lokalizace tumoru	% tumorů exprimujících Egfr1	Studie
Hlava a krk	80-100	Salomon, 1995; Rubin Grandis <i>et al.</i> , 1996
Prsa	14-91	Klijin <i>et al.</i> , 1992; Buccini <i>et al.</i> , 1997
Ledviny	50-90	Salomon, 1995; Yoshida <i>et al.</i> , 1997
Plic	40-80	Salomon, 1995; Fujino <i>et al.</i> , 1996
Tlusté střevo	25-77	Salomon, 1995; Messa <i>et al.</i> , 1998
Ovária	35-70	Salomon, 1995; Bartlett <i>et al.</i> , 1996
Prostata	39-47	Visakorpi <i>et al.</i> , 1992
Gliomy	40-63	Ekstrand <i>et al.</i> , 1991; Salomon, 1995
Pankreas	30-50	Salomon, 1995; Uegaki <i>et al.</i> , 1997
Močový měchýř	31-48	Salomon, 1995; Chow <i>et al.</i> , 1997

Overexpresi Egfr1 je možné prokázat u celé skupiny epiteliálních malignit, které zahrnují karcinomy prsu, plic, močového měchýře, vaječníků, prostaty, hlavy a krku (**tab. 2**). Procesy vedoucí ke zvýšené expresi Egfr1 souvisí s jeho patologickou aktivací. Vedle overexprese Egfr1 mají aktivující charakter rovněž mutace přítomné v tyrozinkinázové doméně receptoru (**obr. 2**). Této oblasti proteínu odpovídají exony 18 - 24 genu *egfr1*. (7)



**Obr. 2:** Mutace tyrozinkinázové domény Egfr1. Všechny popísané mutace vedou ke zvýšení aktivity proteínu Egfr1 a umožňují vazbu nízkomolekulárních inhibitorů. Pouze mutace T790M v exonu 20 vazbu inhibitorů znemožňuje a vede k rezistenci na tento způsob léčby.

Převážná většina aktivujících mutací je přítomna v exonu 19 a exonu 21 genu *egfr1* (tyto mutace zaujímají více jak 90% všech popsáných mutací). V případě exonu 19 se jedná o mutace typu delceí nejméně 3 nukleotidů, nezpůsobují tedy posun ve čtecím rámcí. Nejběžnější deletované jsou aminokyseliny 746-750 (jsou to aminokyseliny ELREA). V exonu 21 je nejčastěji popisována bodová mutace 858. aminokyseliny, která znamená záměnu leucinu (aminokyselina s neutrálním charakterem) za arginin (aminokyselina s bazickými vlastnostmi). V ostatních exonech jsou mutace vzácné, jedná se především o bodové mutace exonu 18 a různé delece a inserce v exonu 20. (8,9,10)

### Mutantní EGFRvIII

Mutantní forma *Egfr1* byla popsána zejména v gliomech. Jedná se o variantní receptor, který má deletovanou extracelulární část. Deletovaná oblast představuje exony 2-7 (tab. 3). Proteinový produkt má molekulární hmotnost 145 kDa a vyznačuje se konstitutivní aktivací, která se vymyká ligand-vazebné regulaci. Tato forma receptoru se označuje jako EGFRvIII. Buňky gliomů, které exprimují EGFRvIII, vykazují zvýšenou Ras aktivaci. Přítomnost EGFRvIII koreluje s větší patogenicitou tumoru a častou chemorezistencí nádorových buněk. (11)

**Tabulka č. 3:** Porovnání wild-type a mutantního *Egfr1* - upraveno z práce Grandis *et Sok* (2004).

	EGFR1	EGFRvIII
<b>Charakteristika genu</b>	26 exonů	delece exonu 2-7
<b>Charakteristika mRNA</b>	5532 bp	delece 801bp
<b>Charakteristika proteinu</b>	170 kDa	145 kDa delece 6-273 aa

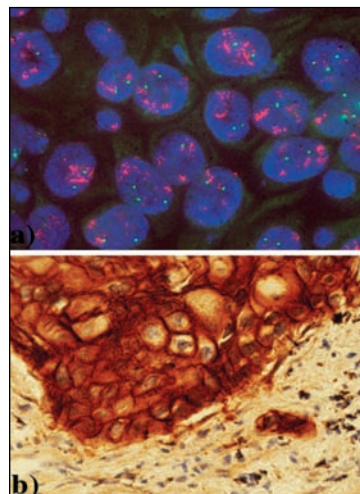
### Diagnostické možnosti vyšetření *Egfr1*

Pro přesnou charakteristiku nádorových buněk se v klinické praxi stále častěji využívá cytogenetického vyšetření jádra na řezech nádorových tkání metodou fluorescenční in-situ hybridizace (FISH). Základem metody jsou fluorescenčně přímo značené DNA sondy, které sekvenčně odpovídají detekovanému úseku na chromozomu. Sondy jsou hybridizovány za specifických podmínek na tkáňové preparáty fixované na podložním skle. Při odečítání počtu fluorescenčních signálů je stanoven počet kopií genu přítomného v jednotlivých buňkách nádoru. K rozlišení pravé amplifikace (zmnožení počtu genu) a polyzomie (zmnožení celého chromozomu) je prováděna další hybridizace s odlišně značenou sondou obvykle pro centromerickou oblast chromozomu, na kterém leží vyšetřovaný gen. Výhodou metody je možnost jejího využití na interfázních jádrech fixovaných tkání. Na obr. 3a je zachycena FISH detekce genu *egfr1* v nádorových buňkách.

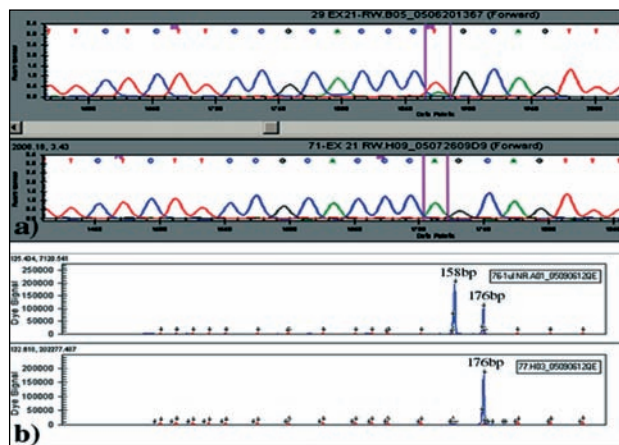
Nejběžnější histologickou metodou pro stanovení míry exprese genu je jeho imunohistochemická detekce na úrovni proteinu. Ve vyšetřovaném vzorku tkáň, který je rovněž uchycen na podložním skle, je prokazována přítomnost exprimovaných proteinů pomocí specifických protilátek s navázanými chemickými sloučeninami, které umožňují jejich vizualizaci. Na preparátech je možné zhodnotit tkáňovou architekturu i přítomnost proteinů v určitých buněčných strukturách - na membráně, v cytoplasmě apod. Imunohistochemické vyšetření proteinu *Egfr1* je zaznamenáno na obr. 3b.

Metody molekulární diagnostiky dále umožňují podrobnou sekvenční analýzu oblastí genu *egfr1*, díky které je možné identifikovat přítomné bodové mutace vedoucí k aktivaci proteinu (obr. 4a). Vedle sekvenace je dále využívána metoda detekce délkového polymorfismu při analýze delceí exonu 19 genu *egfr1* (obr. 4b). Pro správnou interpretaci delceí exonu 19 je však nutné deletovaný exon potvrdit rovněž sekvenací. Z laboratorní praxe se ukazuje významně pro izolaci DNA využít pouze nádorových buněk místo celkové tkáň odebrané pacientům. Operovaná tkáň obsahuje kromě nádorové populace i buňky zdravé. Pokud zastoupení nádorových buněk je nižší jak 60%, tak DNA ze zdravých buněk tvoří příliš vysoké pozadí, díky kterému při sekvenaci může být zachycen pouze wt nukleotid. Vhodnou meto-

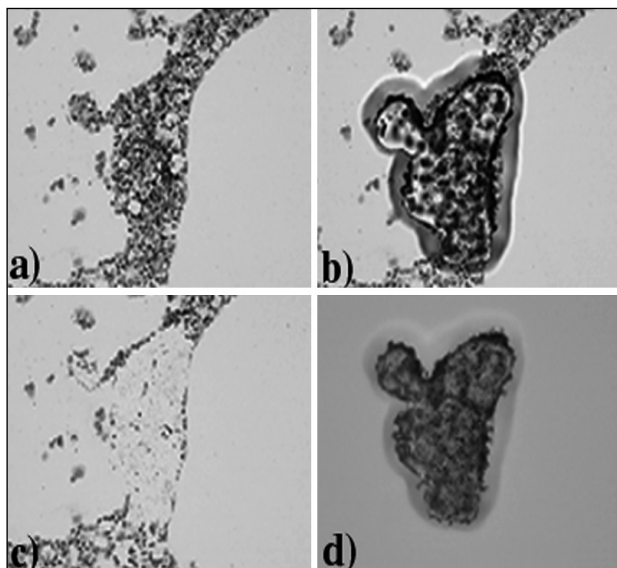
dou pro selekci nádorových buněk z řezů tkáň je laserová záchytná mikrodisekce (laser capture microdissection - LCM, obr. 5). Jedná se o rychlou metodu umožňující izolaci cílových buněk ze specifického komplexu tkáň. Základem LCM je inverzní mikroskop se zabudovaným nízkovýkonostním infračerveným laserem. Nařezané tkáň jsou upevněny na standardní podložní sklíčko. Termoplastická membrána je umístěna nad dehydratovaný preparát. Ohniskem laserového paprsku se aktivuje termoplastická membrána, která je navázána k identifikované cílové buňce v mikroskopované části preparátu. Laser roztaví termoplastickou folii v daném místě, kde je navázána cílová buňka nebo oblast s tumorem. Nádorové struktury jsou pak přeneseny do mikrozku-mavky a následně je z nich uvolněna DNA, kterou po amplifikaci specifickými primery podrobujeme sekvenční analýze.



**Obr. 3:** Vyšetření *Egfr1* metodou FISH a imunohistochemickou metodou: **a)** Fluorescenční detekce amplifikace genu *egfr1* v nádorových buňkách pacienta s nemalobuněčným karcinomem plic. Červený signál odpovídá genu *egfr1* (LSI EGFR1 Spectrum Orange, Genetica, s.r.o., Česká republika) a zelený signál centromerické oblasti chromozomu 7 (CEP 7 Oregon Green 488, Genetica, s.r.o., Česká republika); **b)** Imunohistochemická detekce proteinu *Egfr1* pomocí myši monoklonální protilátky (Anti-humane EGFR, firmy DakoCytomation, Česká republika) na histologickém řezu nádorové tkáň téhož pacienta s nemalobuněčným plicním karcinomem.



**Obr. 4:** Molekulárně biologické vyšetření genu *egfr1*: **a)** Sekvenční analýza exonu 21 genu *egfr1*. V horním chromatografu je zaznamenána bodová mutace (záměna A > T), v dolním chromatografu je přítomný wt nukleotid A; **b)** Výsledek detekce délkového polymorfismu PCR-produktu exonu 19 genu *egfr1*. V horní části záznam vyšetření pacienta s přítomnou delcí, deletovanému exonu odpovídá pik o velikosti 158bp. V dolní části záznam pacient bez delece v exonu 19. Pik o velikosti 176bp je produktem nedeletovaného (wild type) exonu 19



**Obr. 5:** Laserová záchytná mikrodisekce nádorových buněk z cytologického nátěru pacienta s NSCLC: **a)** Na prvním obrázku je cytologický preparát buněk adenokarcinomu plic upevněný na standardní podložní sklíčko pod inverzním mikroskopem, který je součástí mikrodisektoru; **b)** Označené nádorové buňky určené k disekci nízkou výkonostním infračerveným laserem; **c)** Disekovaná část preparátu, která zůstává na podložním sklíčku (nenádorové oblasti); **d)** Cílové nádorové buňky jsou během disekce navázány na termoplastickou membránu víčka, na kterém následně probíhá natrávení proteinů a uvolnění DNA.

### Vysokomolekulární inhibitory Egfr1

Humanizované monoklonální protilátky jsou s úspěchem používány u řady nádorových onemocnění (nádory prsu, hematologické malignity aj.). Podobně i proti patologicky aktivovanému Egfr1 byla vyvinuta chimerická monoklonální protilátka cetuximab (M225, Erbitux). Cetuximab se váže k extracelulární doméně Egfr1 s 5-10x vyšší afinitou než přirozené ligandy (EGF a TGF- $\alpha$ ). (12) Aplikace cetuximabu se osvědčila především u pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem, kdy je indikován v druhé linii léčby v kombinaci s irinotekanem. Z klinických studií vyplývá, že tato kombinovaná terapie má pro pacienty větší benefit než monoterapie. Navozuje odpověď u 22,9% pacientů, zatím co monoterapie pouze 10,8% pacientů ( $P=0,007$ ). Medián času do progresu je také signifikantně vyšší ve skupině s kombinovanou terapií - 4,1 měsíců, ve srovnání s pacienty léčenými monoterapií 1,5 měsíce. (13)

### Nízkomolekulární inhibitory Egfr1

Proti neřízené aktivaci proteinu Egfr1 je zaměřena cílená terapie nízkomolekulárními inhibitory tyrozin kináz, které po navázání na protein inhibují fosforylaci tyrozin kinázové části receptoru a vedou k následnému blokování signálních drah. Z tohoto účinku vyplývá snížená mitogenní aktivita buňky a zpomalení, popřípadě zastavení nádorového růstu. (14)

Kompletními klinickými testy prošly dva preparáty inhibitorů Egfr1: gefitinib (ZDI 839, obchodní název Iressa, jedná se o anilinoquinazolinový derivát) a erlotinib (OSI 774, obchodní název Tarceva, quinazolinový derivát). Oba léky byly v některých zemích již schváleny pro léčbu pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem (NSCLC, non-small-cell lung cancer) (15). V České republice je od roku 2004 u pacientů s NSCLC testována Iressa v rámci programu časného přístupu a od roku 2005 je preparát Tarceva registrovaný pro léčbu pacientů s NSCLC ve druhé linii.

Preparáty typu gefitinibu a erlotinibu jsou důkazy uplatnění poznatků studia kancerogeneze jednotlivých nádorů v cílené terapii. Možnost použití dalších tyrozin kinázových inhibitorů v praxi je nadále testována (**tab. 4**).

**Tabulka č. 4:** Protinádorová aktivita testovaných inhibitorů tyrozin kináz - volně upraveno z práce Arora *et al.*, 2005.

Inhibitor	Cílová tyrozin kináza	IC <sub>50</sub> (nM) k inhibici kinázové aktivity	Typ nádorového onemocnění	Klinické postavení
Imatinib mesylát (STI 571, Glivec)	Bcr/Abl	100	CML GIST	schváleno
	C-kit	100		
	Pdgfr	100		
Gefitinib (ZDI 839, Iressa)	Egfr1	33	NSCLC	schváleno
Erlotinib (OSI 774, Tarceva)	Egfr1	2	NSCLC	schváleno
Lapatinib (GW 572016)	Egfr1	10	nádory prsu další solidní nádory	Fáze II
	Her2	98		
Canertinib (CI-1033)	Egfr (neselektivní)	17 (EGFR1)	nádory prsu	Fáze I/II
		9 (HER2)		
Semaxinib (SU 5416)	Vegfr2	1040	AML	Fáze I/II
	C-kit	-		
	Flt3	-		
Vatalanib (PTK787/ZK222584)	Vegfr1	77	kolorektální karcinomy nádory prostaty a ledvin	Fáze I/II
	Vegfr2	37		
	Vegfr	10		
Sutent (SU 11248)	Pdgfr	10	GIST nádory ledvin	Fáze I/II
	Kit	-		
	Flt3	-		
Sorafenib (BAY 43-9006)	B-raf	38	nádory ledvin maligní melanomy	Fáze II/III
	Vegfr2	90		
Leflunomide (SU 101)	Pdgfr	65	nádory prostaty	Fáze II/III

### Rezistence na léčbu nízkomolekulárními inhibitory tyrozinových kináz

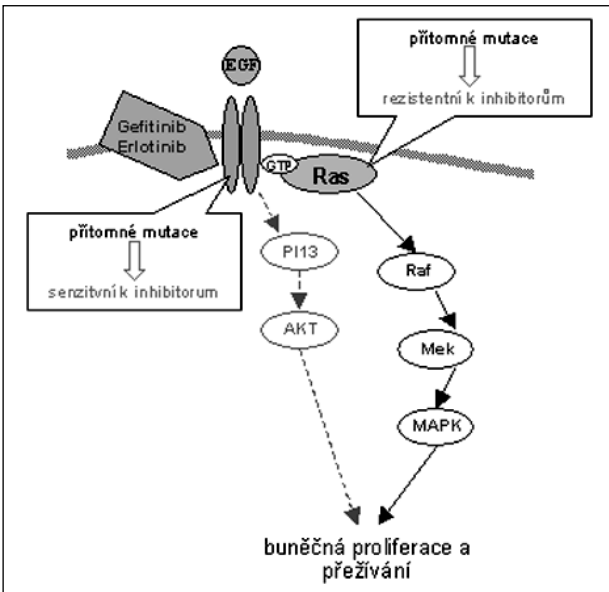
Ačkoliv byla protinádorová aktivita řady inhibitorů již dostatečně prokázána, problémem zůstává nízká primární odpověď nádorů u široké populace pacientů a rozvoj poměrně častých rezistencí na tento typ léčby. U některých pacientů není požadovaná odpověď vůbec navozena. U další skupiny nemocných pro změnu dochází k relapsu onemocnění po rozvinutí rezistence k inhibitorům následkem dlouhodobé léčby. Mechanismy rezistence na terapii inhibitory tyrozinových kináz jsou intenzivně studovány, přesto však nejsou přesně objasněny. Jisté je, že progresí nádorového onemocnění narůstá genová nestabilita maligních buněk, která napomáhá tumoru překonat blokovanou patologickou signální dráhu.

Největší zkušenosti s terapií inhibitory tyrozinových kináz, tedy i s mechanismy rezistence, jsou u případů užívání imatinibu v léčbě pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML). (16) Imatinib blokuje u tohoto onemocnění tyrozin kinázovou aktivitu patologického fúzního proteinu BCR/ABL. Na rezistenci BCR/ABL pozitivních buněk k léčbě imatinibem se podílí zvýšená exprese transportních glykoproteinů (P-glykoprotein) na buněčném povrchu. Tento fakt vede k omezení vstupu imatinibu do buňky, tedy do cytoplazmy, ve které je tyrozin kináza Bcr/Abl přítomna. Dalším mechanismem vzniku rezistence u léčených pacientů s CML je přibývání genetických změn v leukemických buňkách, které pak přestávají mít signalizaci závislou na aktivované tyrozin kináze Bcr/Abl. Nejvíce poznatků v tomto směru pochází ze studia rezistence CML buněk u dlouhodobě léčených pacientů s detekovanými de-novo mutacemi buď v ATP- vazebném místě, nebo v přilehlých částech receptoru. Mutace ATP- vazebného místa znemožňuje vazbu imatinibu, čímž je naopak usnadněna vazba ATP a nová aktivace receptoru. Příkladem takové aberace je nejběžnější mutace T315I. Jiné mutace v přilehlých částech ATP-vazebného místa znamenají změnu konformace proteinu a v konečném důsledku rovněž zamezují navázání imatinibu. Vznik mutací často souvisí se zvýšenou expresí proteinu Bcr/Abl. (17)

Rezistence k imatinibu vyvolala potřebu vývoje dalších preparátů s inhibičními účinky. U patnácti imatinib- rezistentních

buněčných klonů byla testována látka BMS-354825, která vykazuje dvojitý inhibiční účinek ke kinázám Src i Abl. Tento preparát se váže jak k aktivní, tak neaktivní konformaci proteinu Abl. (18) Další látka ON012380 na rozdíl od imatinibu, který se váže k ATP-vazebnému místu tyrozinkinázy, blokuje jinou část Bcr/Abl proteinu. Preparát ON012380 vykazuje antileukemický účinek i u imatinib-rezistentních buněčných linií a také v experimentech se zvířecími modely. (19)

Podobně jako u pacientů s CML, tak i u pacientů s NSCLC dlouhodobě léčených gefitinibem byla popsána mutace v exonu 20 genu *egfr1* (T790M), která způsobuje rezistenci na léčbu inhibitory Egfr1 (obr. 2). Je zajímavé a klinicky významné, že tato mutace strukturálně koresponduje s mutací T315I popsané u tyrozinkinázy Bcr/Abl rezistentní na imatinib. Tato nápadná shoda ukazuje na podobnost mechanismů vedoucích k získané rezistenci na nízkomolekulární inhibitory tyrozinkinázy a naznačuje možnosti pro nové generace Egfr1 inhibitorů, které budou překonávat mechanismy získané rezistence, obdobně jako je tomu v případě imatinibu. (20)



**Obr. 6:** Model rezistence k nízkomolekulárním inhibitorům Egfr1 způsobený mutacemi v genu *k-ras*. Ze schématu je patrné, že K-ras stojí v přenosové kaskádě pod membránovým receptorem Egfr1. Pokud tedy mutace vyvolá konstitutivní aktivaci u proteinu K-ras, potom inhibitory zaměřené proti proteinu Egfr1 ztrácejí svoji účinnost.

### Rezistence na inhibitory Egfr1 zapříčiněná mutací v genu *k-ras*

Významná klinická odpověď na léčbu gefitinibem je zaznamenána asi u 10% pacientů s NSCLC. Bylo zjištěno, že u řady rezistentních pacientů jsou přítomné mutace onkogenu *k-ras*, přičemž mutace jsou výrazně častější u bělošské populace (zhruba 19% pacientů s mutací) než u asijské populace (pouze 3-6% mutací). U genu *k-ras* jsou nejběžněji přítomné bodo-

vé mutace kodónu 12 v 1. exonu (především je detekována záměna glycinu za valin, či asparagin). Často se také objevují bodové mutace kodónu 13 v 1. exonu. Mutace kodónu 59 a 61 jsou u NSCLC velmi vzácné. (21) Všechny popisované mutace jsou aktivující a vedou k narušení intracelulární signalizace podobně jako v případě aberantní aktivace proteinu Egfr1. Za fyziologických podmínek je protein K-ras aktivován fosforylovaným proteinem Egfr1 (obr. 6). Na velkých klinických studiích bylo prokázáno, že mutace genu *k-ras* jsou časté u kuřáků, což pravděpodobně vysvětluje i jejich častější nálezy v bělošské populaci, lepší odpověď na inhibici Egfr1 v nádorech nekuřáků, žen a asiátů. Téměř se nenachází případy s přítomnou mutací genu *egfr1* a současně mutací genu *k-ras*. (22)

Na příkladech NSCLC s mutací buď v genu *egfr1* nebo v genu *k-ras* jsou ukázány dvě možné cesty kancerogeneze u jednoho typu nádorového onemocnění. Dnes je již zcela zřejmé, že u pacientů s mutací v genu *egfr1* je možné odpověď na léčbu předpokládat, na rozdíl od pacientů s detekovanou mutací v genu *k-ras*, kde je možné předpovídat téměř 100% rezistenci k léčbě nízkomolekulárními inhibitory Egfr1. Tato molekulární pozorování mají přímý terapeutický dopad v klinické praxi.

### Specifické postavení erlotinibu

Poněkud odlišná situace je v případě predikce účinnosti na Egfr1 inhibitor - erlotinib. Tento inhibitor má k Egfr1 vyšší afinitu a byl v klinických studiích dávkovaný ve vyšších koncentracích, v podstatě se rovnajících maximální tolerované dávce. Nepřekvapuje proto, že aktivující mutace Egfr1 nebyly v případě erlotinibu asociovány s lepší odpovědí na terapii ve smyslu prodlouženého přežití do progresu, nicméně i v případě erlotinibu zůstává pozitivním prediktorem odpovědi na léčbu amplifikace genu *egfr1*. (23)

### Závěr

Příklad inhibitorů rodiny Egfr1 jasně ukazuje, že studium molekulární biologie nádorové buňky vede k vývoji moderních protinádorových léků a nových možností optimalizace protinádorové terapie pro pacienty s maligním onemocněním. Narůstající genová nestabilita nádorových buněk v důsledku progresu onemocnění je však příčinou častých genetických změn. Díky tomu je nádorová buňka schopná vypořádat se s blokací patologické dráhy, jež vede k její nekontrolované proliferaci. Přesto však vývoj preparátů biologické povahy nabízí pacientům další, dobře tolerované způsoby léčby s minimálními vedlejšími účinky na rozdíl od konvenční chemoterapie. K dobré účinnosti terapie přispívá v tomto případě i správná molekulární diagnostika onemocnění, která umožňuje selektovat pacienty pro určitý druh nákladné terapie.

### Poděkování:

Práce na tomto projektu byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT (6198959216), grantem IGA MZ ČR (NC 7495-3), MPO 1H-PK/45 a částečně také společností Astra-Zeneca v České republice.

### Literatura:

1. Baselg J.: The EGFR as a target for anticancer therapy - focus on cetuximab. Eur J Cancer 2001; 37, Suppl 4: 16-22.
2. Pao W., Miller V.: Epidermal growth factor receptor mutant ions, Small-molecule kinase inhibitors, and Non-small-cell lung cancer: Current knowledge and future directions. J Clin Oncol, 2005; 23: 2556-2568.
3. Grandis JR., Sok JC.: Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. Pharmacol Ther 2004; 102: 37-46.
4. Roskoski R.: The ErbB/Her receptor protein-tyrosine kinase and cancer. Biochem Biophys Res Commun 2004; 319: 1155-1164.

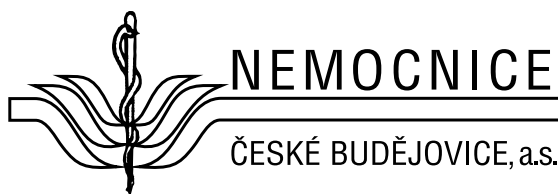
5. Grandis JR., Zeng O., Tweardy DJ.: Retinoic acid normalizes the increased gene transcription rate of TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer cell lines. Nat Med 1996; 2: 237-240.
6. Trojanec R., Špačková K., Cwiertka K. et al.: Amplifikace genu Her-2/neu: molekulární, buněčné a klinické aspekty. Klin Farmakol Farmac 2002; 16: 23-29.
7. Lynch TJ., Bell DW., Sordella R. et al.: Activating mutant ions in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med, 2004; 350: 2129-2139.
8. Shigematsu H., Lin L., Takahashi T. et al.: Clinical and biological featu-

- res associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2005; 97: 339-328.
9. Kosaka T., Yatabe Y., Endoh H. *et al.*: Mutation of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: Biologic al and clinical implications. *Cancer Res*, 2004; 64: 8919-8923.
  10. Yang SH., Mechanic LE., Yant P. *et al.*: Mutations in th t yrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 2106-2110.
  11. Prigent SA., Nagane M., Mishima K. *et al.*: Enhanced tumor igenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras- Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem* 1996; 271: 25639-25645.
  12. Sato JD., Kawamoto T., Le AD. *et al.*: Biological effects in vitro of monoclonal antibodies tu human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1983; 1: 511-529.
  13. Alekshun T., Garrett Ch.: Targeted therapies in the treat ment of colorectal cancers. *Cancer Control* 2005; 12: 105-110 .
  14. Pao W., Miller V., Zakowski M. *et al.*: EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from „never smokers“ and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *PNAS* 2004; 101: 13306-13311.
  15. Arora A., Scholar EM.: Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005; 315: 971-979.
  16. Druker BJ., Lydon NB.: Lessons learned from the developme nt of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogeno us leukemia, *J Clin Invest*, 2000; 105: 3-7.
  17. Gorre ME., Mohammed M., Ellwood K. *et al.*: Clinical resis tance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutat ion or amplification. *Science*, 2001; 293: 876-880.
  18. Burgess MR., Skaggs BJ., Shah NP., Lee FY., Sawyers CL.: Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *PNAS*, 2005; 102: 3395-3400.
  19. Gumireddy K., Baker SJ., Cosenza SC. *et al.*: A non-ATP-co mpetitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance . *PNAS*, 2005; 102: 1992-1997.
  20. Kobayashi S., Boggon TJ., Dayaram T. *et al.*: EGFR mutatio n and resi stance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2005; 352: 786-792.
  21. Shigematsu H., Takahashi T., Nomura M. *et al.*: Somatic mu tations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *C ancer Res*, 2005; 65: 1642-1646.
  22. Soung YH., Lee JW., Kim SY. *et al.*: Mutational analysis o f EGFR and K-RAS genes in lung adenocarcinomas. *Virchows Arch*, 2005; 446: 483-488.
  23. Tsao MS., Sakurada A., Cutz JC. *et al.*: Erlotinib in lung cancer - molecu lar and clinical predictors of outcome. *N Eng l J Med*, 2005; 253: 133-144.

Došlo: 27. 1. 2006

Přijato: 7. 3. 2006

## informace



**onkologické oddělení**

pod záštitou

**Společnosti radiční onkologie, biologie a fyziky a České onkologické společnosti**

**pořádají**

# XIII. Jihočeské onkologické dny

**Český Krumlov - Zámecká jízdárna**

**19. 10. - 21. 10. 2006**

### Téma

**DIAGNOSTIKA A LÉČBA NÁDORŮ PRSU**

### **Předběžný program**

<b>19.10.2006</b> (čtvrtek)	<b>Satelitní sympozia</b>
<b>20.10.2006</b>	<b>Odborný program Společenský večer</b>
<b>21.10.2006</b>	<b>Odborný program Doprovodný program</b>

**Abstrakta přihlašovaných přednášek a posterů do programu XIII. JOD, zašlete do 30. 6. 2006 na adresu Nemocnice České Budějovice, a. s.**

**Podrobné informace o poplatcích, ubytování, doprovodném programu a p., poskytuje : Informační odd. Nemocnice Č. Budějovice a. s., PhDr. Marie Šotolová, ul. B. Němcové č. 54, 370 87 České Budějovice, tel: 387 872 015, fax: 387 872 065, mobil: 723 847 004, e-mail: pr@nemcb.cz**