

Az EGFR extracelluláris módosulásainak hatása fej-nyaki daganatok cetuximabterápiájára

CSEREPES MIHÁLY¹, NELHÜBEL A. GYÖRGY¹, MEILINGER-DOBRA MÓNICA², SURGUTA SÁRA ESZTER^{1,5}, RÁSÓ ERZSÉBET⁶, LADÁNYI ANDREA³, KENESSEY ISTVÁN^{4,6}, SZÖÖR ÁRPÁD⁷, VEREB GYÖRGY⁷, REMENÁR ÉVA², TÓVÁRI JÓZSEF¹

Országos Onkológiai Intézet, ¹Kísérletes Farmakológiai Osztály, ²Fej-nyaki Daganatok Multidiszciplináris Központ, ³Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály, ⁴Nemzeti Rákgizsér, ⁵Semmelweis Egyetem, ⁶Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, Budapest, ⁷Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

Finanszírozás: A közleményhez kapcsolódó munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K116295 (Tóvári J.), és ANN128524 (Ladányi A.) számú pályázata, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium (ITM) (TKP2020-NKA-26; Tóvári J., Cserepes M.), az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap (GINOP-2.3.2-15-2016-00050, Vereb Gy.) támogatták. Szöör Á. a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíjának kedvezményezettje, valamint az ITM ÚNKP-20-5-DE-48 Új Nemzeti Kiválósági Programjának támogatottja. Surguta S. E. az ITM-NKFA finanszírozású Kooperatív Doktori Program (1018567) támogatottja.

Levelezési cím:

Dr. Tóvári József, Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály, 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9.
Tel.: +36-1-224-877, fax: +36-1-224-8724,
e-mail: tozsi@oncol.hu, jtovari@yahoo.com

Közlésre érkezett:

2021. április 18.

Elfogadva:

2021. május 12.

A fej-nyaki laphámkarzinómák (HNSCC) világszerte sok emberéletet követelnek. Előrehaladott stádiumú betegek kemoterápiájának fontos támogatója az EGFR-t célzó cetuximab. Ugyanakkor számos beteg rezisztenciát mutat, s bár ennek mechanizmusa ismeretlen, felmerült az EGFR változásainak, valamint a sejtprolifrációt irányító c-Met jelátviteli útvonalnak a jelentősége. Munkánk során az EGFR VIII több-exonos deléció, illetve az EGFR R521K polimorfizmus hatását vizsgáltuk a cetuximab hatékonyságára sejtes, xenograft és klinikai rendszerekben. Emellett a c-Met gátlásának hatását is vizsgáltuk *in vitro* és *in vivo*. Eredményeink rámutattak, hogy az EGFR VIII variáns a fej-nyaki daganatokban ritka. A gyakori R521K változat esetén a cetuximab által kifejtett antitestfüggő sejtes toxicitás, valamint az *in vivo* tumorellenes hatás csak a vad típusú EGFR esetén kifejezett. Ez a különbség a betegek immunfenotípusában és túlélésében nem mutatkozott meg, bonyolultabb mechanizmust sejtetve. A c-Met-gátló SU11274 a cetuximabrezisztens, EGFR R521K heterozigóta genotípusú sejteken és xenograftokban mutatkozott hatékonynak, felvetve a két útvonal egyidejű gátlásának stratégiáját. *Magy Onkol* 65:188-195, 2021

Kulcsszavak: fej-nyaki daganatok, EGFR, c-Met, célzott tumorterápia, cetuximab, SU11274, rezisztencia

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) take many lives worldwide. Patients with recurrent/metastatic disease receive combination chemotherapy containing anti-EGFR antibody cetuximab. However, resistance often hinders therapy. The mechanism is yet to unveil, although EGFR extracellular alterations and activity of c-Met signaling were accused. We investigated the effects of EGFR-VIII and EGFR-R521K on cetuximab efficacy in HNSCC in cellular, xenograft, and clinical setup. Furthermore, we investigated the efficacy of c-Met inhibition in HNSCC in vitro and in vivo. We showed that EGFR-VIII is very rare in HNSCC, while the common R521K polymorphism abolishes antibody-dependent cellular cytotoxicity and in vivo antitumor effect of cetuximab. This selectivity was not reflected in immunophenotype or survival data of HNSCC patients, suggesting a more complex mechanism behind. Interestingly, c-Met inhibitor SU11274 was more effective in cetuximab-resistant, EGFR R521K heterozygous cells and xenografts, raising the possible importance of simultaneous targeting of the two receptors.

Cserepes M, Nelhübel AG, Meilinger-Dobra M, Surguta SE, Rásó E, Ladányi A, Kenessey I, Szöör Á, Vereb G, Remenár É, Tóvári J. Consequences of extracellular alterations of EGFR on cetuximab therapy in HNSCC. *Magy Onkol* 65:188-195, 2021

Keywords: head and neck cancer, EGFR, c-Met, targeted therapy, cetuximab, SU11274, resistance

BEVEZETÉS

A fej-nyaki régió rosszindulatú daganatai világszerte évente több mint 450 000 halálesethez vezetnek [1]. Az esetek legnagyobb részét laphámsejttumороk okozzák (fej-nyaki laphámkarzinóma, HNSCC). A sebészileg el nem távolítható tumorok kezelésére több sugárterápiás, valamint kemoterápiás lehetőség áll rendelkezésre. A HNSCC szisztémás kezelésének sarokköve hagyományosan a ciszplatin, de a monoterápiákhoz képest a különböző kombinált terápiaк hatékonyabbnak bizonyultak. Ilyen kombinált terápiaкban alkalmazhatók például a ciszplatin/karboplatin, az 5-fluorouracil (5-FU), a paklitaxel, a docetaxel, valamint az epidermális növekedési faktort célzó monoklonális antitest, a cetuximab [2]. A kombinált terápiaк mellett új lehetőségként jelentek meg az immunterápiaк, melyek ígéretes eredményeket vetítenek elő a pembrolizumab [3] vagy a nivolumab [4] alkalmazásával. Ugyanakkor az immunterápia a betegek jelentős részénél nem bizonyul hatékonynak, így számukra nem nyújt valódi kezelési alternatívát [5, 6].

A cetuximab alkalmazása jelenleg két indikációban elfogadott HNSCC-s betegeknél. Egyrészt elsővonalas, sugárkezeléssel kombinált terápiaкban olyan betegek esetén, akiknek állapota a ciszplatinkezelést nem teszi lehetővé. Emellett kombinációs terápiaкban alkalmazható recidív vagy metasztatikus betegség kezelésében, ciszplatin, 5-FU és cetuximab kombinációjával, mely hat hét után cetuximab-monoterápiával egészül ki a betegség progressziójáig. Ez a ma használatos EXTREME protokoll [7].

Az Országos Onkológiai Intézetben emellett a primer tumorok sugárterápiával kombinált ciszplatin-docetaxel-5-FU (TPF) [8] kombinált terápia hatékonyságát is vizsgálták cetuximab hozzáadása esetén (ETPF) egy egycentrumos fázis II-es klinikai kipróbálás során [9].

A cetuximab jótekonу hatása azonban betegenként változik. A cetuximabrezisztencia kapcsán számos elképzelés látott napvilágot – a tumorhipoxia, a tumornak az immunrendszer hatása alól való kibújása, a tumormikrobiom szerepe vagy a genetikai változások –, ám a konkrét okokat még nem fedték fel [10].

A cetuximab monoklonális anti-EGFR antitest, klinikai alkalmazásra elfogadottá vált vad típusú KRAS kolorektális rák (CRC) kezelésére, ami a diagnosztikában az első rutin genotipizálásához vezetett, hiszen a KRAS szomatikus mutációi cetuximabrezisztenciát okoznak [11]. Hasonló vizsgálat szükséges a nem kissejtes tüdődaganatban szenvedő betegek másodvonalbeli cetuximabkezelése előtt is [12]. Fej-nyaki daganatokban azonban RAS-mutációk ritkán fordulnak elő, ami az anti-EGFR terápiaкkal szembeni rezisztencia más mechanizmusait feltételezi e betegségben. Feltételezték, hogy a hipoxia által kiváltott epiteliális-mezenhimális átmenet (EMT) felelős lehet a cetuximabrezisztenciáért [13]. A PI3K-AKT-mTOR jelátviteli út vonal szerepe szintén elképzelhető, hogy kritikus szerepet játszik a cetuximabterápiára adott válaszbán [14, 15]. A citotoxikus T-limfociták és az NK-sejtek aktivitását befolyásoló immunszuppresszió fontos szerepe is felmerült [16], azonban még további vizsgálatok szükségesek ennek megerősítésére.

A cetuximab célreceptorának, az EGFR-nek a változásai jelentős mértékben befolyásolhatják az antitest kötődését, így a receptor gátlását. Vastagbélrák esetén az EGFR S468R szubsztitúció cetuximabrezisztenciához vezet, azonban egy újabb generációs anti-EGFR antitest, a necitumumab kiküszöböli ezt a rezisztenciát és képes a mutáció mellett is felismerni a receptort [17]. Az extracelluláris domén változatait is vizsgálták, két módosulást írtak le, a többexonos deléciók okozó EGFRvIII-at [18] és az R521K misszensz pontmutációval járó polimorfizmust [19], melyek magas gyakorisággal fordulnak elő fej-nyaki laphámkarzinómákban.

Egy nemrégiben készült tanulmány azt állította, hogy az R521K polimorfizmus egy negatív prediktív tényező és a cetuximabrezisztencia tényleges mediátora [20], egy másik tanulmány negatív prognosztikai hatást írt le [21], míg egy harmadik hasonló tanulmány csak egy trendről számolt be a progressziómentes túlélésben, és nem talált különbséget a teljes túlélést illetően [22].

Az EGFR variációi mellett az alternatív szignalizációs útvonalak közül figyelemre méltó a hepatocita növekedési faktor (HGF) és receptora, a c-Met által indított jelátvitel, mely befolyásolja a sejtek proliferációját, túlélését, mozgását, valamint a tumorangiogenezist is. Fokozza a tumorsejtek proliferációját, gátolja az apoptotikus sejtpusztulást, valamint a sejtmozgást. Ezek a folyamatok pedig a klinikumban a tumorok progressziójához és áttétképzéshez vezetnek. A c-Met gyakori felülexpresszióját igazolták fej-nyaki daganatok esetén. Ráadásul ugyanazon betegeкben a nyirokcsomót érintő áttéteкben magasabb volt a receptor szintje, mint a primer tumorban. Ez felveti, hogy a c-Met által mediált szignalizáció döntő fontosságú lehet HNSCC daganatokban [23, 24].

A jelen tanulmány célja, hogy a különböző EGFR-variánsok és immunfenotípusok jelentőségét felmérjük cetuximabrezisztenciában *in vitro*, *in vivo* és retrospektív klinikai vizsgálat keretében, az Országos Onkológiai Intézet ETPF terápiaк kísérleti betegcsoportjában. Emellett megvizsgáltuk, hogy a c-Met specifikus gátlószere (SU11274) hogyan képes befolyásolni a kísérletes tumormodellek viselkedését *in vitro* és *in vivo*.

Módszerek

A kezelésekhez használt cetuximab (Erbix), EGF a Mercktől származnak. A c-Met-gátló SU11274 [(3Z)-N-{3-klorofenil}-3-[(3,5-dimetil-4-[[4-metilpiperazin-1-il]karbonil]-1H-pirrol-2-il]metilén)-N-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-szulfonamid] molekulát a ViChem Chemie kutató Kft. laboratóriuma szintetizálta.

A vizsgálatban szereplő fej-nyaki daganatsejtvonalak, a PE/CA PJ15 (továbbiakban: PJ15) és a PE/CA PJ41 (továbbiakban: PJ41) a Sigma-Aldrich-tól kerültek beszerzésre, a sejt kultúrákat IMDM (Lonza) médiumban, 10% FBS (BioSera) és 1% Penicillin/Streptomycin (BioSera) mellett tartottuk 37 °C-os inkubátorban, 5% CO₂-tartalom biztosításával.

A sejtek proliferációját 96 lyukú lemezekben (3000 sejt/lyuk) végeztük, a letapadt sejteket 72 órás kezelésnek alávétve, a kezelés végén a sejtek életképességét MTT-esszével mérve, az abszorbanciát 570 nm-nél leolvastva.

A sejtekből teljes RNS-, illetve DNS-izolálást a Direct-Zol RNA miniprep kit (Zymo Research), és NucleoSpin Tissue mini kit for DNA (Macherey-Nagel) segítségével végeztük. A formalinfixált, paraffinba ágyazott (FFPE) blokkokból High Pure FFPE RNA/DNA izoláló kiték (Roche) segítségével izoláltunk teljes nukleinsavkészletet. Az EGFR VIII expresszió vizsgálatában AMV-reverz transzkriptáz kit (ProMega) segítségével cDNS-t írtunk át, majd PCR segítségével amplifikáltuk a megfelelő szakaszokat a következő primerekkel: EGFR VIII: 5'-GCT CTG GAG GAA AAG AAA GGT AAT TAT és 5'-ACG CCG TCT TCC TCC ATC T. Nem trunkált, vad típusú EGFR: 5'-TAC CTA TGT GCA GAG GAA TTA TGA TCT TT és 5'-CCA CTG TGT TGA GGG CAA TG. EGFR521 régió 5'-ACT GCT GTG ACC CAC TCT G és 5'-TGC CTC GGC TGA CAT TCC. Gélelektroforézist követően a specifikus PCR-termékeket Sanger-szekvenálásra küldtük (Microsynth AG) az eredmények validálására.

A sejtek felszínén lévő receptorok számának meghatározásához mérésenként 200 000 sejtet szuszpenzióban tartva cetuximabot (10 µg/ml), majd kecske anti-humán IgG – Alexa 647 (Thermo-Fisher) konjugált antitestet (200× hígítás) használtunk. A jelölt sejteket NovoCyte áramlási citométerrel mértük, a sejtenként kapott fluoreszcenciaérték arányos a sejtekben expresszált EGFR mennyiségével.

Az EGFR foszforilációjának követéséhez 10^6 sejtet kezeltünk cetuximabbal (100 µM), vagy hagyunk kezeletlen kontrollként. 24 óra inkubáció után az EGFR foszforilációját 5 nM EGF hozzáadásával 30 percig indukáltuk. A receptor aktivációját az EGFR foszforilációs array kit (RayBiotech) segítségével mértük, az egyes foszforilációs helyekre specifikus jelölést a kezeletlen mintákon és a cetuximabkezelt mintákon összehasonlítva. Emellett western blot segítségével az EGFR szignalizációját is vizsgáltuk, az általa szabályozott Erk 1/2 foszforilációjának vizsgálatával. Ehhez a Bio-Rad wet blot rendszerét használtuk a gyártó protokollja szerint. A vizsgálatot 50 µg összfahérjén végeztük, az előhíváshoz elsődlegesen pERK1/2 és ERK1/2 (#9101 and #9102, Cell Signaling Technology) antitesteket, másodlagos jelöléshez pedig HRP-konjugált anti-nyúl IgG antitestet alkalmaztunk. Az ECL (Advansta) által láthatóvá tett fehérjeljelölést Alliance Q9 (UVITEC) készülékkel detektáltuk.

Az antitestfüggő sejt citotoxicitás (ADCC) vizsgálatára SCID egerek lépéből származó immunsejtekkel való kokultúrában vizsgáltuk a cetuximab (100 µM) hatását, melyet a CytoTox 96 kit (ProMega) segítségével értékeltünk ki.

Az állatkísérleteket az Országos Onkológiai Intézet kísérleti állatházában végeztük (engedélyszámok: PEI/001/1738-3/2015, illetve PEI/001/2574-6/2015). A cetuximab hatásának vizsgálatához 12 hetes nőstény SCID (CB17/lcr-Prkdc^{scid}) állatok szubkután oltását követően nyomon követtük a tumorok növekedését, a kezelt csoportban a humán dózissal megfelelő 400 mg/m² (első kezelés) és 250 mg/m² (fenntartó

kezelés) adagolásban, hetente egyszer, intraperitoneálisan. A SU11274 hatásának vizsgálatához nőstény SCID egerek lépébe oltott tumorsejtek primer daganatképző és áttétképző (májkolóniák) hatását vizsgáltuk, napi 0,5 mg/ttkg SU11274 vagy fiziológiás sóoldat (kontrollcsoport) intraperitoneális alkalmazásával. A szubkután tumorok mérése tolómérővel történt, a tumortérfogat becsléséhez a szélesség²×hosszúság×n/6 képletet használtuk. 21 nap kezelés után a kísérlet terminálását követően a lép- és májtumorokat eltávolítottuk, a primer tumorok tömegét mértük, a májjáttéteket pedig sztereomikroszkóp segítségével számoltuk meg.

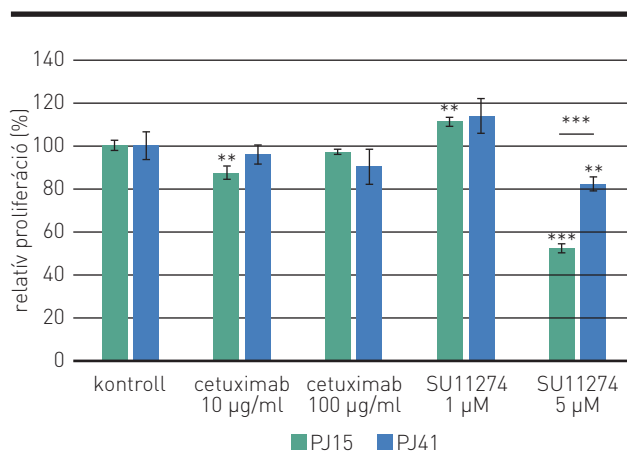
Az Országos Onkológiai Intézetben cetuximabot magában foglaló ETPF-terápiával 2007 és 2013 között kezelt klinikai fázis II-es tesztelésben (9) részt vevő HNSCC-s betegek közül 32 beteg került bevélasztásra, akiknél a kórlefolys és az EGFR-státusz is tisztázható volt. A betegadatok anonimizálva kerültek rögzítésre, melyhez minden esetben patológiai blokkból immunhisztokémiai jelölés készült NKp46-, CD68- és CD16-expresszió meghatározására, korábban leírt módszerrel (25). Emellett a szövettani anyagból RNS-t és DNS-t izolálva meghatároztuk az EGFR VIII és az EGFR 521 státuszt is. A betegek EGFR-státuszát és a cetuximabterápiára adott válaszát elemeztük.

A statisztikai elemzés során két csoport közti különbségeket Student-féle t-tesztel értékeltük, a nemparaméteres adatokat Mann-Whitney U-tesztel vizsgáltuk. A betegek túlélését csoportonként log-rank tesztnek vetettük alá. A statisztikai tesztekhez Statistica 13 programcsomagot (Tibco) használtunk.

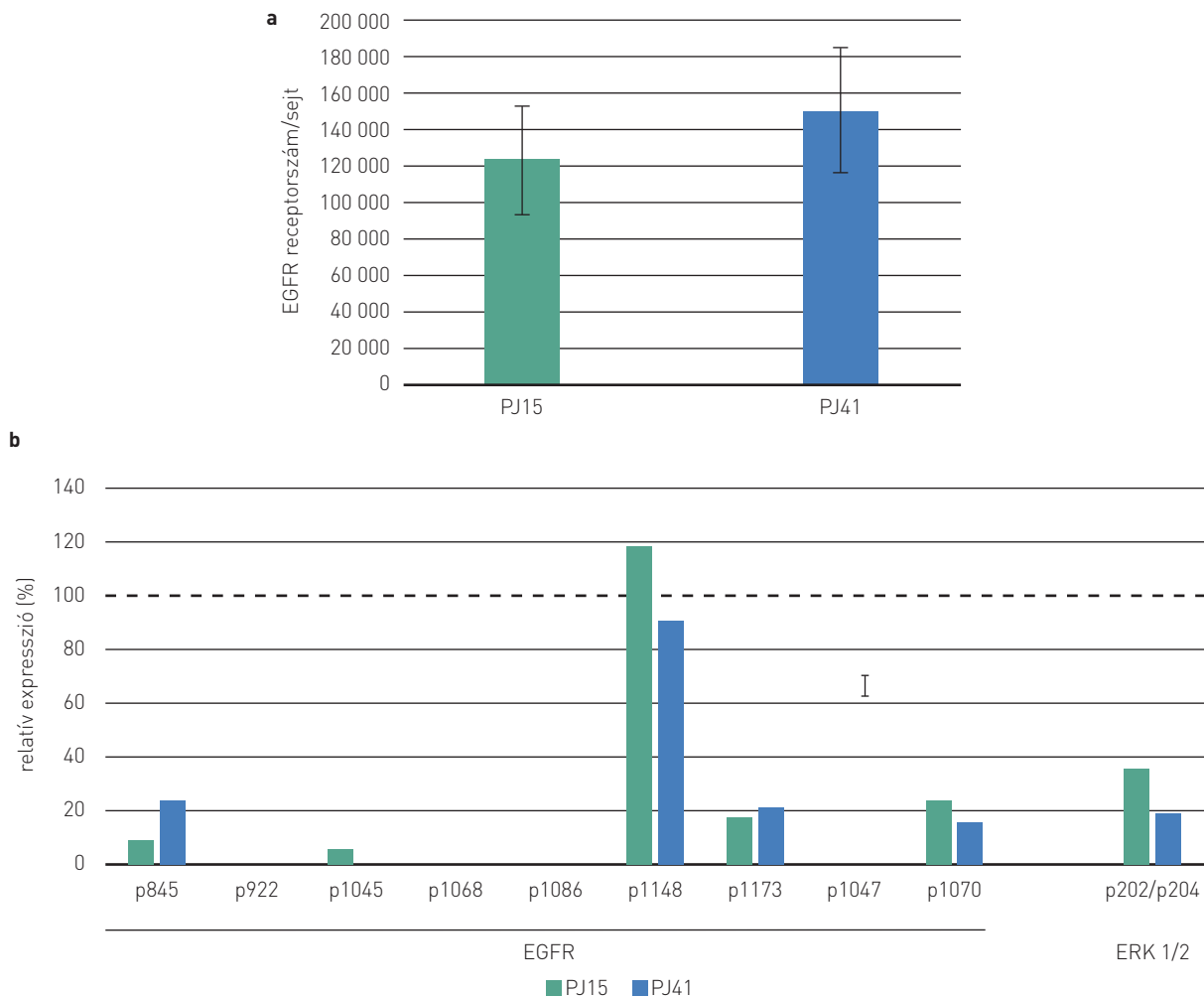
EREDMÉNYEK

EGFR-módosulások HNSCC-ben

A genotipizálás során bizonyítást nyert, hogy sem a két HNSCC-sejtvonal, sem a 32 betegminta nem fejezte ki az EGFR VIII izoformáját, ezáltal azt sugallva, hogy ez az eltérés nem lehet okozója a gyakori cetuximabrezisztenciának. Az EGFR R521K



1. ÁBRA. A cetuximab és az SU11274 *in vitro* hatásai HNSCC-sejtek növekedésére. Különböző dózisú cetuximab- és SU11274-kezelések hatása PJ15 és PJ41 sejtek proliferációjára 72 óra elteltével. 100%: kezelés nélküli érték. 3 mérés átlaga ± SD (**p<0,01, ***p<0,001)



2. ÁBRA. A cetuximab kötődése EGFR-hez, és EGFR-gátló hatása. a) Sejtfelszíni receptorjelölődés kvantitatív ábrázolása áramlási citometria segítségével HNSCC-sejteken. 3 mérés átlaga $\pm$ SD. b) Az EGFR 9 foszforilációs helyének, valamint az ERK 1/2 EGF-függő foszforilációjának mérése 24 órás cetuximabkezelést (100 μ g/ml) követően. 100%: kezelés nélküli érték. 2 mérés átlaga

polimorfizmus vizsgálatában a PJ41 sejtek vad típusúnak, míg a PJ15 sejtek heterozigótának mutatkoztak. A betegek között 20 vad típusú, 10 heterozigóta és 2 homozigóta mutáns genotípust regisztráltunk. A további vizsgálatokban ezért erre a polimorfizmusra koncentráltunk, a heterozigóta és homozigóta mutáns genotípust egy csoportba vonva vizsgáltuk a klinikai mintában.

Az EGFR R521K genotípus hatása a tumorsejtek cetuximab- és SU11274-válaszára

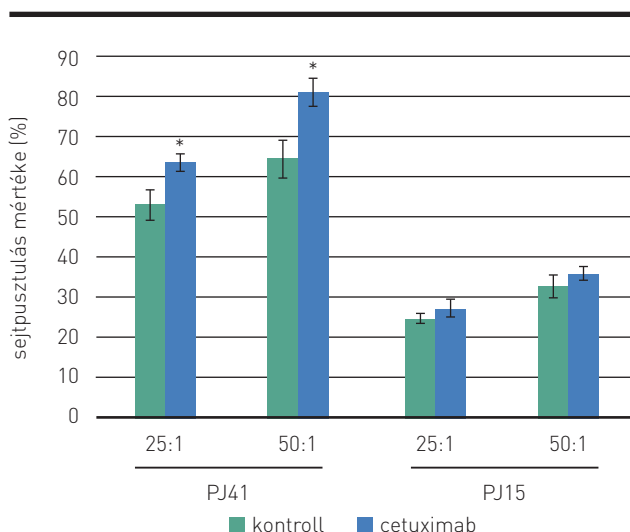
A sejtek proliferációjának vizsgálatában megmutattuk, hogy a cetuximabval való kezelés még magas (100 μ g/ml) dózisban sem fejt ki gátló hatást a sejtek proliferációjára, míg a c-Met-gátló SU11274 5 μ M koncentrációban hatékonyan gátolta a proliferációt, és ez a hatás kifejezettebb volt a heterozigóta PJ15 sejtek esetében (1. ábra). Megvizsgáltuk továbbá, hogy a cetuximab

EGFR-hez való kötődése, illetve az általa kifejtett EGFR-foszforilációt gátló hatás különbözik-e a PJ15 és PJ41 sejtek között. A kísérleti eredmények alapján egyértelmű, hogy a két sejtben hasonló mértékű a cetuximab kötődése (2.a ábra), valamint, hogy mindkét sejtben hasonlóan erős az EGFR aktiválódásának (kilenc foszforilációs helyen mérve – a p1148 alacsony expressziós szintje miatt a változás hiánya bizonytalan), és a tőle függő jelátvitel (Erk-aktiváció) gátlása is (2.b ábra). Ez alapján tehát látható, hogy a sejtekre kifejtett direkt hatás tekintetében nincs különbség vad típusú, illetve R521K polimorf EGFR esetén.

Az EGFR R521K hatása az antitestfüggő sejtcsitotoxicitásra

A cetuximab közvetlen hatása mellett megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van az immunsejtek által történő tumorsejt-

ölő képességre. Az *in vitro* végzett kokultúrák eredmények azt mutatták, hogy a vad típusú EGFR-t expresszáló PJ41 sejtek sokkal érzékenyebbek a cetuximabkezelésre, míg hasonló körülmények között a PJ15 sejteket csak mérsékelten tudták eliminálni a jelen lévő immunsejtek (3. ábra). Ez az eredmény az R521K lehetséges rezisztenciát kiváltó szerepét támasztja alá.



3. ÁBRA. Antitestfüggő citotoxicitás mérése HNSCC-sejteken. SCID egerek lépéből izolált immunsejtek és HNSCC-sejtek kokultúrájában a tumorsejtek immunspecifikus pusztulását mérve összevethető cetuximab jelenlétében és anélkül a sejtlő hatás mértéke. A kísérletet 25:1 és 50:1 lépsejt:tumorsejt arány mellett ismételtük, mind PJ41, mind PJ15 sejtek esetében. 3 mérés átlaga $\pm$ SD (* $p < 0,05$)

A cetuximab és az SU11274 hatása *in vivo*

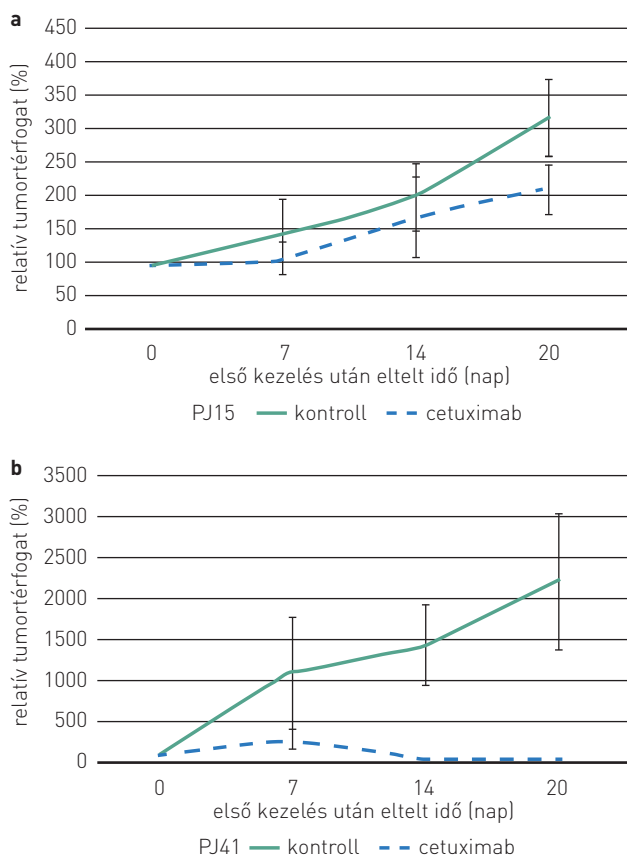
A cetuximab hatását állatkísérletben is megvizsgáltuk, és az eredmények azt mutatták, hogy míg az EGFR R521K heterozigóta mutáns PJ15 esetében nem volt számottevő tumorelles hatás detektálható (4.a ábra), a vad típusú PJ41 xenograft modellben szinte teljes remisszió érhető el 21 nap alatt (4.b ábra).

Hogy az immunuszupprimált SCID egerekben is aktív NK- és makrofág sejtek szerepét tisztázzuk, a cetuximabot kombinációs kezelésben is alkalmaztuk NK-sejt-gátló (anti-aszialo-GM1 nyúlszérum, FUJIFILM Wako Chemicals), illetve makrofág-gátló (Clodrosome, Encapsula NanoSciences) gyártói utasítás szerinti alkalmazásával az érzékenyek mutatkozó PJ41 modellben (5. ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy míg az egy sejtípust gátló vagy kombinált immungátló kezelések a kontrolltumorok növekedési ütemét a várakozásoknak megfelelően tovább gyorsították, a cetuximabkezelés hatékonyságát ezek a kombinációs terápiák meglepő módon nem tudták csökkenteni, így az *in vivo* modellek viselkedését nem lehet csupán az NK-sejtek és makrofágok működésével magyarázni.

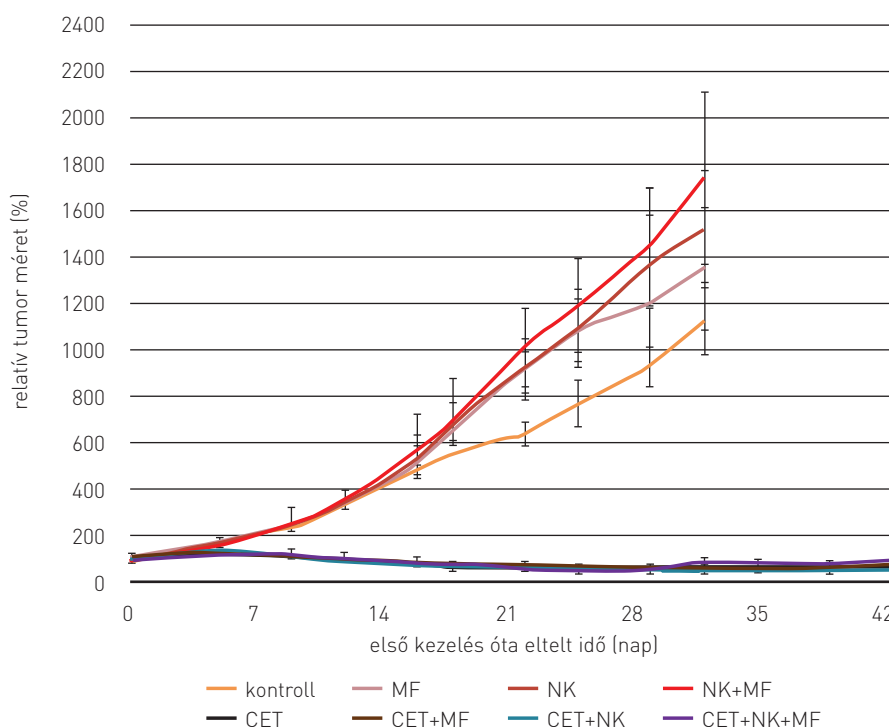
Felmerült emellett, hogy más jelátviteli útvonalak aktivitása is szerepet játszhat a tumorok terápiával szembeni ellenállásában. Az *in vitro* sikeresen tesztelt SU11274 c-Met-gátlószerral végzett állatkísérletek megmutatták, hogy a cetuximabbal szemben ellenálló, EGFR R521K heterozigóta genotípusú PJ15 tumorok esetén mind a primer tumorok növekedése, mind az áttéti májkolóniák megjelenése hatékonyan gátolható a c-Met gátlásával, míg a cetuximabra érzékeny vad típusú PJ41 modell esetén ez a hatás elmaradt (6. ábra). Ez az eredmény felveti a cetuximabrezisztens tumorok c-Met-gátlással szembeni megnövekedett érzékenységét.

Klinikai HNSCC tumorok EGFR-státuszának, immunfenotípusának és a betegség klinikopatológiájának vizsgálata

A felmerült immunsejtes hatást tovább vizsgálandó immunhisztokémiai eljárással jelöltük a CD16⁺ (NK-sejt, makrofág, neutrofil granulocita) sejteket, a CD68⁺ makrofágokat, illetve az NKp46⁺ NK-sejteket. A jelölt sejtek kvantifikálása lehetővé tette, hogy az immunfenotípust összevessük az EGFR R521K státusszal, illetve a klinikai lefolyással és a betegek



4. ÁBRA. A cetuximab hatása *in vivo* HNSCC xenograft modellekben. a) PJ15 tumorok és b) PJ41 tumorok növekedése cetuximabterápia (heti 400 mg/m², majd 250 mg/m² dózisban) mellett, ill. kezelés nélkül. Csoportátlag $\pm$ SEM, n=5



5. ÁBRA. Cetuximab, makrofág-, ill. NK-sejt-gátlás hatása PJ41 xenograft modellben. PJ41 tumorok növekedése cetuximab (CET), makrofág-gátlás (MF), NK-sejt-gátlás (NK), illetve ezek kombinált kezelésének hatására. Csoportátlag $\pm$ SEM, n=5

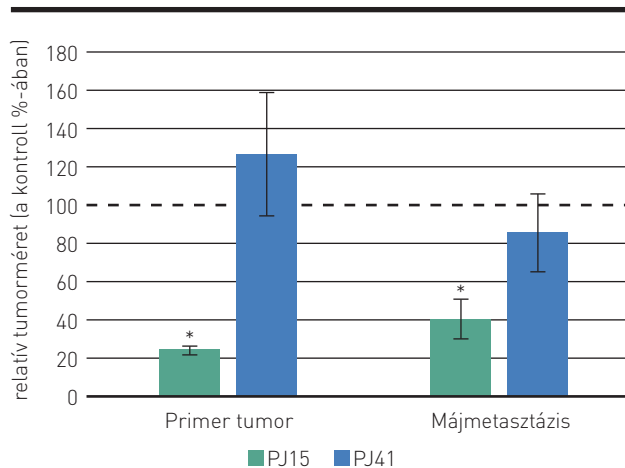
túlélésével. Az EGFR-státusz és az immunsejtek intratumorális jelenléte nem mutatott összefüggést, a kombinációs immunszuppresszív állatkísérlethez hasonlóan pedig az immunsejtek mennyisége a klinikai válaszáddal és a túléléssel sem mutatott szignifikáns összefüggést (7. ábra).

A vizsgálatba vont 32 HNSCC-s beteg EGFR-státuszát és klinikai válaszáat vizsgálva azt láttuk, hogy a progressziómentes (8.a ábra) és teljes túlélés (8.b ábra) sem változott szignifikánsan a különböző EGFR-státuszú csoportok között. Úgy tűnik, hogy az *in vitro* és *in vivo* tapasztalt különbségek a cetuximabérzékenységekben nem tükröződnek a klinikai terápia sikerének mérésekor.

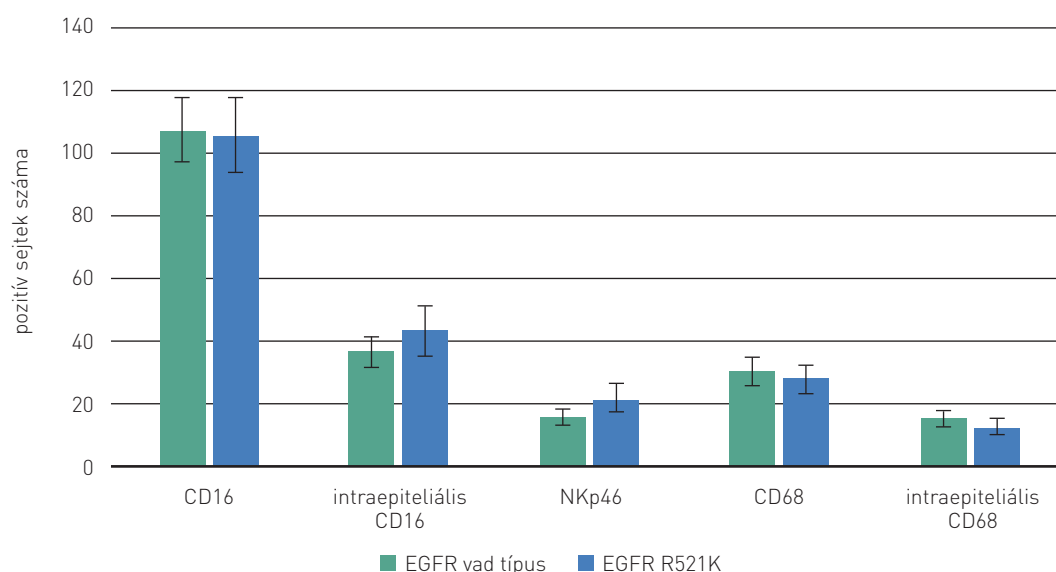
MEGBESZÉLÉS

A fej-nyaki laphámkarinómák nagyszámú betegcsoportja és a mai napig limitált sikerű kezelési módszerei megkövetelik, hogy a meglévő terápiák hatásosságát jobban megismerjük, illetve új terápiás célpontokat kutassunk fel. A klinikumban használt, EGFR-t célzó antitest cetuximab gyakran korlátozott hatékonyságú, amelynek magyarázatára több lehetőség is felmerült. Vizsgálatainkban felmértük, hogy a receptor extracelluláris változásai milyen hatással lehetnek a terápiás hatékonyságra molekuláris, sejtes, illetve szöveti szinten. Emellett megvizsgáltuk egy lehetséges kiegészítő terápia, a c-Met specifikus gátlószerének hatásait *in vitro* és *in vivo*.

Az EGFR két módosulását írták le korábban fej-nyaki laphámrák esetén: a többexonos deléciót okozó vIII variáns, illetve az R521K misszensz pontmutációval járó polimorfizmust.



6. ÁBRA. A c-Met-gátló SU11274 hatása *in vivo* HNSCC xenograft modellekben. Primer léptumorok és májmetasztázisuk méretének összehasonlítása PJ15 és PJ41 modellben, napi 0,5 mg/ttkg SU11274-kezelés hatására, 21 nappal a beoltást követően. Csoportátlag $\pm$ SEM, n=5 (*p<0,05)



7. ÁBRA. Fej-nyaki laphámrákos betegek immunfenotípusa EGFR R521K státusz szerint. Kvantitatív immunfenotipizálás (pozitív sejtek számolása) vad típusú és EGFR R521K betegekből származó szövettani mintákon. 3 látótér átlaga $\pm$ SEM

Az általunk végzett genetikai elemzés megmutatta, hogy bár van irodalmi adat, amely magas EGFR VIII gyakoriságot ír le HNSCC esetén [26], más közleményekkel egyetértésben [27] mi sem találtuk ennek nyomát. Ugyanakkor az EGFR R521K polimorfizmus magas gyakorisággal fordul elő a magyar betegpopulációban, ezért alapos vizsgálatra érdemes.

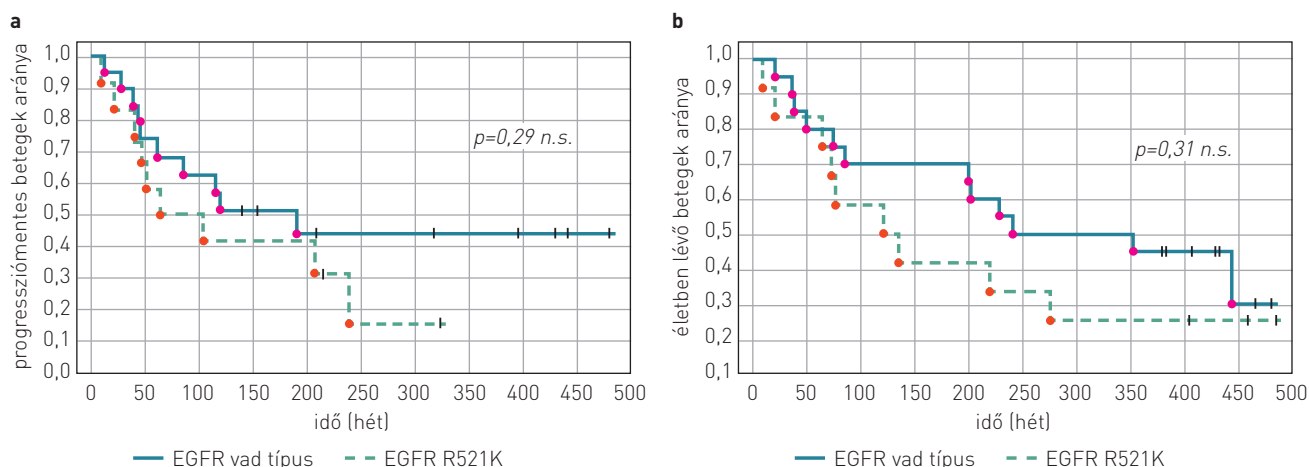
Az antitestek egyik hatása receptorok esetén a ligandum kötődésének gátlása, amelynek hatására direkt tumorellenes hatást érhetnek el. A cetuximab esetén megmutattuk, hogy a kötődés és az aktivitás gátlása is hasonló mértékben tud lezajlani mind vad típusú, mind R521K genotípusú EGFR esetén, ez a gátlás mégsem vezet a sejtproliferáció csökkenéséhez.

A cetuximab a kedvező terápiás hatást azonban nem csupán a direkt gátlás, hanem az antitest általi felismerés és eliminálás által is elérheti. Ezt alátámasztották mind az *in vitro* ADCC-tesztek eredményei, mind az állatkísérletek. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy az immunszuppresszív terápiával való kombináció nem függesztette fel a cetuximab hatását, ami rávilágít arra, hogy a szervezetben komplexebb kölcsönhatások felderítésére van szükség a hatékonyság megértéséhez.

Az Országos Onkológiai Intézet kísérleti betegcsoportján végzett vizsgálatok megmutatták, hogy a klinikai terápiában nem mutatkozik éles különbség az EGFR R521K státusz alapján a cetuximab hatékonyságában. Ennek több oka is elképzelhető. Egyrészt a terápiás protokoll a cetuximab mellett ciszplatin, docetaxel, 5-fluorouracil hatását is egyesíti, melyek elfedhetik a cetuximab sikerességében esetleg meglévő különbségeket. Elképzelhető az is, hogy más kompenzációs

mechanizmusok lépnek fel, illetve nem zárható ki a tumorok heterogenitásának fontos szerepe, melyet a sejtvonalak, illetve belőlük származó xenograft tumorok nem képesek modellezni. Ebben a kérdésben a közeljövőben nagy szerepet kaphatnak a fejlettebb (GEMM, PDX) állatkísérletes modellek. Harmadrészt a klinikai csoport alacsony betegszáma miatt az eredmények bizonytalanságán javítani szükséges. Nagyobb minta vizsgálatához a recidív/metasztatikus betegeknél alkalmazott EXTREME protokoll szerint kezelt esetek vizsgálatát tervezzük, ahol reményeink szerint hamarosan nagyobb biztonsággal vonhatunk le következtetéseket. Mindenesetre elgondolkodtató, hogy hasonló tanulmányok változó választ adnak a kérdésre abban a tekintetben, hogy van-e (éppen csak) szignifikáns progressziómentes túlélési előnye a vad típusú EGFR-t hordozó betegeknél, vagy nincs ilyen hatás [20–22]. A látszólag kis hatás mellett feltétlenül szükséges a magyar populáción végzett vizsgálat kibővítése és közlése, valamint esetlegesen a jövőben a meglévő tanulmányokkal összevont metaanalízise is.

A cetuximab alkalmazása hatékony modalitása a HNSCC-s betegek kemoterápiás protokolljának. Ugyanakkor fontos az alternatív támadási pontok és gyógyszerjelöltek kutatása is, lehetőséget biztosítva a cetuximabrezisztens tumorok kezelésére. Egy ilyen lehetőség a c-Met receptort specifikusan gátló kismolekula SU11274 is. Mint az *in vitro* és *in vivo* vizsgálataink során kimutattuk, hatékony tumorellenes és antimetasztatikus hatás érhető el alkalmazásával PJ15 sejtek és xenograftok esetén. Ez egyben előrevetíti a tumor-sejtek sejten belüli jelátviteli útvonalaktól való függését,



8. ÁBRA. Fej-nyaki laphámrákos betegek túlélési adatai EGFR R521K státusz szerint. A betegek progressziómentes (a) és teljes túlélésének (b) analízise EGFR R521K státusz függvényében. n(vad típus)=20, n(R521K)=12; p: log-rank teszt

amelynek hatékony kiaknázása a rákellenes terápiákban leginkább kombinált kezelések révén válhat lehetségessé. Emellett EGFR elleni új generációs antitestek fejlesztése is ígéretes lehet, melyek képesek lehetnek a rezisztencia leküzdésére [17, 20].

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozunk Hidvégi Anitának és Léner Violetának az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott segítségért, valamint Parragné Derecskei Katalinnak az immunhisztokémiai minták elkészítéséért.

IRODALOM

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424, 2018
- Oosting SF, Haddad RI. Best practice in systemic therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Front Oncol* 9:815, 2019
- Ho WJ, Mehra R. Pembrolizumab for the treatment of head and neck squamous cell cancer. *Expert Opin Biol Ther* 19:879–885, 2019
- Nivolumab doubles survival for patients with HNSCC. *Cancer Discov* 6:OF3, 2016
- Keytruda. European Medicines Agency, 2018. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda>
- Opdivo. European Medicines Agency, 2018 <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/opdivo>
- Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359:1116–1127, 2008
- Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *New Engl J Med* 357:1695–1704, 2007
- Specenier PM, Remenar E, Buter J, et al. TPF plus cetuximab induction chemotherapy followed by biochemoradiation with weekly cetuximab plus weekly cisplatin or carboplatin: a randomized phase II EORTC trial. *Ann Oncol* 28:2219–2224, 2017
- Alsahafi E, Begg K, Amelio I, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis* 10:1–17, 2019
- Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitt E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360:1408–1417, 2009
- Mazzarella L, Guida A, Curigliano G. Cetuximab for treating non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* 18:483–493, 2018
- Wiehac E, Hansson KT, Alexandersson L, et al. Hypoxia mediates differential response to anti-EGFR therapy in HNSCC cells. *Int J Mol Sci* 18:943, 2017
- Rebucci M, Peixoto P, Dewitte A, et al. Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: role of AKT inhibition in bypassing this resistance. *Int J Oncol* 38:189–200, 2011
- Swick AD, Prabakaran PJ, Miller MC, et al. Cotargeting mTORC and EGFR signaling as a therapeutic strategy in HNSCC. *Mol Cancer Ther* 16:1257–1268, 2017
- Trivedi S, Concha-Benavente F, Srivastava RM, et al. Immune biomarkers of anti-EGFR monoclonal antibody therapy. *Ann Oncol* 26:40–47, 2015
- Bagchi A, Haidar JN, Eastman SW, et al. Molecular basis for necitumumab inhibition of EGFR variants associated with acquired cetuximab resistance. *Mol Cancer Ther* 17:521–531, 2018
- Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 12:5064–5073, 2006
- Su NW, Leu YS, Lee JC, et al. EGF and EGFR genetic polymorphisms predict prognosis in locally advanced pharyngolaryngeal squamous cell carcinoma patients receiving postoperative concurrent chemoradiotherapy. *Onco Targets Ther* 7:2197–2204, 2014
- Braig F, Kriegs M, Voigtlaender M, et al. Cetuximab resistance in head and neck cancer is mediated by EGFR-K521 polymorphism. *Cancer Res* 77:1188–1199, 2017
- Stoehlmacher-Williams J, Obermann L, Ehninger G, Goekkurt E. Polymorphisms of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and survival in patients with advanced cancer of the head and neck (HNSCC). *Anticancer Res* 32:421–425, 2012
- Klinghammer K, Knödler M, Schmittle A, et al. Association of epidermal growth factor receptor polymorphism, skin toxicity, and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res* 16:304–310, 2010
- Cortesina G, Martone T, Galeazzi E, et al. Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases. *Int J Cancer* 89:286–292, 2000
- Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, et al. The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 69:3021–3031, 2009
- Ladányi A, Kapuvári B, Papp E, et al. Local immune parameters as potential predictive markers in head and neck squamous cell carcinoma patients receiving induction chemotherapy and cetuximab. *Head Neck* 41:1237–1245, 2019
- Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 12:5064–5073, 2006
- Melchers LJ, Clausen MJAM, Mastik MF, et al. Head and neck squamous cell carcinomas do not express EGFRvIII. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 90:454–462, 2014