

Farnezil-transzferáz-inhibitorok (FTI) szinergista módon potenciórozzák a mutáns KRAS inhibitorai daganatellenes hatásait preklinikai modellekben

BARANYI MARCELL¹, HEGEDŰS BALÁZS¹, MOLNÁR ESZTER¹, TÓVÁRI JÓZSEF², IVAN RANDELÓVIĆ², PERCZEL ANDRÁS³, BUDAY LÁSZLÓ⁴, KESERŰ GYÖRGY⁴, TÍMÁR JÓZSEF¹

¹Semmelweis Egyetem, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, ²Országos Onkológiai Intézet, ³Eötvös Loránd Tudományegyetem, Szerves Kémiai Tanszék, ⁴ELKH, Enzimológiai Intézet, Budapest

A munkát az NKFIH TKI-EGA-25 (TJ), a Jövő 2020-1.1.6-2021-0004 (BL) pályázataival, valamint a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-22-4-II kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja finanszírozta (BM).

Levezetési cím:

Dr. Tímár József, Semmelweis Egyetem, Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93., e-mail: jtimar@gmail.com

Közlésre érkezett:

2023. április 30.

Elfogadva:

2023. augusztus 21.

A KRAS-mutáció az egyik leggyakoribb onkogénhiba emberi daganatokban, így óriási jelentőségű, hogy sikerült mutáns KRAS-ra specifikus inhibitorokat kifejleszteni. Ugyanakkor hamar kiderült, hogy pl. a KRAS G12C-inhibitorok alkalmazása során gyorsan rezisztencia alakul ki, illetve, hogy a monoterápiák nem minden daganattípusban hatásosak, ezért különféle új kombinációkat keresnek. *In silico* elemzéseink felhívták figyelmünket a KRAS G12C-mutáns sejtvonalak farnezil-transzferáz-inhibitor (FTI) érzékenységre, ezért vizsgálni kezdtük ezen gyógyszerek hatásait az újonnan törzskönyvezett G12C-inhibitorokkal (szotoraszib és adagraszib) együtt adva. Megállapítottuk, hogy az FTI-k potenciórozni képesek a KRAS-inhibitorok daganatellenes hatásait emberi tüdő-, vastagbél- és hasnyálmirigy-rák-sejtvonalakon *in vitro* és *in vivo* egyaránt. Ezt követően az új KRAS G12D-szelektív inhibitor (MRTX1133) is tesztelni kezdtük FTI-vel kombinációban, amely során szintén szinergista tumorellenes hatást kaptunk. Mivel nincsen jelenleg még KRAS G12V-szelektív inhibitor, ilyen daganatokon a BI-2852 pan-RAS-inhibitor alkalmaztuk, és ebben az esetben is igazoltuk a szinergizmust az FTI és a RAS-inhibitor között. Miután több FTI is törzskönyvezésre került (tipifarnib és lonafarnib) más indikációkban, felmerül a klinikai lehetősége a mutáns KRAS inhibitorai FTI-vel történő kombinációjának. *Magy Onkol* 67:223–235, 2023

In silico studies raised the possibility that farnesyltransferase inhibitors (FTIs) may have antitumoral effects on KRAS mutant cancer cells. Accordingly, we have tested FTIs (tipifarnib and lonafarnib) in G12C mutant human cancer cell lines in vitro and in vivo. We have discovered that the combination of the two drugs has a synergistic antitumoral effect. Next, we have tested FTIs on G12D mutant human cancer cell lines and found that the combination has antitumoral effect in various preclinical cancer models. At last, we have also tested FTIs on G12V mutant human cancer cells and again we have detected antitumoral effects. We suggest that FTIs may have clinical relevance outside the HRAS mutant cancers.

*Baranyi M, Hegedűs B, Molnár E, Tóvári J, Randelović I, Perczel A, Buday L, Keserű G, Tímár J. Farnesyltransferase inhibitors have antitumoral effects in mutant KRAS containing cancer cells in preclinical models. *Magy Onkol* 67:223–235, 2023*

Keywords: farnesyltransferase inhibitor, combination therapy, preclinical tumor models

Kulcsszavak: farnezil-transzferáz-inhibitor, KRAS-inhibitor, kombinációs kezelés, preklinikai daganatmodellek

BEVEZETÉS

A RAS proteinek a kis GTP-áz fehérjék családjába tartoznak (tömeg: 21 kD), és szabályozó szerepet látnak el a leggyakoribb növekedésfaktor-receptor jelpályákban (EGFR-ek, MET vagy a KIT) [1]. A családba három fehérje és génjeik tartoznak, a KRAS, a HRAS és az NRAS, melyek különböző kromoszómákon vannak kódolva. Emberben a KRAS gén a 12. kromoszómán a p12.1 lókuszbán található és 6 exon kódolja, amelyek mutációi a 2–4. exonokban fordulnak elő. A HRAS gén a 11. kromoszóma p15.5 lókuszában, míg az NRAS gén az 1. kromoszóma p13.2 lókuszában kódolt. A RAS géneket 6 exon kódolja, és mutációik jellegzetes forró pontokban koncentrálnak: a KRAS esetében ez a 2. exon 12-es kodonja, amely a GTP-áz doménben van, a 3. exon 61-es kodonja, amely pedig a II. kapcsoló régió és a 4. exon 117/146-os kodonja. Az NRAS esetében is ezek a mutációs forró pontok, de leggyakrabban a 3. exon 61-es kodonjában helyezkednek el. A KRAS a leggyakrabban mutált onkogén emberi daganatokban. A hasnyálmirigyrák 80%-a KRAS-mutáns, míg a vastagbélrák, tüdő-adenokarcinómák és kolangiális karcinómák mintegy harmada hordoz KRAS-mutációt. Bár mutációja bármely rosszindulatú daganatban előfordulhat, 10% feletti gyakoriság jellemzi az ovárium- és endometriális karcinómákat. Az NRAS-mutáció gyakorisága melanómákban 20%, míg a vastagbélrákban és a hematológiai daganatokban 10%. A HRAS-mutációk emberi daganatokban ritkák, de 10%-os incidenciát jellemzi a méhnyakrákokat és a húgyhólyagrakot. A KRAS-mutációs mintázat is tumorspecifikus sajátosságokat mutat. Az elemzések azt mutatják, hogy a KRAS exon 2/ G12D és G12V típusú mutációk a leggyakoribban a különböző daganatfélésekben, de jellegzetes variációkat mutatnak. A G12D mutáció a hasnyálmirigyrákban a legmagasabb és a tüdő adenokarcinómájában a legalacsonyabb. A G12V típusú mutáció az ováriumrákban a leggyakoribb és a kolangiális rákban a legritkább. Nagyon jellegzetes, hogy a KRAS G12C típusú mutáció messze a tüdő-adenokarcinómában a leggyakoribb (~40%), és minden más KRAS-mutáns daganattípusban sokkal alacsonyabb (~10%). A KRAS exon 2 más típusú mutációi sokkal ritkábbak, de megint nagyon jellegzetesek az eltérések az egyes daganatfélések között. Az endometriális rák G12A mutáció jellemzi, míg a G12S kolangiális rákra specifikus. A G12R mutáció majdnem kizárólagosan hasnyálmirigy- és specifikus, míg a G13D mutáció a vastagbélrákokat jellemzi [1].

Mutáns KRAS-t hordozó daganatok célzott terápiája

Allélspecifikus inhibitorok

Bár sokáig célozhatatlannak tartották, az elmúlt néhány évben számos, mutáns KRAS-ra specifikus inhibitor sikeresen kifejlesztett [2]. A sort a KRAS G12C mutációra specifikus irreverzibilis inhibitorok kezdték. Ezek közül több is eljutott a klinikai kipróbálásig, közülük kettő sikeresen szerepelt fázis II-es vizsgálatokban. Sajnálatos módon a két sikeres szer, a szotoraszib/AMG510 [3, 4] és adagraszib/MRTX849

[5] elsősorban tüdőrákban bizonyult hatékonyaknak, így az FDA ezen indikációban törzskönyvezte ezeket. A klinikai vizsgálatok során kiderült, hogy a kezelés alatt viszonylag hamar alakul ki rezisztencia, aminek legfőbb okai a KRAS és NRAS ún. másodlagos mutációi [6], így nagy aktivitás van újabb, hatékonyabb kombinációs modalitások kidolgozására: G12C-mutáns vastagbélrákban EGFR-inhibitorral kísérleteznek, más daganatokban CDK4/6- MEK- vagy mTOR-inhibitor kombinációkat vizsgálnak [7]. A fejlesztések következő lépése a sokkal gyakoribb KRAS G12D mutációra specifikus inhibitorok kifejlesztése. Ennek legelőrehaladottabb fajtája a G12D-szelektív MRTX1133, amely a G12D GTP-kötött formáját blokkolja [8]. Az irodalomban két másik G12D-szelektív inhibitor is megjelent, a KRAS12D1-3 és a RAS(ON) G12D, amelyek kémiai szerkezete még nem ismert, és nem hozzáférhetők [9].

Pan-RAS-inhibitorok

Az allélspecifikus fejlesztések ellentéte a pan-RAS-inhibitorok kialakítása, itt számos vegyület jelent meg. A BI-2852 inaktív KRAS-homodimert képes indukálni, és kiderült, hogy erősen szelektív a KRAS G12D allélre a vad típusal vagy más mutánsokkal szemben [10]. A BI-pan-KRAS1-4 a G12D és G12V allélszelektív inhibitora. A BI-pan-KRASdegrader1 valamennyi mutáns forma esetében hatékony volt *in vitro*. Az RSC-1255 és RMC-6236 újabb pan-RAS-inhibitorok [9].

Indirekt RAS-inhibitorok

Ezen vegyületek közül a legelőrehaladottabb állapotban az SOS1-inhibitorok vannak, melyek a GTP-exchange proteinek ezen családját blokkolják, sajnos „pan-RAS” inhibitorok és nem mutációszelektívek, így várható a mellékhatások széles skálája [2]. A RAS fehérjék az SRC révén a C32 helyen tirozin-foszforilálódnak és ezzel aktiválódnak. Az SHP2 egy tirozin-foszfátáz, amely a C32P helyen defoszforilálja a RAS-t és ezzel blokkolja a jelátvitel hatékonyságát. Ezért számos SHP2-inhibitor fejlesztettek ki; ezek egy részét KRAS-inhibitorokkal kombinációban elemezték *in vitro*, és néhány kombináció már klinikai fázisba is jutott [9, 11].

A HRAS-inhibitorok új osztálya:

farnezil-transzferáz-inhibitorok

A RAS proteinek másodlagos módosulásának sajátos formája a farneziláció, amely elősegíti a membránhoz való kihorgonyozódást és a hatékony jelátvitelt. Ezért korábban számos FTI-t terveztek, fejlesztettek, ezek közül sok eljutott a klinikai fázisvizsgálatokig, de elbuktak [2]. Ennek oka az volt, hogy a KRAS és NRAS esetében a farneziláció alternatívája a geraniláció [2]. Ugyanakkor a HRAS protein esetében ilyen alternatíva nincsen, ezért két FTI-t is teszteltek klinikai körülmények között HRAS-mutáns daganatokon, a tipifarnibot [12] és a lonafarnibot [13]. A tipifarnib igen hatékonyak bizonyult HRAS-mutáns fej-nyaki laphámrákokban, így ott FDA-törzskönyve is született 2022-ben [12]. A jelenlegi vizsgálatok

HRAS-mutáns húgyhólyagrakokban zajlanak [14]. A lonafarnibot progéiaszindrómás gyerekek esetében vizsgálták klinikailag, mert ebben a betegségben egy magi fehérje, az LMNA mutáns, és ez a fehérje erősen farnezilált. A klinikai vizsgálatok olyan sikeresek voltak, hogy a lonafarnib lett az első törzskönyvezett FTI gyógyszer [13]. Ezek a fejlemények felvetették annak a lehetőségét, hogy az FTI-k daganatellenes felhasználását újra kell, lehet gondolni. Ezért kísérleti rendszerekben megvizsgáltuk az új RAS-inhibitorok FTI-vel történő kombinációját preklínikai modellekben.

ANYAG ÉS MÓDSZER

In vitro 2D kombinációs tesztek

A daganatsejtvonalak (1. táblázat) 70-80%-os konfluenciájú tenyészetéből tripszines emésztés segítségével egy-sejt-szuspenziót készítettünk, amelyet Luna II automatizált sejtszámlálóval számoltunk meg. A sejteket 5000–10 000 sejt/lyuk sűrűségben (az adott sejtvonal növekedési sebességétől függően) 24 lyukú lemezre ültettük. A tápoldatot másnap friss, inhibitorokkal (2. táblázat) kiegészített tápoldatra cseréltük le. 6 nap elteltével a lyukakat DPBS-szel (Lonza) mostuk, majd a sejteket 10%-os triklórecetsavval fixáltuk, és 15 percig szulfuradamin-B (SRB) (Sigma) festékkel festettük. A lemezeket többször mostuk 1%-os ecetsavval a felesleges festékanyag eltávolítása érdekében. A fehérjéhez kötött SRB-t 10 mM Tris-pufferben (pH=7,4) oldottuk fel, és az OD-t (optikai denzitást) 570 nm-en mértük mikrolemes-olvasóval (EL800, BioTec Instruments, Winooski, VT, USA). Az OD-értékeket a kontrollhoz normalizáltuk. A transzformált adatokat a kombinációs index (CI) kiszámításához használtuk. A feltüntetett

1. TÁBLÁZAT. A felhasznált emberi daganatsejtvonalak

Daganatsejtvonal	Eredet	KRAS-mutáns státusz
H358	tüdőrák	KRAS G12C
H1792	tüdőrák	KRAS G12C
PF139	tüdőrák	KRAS G12C
SW1573	tüdőrák	KRAS G12C
PF97	vastagbélrák	KRAS G12C
MIAPACA2	hasnyálmirigyrák	KRAS G12C
SW1990	hasnyálmirigyrák	KRAS G12D
H838 G12D	tüdőrák	KRAS G12D
SNUC2B	vastagbélrák	KRAS G12D
SW480	vastagbélrák	KRAS G12V
A549	tüdőrák	KRAS G12S
HCT116	vastagbélrák	KRAS G13D

2. TÁBLÁZAT. Az alkalmazott KRAS-inhibitorok

Brandnév	Hatóanyag neve	Célpont
Lumykras	szotoraszib (AMG510)	KRAS G12C
Krazati	adagraszib (MRTX849)	KRAS G12C
–	ARS-1620	KRAS G12C
–	MRTX1133	KRAS G12D
–	BI2852	pan-KRAS
Zarnestra	tipifarnib	farnezil-transzferáz enzim
Zokinvy	lonafarnib	farnezil-transzferáz enzim
–	FTI277	farnezil-transzferáz enzim
–	BMS214662	farnezil-transzferáz enzim

adatok három független kísérlet eredményei. A hőtérképeket a Microsoft Excel szoftver segítségével készítettük el.

In vitro 3D kombinációs tesztek

A sejteket 3000 sejt/lyuk sűrűségben ültettük a belső 60, poly-HEMA-bevonatú lyukba 200 µl tápfolyadékban, míg a külső lyukakat DPBS-szel (Lonza) töltöttük fel a párolgás elkerülése érdekében. A sejteket a lyukak alján koncentráltuk 540 RCF (relatív centrifugális erő) centrifugálással, hogy elősegítsük a lyukankénti egy szferoid képződését. A sejtek 24 órán belül szferoidokká álltak össze, majd további 100 µl, inhibitorokkal kiegészített tápfolyadék hozzáadásával kezeltük őket. Minden koncentrációs csoport három szferoidot tartalmazott. A szferoidokat TouPCam XW 3MP mikroszkópkamerával fényképeztük a kezelés első és hatodik napján. A képeket az ImageJ szoftver segítségével elemeztük, egy erre a célra kialakított script segítségével, amely a szferoidok 2D-s vetületeinek területét méri. Az eredményeket manuálisan felülvizsgáltuk, és a vetületekből mért területértékek segítségével kiszámítottuk a szferoidok sugarát majd térfogatát a $V=4/3 \times \pi \times \text{sugár}^3$ képlet segítségével. A bemutatott adatok három független kísérlet eredményei.

In vivo kísérletek

Az *in vivo* kísérletekhez a H358 és az SW1573 humán tüdő-adenokarcinóma sejteket (5×10^6 , illetve 1×10^6 darab/állat mennyiségben) 28-28 nőtény SCID (súlyos kombinált immunhiányos) egerekbe injektáltuk szubkután xenograft tumorok létrehozásához. A sejteket 200 µl DMEM:Matrigel (Corning, Corning, NY, USA) keverékben (arány 1:1) adtuk be az előzetes kísérletek mérései alapján. Amikor a tumorok elérték a kb. 100 mm³-es nagyságot (H358: 7 nappal, SW1573: 26 nappal az injekció beadása után), az állatokat randomizáltuk (7 állat/csoport), és hétvégék kivételével naponta intraperitoneálisan kezeltük őket. A gyógyszereket 60% DPBS-ben, 34% PEG300-ban (polietilén-glikol), 5% DMSO-ban

3. TÁBLÁZAT. AMG510/szotoraszib és tipifarnib inhibitorok kombinációjának hatása *in vitro* KRAS G12C-mutáns emberi daganatsejtvonalakon

H358 életképesség	0 nM AMG510			10 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			H358 Kombinációs Index	10 nM AMG510	25 nM AMG510	50 nM AMG510
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,60	0,04	3	0,35	0,03	3	0,20	0,04	3	0,645	0,902	0,928	
50 nM tipifarnib	0,78	0,04	3	0,47	0,03	3	0,32	0,01	3	0,19	0,01	3	0,575	0,784	0,895	
100 nM tipifarnib	0,74	0,08	3	0,43	0,03	3	0,29	0,02	3	0,18	0,01	3	0,371	0,542	0,653	
500 nM tipifarnib	0,61	0,02	2	0,31	0,04	2	0,21	0,02	2	0,14	0,02	2				

H1792 életképesség	0 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			H1792 Kombinációs Index	25 nM AMG510	50 nM AMG510	100 nM AMG510
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 μ M tipifarnib	1,00	0,00	2	0,79	0,05	2	0,64	0,01	2	0,68	0,05	2	0,337	0,075	0,091	
1 μ M tipifarnib	0,20	0,03	2	0,15	0,00	2	0,10	0,02	2	0,11	0,02	2	0,201	0,208	0,224	
2 μ M tipifarnib	0,16	0,01	2	0,11	0,01	2	0,11	0,03	2	0,11	0,04	2	0,247	0,289	0,171	
4 μ M tipifarnib	0,14	0,05	2	0,10	0,02	2	0,10	0,02	2	0,09	0,01	2				

PF139 életképesség	0 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			500 nM AMG510			PF139 Kombinációs Index	50 nM AMG510	100 nM AMG510	500 nM AMG510
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	4	0,84	0,03	4	0,81	0,04	4	0,73	0,01	4	0,767	0,384	0,391	
100 nM tipifarnib	0,84	0,10	4	0,77	0,17	4	0,69	0,12	4	0,62	0,13	4	0,548	0,517	0,403	
500 nM tipifarnib	0,64	0,07	4	0,54	0,07	4	0,53	0,06	4	0,48	0,08	4	0,709	0,761	0,621	
1000 nM tipifarnib	0,53	0,01	3	0,47	0,04	3	0,48	0,04	3	0,44	0,04	3				

SW1573 életképesség	0 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			500 nM AMG510			SW1573 Kombinációs Index	50 nM AMG510	100 nM AMG510	500 nM AMG510
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,90	0,05	3	0,87	0,03	3	0,77	0,06	3	0,601	0,621	0,621	
10 nM tipifarnib	0,67	0,04	3	0,40	0,06	3	0,38	0,05	3	0,33	0,05	3	0,692	0,706	0,731	
25 nM tipifarnib	0,52	0,04	3	0,31	0,04	3	0,29	0,04	3	0,27	0,06	3	0,737	0,754	0,774	
50 nM tipifarnib	0,43	0,03	3	0,26	0,03	3	0,25	0,03	3	0,23	0,04	3				

3. TÁBLÁZAT. AMG510/szotoraszib és tipifarnib inhibitorok kombinációjának hatása *in vitro* KRAS G12C-mutáns emberi daganatsejtvonalakon (folytatás)

PF97 életképesség	0 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			500 nM AMG510			PF97 Kombinációs Index	50 nM AMG510	100 nM AMG510	500 nM AMG510
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,42	0,15	3	0,36	0,13	3	0,36	0,15	3	0,713	0,099	0,083	
100 nM tipifarnib	0,77	0,10	3	0,39	0,11	3	0,34	0,08	3	0,31	0,10	3	0,067	0,03	0,061	
500 nM tipifarnib	0,63	0,08	3	0,34	0,08	3	0,31	0,08	3	0,30	0,09	3	0,043	0,024	0,03	
1000 nM tipifarnib	0,62	0,08	3	0,31	0,07	3	0,28	0,09	3	0,27	0,06	3				

MIAPACA2 életképesség	0 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			MIAPACA2 Kombinációs Index	25 nM AMG510	50 nM AMG510	100 nM AMG510
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,75	0,16	3	0,58	0,15	3	0,44	0,11	3	0,675	0,545	0,494	
5 nM tipifarnib	0,53	0,19	3	0,38	0,18	3	0,30	0,12	3	0,21	0,07	3	0,494	0,437	0,424	
10 nM tipifarnib	0,38	0,13	3	0,25	0,10	3	0,21	0,07	3	0,16	0,04	3	0,53	0,516	0,522	
25 nM tipifarnib	0,26	0,06	3	0,17	0,06	3	0,15	0,04	3	0,13	0,03	3				

Tüdőrák: H358, H1792, PF139, SW1573, kolorektális rák: PF97, hasnyálmirigy: MIAPACA2. A bal oldalon a 6 napos *in vitro* 2D életképességi tesztek eredményei láthatók (relatív életképesség átlaga, SD, N), a jobb oldali táblázatok a hozzájuk tartozó Kombinációs Index értékeket mutatják (1 feletti Kombinációs Index értékek antagonista, 1 körüli értékek additív, 1 alatti értékek szinergista hatóanyag-kölcsönhatást jeleznek)

és 1% Tween80-ban oldottuk be. A H358 xenograftokat 5 mg/kg AMG510; 40 mg/kg tipifarnib, míg az SW1573 xenograftokat 25 mg/kg AMG510 és 40 mg/kg tipifarnib kezelésben részesítették. A kontrollok vivőanyagot kaptak. A bőr alatti tumorokat mérőkaliperrel mértük, és a tumor térfogatát a $V = (\text{hossz} \times \text{szélesség}^2) \times \pi / 6$ képlettel számoltuk ki, és mm³-ben fejeztük ki. A H358-kísérletet 18 nap után, az SW1573-at pedig 25 napos kezelés után fejeztük be. A tumorok tömegét a kísérlet terminálását követően megmértük.

A 56 nőstény SCID egér a KINETO Lab állatházából származott (engedélyszám: PEI-001-1715-2/2015, 24/07/2015). Az állatkísérleteket a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU Európai Parlamenti és Európai Tanács által előírt irányelveinek megfelelően végeztük. Engedélyszám: PE/EA/401-7/2020, 23/04/2020. Az egerek egészségi állapotát a KINETO Lab állatházi személyzete monitorozta.

EREDMÉNYEK

G12C-mutáns daganatsejtvonalak

Emberi KRAS G12C-mutáns tüdőrák- (H358, H1792, PF139, SW1573), vastagbélrák- (PF97) és hasnyálmirigy- (MIAPACA2) sejtvonalak felhasználásával teszteltük a G12C-inhibitor szotoraszib/AMG510 és a farnezil-transzferáz-inhibitor tipifarnib mono- és kombinációs terápia *in vitro* hatékonyságát 2D sejtenyészeteken. A sejtvonalak különböző mértékű érzékenységet mutattak mind a szotoraszib, mind a tipifarnib iránt, azonban a kombinált kezelések minden esetben hatékonyabbak voltak, és a számítások szerint a hatások szinergisztikusnak bizonyultak (nem egyszerűen additív) (3. táblázat). A kísérletet megismételtük a G12C-mutáns tüdőrák sejtvonalakon úgy, hogy FTI-ként a lonafarnib inhibitor használtuk, és ez esetben is azt tapasztaltuk, hogy a monoterápiák hatásosan gátolták a tüdőráksejtek szaporodását, azonban a két szer kombinációja (G12C-inhibitor szotoraszib és a lonafarnib) sokkal hatékonyabbnak bizonyult és a hatás szinergisztikus volt (4. táblázat). A következőkben *in vitro* 3D tüdőrákmodell (szferoid) használtunk a G12C-inhibitor szotoraszib és a tipifarnib daganatellenes hatásainak elemzésére. Ezek a tesztek is azt igazolták, hogy a két szernek monoterápiában daganatgátló hatása van, azonban együttes alkalmazásuk a leghatékonyabb, és a hatás ez esetben is szinergisztikus (5. táblázat).

Gyakran előfordul, hogy egy daganatgátló szer *in vitro* hatékony, de különböző okoknál fogva *in vivo* körülmények között nem hatékony. Ezért SCID egér xenograft modelljén két G12C-mutáns daganatsejtvonal felhasználásával elemeztük a szotoraszib és a tipifarnib monoterápiás és kombinációs hatásait. A H358 sejtvonal kvázi érzékeny, míg az SW1573 rezisztens a G12C-inhibitorral szemben, ezért sokkal nagyobb dózist kellett alkalmazni. Mindkét sejtvonal esetében azt láttuk, hogy a monoterápiák mérsékelten hatékony daganatgátló hatásúak, azonban a kombinációs kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak *in vivo* körülmények között is

4. TÁBLÁZAT. AMG510/szotoraszib és lonafarnib inhibitorok kombinációjának szinergista tumorellenes hatásai KRAS G12C-mutációt hordozó dagantsejtvonalakon *in vitro*

H358 életképesség	0 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			H358 Kombinációs Index	25 nM AMG510	50 nM AMG510	100 nM AMG510
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,28	0,04	3	0,15	0,02	3	0,07	0,01	3	250 nM lonafarnib	0,699	0,788	0,828
250 nM lonafarnib	0,57	0,09	3	0,20	0,03	3	0,12	0,01	3	0,06	0,00	3	500 nM lonafarnib	0,659	0,748	0,856
500 nM lonafarnib	0,50	0,09	3	0,18	0,02	3	0,11	0,01	3	0,06	0,01	3	1000 nM lonafarnib	0,556	0,627	0,742
1000 nM lonafarnib	0,40	0,05	3	0,15	0,00	3	0,09	0,00	3	0,05	0,02	3				
H1792 életképesség	0 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			H1792 Kombinációs Index	25 nM AMG510	50 nM AMG510	100 nM AMG510
átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N					
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,76	0,04	3	0,72	0,06	3	0,69	0,09	3	250 nM lonafarnib	0,764	0,72	0,658
250 nM lonafarnib	0,24	0,03	3	0,22	0,02	3	0,21	0,02	3	0,21	0,02	3	500 nM lonafarnib	0,757	0,811	0,645
500 nM lonafarnib	0,19	0,03	3	0,17	0,02	3	0,18	0,03	3	0,16	0,03	3	1000 nM lonafarnib	0,653	0,507	0,472
1000 nM lonafarnib	0,15	0,04	3	0,13	0,02	3	0,12	0,01	3	0,12	0,02	3				
PF139 életképesség	0 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			PF139 Kombinációs Index	25 nM AMG510	50 nM AMG510	100 nM AMG510
átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N					
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,73	0,07	3	0,62	0,04	3	0,56	0,03	3	250 nM lonafarnib	0,544	0,494	0,745
250 nM lonafarnib	0,92	0,14	3	0,60	0,10	3	0,51	0,08	3	0,49	0,05	3	500 nM lonafarnib	0,523	0,443	0,592
500 nM lonafarnib	0,88	0,04	3	0,54	0,07	3	0,44	0,08	3	0,42	0,06	3	1000 nM lonafarnib	0,563	0,482	0,564
1000 nM lonafarnib	0,65	0,11	3	0,44	0,08	3	0,37	0,06	3	0,35	0,07	3				
SW1573 életképesség	0 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			100 nM AMG510			SW1573 Kombinációs Index	25 nM AMG510	50 nM AMG510	100 nM AMG510
átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N					
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,88	0,06	3	0,86	0,10	3	0,86	0,06	3	250 nM lonafarnib	0,107	0,092	0,098
250 nM lonafarnib	0,56	0,08	3	0,36	0,08	3	0,35	0,07	3	0,35	0,07	3	500 nM lonafarnib	0,114	0,09	0,095
500 nM lonafarnib	0,50	0,08	3	0,31	0,07	3	0,29	0,07	3	0,29	0,07	3	1000 nM lonafarnib	0,144	0,162	0,129
1000 nM lonafarnib	0,43	0,09	3	0,27	0,07	3	0,28	0,06	3	0,26	0,06	3				

Tüdőráksejtvonalak: H358, H1792, PF139, SW1573. A bal oldalon a 6 napos 2D életképességi tesztek eredményei láthatók (relatív életképesség átlaga, SD, N), a jobb oldali táblázatok a hozzájuk tartozó Kombinációs Index értékeket mutatják (1 feletti Kombinációs Index értékek antagonisták, 1 körüli értékek additív, 1 alatti értékek szinergista hatóanyag-kölcsönhatást jeleznek)

5. TÁBLÁZAT. AMG510/szotoraszib és tipifarnib inhibitorok kombinációjának szinergista tumorelles hatáskai 3D szferoid *in vitro* sejtmodeliben

H358 életképesség	0 nM AMG510			10 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			H358 Kombinációs Index	10 nM AMG510	25 nM AMG510	50 nM AMG510
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,29	0,02	3	0,14	0,02	3	0,10	0,01	3	50 nM tipifarnib	0,313	0,295	0,188
100 nM tipifarnib	0,49	0,06	3	0,13	0,03	3	0,06	0,02	3	0,03	0,01	3	100 nM tipifarnib	0,238	0,182	0,179
500 nM tipifarnib	0,35	0,01	3	0,11	0,02	3	0,04	0,01	3	0,02	0,01	3	500 nM tipifarnib	0,172	0,117	0,206
1000 nM tipifarnib	0,33	0,01	3	0,08	0,02	3	0,03	0,01	3	0,03	0,03	3				
H1792 életképesség	0 nM AMG510			10 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			H1792 Kombinációs Index	10 nM AMG510	25 nM AMG510	50 nM AMG510
átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N					
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,87	0,17	3	0,80	0,15	3	0,67	0,14	3	1 µM tipifarnib	0,277	0,389	0,461
100 nM tipifarnib	0,50	0,15	3	0,41	0,11	3	0,42	0,11	3	0,41	0,09	3	2 µM tipifarnib	0,263	0,26	0,354
500 nM tipifarnib	0,39	0,11	3	0,33	0,07	3	0,32	0,06	3	0,33	0,10	3	4 µM tipifarnib	0,681	0,201	0,257
1000 nM tipifarnib	0,38	0,12	3	0,34	0,07	3	0,27	0,08	3	0,28	0,04	3				
PF139 életképesség	0 nM AMG510			10 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			PF139 Kombinációs Index	10 nM AMG510	25 nM AMG510	50 nM AMG510
átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N					
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,82	0,05	3	0,75	0,02	3	0,73	0,09	3	100 nM tipifarnib	0,278	0,058	0,033
100 nM tipifarnib	0,74	0,08	3	0,62	0,08	3	0,46	0,15	3	0,39	0,07	3	500 nM tipifarnib	0,115	0,056	0,084
500 nM tipifarnib	0,60	0,03	3	0,41	0,04	3	0,35	0,07	3	0,37	0,09	3	1000 nM tipifarnib	0,061	0,056	0,101
1000 nM tipifarnib	0,55	0,07	3	0,30	0,08	3	0,29	0,06	3	0,34	0,07	3				
SW1573 életképesség	0 nM AMG510			10 nM AMG510			25 nM AMG510			50 nM AMG510			SW1573 Kombinációs Index	10 nM AMG510	25 nM AMG510	50 nM AMG510
átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N					
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,85	0,01	3	0,69	0,09	3	0,60	0,11	3	10 nM tipifarnib	0,351	0,391	0,461
100 nM tipifarnib	0,78	0,04	3	0,60	0,06	3	0,51	0,04	3	0,42	0,05	3	25 nM tipifarnib	0,347	0,225	0,298
500 nM tipifarnib	0,68	0,09	3	0,47	0,07	3	0,35	0,05	3	0,31	0,03	3	50 nM tipifarnib	0,276	0,143	0,284
1000 nM tipifarnib	0,53	0,03	3	0,37	0,05	3	0,25	0,01	3	0,28	0,04	3				

KRAS G12C mutációt hordozó tüdőráksejtvonalak: H358, H1792, PF139, SW1573. A bal oldalon a 6 napos szferoid életképességi tesztek eredményei láthatók (relatív szferoidméret átlaga, SD, N), a jobb oldali táblázatok a hozzájuk tartozó Kombinációs Index értékeket mutatják (1 feletti Kombinációs Index értékek antagonista, 1 körüli értékek szinergista hatóanyag-kölcsönhatást jeleznek)

6. TÁBLÁZAT. AMG510/szotoraszib és tipifarnib inhibitorok kombinációjának tumorelles hatásai *in vivo* xenograft tüdőrákmodellekben

Tumortömeg (g)					Tumortömeg (g)				
H358	kontroll	AMG510	tipifarnib	AMG+TIPI	SW1573	kontroll	AMG510	tipifarnib	AMG+TIPI
1	0,466	0,053	0,182	0,144	1	0,351	0,1025	0,5323	0,0318
2	0,612	0,559	1,599	0,038	2	0,76	n.a.	0,2277	0,4871
3	0,242	0,038	1,023	0,027	3	n.a.	0,7238	0,3143	0,4632
4	0,403	0,157	0,223	0,021	4	0,6163	0,2227	n.a.	0,266
5	0,445	n.a.	0,225	0,029	5	1,377	0,144	0,2239	0,1962
6	0,459	0,254	0,205	0,036	6	0,7105	0,5804	0,2604	0,1802
7	0,389	0,029	0,239	0,234	7	0,1855	0,4184	1,2243	0,0455
átlag	0,430857143	0,1816667	0,528	0,0755714	átlag	0,666716667	0,3653	0,4638167	0,2385714
SD	0,110479906	0,2043151	0,5604263	0,0819204	SD	0,412045995	0,251389	0,3898896	0,1817555
N	7	6	7	7	N	6	6	6	7

KRAS G12C mutációt hordozó tüdő-tumor-sejtvonalak: H358, SW1573. Mindkét tumormodell esetén a kombinációs kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak. A kezelés naponta (hétfő kivételével), ip. történt, 40 mg/ttkg tipifarnib-, illetve 5 mg/ttkg (H358) és 25 mg/ttkg (SW1573) AMG510-dózisokkal

(6. táblázat). Felmerülhet, hogy a kombinációs kezelés esetleg toxikus mellékhatású lehet, de az egerek testsúlyvesztése 5–10% körül mozgott, és a kombinációs kezelések esetében sem fokozódott. Továbbmenve, a kísérlet terminálásakor szövettani vizsgálatra kerülő máj és vese patológiai vizsgálata nem mutatott eltéréseket, ami arra utal, hogy a két fontos szerv, amely G12C-inhibitorok vagy FTI-k klinikai alkalmazása során toxikus mellékhatásokat szenvedhet, a kísérleti rendszerben nem volt érintett.

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy az FTI és G12C-inhibitor daganatellenes hatásainak potenciózása általános érvényű, vagy csak a szotoraszibra érvényes, ezért egy másik klinikailag használt G12C-inhibitor, az adagraszib hatásait is megvizsgáltuk G12C-mutáns emberi tüdőrák (PF139, SW1573), vastagbélrák- (PF97) és hasnyálmirigyrák- (MIAPACA2) sejtvonalakon *in vitro*. Eredményeink szerint a tipifarnib az adagraszib daganatellenes hatását is potenciózni volt képes, és ezen esetben is szinergista hatásának bizonyult (7. táblázat). A potenciózó hatás nem bizonyult specifikusnak a tipifarnibra, mert amikor az adagraszibet egy másik FTI-vel, a lonafarnibbal kombináltuk *in vitro* körülmények között, az FTI ezen esetben is potenciózta a G12C-inhibitor adagraszib daganatellenes hatását (7. táblázat).

G12D-mutáns daganatsejtvonalak

A továbbiakban azt teszteltük, hogy az FTI-k mutáns KRAS-t hordozó daganatokban észlelt gátló hatásai mutációspecifikusak-e, ezért G12D-mutáns emberi daganatsejtvonalat is teszteltünk *in vitro* (SW1990 hasnyálmirigyrák), ahol KRAS-inhibitoroként az MRTX1133-at alkalmaztuk. A tipifarnib mérsékelt daganatellenes hatásának bizonyult ezen sejtvonal

esetében, míg az MRTX1133 igen aktív volt, de a két szer kombinációja bizonyult a leghatékonyabbnak, és a hatás ismételt szinergikus volt számításaink szerint (8. táblázat). Ezek után a G12D-inhibitor MRTX1133 hatását a másik FTI, a lonafarnib is sikeresen potenciózta kombinációban a G12D-mutáns hasnyálmirigyrák-sejtvonalon (8. táblázat).

Más típusú KRAS-mutáns sejtvonalak

Az irodalomban már leírtak ún. pan-KRAS-inhibitorokat, melyek közül a BI-2852-t teszteltük különféle KRAS-mutációt hordozó emberi daganatsejtvonalakon *in vitro*, és elemeztük a BI+tipifarnib kombináció hatásosságát. A kísérletekben G12C-mutáns (SW1573), G12D-mutáns (SW1990), G12V-mutáns (SW480), G12S-mutáns (A549) és G13D-mutáns (HCT116) sejtvonalakat használtunk. *In vitro* adataink szerint az FTI változó, általában mérsékelt daganatellenes hatást mutatott monoterápiában, azonban a BI-2852-vel történő kombináció potenciózta a pan-KRAS-inhibitor hatását mindegyik esetben (9. táblázat). Ebben az esetben is igazolódt, hogy a pan-KRAS-inhibitor hatását a másik FTI, a lonafarnib is képes volt potenciózni a vizsgált, változatos típusú KRAS-mutációt hordozó daganatsejtvonalakon (9. táblázat).

MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt évek talán legnagyobb horderejű eredménye a kísérletes és klinikai rákkutatásban az, hogy az eddig „non-druggable”, nem célozható KRAS-mutáns onkogénről kiderült, hogy mégis válhat belőle kiváló célzott terápiás célpont, és az első törzskönyvezett gyógyszerek már beléptek a klinikumba, még ha meglehetősen szűk indikációs körben is (KRAS G12C-mutáns tüdő-adenokarcinóma) (4, 5). Mint minden más

7. TÁBLÁZAT. MRTX849/adagraszib és farnezil-transzferáz-inhibitorok (tipifarnib, lonafarnib) kombinációjának tumorelles hatáσαι KRAS G12C mutációt hordozó deganatsjtvonalakon *in vitro*

PF97 életképesség	0 nM MRTX849			25 nM MRTX849			100 nM MRTX849			500 nM MRTX849			PF97 Kombinációs Index MRTX849	25 nM MRTX849	100 nM MRTX849	500 nM MRTX849
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,58	0,14	3	0,47	0,16	3	0,46	0,10	3	100 nM tipifarnib	0,23	0,055	0,201
100 nM tipifarnib	0,85	0,08	3	0,49	0,11	3	0,38	0,12	3	0,38	0,13	3	500 nM tipifarnib	0,229	0,173	0,229
500 nM tipifarnib	0,73	0,12	3	0,45	0,11	3	0,40	0,09	3	0,37	0,08	3	1000 nM tipifarnib	0,213	0,144	0,14
1000 nM tipifarnib	0,58	0,03	3	0,39	0,12	3	0,33	0,11	3	0,31	0,11	3				
MIAPACA2 életképesség	0 nM MRTX849			25 nM MRTX849			50 nM MRTX849			100 nM MRTX849			MIAPACA2 Kombinációs Index MRTX849	25 nM MRTX849	50 nM MRTX849	100 nM MRTX849
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,50	0,17	3	0,38	0,15	3	0,29	0,10	3	5 nM tipifarnib	0,402	0,398	0,476
5 nM tipifarnib	0,50	0,18	3	0,25	0,12	3	0,20	0,08	3	0,17	0,06	3	10 nM tipifarnib	0,307	0,387	0,437
10 nM tipifarnib	0,37	0,10	3	0,17	0,05	3	0,17	0,06	3	0,15	0,05	3	25 nM tipifarnib	0,469	0,5	0,573
25 nM tipifarnib	0,25	0,07	3	0,14	0,05	3	0,14	0,05	3	0,13	0,04	3				
SW1573 életképesség	0 nM MRTX849			10 nM MRTX849			25 nM MRTX849			100 nM MRTX849			SW1573 Kombinációs Index MRTX849	10 nM MRTX849	25 nM MRTX849	100 nM MRTX849
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,85	0,06	3	0,77	0,06	3	0,67	0,04	3	50 nM tipifarnib	0,129	0,093	0,11
50 nM tipifarnib	0,48	0,01	3	0,29	0,02	3	0,26	0,02	3	0,26	0,02	3	250 nM tipifarnib	0,259	0,187	0,179
250 nM tipifarnib	0,32	0,02	3	0,22	0,03	3	0,20	0,02	3	0,19	0,02	3	500 nM tipifarnib	0,354	0,279	0,248
500 nM tipifarnib	0,27	0,01	3	0,19	0,02	3	0,18	0,00	3	0,17	0,02	3				
PF97 életképesség	0 nM MRTX849			10 nM MRTX849			100 nM MRTX849			500 nM MRTX849			PF97 Kombinációs Index MRTX849	10 nM MRTX849	100 nM MRTX849	500 nM MRTX849
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,53	0,06	3	0,29	0,04	3	0,19	0,04	3	250 nM lonafarnib	0,228	0,151	0,21
250 nM lonafarnib	0,73	0,02	3	0,33	0,06	3	0,16	0,03	3	0,11	0,03	3	500 nM lonafarnib	0,152	0,081	0,114
500 nM lonafarnib	0,61	0,04	3	0,26	0,05	3	0,12	0,02	3	0,09	0,02	3	1000 nM lonafarnib	0,167	0,083	0,094
1000 nM lonafarnib	0,51	0,05	3	0,21	0,04	3	0,11	0,03	3	0,08	0,01	3				

7. TÁBLÁZAT. MRTX849/adagraszib és farnezil-transzferáz-inhibitorok (tipifarnib, lonafarnib) kombinációjának tumorelles hatáσαι KRAS G12C mutációt hordozó daganatsejtvonalonon *in vitro* [folytatás]

MIAPACA2 életképesség	0 nM MRTX849			25 nM MRTX849			50 nM MRTX849			100 nM MRTX849			MIAPACA2 Kombinációs Index MRTX849 MRTX849 MRTX849					
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	25 nM	50 nM	100 nM
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,51	0,16	3	0,38	0,11	3	0,27	0,06	3	0,27	0,06	3	0,921	0,891	0,913
25 nM lonafarnib	0,95	0,03	3	0,44	0,09	3	0,32	0,07	3	0,23	0,04	3	0,23	0,04	3	0,817	0,755	0,851
50 nM lonafarnib	0,81	0,06	3	0,35	0,08	3	0,25	0,06	3	0,20	0,04	3	0,20	0,04	3	0,817	0,755	0,851
100 nM lonafarnib	0,45	0,07	3	0,23	0,06	3	0,19	0,03	3	0,16	0,03	3	0,16	0,03	3	0,833	0,833	0,9

SW1573 életképesség	0 nM MRTX849			10 nM MRTX849			25 nM MRTX849			100 nM AMG510			SW1573 Kombinációs Index MRTX849 MRTX849 AMG510					
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	10 nM	25 nM	100 nM
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,87	0,05	3	0,79	0,05	3	0,72	0,05	3	0,72	0,05	3	0,235	0,181	0,232
50 nM lonafarnib	0,92	0,02	3	0,62	0,03	3	0,54	0,04	3	0,51	0,04	3	0,51	0,04	3	0,426	0,372	0,357
250 nM lonafarnib	0,58	0,02	3	0,37	0,03	3	0,33	0,03	3	0,32	0,04	3	0,32	0,04	3	0,703	0,639	0,595
500 nM lonafarnib	0,45	0,05	3	0,32	0,02	3	0,29	0,02	3	0,28	0,03	3	0,28	0,03	3	0,703	0,639	0,595

Tüdőrák: PF139, SW1573, colorektális rák: PF97 és hasnyálmirigyák: MIAPACA2. A bal oldalon a 6 napos 2D életképességi tesztek eredményei láthatók (relatív életképesség átlaga, SD, N), a jobb oldali táblázatok a hozzájuk tartozó Kombinációs Index értékeket mutatják (1 feletti Kombinációs Index értékek antagonisták, 1 körüli értékek additív, 1 alatti értékek szinergista hatóanyag-kölcsönhatást jeleznek)

8. TÁBLÁZAT. MRTX1133 és farnezil-transzferáz-inhibitorok (tipifarnib, lonafarnib) kombinációjának szinergista tumorelles hatáσαι KRAS G12D mutációt hordozó daganatsejtvonalonon *in vitro*

SW1990 életképesség	0 nM MRTX1133			2,5 nM MRTX1133			5 nM MRTX1133			10 nM MRTX1133			SW1990 Kombinációs Index MRTX1133 MRTX1133 MRTX1133					
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	2,5 nM	5 nM	10 nM
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,74	0,05	3	0,59	0,04	3	0,45	0,01	3	0,45	0,01	3	0,403	0,422	0,595
100 nM tipifarnib	0,80	0,05	3	0,54	0,02	3	0,41	0,05	3	0,34	0,02	3	0,34	0,02	3	0,241	0,273	0,409
500 nM tipifarnib	0,70	0,06	3	0,41	0,04	3	0,32	0,03	3	0,27	0,03	3	0,27	0,03	3	0,188	0,206	0,295
1000 nM tipifarnib	0,63	0,03	3	0,35	0,02	3	0,26	0,01	3	0,22	0,01	3	0,22	0,01	3	0,188	0,206	0,295

SW1990 életképesség	0 nM MRTX1133			2,5 nM MRTX1133			5 nM MRTX1133			10 nM MRTX1133			SW1990 Kombinációs Index MRTX1133 MRTX1133 MRTX1133					
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	2,5 nM	5 nM	10 nM
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,85	0,21	3	0,70	0,23	3	0,55	0,20	3	0,55	0,20	3	0,919	0,667	0,788
200 nM lonafarnib	0,83	0,11	3	0,74	0,19	3	0,57	0,18	3	0,46	0,16	3	0,46	0,16	3	0,625	0,594	0,567
1000 nM lonafarnib	0,65	0,05	3	0,53	0,16	3	0,46	0,16	3	0,34	0,12	3	0,34	0,12	3	0,628	0,515	0,546
2000 nM lonafarnib	0,58	0,01	3	0,45	0,17	3	0,37	0,13	3	0,31	0,10	3	0,31	0,10	3	0,628	0,515	0,546

SW1990 hasnyálmirigyák. A bal oldalon a 6 napos 2D életképességi tesztek eredményei láthatók (relatív életképesség átlaga, SD, N), a jobb oldali táblázatok a hozzájuk tartozó Kombinációs Index értékeket mutatják (1 feletti Kombinációs Index értékek antagonisták, 1 körüli értékek additív, 1 alatti értékek szinergista hatóanyag-kölcsönhatást jeleznek)

9. TÁBLÁZAT. BI-2852 és farnezil-transzferáz-inhibitorok (tipifarnib, lonafarnib) kombinációjának tumorelleses hatásai különféle KRAS-mutációt hordozó daganatsejtvonalakon *in vitro*

SW1573 életképesség	0 µM BI-2852			10 µM BI-2852			20 µM BI-2852			30 µM BI-2852			SW1573 Kombinációs Index	10 µM BI-2852	20 µM BI-2852	30 µM BI-2852
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,91	0,03	3	0,78	0,03	3	0,57	0,05	3	25 nM tipifarnib	0,6	0,571	0,615
25 nM tipifarnib	0,41	0,02	3	0,34	0,01	3	0,29	0,01	3	0,26	0,02	3	50 nM tipifarnib	0,623	0,59	0,588
50 nM tipifarnib	0,35	0,01	3	0,29	0,01	3	0,25	0,01	3	0,22	0,02	3	100 nM tipifarnib	0,68	0,678	0,597
100 nM tipifarnib	0,29	0,00	3	0,24	0,01	3	0,23	0,01	3	0,19	0,00	3				

SW1990 életképesség	0 µM BI-2852			10 µM BI-2852			20 µM BI-2852			30 µM BI-2852			SW1990 Kombinációs Index	10 µM BI-2852	20 µM BI-2852	30 µM BI-2852
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,93	0,05	3	0,86	0,08	3	0,82	0,08	3	100 nM tipifarnib	0,493	0,438	0,42
100 nM tipifarnib	0,76	0,06	3	0,68	0,08	3	0,63	0,06	3	0,58	0,09	3	500 nM tipifarnib	0,539	0,433	0,425
500 nM tipifarnib	0,67	0,04	3	0,56	0,05	3	0,52	0,06	3	0,49	0,05	3	1000 nM tipifarnib	0,581	0,543	0,435
1000 nM tipifarnib	0,55	0,04	3	0,51	0,04	3	0,49	0,03	3	0,44	0,05	3				

SW480 életképesség	0 µM BI-2852			5 µM BI-2852			10 µM BI-2852			15 µM BI-2852			SW480 Kombinációs Index	5 µM BI-2852	10 µM BI-2852	15 µM BI-2852
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,93	0,08	3	0,75	0,20	3	0,54	0,29	3	100 nM tipifarnib	0,692	0,589	0,584
100 nM tipifarnib	0,57	0,23	3	0,48	0,18	3	0,36	0,09	3	0,24	0,03	3	500 nM tipifarnib	0,653	0,499	0,496
500 nM tipifarnib	0,43	0,21	3	0,34	0,14	3	0,24	0,05	3	0,17	0,02	3	1000 nM tipifarnib	0,539	0,451	0,436
1000 nM tipifarnib	0,35	0,16	3	0,27	0,09	3	0,20	0,03	3	0,13	0,02	3				

A549 életképesség	0 µM BI-2852			20 µM BI-2852			30 µM BI-2852			40 µM BI-2852			A549 Kombinációs Index	20 µM BI-2852	30 µM BI-2852	40 µM BI-2852
	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N	átlag	SD	N				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,95	0,05	3	0,85	0,09	3	0,76	0,07	3	25 nM tipifarnib	0,551	0,591	0,667
25 nM tipifarnib	0,62	0,01	2	0,43	0,06	2	0,38	0,08	2	0,34	0,06	2	50 nM tipifarnib	0,682	0,711	0,74
50 nM tipifarnib	0,53	0,03	3	0,40	0,08	3	0,36	0,09	3	0,32	0,06	3	100 nM tipifarnib	0,756	0,736	0,713
100 nM tipifarnib	0,43	0,04	3	0,34	0,05	3	0,30	0,05	3	0,26	0,04	3				

9. TÁBLÁZAT. BI-2852 és farnezil-transzferáz-inhibitorok (tipifarnib, lonafarnib) kombinációjának tumorelles hatáskülönféle KRAS-mutációt hordozó daganatsejtvonalakon *in vitro* (folytatás)

HCT116 életképesség	0 µM BI-2852		10 µM BI-2852		20 µM BI-2852		30 µM BI-2852		HCT116 Kombinációs Index	10 µM BI-2852	20 µM BI-2852	30 µM BI-2852
	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD				
0 nM tipifarnib	1,00	0,00	3	0,85	0,04	3	0,71	0,05	3	0,59	0,04	3
25 nM tipifarnib	0,58	0,03	2	0,49	0,02	2	0,45	0,02	2	0,41	0,04	2
50 nM tipifarnib	0,51	0,03	3	0,44	0,07	3	0,41	0,04	3	0,39	0,04	3
100 nM tipifarnib	0,43	0,06	3	0,34	0,06	3	0,33	0,04	3	0,30	0,04	3

SW480 életképesség	0 µM BI-2852		15 µM BI-2852		20 µM BI-2852		30 µM BI-2852		SW480 Kombinációs Index	15 µM BI-2852	20 µM BI-2852	30 µM BI-2852
	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD				
0 nM lonafarnib	1,00	0,00	3	0,81	0,05	3	0,67	0,10	3	0,39	0,09	3
500 nM lonafarnib	0,72	0,06	3	0,58	0,07	3	0,49	0,08	3	0,28	0,06	3
1000 nM lonafarnib	0,64	0,06	3	0,51	0,08	3	0,41	0,06	3	0,25	0,05	3
2000 nM lonafarnib	0,56	0,08	3	0,40	0,07	3	0,32	0,07	3	0,19	0,05	3

G12C-mutáns sejtvonal: SW1573, G12D-mutáns sejtvonal: SW1990, G12V-mutáns sejtvonal: SW480, G12S-mutáns sejtvonal: A549, G13D-mutáns sejtvonal: HCT116. A bal oldalon a 6 napos 2D életképességi tesztek eredményei láthatók (relatív életképesség átlaga, SD, N), a jobb oldali táblázatok a hozzájuk tartozó Kombinációs Index értékeket mutatják (1 feletti Kombinációs Index értékek antagonista, 1 körüli értékek additív, 1 alatti értékek szinergista hatást jeleznek)

célzott terápiás szer esetében, a rezisztencia kialakulása sajnos gyakori, és igen sokrétű genetikai változáson alapul (6). Másrészt ezen inhibitorok, hasonlóan más célzott gyógyszerekhez (mint pl. a BRAF-inhibitorok), önmagukban nem elég hatékonyak, ezért számos különféle kombinációs lehetőséget tesztelnek klinikailag, így az immunellenőrzőpont-gátlókkal, a MEK-inhibitorokkal vagy az anti-EGFR antitestekkel (15).

Az FTI-k sok évtizedes kálváriája végre megszülte első gyümölcsét, amihez az kellett, hogy megértsük, a KRAS vagy NRAS, bár farnezilált fehérjék, de van alternatív prenilációs mechanizmusuk, ezért ellenük az FTI-k hatástalanok. Ugyanakkor kiderült, hogy a HRAS esetében ez nem működik, így az FTI-k első daganatos indikációi a HRAS-mutáns daganatok lettek (fej-nyaki rákok vagy húgyhólyagrak) (12, 14).

Korábban a biszfoszfonátokról derült ki, hogy a csontáttétekben való hatékonyságuk nemcsak az oszteoklasztgátláson alapul, hanem direkt antitumorális hatásúak, aminek lehetséges oka e gyógyszer-család prenilációgátló képessége. Kimutattuk, hogy kísérleti rendszerekben a biszfoszfonát direkt gátolja a (vad) KRAS-sal rendelkező tüdőrákokat *in vitro* és *in vivo*, csontáttétektől függetlenül (16). Egy nagyobb klinikai anyagon hazai szerzők kimutatták, hogy a csontáttétes tüdőrákok esetében a biszfoszfonátok igen hatékonyak, de főleg a vad KRAS-t hordozó esetekben, bár valamiféle hatékonyság a mutáns KRAS-t hordozó daganatokban is jelen volt (17). *In silico* elemzéseink során azt találtuk, hogy a különféle prenilációgátló szerek közül az FTI-k *in vitro* aktívak olyan daganatsejtvonalakon, amelyek mutáns KRAS-t hordoznak (18).

Ezen megfigyeléseink alapján szisztematikusan vizsgáltuk a KRAS-mutáns emberi daganatsejtvonalakat, hogy a klinikailag elérhető vagy kísérleti stádiumban lévő KRAS-inhibitorok hatását lehetséges-e potenciózni FTI-ekkel. Helyzetünket megkönnyítette, hogy már két FTI-t is törzskönyveztek, a tipifarnibot és a lonafarnibot. Vizsgálataink kimutatták, hogy a KRAS G12C-inhibitorok igen hatékonyan potenciózzák a két törzskönyvezett inhibitor (szotoraszib és adagraszib) hatását *in vitro* és *in vivo* preklinikai modellekben. Ezen eredményeinken felbátorodva egy G12D-inhibitor (MRTX1133) hatását is elemeztük, és hasonlóan biztató kísérleti eredményeket kaptunk. Végül, felhasználva egy fejlesztés alatt álló pan-RAS-inhibitor (BI-2852) megmutattuk, hogy G12V-, G12S- vagy G13D-mutáns daganatsejtvonalakon is hatékony az FTI-ekkel történő kombináció.

Joggal merül fel a kérdés, hogy mi lehet a patomechanizmusa ennek a jótékony hatásnak, ha a KRAS rezisztens a farnezil-transzferázokkal szemben? Az egyik lehetséges magyarázat, hogy számos olyan kulcsfontosságú fehérje működik a daganatokban, melyek farnezilálódnak, mint pl. a lipidkináz-útvonalban a RHEB

(19), vagy a sejtosztódásban kulcsszereplő lamin A. De talán a legérdekesebb az a megfigyelésünk volt, hogy kiderült, a G12C-mutáns daganatokban, amikor ezeket G12C-inhibitorokkal kezelik, mintegy kompenzatorikusan felülregulálódik a vad HRAS (mintegy átvéve a kieső KRAS fehérje szerepét). Ha a HRAS-t kiütjük a daganatsejtekben, akkor az FTI-k potenciózó hatása megszűnik (nem közölt adat).

Ezen megfigyeléseink mind arra mutatnak, hogy a mutáns KRAS inhibitorainak klinikai hatékonyságát FTI-k együttes adagolásával potenciózni lehet, egy kicsit a BRAF-inhibitorok MEK-inhibitorokkal történő kombinációjához hasonlóan.

Véleményünk szerint az általunk felfedezett gyógyszer- kölcsönhatás a mutáns KRAS inhibitorai és az FTI-k között új utat nyithat a RAS-mutáns daganatok klinikai vizsgálatában.

IRODALOM

1. Tímár J, Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev* 39:1029–1033, 2020
2. Moore AR, Rosenberg SC, McCormick F, Malek S. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat Rev Drug Discov* 19:533–552, 2020
3. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, et al. KRAS(G12C) inhibition with sotorasib in advanced solid tumors. *N Engl J Med* 383:1207–1217, 2020
4. Nakajima EC, Drezner N, Li X, et al. FDA approval summary: sotorasib for KRAS G12C-mutated metastatic NSCLC. *Clin Cancer Res* 28:1482–1486, 2022
5. Janne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, et al. Adagrasib in non-small cell lung cancer harboring a KRASG12C mutation. *N Engl J Med* 387:120–131, 2022
6. Dunnett-Kane V, Nicola P, Blackhall F, et al. Mechanisms of resistance to KRAS(G12C) inhibitors. *Cancers* 13:151, 2021
7. Nagasaka M, Potugai B, Nguyen A, et al. KRAS inhibitors – yes but what next? Direct targeting of KRAS – vaccines, adoptive T cell therapy and beyond. *Cancer Treat Rev* 101:102309, 2021
8. Wang X, Allen S, Blake JF, et al. Identification of MRTX1133, a noncovalent, potent, and selective KRAS(G12D) inhibitor. *J Med Chem* 65:3123–3133, 2021
9. Hoffmann MH, Galah D, Misale S, et al. Expanding the reach of precision oncology by drugging all KRAS mutants. *Cancer Discov* 12:924–937, 2022
10. Tran TH, Alexander P, Dharmiah S, et al. The small molecule BI-2852 induces a nonfunctional dimer of KRAS. *Proc Natl Acad Sci USA* 117:3363–3364, 2020
11. Hillig RC, Santier B, Schroeder J, et al. Discovery of potent SOS1 inhibitors that block RAS activation via disruption of the RAS-SOS1 interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:2551–2560, 2019
12. Ho AL, Brana I, Haddad R, et al. Tipifarnib in head and neck squamous cell carcinoma with HRAS mutations. *J Clin Oncol* 39:1856–1864, 2021
13. Dhillon S. Lonafarnib: first approval. *Drugs* 82:283–289, 2021
14. Lee HW, Sa JK, Gualberto A, et al. A phase II trial for patients with previously treated, metastatic urothelial carcinoma harboring HRAS mutation. *Clin Cancer Res* 26:5113–5119, 2020
15. Lietman CD, Johnson ML, McCormick FM, Lindsay CR. More to the RAS story: KRASG12C inhibition, resistance mechanisms and moving beyond KRASG12C. 2022 ASCO Educational Book 351333:1–13, 2022
16. Kenessey I, Kóí K, Horváth O, et al. KRAS-mutation status dependent effect of zoledronic acid in human non-small cell lung cancer preclinical models. *Oncotarget* 7:79503–79514, 2016
17. Radeckzy P, Megyesfalvi Z, László V, et al. The effects of bisphosphonate and radiation therapy in bone-metastatic lung adenocarcinoma: the impact of KRAS mutation. *Transl Lung Cancer Res* 10:675–684, 2021
18. Baranyi M, Buday L, Hegedüs B. K-RAS prenylation as a potential anti-cancer target. *Cancer Metastasis Rev* 39:127–141, 2020
19. Rittler D, Baranyi M, Molnár E, et al. The antitumor effect of lipophilic bisphosphonate BHP1222 in melanoma models: the role of the PI3K/AKT pathway and the small G protein RHEB. *Int J Mol Sci* 20:4917, 2019