

Paweł Krawczyk¹,
Elżbieta Czekajska-Chehab²,
Kamila Wojas-Krawczyk¹,
Olga Jankowska¹,
Dorota Koczkodaj³,
Andrzej Rolski¹,
Dorota Mulawka⁴,
Elżbieta Korobowicz⁴,
Janusz Milanowski¹

¹ Katedra i Klinika Pneumonologii,
Onkologii i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie

² Katedra i Zakład Radiologii Lekarskiej

³ Katedra i Zakład Genetyki Medycznej

⁴ Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej

Molekularne terapie celowane w niedrobnokomórkowym raku płuca

STRESZCZENIE

Terapie celowane działają w sposób wybiórczy na białka sygnałowe komórek nowotworowych, powodując upośledzenie ich funkcji życiowych. W niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) zastosowanie znalazły inhibitory kinaz tyrozynowych związanych z receptorem dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR): erlotynib i gefitynib. Leki te są stosowane w zaawansowanym raku płuca jako terapia drugiego lub trzeciego rzutu po niepowodzeniu pierwszorazowej chemioterapii. Cetuximab jest przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko zewnątrzkomórkowej domenie EGFR. Natomiast bewacyzumab jest przeciwciałem blokującym działanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF), powodując upośledzenie ukrwienia tkanki nowotworowej. Przeciwciała mogą być stosowane jako uzupełnienie chemioterapii oraz po jej zakończeniu. Mediana czasu życia chorych na zaawansowaną postać NDRP w wyniku stosowania bewacyzumu wyniosła po raz pierwszy w historii leczenia tego nowotworu ponad 12 miesięcy. Istnieją duże różnice w skuteczności omawianych leków w zależności od genetycznych właściwości komórek nowotworowych. Obecnie najważniejszymi badaniami molekularnymi użytecznymi w kwalifikacji chorych do terapii celowanych są: badanie immunohistochemiczne w celu wykrycia ekspresji EGFR, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, za pomocą której można wykryć amplifikację genu dla EGFR, oraz metody genetyczne zmierzające do określenia występowania mutacji *EGFR* i *K-Ras*.

Forum Medycyny Rodzinnej 2009, tom 3, nr 1, 16–26

słowa kluczowe: niedrobnokomórkowy rak płuca, terapie celowane, receptor naskórkowego czynnika wzrostu, VEGF, inhibitory kinazy tyrozynowej, przeciwciała monoklonalne

WSTĘP

Terapie celowane działają w sposób wybiórczy na białka sygnałowe komórek nowotworowych. Projektowane leki najczęściej blokują receptory komórkowe, odpowiedzialne za przekazanie sygnału do aktywacji

i podziału komórki nowotworowej, doprowadzając do jej programowanej śmierci (apoptozy). Wewnątrz komórki cząsteczki te mogą wiązać się z białkami regulującymi cykl komórkowy, wpływając na ich potencjał mitogenny. Ważna grupa leków oddziałuje

Adres do korespondencji:
dr hab. med. Paweł Krawczyk
Katedra i Klinika Pneumonologii,
Onkologii i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8, 20–950 Lublin
tel. (081) 724–42–93
faks: (081) 724–48–23
e-mail: pulm.dept@am.lublin.pl

Copyright © 2009 Via Medica
ISSN 1897–3590

z białkami sterującymi powstawanie naczyń w obrębie guza. Mechanizm działania terapii celowanych powoduje, że w odróżnieniu od konwencjonalnych cytostatyków wywołują one niewiele efektów ubocznych. Ponadto możliwy jest indywidualny dobór terapii dla chorych, którzy odniosą największą korzyść z zastosowanego leczenia w wyniku genetycznej predyspozycji komórek nowotworowych na działanie leku. Ze względu na odmienny charakter działania terapie celowane mogą być stosowane jako uzupełnienie chemioterapii lub po niepowodzeniu standardowego leczenia.

Historia badań nad terapiami celowanymi w onkologii dotyczy 20 ostatnich lat. Najszersze zastosowanie znalazły przeciwciała monoklonalne, na przykład rituximab (anty-CD20) wykorzystywany w leczeniu chłoniaka grudkowego; trastuzumab (anty-HER2/cErb2) w raku sutka oraz cetuximab (anty-EGFR) w raku jelita grubego i raku płaskonabłonkowym głowy i szyi. Drobnocząsteczkowe leki hamujące kinazę tyrozynową (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*) początkowo znalazły zastosowanie w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej oraz mięsaka podścieliska przewodu pokarmowego (imatinib — inhibitor kinazy białka bcr-abl i c-kit, Gleevec®). Trwają badania nad wykorzystaniem inhibitorów proteasomu w terapii szpiczaka plazmocytozy (bortezomib). Na etapie eksperymentów klinicznych są badania nad oligonukleotydami antysensowymi, terapiami genowymi, retinoidami, agonistami receptora Toll-podobnego typu 9 (ProMune®), immunoterapią czynną antygenami nowotworowymi, a także inhibitorami transferazy farnezylowej, metaloproteinaz, receptora dla insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF, *insulin-like growth factor*) oraz białka Ras.

Postęp w dziedzinie chemioterapii nowotworów nie wiązał się z istotnym wzrostem odsetka chorych wyleczonych z raka płuca ani z wydłużeniem czasu życia tych

pacjentów. Pięć lat od momentu postawienia diagnozy przeżywa zaledwie 10–15% chorych, a zaawansowany NDRP jest nadal niemal w 100% chorobą śmiertelną. W latach 70. XX wieku wprowadzono do leczenia NDRP związki platyny, które wydłużyły medianę przeżycia chorych z zaawansowanym NDRP do ponad 6 miesięcy w porównaniu z 4 miesiącami u chorych leczonych paliatywnie. Dwulekowe schematy oparte na cisplatynie lub karboplatynie w połączeniu z gemcytabiną, nawelbiną, docetakselem bądź paklitakselem spowodowały wydłużenie mediany życia chorych z zaawansowanym NDRP do ponad 8 miesięcy. W grupie tej zanotowano także 10-procentowy wzrost odsetka rocznych przeżyć [1]. Niewielką skuteczność posiadała także chemioterapia pooperacyjna. W badaniu *International Adjuvant Lung Cancer Trial* (IALT) wykazano, że za pomocą leczenia adjuwantowego można uzyskać wzrost odsetka chorych żyjących ponad 5 lat po zabiegu operacyjnym o około 5–10% [2]. Stwierdzono, że dotychczas stosowane leki, bez względu na schemat ich podawania, osiągnęły maksimum swojej skuteczności. Badania nad terapiami celowanymi zmierzają w kierunku opracowania leków konsolidujących efekt leczenia operacyjnego oraz możliwych do zastosowania jako leczenie drugiego lub trzeciego rzutu w celu opanowania progresji choroby występującej po chemioterapii pierwszego rzutu.

INHIBITORY KINAZ TYROZYNOWYCH W LECZENIU ZAAWANSOWANEGO NDRP

Kinazy białkowe są enzymami przeprowadzającymi reakcję fosforylacji cząsteczki białka specyficznego dla danej kinazy. Fosforylacja zwykle prowadzi do zmiany konformacji białka i, w konsekwencji, zmiany jego aktywności, zdolności do wiązania się z innymi białkami albo przemieszczenia cząsteczki w obrębie komórki. Około 30% białek podlega regulacji na tej drodze,



Mechanizm działania terapii celowanych powoduje, że w odróżnieniu od konwencjonalnych cytostatyków wywołują one niewiele efektów ubocznych

a większość szlaków metabolicznych komórki, zwłaszcza sygnalizacyjnych, angażuje enzymy z grupy kinaz białkowych. W zależności od rodzaju reszty aminokwasowej, na którą przenoszona jest grupa fosforanowa, kinazy białkowe dzieli się na kinazy serynowo-treoninowe i kinazy tyrozynowe. Kinazy tyrozynowe stanowią integralną część receptorów katalitycznych, na przykład receptorów dla czynników wzrostowych, takich jak płytkowcy (PDGF, *platelet-derived growth factor*), insulinopodobny (IGF1), naskórkowy (EGF) i śródbłonna naczyń (VEGF). Istnieje też liczna grupa cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych, takich jak kinaza Abl, src, aktywowanych przez mitageny (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*), Akt. Dysregulacja ich aktywności, na przykład w wyniku fosforylacji samych kinaz, jest częstą przyczyną chorób nowotworowych [3].

W leczeniu NDRP zastosowanie znalazły inhibitory kinaz tyrozynowych specyficznych dla EGFR. Są to drobnocząsteczkowe leki o nazwach erlotynib (Tarceva®) i gefitynib (Iressa®). Działają one wybiórczo na komórki rakowe, ale też na prawidłowe komórki nabłonkowe i naskórkowe, wykazując w związku z tym znikome działania niepożądane. Do najważniejszych skutków ubocznych należy znacznego stopnia wysypka, występująca nawet u 50% leczonych, oraz biegunki. Atrakcyjna dla pacjenta jest forma leczenia. Oba preparaty stosowane są w formie doustnych tabletek: erlotynib w dawce 25, 100 i 150 mg, a gefitynib w dawce 250 lub 500 mg.

Wyniki pierwszych badań nad skutecznością gefitynibu i erlotynibu w zaawansowanym NDRP nie były zachęcające. W próbach klinicznych, takich jak *Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment* (INTACT-1, INTACT-2), *Iressa Dose Evaluation in Lung Cancer* (IDEAL-1 i IDEAL-2) dotyczących gefitynibu oraz badaniach *Tarceva Lung cancer iNvesTigation* (TALENT) i *Tarceva Responses in Conjunction with Paclitaxel and Carboplatin* (TRIBUTE), analizujących

erlotynib, leki te zastosowano w połączeniu z chemioterapią według dwulekowego schematu: cisplatyna z gemcytabiną lub karboplatyna z paklitakselem (leczenie pierwszego rzutu). Badania te objęły w sumie ponad 6000 chorych i prowadzone były w kilkuset ośrodkach w Europie, Azji i Stanach Zjednoczonych. Efekt gefitynibu i erlotynibu w tych badaniach był porównywalny z efektem placebo (podobny odsetek odpowiedzi na stosowaną chemioterapię), a mediana czasu życia chorych leczonych TKI wahała się od 6 miesięcy (w badaniu IDEAL-2 — gefitynib 500 mg) do 10 miesięcy (w badaniu INTACT-1 — gefitynib 250 mg oraz w badaniach TALENT i TRIBUTE — erlotynib 150 mg). Niepowodzenie wymienionych badań wynikało z różnic w oddziaływaniu zastosowanych leków na komórki w różnych stadiach cyklu komórkowego. Erlotynib i gefitynib indukowały zatrzymanie komórek nowotworowych w fazie G₁ cyklu komórkowego, co blokowało fazę M i uniemożliwiało działanie pozostałych cytostatyków [4– 7].

W kolejnych badaniach skupiono się na stosowaniu TKI dla EGFR w monoterapii zaawansowanego NDRP po niepowodzeniu chemioterapii pierwszego rzutu. W badaniu *Iressa Survival Evaluation in lung* (ISEL) gefitynib (250 mg/d *p.o.*) zastosowano u 1129 chorych, a 563 otrzymywało placebo. Odsetek odpowiedzi na leczenie był wyższy w grupie otrzymującej gefitynib i wynosił 8,2%, a mediana czasu przeżycia chorych leczonych wynosiła 5,6 miesiąca vs. 5,1 miesiąca u chorych otrzymujących placebo [8].

Spektakularnym sukcesem zakończyło się badanie BR.21 dotyczące stosowania erlotynibu w doustnej dawce 150 mg u 488 chorych z zaawansowanym NDRP (placebo otrzymywało 243 pacjentów). Mediana czasu przeżycia badanych wzrosła do 6,7 miesiąca w porównaniu z 4,7 miesiąca u chorych otrzymujących placebo. Znacznie wyższy był także odsetek chorych pozostających w re-

misji przez 6 miesięcy (25% vs. 10%) [9]. Erlotynib jest pierwszym lekiem z grupy TKI, który przynosi konkretne korzyści kliniczne stosującym go chorym: wydłuża czas życia i czas wolny od progresji choroby oraz poprawia jakość życia chorych.

Uzyskane wyniki pozwoliły na rejestrację erlotynibu w leczeniu drugiego i trzeciego rzutu zaawansowanego NDRP w krajach Unii Europejskiej i Stanach Zjednoczonych. Natomiast gefitynib jest obecnie zarejestrowany tylko w niektórych krajach Azji, a w Stanach Zjednoczonych i w Szwajcarii jego zastosowanie jest ograniczone tylko do chorych, którzy obecnie lub w przeszłości odnieśli korzyści z wcześniejszego leczenia tym preparatem. Nowi chorzy mogą być leczeni gefitynibem tylko w ramach badań klinicznych. Zaznaczyć także należy, że za pomocą docetakselu i pemetreksedu — leków zarejestrowanych do stosowania w leczeniu drugiego rzutu w zaawansowanym NDRP — udało się przedłużyć medianę czasu życia chorych do ponad 8 miesięcy. Leki te charakteryzują się jednak znacznie większą toksycznością od erlotynibu, a odsetek odpowiedzi na leczenie (ok. 9%), jak również odsetek chorych żyjących dłużej niż rok (ok. 30%) są podobne w przypadku stosowania wymienionych leków oraz erlotynibu [9, 10].

Na tym etapie badań stwierdzono również, że głównym czynnikiem predykcynym, jeśli chodzi o skuteczność stosowanego leczenia, są dane dotyczące palenia tytoniu oraz płeć i rasa chorych. Leki hamujące kinazę tyrozynową dla EGFR wywierały większy efekt u osób niepalących, kobiet z rozpoznaniem histopatologicznym raka gruczołowego płuca oraz u Azjatów [9]. Porównanie wpływu czynników klinicznych na prawdopodobieństwo przeżycia chorych z zaawansowanym NDRP dokonane przez Clarka dowiodło jednak, że kobiety i chorzy na raka gruczołowego mają dłuższą medianę przeżycia niż mężczyźni i chorzy na raka płaskonabłonkowego, nawet jeśli analizy dokonuje

się w grupie otrzymującej placebo. Z badania tego wynikało, że jedynym niezależnym czynnikiem warunkującym wyższą skuteczność erlotynibu jest fakt niepalenia papierosów przez chorych [11].

Trwają badania nad możliwościami wykorzystania erlotynibu w innych sytuacjach niż tylko w zaawansowanym raku płuca jako leczenie drugiego rzutu. Niezwykle ciekawych danych dostarcza badanie *Sequential Tarceva in Unresectable NSCLC (SATURN)* — pierwsze prospektywne badanie dotyczące skuteczności erlotynibu u chorych z zaawansowanym NDRP bez progresji po zakończonej chemioterapii pierwszego rzutu. Badanie objęło 889 pacjentów z ponad 160 ośrodków na świecie. Pierwsze wyniki tego badania wskazują na znaczne wydłużenie mediany czasu bez progresji choroby u pacjentów otrzymujących erlotynib. Efekt leczenia erlotynibem można także zaobserwować u chorych w stopniu IA-IIIa po operacji NDRP (leczenie adjuwantowe). Badanie *Randomised, Double-Blind Trial in Adjuvant NSCLC with Tarceva (RADIANT)* ma na celu wykazanie wpływu erlotynibu na obniżenie ryzyka nawrotu choroby po zabiegu chirurgicznym. W badaniu *Surgery for Early Lung Cancer with Preoperative Erlotinib (Tarceva) (SELECT)* erlotynib wykorzystywany jest jako terapia neoadjuwantowa. Istnieje także możliwość podawania TKI w monoterapii u chorych na NDRP w podeszłym wieku, którzy nie mogą być leczeni cytostatykami [12].

BADANIA MOLEKULARNE W KWALIFIKACJI CHORYCH NA NDRP DO LECZENIA ZA POMOCĄ TKI

Skuteczność leczenia TKI związanej z EGFR może zależeć do kilku czynników. Najbardziej logiczny wydaje się związek między występowaniem nadmiernej ekspresji EGFR na powierzchni komórek nowotworowych a efektem leczenia erlotynibem i gefitynibem. Ponad 50% chorych wykazuje silną ekspresję EGFR w ponad 10% komórek. Niestety, gen



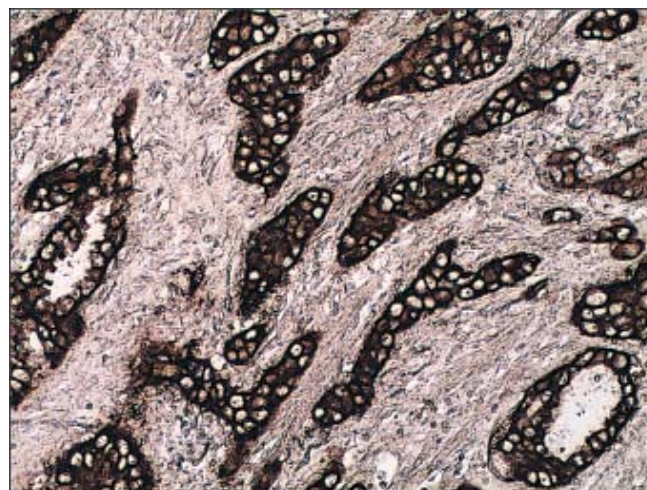
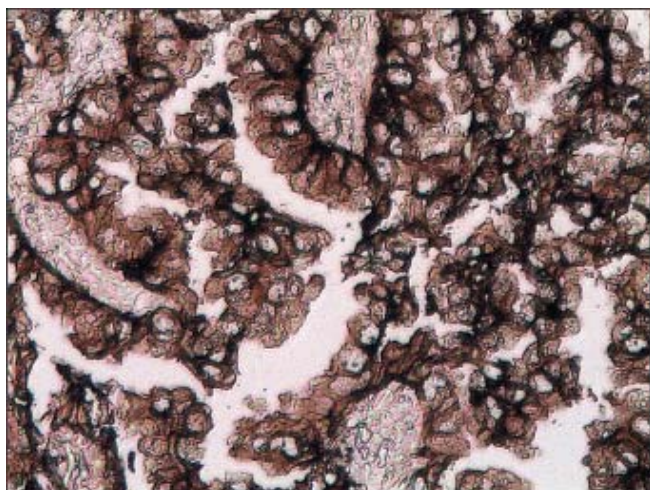
Badanie immunohistochemiczne (IHC) przeprowadzane w celu wykrycia ekspresji EGFR, w przypadku kwalifikacji chorych do leczenia TKI nie zawsze jest wiarygodne

dla EGFR (nazywany też *HER1*, *human epidermal receptor*), znajdujący się w ramieniu krótkim chromosomu 7, podlega licznym mutacjom, których skutkiem może być konstytutywna aktywacja receptora, zablokowanie jego funkcji lub utrata fragmentu cząsteczki. Zjawiska te są odpowiedzialne za skuteczność działania TKI i są niezależne od ekspresji EGFR na komórkach lub powodują jej obniżenie. W związku z tym najbardziej wiarygodnym czynnikiem warunkującym efekt terapeutyczny jest nadmierna liczba kopii genu *EGFR*. W przypadku 11% chorych dochodzi do amplifikacji genu, o której mówi się, gdy stosunek liczby kopii genu *EGFR* do liczby chromosomów 7 wynosi powyżej 2 lub obserwuje się ponad 15 kopii genu *EGFR* w ponad 10% komórek nowotworowych. Chorych, którzy powinni odnieść korzyść ze stosowania TKI, może charakteryzować także wysoka polisomia, stwierdzana, jeśli w ponad 40% komórek nowotworowych występuje powyżej 4 kopii genu *EGFR* (34% pacjentów) [13, 14].

Jak wynika z tych rozważań, badanie immunohistochemiczne (IHC) przeprowadzane w celu wykrycia ekspresji EGFR, w przypadku kwalifikacji chorych do leczenia TKI nie zawsze jest wiarygodne (ryc. 1A, B).

Dowodzą tego również niejednoznaczne wyniki badań klinicznych. W badaniu ISEL, dotyczącym gefitynibu, oraz badaniu BR.21, analizującym skuteczność erlotynibu, wykazano, że u chorych, których komórki nowotworowe posiadały ekspresję EGFR, prawdopodobieństwo przeżycia było nieznacznie wyższe w grupie stosującej TKI w porównaniu z grupą otrzymującą placebo. Natomiast w grupie chorych niewykazujących ekspresji EGFR na komórkach nowotworowych prawdopodobieństwo przeżycia było zbliżone u pacjentów otrzymujących TKI i placebo [13, 15]. Badanie TRUST przeprowadzone w grupie chorych leczonych erlotynibem wykazało, że prawdopodobieństwo przeżycia zależy w niewielkim stopniu od ekspresji EGFR na komórkach nowotworowych [16].

Amplifikację genu *EGFR* można wykryć za pomocą metody fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridisation*) lub chromogenicznej hybrydizacji *in situ* (CISH, *chromogenic in situ hybridisation*). Obie metody wykorzystują sondy molekularne w celu wyznaczenia centromeru chromosomu 7 oraz sondy specyficznej w stosunku do genu *EGFR*. W metodzie FISH sondy połączone są z fluorochromami, których świecenie wzbudzone jest w mikro-



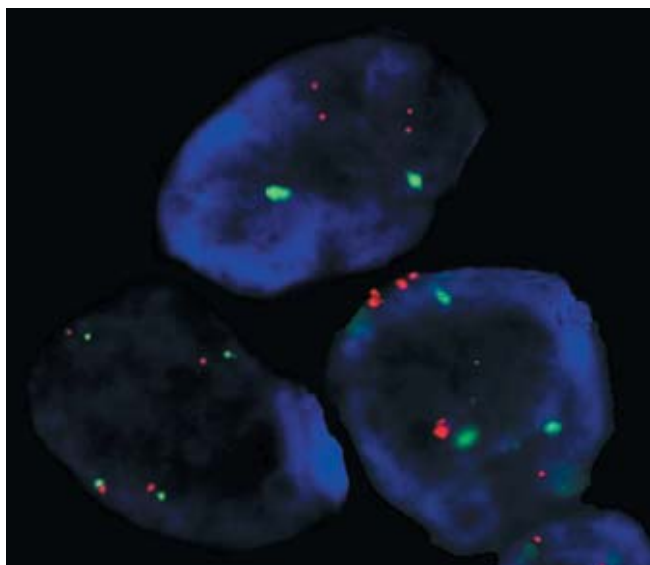
Rycina 1A, B. Barwienie immunohistochemiczne przeprowadzone w celu wykrycia ekspresji naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) w tkance gruczołowego raka płuca. Intensywny brunatny odczyn świadczy o wysokiej ekspresji EGFR. U chorej w wyniku leczenia erlotynibem uzyskano częściową remisję nowotworu, która utrzymuje się przez 9 miesięcy leczenia (materiał własny)

skopie fluorescencyjnym pod wpływem promieniowania UV (ryc. 1C). W przypadku metody CISH sondy znakowane są biotyną lub digoksygeniną (podobnie jak przeciwciała monoklonalne w metodzie IHC), a reakcja barwna zachodzi w wyniku oddziaływania enzym-substrat i odczytywana jest w zwykłym mikroskopie świetlnym. Obliczana jest liczba kopii genu *EGFR* oraz liczba chromosomów 7 w komórkach nowotworowych, przy czym metoda FISH jest bardziej precyzyjna i wiarygodna. W większości badań klinicznych dotyczących skuteczności TKI u chorych z zaawansowanym rakiem płuca oraz z amplifikacją genu *EGFR* lub wysoką polisomią stwierdzaną w komórkach nowotworowych dowiedziono, że erlotynib i gefitynib zwiększają prawdopodobieństwo przeżycia chorych w stosunku do placebo.

U chorych tych stwierdzano także wyższy odsetek odpowiedzi na leczenie oraz wyższy odsetek jednorocznych przeżyć. Natomiast grupa chorych bez amplifikacji genu *EGFR* nie odniosła tak spektakularnych korzyści ze stosowania TKI w porównaniu z placebo [13, 14].

Duże nadzieje na wykrycie markerów pozwalających przewidzieć skuteczność działania TKI dają badania oparte na technikach łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) lub sekwencjonowania DNA, których celem jest wykrycie punktowych mutacji w obrębie genów *EGFR* i *K-Ras*. Najczęstsze mutacje genu *EGFR* dotyczą delecji w obrębie egzonu 19 i substytucji w egzonie 21. Można je wykryć w komórkach około 15% guzów NDRP. Obie mutacje wiążą się prawdopodobnie z większą wrażliwością komórek nowotworowych na działanie gefitynibu. Nie stwierdza się jednak wpływu obecności tych mutacji na zwiększenie prawdopodobieństwa przeżycia po zastosowaniu erlotynibu [17, 18].

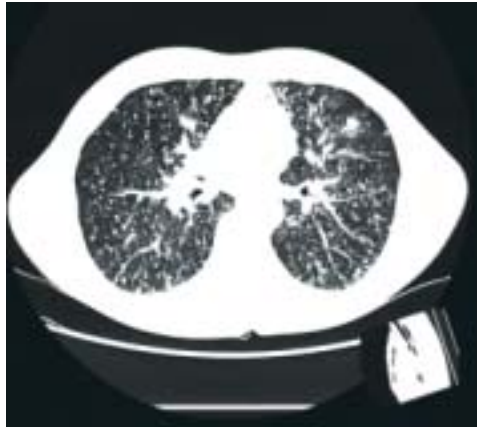
K-Ras jest onkogenem kodującym białko K-Ras należące do nadrodziny guanozynotrifosforanów (GTP-az), odpowiedzial-



Rycina 1C. Badanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* przeprowadzone u tej samej chorej. W jądrach komórek nowotworowych stwierdza się amplifikację oraz wysoką polisomię genu *EGFR* (materiał własny)

nych za hydrolizę GTP do GDP. Białko Ras bierze udział w przekazywaniu sygnałów mitogennych. W strukturze sygnałowej komórki działa o poziom niższy niż kinazy tyrozynowe receptorów błonowych, a na poziomie kinazy serynowo-treoninowej Raf, przekazującej sygnał mitogeny od receptora błonowego do jądra komórkowego. Punktem mutacja *K-Ras*, która zachodzi pod wpływem karcynogenów dymu tytoniowego w około 17% guzów NDRP, skutkuje nadmierną aktywnością białka Ras, prowadzącą do proliferacji komórek i onkogenezy. Wykazano, że erlotynib zwiększa prawdopodobieństwo przeżycia chorych z zaawansowanym NDRP, w przypadku których komórki nowotworowe posiadają dziki (nie zmutowany) typ genu *K-Ras*. Co więcej, wydaje się, że obecność mutacji *K-Ras* u palaczy niewyraźliwia tych chorych na działanie TKI, nawet w przypadku nadmiernej ekspresji receptora dla EGF i amplifikacji genu *EGFR* w komórkach nowotworowych [19].

Wśród innych czynników mogących wpływać na skuteczność działania TKI wymienia się zjawisko zamiany markerów nabłonkowych na mezenchymalne na po-



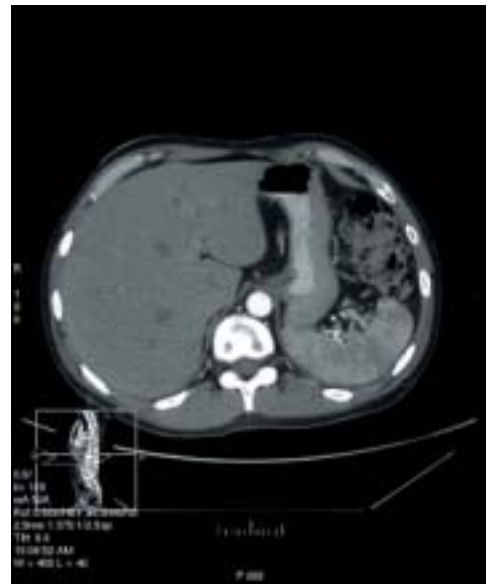
Rycina 2A. Obraz tomografii komputerowej klatki piersiowej chorego z przerzutowym rakiem oskrzelowo-pęcherzykowym. Progresa choroby nastąpiła po niepowodzeniu chemioterapii pierwszego rzutu według schematu zawierającego cisplatynę i nawelbinę oraz leczenia drugiego rzutu, polegającego na podawaniu docetakselu



Rycina 2B. Na podstawie tomografii komputerowej wykonanej u tego samego chorego po 2 miesiącach leczenia trzeciego rzutu erlotynibem można stwierdzić częściową remisję choroby



Rycina 2C. Tomografia komputerowa jamy brzusznej wskazuje na obecność licznych przerzutów do wątroby i nadnercza



Rycina 2D. Na podstawie tomografii komputerowej wykonanej u tego samego chorego po 2 miesiącach leczenia erlotynibem można stwierdzić zmniejszenie ognisk przerzutowych w narządach jamy brzusznej

wierzchni komórek nowotworowych. Metodą immunohistochemiczną ocenia się ekspresję E-kadheryny i γ -kateniny (markery nabłonkowe) oraz wimentyny i fibronektyny (markery mezenchymalne). Ekspresja markerów nabłonkowych związana jest z większą wrażliwością na erlotynib i mniejszą skłonnością do powstawania przerzutów. Istotne wydaje się także stężenie ligandów dla EGFR w tkance guza i w surowicy krwi. Ba-

dania dotyczą przede wszystkim EGF i amfireguliny (gen *AREG*) [12].

Trwają badania nad inhibitorami kinaz związanych z innymi szlakami sygnałowymi. Uzasadnieniem tych eksperymentów jest fakt, że większość komórek nowotworowych charakteryzuje równoczesne zaburzenie kilku szlaków metabolicznych. Najbardziej zaawansowane próby kliniczne dotyczą so-rafenibu (inhibitor kinaz związanych z biał-

kami C-RAF, B-RAF, receptorem naczyniowo-śródbłonkowych czynników wzrostu [VEGFR-2, VEGFR-3, *vascular endothelial growth factor receptor*], receptorem płytkowego czynnika wzrostu [PDGFR- β , *platelet derived growth factor receptor β*], c-kit), sunitynibu (inhibitor kinaz związanych z PDGFR- β , VEGFR-2, c-kit, *fms-like tyrosine kinase 3*), wanedetanibu (inhibitor kinaz związanych z VEGFR-2, VEGFR-3, EGFR, RET) oraz watalanibu (inhibitor kinaz związanych z VEGFRs, PDGFR, c-kit). W przypadku określenia wrażliwości chorych na działanie tych leków zastosowanie może znaleźć badanie obecności w komórkach nowotworowych fosforylowanych postaci kinaz, takich jak p-Akt i p-MAPK. Fosforylacja kinaz zwiększa ich aktywność enzymatyczną i powoduje aktywację licznych czynników transkrypcyjnych. Natomiast enzymy odpowiedzialne za odłączanie reszt fosforanowych od cząsteczek kinaz (fosfatazy i fosfodiesterazy, np. białko PTEN [*phosphatase and tensin homolog*]) są inhibitorami szlaku kinazowego. Wysoka aktywność białka PTEN pośredniczy w zahamowaniu aktywności mitotycznej komórki i wiąże się wyższą skutecznością działania TKI [20].

Od niedawna trwają próby standaryzacji badań molekularnych wykorzystywanych w badaniach klinicznych nad skutecznością TKI w NDRP. Powstała *Molecular Assays in NSCLC Working Group* sponsorowana przez Genentech, Roche Pharmaceuticals i OSI Pharmaceuticals. Rekomendacje naukowców pracujących w tej grupie obejmują między innymi zalecenia dotyczące rodzaju materiału tkankowego, w którym możliwe jest wykonywanie badań. Najbardziej wiarygodne wyniki, z uwagi na heterogenne utkanie guzów NDRP, można uzyskać, badając materiał operacyjny. Fragmenty tkanki pobierane w czasie biopsji przez- lub wewnątrzskrzelowej podczas bronchoskopii mogą okazać się zbyt małe w przypadku nowotworów o mieszanym typie histologicznym.

Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa dostarcza często komórek pozbawionych błony komórkowej, co uniemożliwia wykrycie ekspresji EGFR za pomocą metody IHC. Próbkę przechowuje się najczęściej w postaci bloczków parafinowych, chociaż możliwe jest wykonanie badań zaraz po pobraniu w materiałach mrożonych w ciekłym azocie. Podejmowane są także próby standaryzacji metod badań molekularnych (IHC, FISH, CISH, analiza mutacji) i sposobu interpretacji wyników. Chodzi tu przede wszystkim o wykorzystanie w badaniach jednakowych zestawów odczynników, co umożliwi uzyskanie powtarzalnych wyników. Niezbędne jest także wprowadzenie w laboratoriach systemu kontroli wewnętrznej i zewnętrznej, podczas których znane próbki tkanki opracowane w ośrodku referencyjnym będą analizowane w pozostałych ośrodkach zakwalifikowanych do prowadzenia badań molekularnych [21].

IMMUNOTERAPIA BIERNA I CZYNNA W TERAPIACH CELOWANYCH W NDRP

Postęp immunoterapii za pomocą przeciwciał monoklonalnych stał się możliwy po wyeliminowaniu, dzięki metodom inżynierii genetycznej, z cząsteczki przeciwciała obcego białka (cząsteczki chimeryczne składające się z białka mysiego i ludzkiego). W leczeniu raka płuca stosuje się przeciwciała skierowane przeciwko domenie zewnątrzkomórkowej EGFR. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą cetuximabu (Erbix[®]). Lek ten został już zarejestrowany w terapii przerzutowego raka jelita grubego i miejscowo zaawansowanego raka płaskonabłonkowego w obrębie głowy i szyi. W badaniach *Lung Cancer Cetuximab Study* (LUCAS) i *First-Line Treatment for Patients with EGFR-EXpressing Advanced NSCLC* (FLEX) wykazano, że stosowane cetuximabu u chorych z zaawansowanym NDRP przedłuża czas ich życia do ponad 8 miesięcy. Cetuximab, ze względu na mechanizm



W leczeniu raka płuca stosuje się przeciwciała skierowane przeciwko domenie zewnątrzkomórkowej EGFR



**Efekt terapeutyczny
bewacyzumabu polega
na redukcji i normalizacji
naczyń krwionośnych
w obrębie guza**

działania, może być stosowany w skojarzeniu z chemioterapią i/lub radioterapią. Warunkiem jego skuteczności jest jednak obecność ekspresji EGFR i brak mutacji genu *K-Ras* w komórkach nowotworowych. Duże nadzieje na postęp w leczeniu NDRP wiążą się z innym przeciwciałem blokującym EGFR — penitumumabem (Vectibix®), którego cząsteczka składa się w całości z ludzkiego białka [22].

Prawdziwym sukcesem i rejestracją leku zakończyły się badania nad bewacyzumabem (Avastin®). Jest to humanizowane przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko czynnikowi wzrostu śródbłonna naczyń. Efekt terapeutyczny bewacyzumabu polega na redukcji i normalizacji naczyń krwionośnych w obrębie guza. Zmniejszenie ukrwienia guza NDRP i eliminacja z niego nieprawidłowych naczyń, w których przepływ krwi był turbulentny, powoduje spowolnienie wzrostu nowotworu i opóźnienie powstawania przerzutów drogą krwionośną. W badaniu *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG 4599) bewacyzumab został zastosowany w dawce 15 mg/kg mc. we wlewie dożylnym w połączeniu z chemioterapią prowadzoną w oparciu na karboplatynie i paklitakselu. Po 6 cyklach chemioterapii kontynuowano stosowanie bewacyzumabu w monoterapii, aż do momentu pojawienia się progresji choroby. W badaniu tym po raz pierwszy w historii uzyskano wydłużenie mediany czasu przeżycia chorych z zaawansowanym NDRP do ponad roku (12,3 miesiąca), a mediana czasu życia w podgrupie obejmującej chorych z rakiem gruczołowym wyniosła nawet 14,2 miesiąca. Mediana czasu do wystąpienia progresji u chorych leczonych bewacyzumabem wyniosła 6,2 miesiąca w porównaniu z 4,5 miesiąca u chorych otrzymujących placebo [23].

Niestety, stosowanie bewacyzumabu wiąże się ze zwiększeniem ryzyka poważnych powikłań. Najważniejszymi spośród nich są krwawienia do centralnego układu nerwowego i układu oddechowego, nadciśnienie

tętnicze oraz nasilenie neutropenii i zwiększenie ryzyka gorączki neutropenicznej. W celu eliminacji działań niepożądanych przystąpiono do badań mających na celu redukcję dawki bewacyzumabu. W badaniu *Avastin in Lung* (AVAIL) wykazano, że skuteczność dawki 7,5 mg/kg mc. i 15 mg/kg mc. jest porównywalna, a częstość występowania wszystkich działań niepożądanych niezależnie od stosowanej dawki nie przekracza 1,5% leczonych. Trwają próby kliniczne łącznego stosowania erlotynibu i bewacyzumabu (badanie TASK), a nawet erlotynibu, bewacyzumabu i cetuximabu. Badaniom poddawany jest także lek o nazwie zactima (ZD6474) — podwójny inhibitor EGFR i VEGFR — aktywny w przypadkach niepowodzeń chemioterapii oraz w oporności na TKI [24].

Immunoterapia czynna jest metodą leczenia modyfikującą status immunologiczny pacjenta lub oddziaływującą toksycznie na komórki nowotworowe poprzez umożliwienie rozpoznania ich specyficznych antygenów przez układ immunologiczny. Pierwsze próby immunoterapii czynnej raka płuca polegały na podawaniu preparatów immunostymulujących, takich jak szczepionka przeciw gruźlicy (BCG, *bacillus calmette-guerin*), lewamizol, OK-432 lub inhibitory cyklooksygenazy COX2, obniżające stężenie prostaglandyny PGE2. Podawano także całe komórki nowotworowe lub wyizolowane z nich antygeny. Obecnie największe nadzieje wiąże się z syntetycznymi oligopeptydami, będącymi epitopami antygenów nowotworowych.

Stimuvax (L-BLP 25) jest złożoną „szczepionką” stosowaną w leczeniu zaawansowanego NDRP. Jest ona poddawana badaniom klinicznym III fazy (1300 pacjentów w 140 ośrodkach medycznych na świecie). Liposomalna kapsułka szczepionki zawiera 20-aminokwasową tandemową sekwencję występującą w domenie zewnątrzkomórkowej ludzkiego białka mucyny MUC-1 oraz adjuwant

w postaci monofosfolipidu A. Część MUC-1 jest szeroko rozpowszechniona na powierzchni wielu komórek nowotworowych (rak piersi, rak płuca, rak jelita grubego). Ulega nie tylko wzmożonej ekspresji, ale też glikozylacji, co czyni ją, ze względu na silne właściwości immunostymulujące, doskonałym celem dla immunoterapii. W wyniku swoistej stymulacji limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych możliwe jest wyeliminowanie komórek nowotworowych wykazujących ekspresję MUC-1. Stimuvax jest podawany podskórnie w cztery różne miejsca w ośmiu tygodniowych kursach, które poprzedza leczenie cyklofosfamidem. Wstępne wyniki są obiecujące, a leczenie jest całkowicie bezpieczne i nie wywołuje działań niepożądanych charakterystycznych dla chemioterapii [25].

Wśród innych immunoterapeutyków należy wymienić belagenpumatucel-L (Lucanix®), składający się z czterech linii komórek NSCLC z wbudowaną sekwencją anty-sensową dla genu TGF- β_2 . Badaniom poddawana jest „szczepionka” z rekombinowanego białka MAGE-3 (Pro D MAGE-3/His) połączona z adjuwantem SBAS-2 oraz „szczepionka” GVAX zawierająca autologiczne komórki nowotworowe modyfikowane genetycznie w celu produkcji czynnika

wzrostu kolonii granulocytno-makrofagowych (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) [26].

Kwalifikacja chorych do chemioterapii obejmowała dotychczas jedynie badania kliniczne. Decyzja o rozpoczęciu leczenia była podejmowana na podstawie oceny stopnia zaawansowania, stanu sprawności chorych, rodzaju wcześniejszych terapii i rozpoznaniu histopatologicznym. Obecnie projektowanie terapii będzie prawdopodobnie obejmować panel badań genetycznych, które umożliwią precyzyjne dobranie leku w zależności od wrażliwości na jego działanie komórek nowotworowych. Indywidualizacja terapii pozwoli już wkrótce zminimalizować skutki uboczne oraz zmaksymalizować skuteczność leczenia dla każdego chorego. Trudno mówić w tym momencie o znaczącym postępie dotyczącym możliwości wyleczenia raka płuca. Efektem terapii jest jednak istotne przedłużenie czasu życia chorych, którego następstwem może być kwalifikacja raka płuca do chorób przewlekłych.

Odczynniki do wykonania oznaczeń IHC i FISH zostały zakupione z grantu naukowego firmy Roche. Preparaty zostały wykonane w Pracowni Naukowej Katedry i Zakładu Patomorfologii Klinicznej UM w Lublinie.



**Indywidualizacja terapii
pozwoli już wkrótce
zminimalizować
skutki uboczne
oraz zmaksymalizować
skuteczność leczenia
dla każdego chorego**

PIŚMIENNICTWO

1. Kelly K., Crowley J., Bunn P.A. Jr, Presant C.A., Grevstad P.K. i wsp. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19: 3210–3218.
2. Arriagada R., Bergman B., Dunant A., Le Chevalier T., Pignon J. P., Vansteenkiste J. International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 351–360.
3. Zhang L., Bhojani M. S., Ross B. D., Rehemtulla A. Molecular imaging of protein kinases. *Cell Cycle.* 2008; 7(3): 314–317.
4. Giaccone G., Herbst R. S., Manegold C., Scagliotti G., Rosell R. i wsp. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 777–784.
5. Herbst R.S., Giaccone G., Schiller J.H., i wsp. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 785–794.

6. Gatzemeier U., Pluzańska A., Szczesna A. i wsp. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 1545–1552.
7. Herbst R.S., Prager D., Hermann R. i wsp. TRIBUTE Investigator Group. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 5892–5899.
8. Thatcher N., Chang A., Parikh P. i wsp. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005; 366: 1527–1537.
9. Shepherd F.A., Rodrigues Pereira J., Ciuleanu T. i wsp. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 123–132.
10. Hanna N., Shepherd F.A., Fossella F.V. i wsp. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 1589–1597.
11. Clark G.M. Prognostic factors versus predictive factors: examples from a clinical trial of erlotinib. *Mol. Oncol.* 2007; 1: 406–412.
12. <http://clinicaltrials.gov>
13. Tsao M.S., Sakurada A., Cutz J.C. i wsp. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 133–144.
14. Zhang X., Chang A. Molecular predictors of EGFR-TKI sensitivity in advanced non small cell lung cancer. *Int. J. Med. Sci.* 2008; 5: 209–217.
15. Hirsch F.R., Varella-Garcia M., Bunn P.A. Jr i wsp. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 5034–5042.
16. Schnaider Schott-von Römer K., Gütz S., Raack B., i wsp. Biomarker analysis from TRUST, a trial of erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC). ASCO 2007 Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 suppl.); 2007: 7674.
17. Bell D.W., Lynch T.J., Haserlat S.M. i wsp. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 8081–8092.
18. Riely G.J., Pao W., Pham D. i wsp. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 839–844.
19. Zhu C.Q., da Cunha Santos G., Ding K. i wsp. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 4268–4275.
20. Gridelli C., Maione P., del Gazo F. i wsp. Sorafenib and Sunitinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *The Oncologist.* 2007; 12: 191–200.
21. Eberhard D.A., Giaccone G., Johnson B.E., Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 983–994.
22. Ciardiello F., Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 1160–1174.
23. Sandler A., Gray R., Perry M.C. i wsp. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2542–2550.
24. Manegold C., von Pawel J., Zatloukal P. i wsp. the BO17704 study group. Randomised, double-blind multicentre phase III study of bevacizumab in combination with cisplatin and gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with advanced or recurrent non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): BO17704. ASCO 2007 Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 suppl.).
25. Bradbury P.A., Shepherd F.A. Immunotherapy for lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2008; 3: 164–170.
26. Neumanaitis J.J. Are vaccines making a comeback in non-small-cell lung cancer? *J. Clin. Oncol.* 2008; 26 (9): 1402–1403.