

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

HER2 pozitív tumorok kombinált antitest terápiaja

Dr. Tóth Gábor

Témavezető: Dr. Vereb György



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

HER2 pozitív tumorok kombinált antitest terápiaja

Dr. Tóth Gábor

Témavezető: Dr. Vereb György



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2018

HER2 pozitív tumorok kombinált antitest terápiaja

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta:

Dr. Tóth Gábor

általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
Farmakológia doktori programja keretében

Témavezető: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora
Dr. Szatmári István, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem, GYTK,
Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára,
2018. szeptember 25., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kulka Janina, az MTA doktora
Dr. Lányi Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kulka Janina, az MTA doktora
Dr. Lányi Árpád, PhD
Prof. Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora
Dr. Szatmári István, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme,
2018. szeptember 25., 13 óra

Absztrakt

A HER2-ellenes célzott antitest kezelések témakörében a klinikumban alkalmazott trastuzumab és pertuzumab kombinációjának előnyét vizsgáltuk HER2-pozitív daganatokban, szem előtt tartva a trastuzumab rezisztencia jelenségét, mely HER2-pozitív emlőrákok esetén 50%-nál is gyakoribb. A kombináció hatékonyságát hatásmechanismusának vizsgálatával támasztottuk alá. Az antitestek közvetlen biológiai (jelátviteli) és az ADCC-t kiváltó hatásai között az elkülönítést a trastuzumab és pertuzumab egész antitestek, valamint $F(ab')_2$ fragmentumaik összehasonlító vizsgálatával végeztük.

Az *in vitro* ADCC vizsgálatokhoz nem-radioaktív kísérleti módszert kerestünk. Vizsgáltuk a FDA és a CFSE felszabadulás mérésén, a CFSE és propidium jodid jelölésén, valamint a kaszpáz aktiváció kimutatásán alapuló áramlási citometriás módszereket, valamint az impedancia alapú sejtanalizátor alkalmazhatóságát. A legnagyobb dinamikus tartományt és az antitest dózis-hatásfüggvényének kvantitálását ez utóbbi biztosította, így letapadó célsejtek esetén az impedancia alapú sejtanalizátor módszert, szuszpenzióban növekvő célsejtek esetén a kaszpáz aktiválódás áramlási citometriás meghatározását javasoljuk az ADCC radioaktivitás-mentes *in vitro* mérésére.

A teljes trastuzumab és pertuzumab antitestekből kiindulva pepszin-agarózos emésztéssel az $F(ab')_2$ rész sérülése nélkül távolítottuk el az Fc fragmentumot.

In vitro a teljes és $F(ab')_2$ antitest kezelések a JIMT-1 sejtek növekedését nem csökkentették, az ismertén trastuzumab-érzékeny BT-474 sejtvonalnál a két antitest kombinációja az egyedi kezeléseknél nagyobb, de additív proliferációgátló hatást eredményezett teljes antitestek és $F(ab')_2$ fragmentumok esetén is.

In vivo az $F(ab')_2$ fragmentumok nem, a teljes antitestek egymáshoz hasonló mértékben csökkentették a JIMT-1 xenograft növekedését. A teljes antitestek kombinációja fokozottan gátolta a tumor növekedést, mely korrelált a xenograftok *ex vivo* immunfluoreszcenciás jelölésével kimutatható fokozott NK-sejt penetrációval. *In vitro* ADCC kísérletekben a két antitest kombinációja nem-szaturáló koncentrációknál additív volt.

Ezek alapján feltehető, hogy a jelenleg klinikumban engedélyezett maximális antitest dózisok *in vivo* nem telítik az ADCC-t. Emiatt a daganat felfedezése után mihamarabb célszerű mindkét antitestet a klinikai kipróbálások során meghatározott maximális tolerálható dózisában, kombinálva alkalmazni. Mivel a keringő és disszeminált tumorsejtek kifejezetten érzékenyek az ADCC-re, a kombinált antitest terápiát még a primer daganat rezisztenciája esetén is célszerű folytatni a metasztázisok kialakulásának gátlására.

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az elmúlt évtizedben és napjainkban a daganatellenes terápiás kutatások és fejlesztések egyik legnagyobb reménye a daganatellenes immunterápia. Az onkológiai terápiás protokollok az elmúlt évtizedben az általános citotoxikus hatásmechanizmusú kemoterápiától és sugárkezeléstől a daganat-specifikus kezelés irányába mozdultak. 2013-ban a Science magazin a daganatellenes immunterápiát „Az év áttörése” („Breakthrough of the Year”) címmel illette. A „személyre-szabott orvoslás” körbe tartozó, klinikai felhasználásra engedélyezett daganat-specifikus kezelések alapját és zömét jelenleg az antitest alapú kezelések adják.

A daganatterápia fejlődése új lendületet kapott amikor a daganatok kialakulásáért és progressziójáért felelős biológiai útvonalak megértése specifikus célpontokat is feltárt, melyek specifikus daganatellenes terápiák célpontjai lehettek. A specifikus daganatterápia célja ezen célcélpontokon keresztül „támadva” a daganatos sejtet annak életképességének, proliferációjának gátlása, végső soron a daganat *in situ* elölése, miközben a környező, ép szöveteket nem éri károsító hatás.

A monoklonális antitestek sejtfelszíni antigéneket felismerve azokhoz kötődnek, és egyrészt tumorelles immunválaszt váltanak ki (antitestfüggő sejtes citotoxicitás, komplement mediálta citotoxicitás), másrészt blokkolhatják a felismert fehérje, például növekedési faktor receptor funkcióját, ezáltal közvetlen biológiai proliferáció-gátló hatást válthatnak ki. Az antitest terápiák korai sikerei egyre nagyobb érdeklődést és még több antitest kifejlesztését eredményezték, ezzel a klinikumban engedélyezett terápiás monoklonális antitestek száma exponenciálisan nőtt.

A szolid tumorok természetüknél fogva zártabb „niche”-t képezve nehezebben hozzáférhetőek, így az első sikereket vérképzőszervi daganatok ellen érték el, a szolid tumorok elleniek további fejlesztést, optimalizációt igényelnek.

Az antitestek (IgG) általános felépítése

A terápiában is használt antitestek általában az IgG alosztályba tartoznak. A teljes IgG antitestek (Wab, whole antibody) felépítésüket tekintve három fő funkcionális részre oszthatóak. Két, egymással megegyező Fab („fragment antigen binding”) részre, mely specifikusan felismeri a neki megfelelő antigén epitópot, és az Fc részre, mely az immunsejtek receptoraihoz és a komplement proteinekhez kapcsolódik, ennek következtében fejt ki hatását, pl. hízósejtek, basofil sejtek és eozinofil granulociták degranulációja, opsonizáció, és antitest mediálta sejt citotoxicitáson keresztül sejt lízis.

Pepszines emésztéssel a diszulfid hidakat megkímélve tudjuk hasítani a molekulát, így a két Fab régió összekötve marad, és egy $F(ab')_2$ fragmentumot alkot, melyről az Fc rész levált.

Az antitestfüggő sejt citotoxicitás

Az extracelluláris sejtpusztítás fontos effektor sejtjei közé tartoznak a természetes ölősejtek (Natural Killer, NK-sejt). Az NK-sejtek aktiválásában fontos szerepet játszanak az immunglobulinok kötésére alkalmas $Fc\gamma RIII$ (CD16) receptorok, melyek az IgG-vel opsonizált sejtek (vírussal fertőzött vagy tumorossá fajult sejtek) megkötését és elpusztítását lehetővé teszik. Ezt a folyamatot nevezzük antitestfüggő sejt citotoxicitásnak (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC).

Az ölősejt aktiválódási folyamata során intracelluláris kaskád folyamatok, membránbeli mozgások, valamint a citoszkeleton átrendeződésének eredményeként az intracelluláris granulumok tartalma exocitózissal kiürül, mely tartalom egyik fő eleme a perforin. A perforin az extracelluláris térbe ürülve a magasabb pH és Ca^{2+} koncentráció hatására kötődik a célsejt membránjához, és oligomerizálódással 10–20 nm átmérőjű pórusokat formálva kilyukasztja azt. A pórusokon keresztül a granulumok egyéb enzimeit (pl. granzim B) a célsejtbe jutnak, és sejtthálhoz vezető kaspáz útvonalakat aktiválnak. A pórusok egyúttal átjárhatóvá teszik a membránt az ionok és a víz számára, aminek eredménye a sejt lízise. A célsejt membránjának

kilyukasztását és a kaszpáz kaszkád aktiválását, mely a célsejt halálával zárul, „halálos csapás”-nak (lethal hit) nevezzük.

Az ADCC kvantitatív vizsgálatára használt módszerek

A ^{51}Cr felszabadulás mérése a citotoxicitási tesztek legrégebben, széles körben elfogadott módja. Ugyanakkor, mivel a módszer radioaktív anyagok használatát igényli, ami komoly egészségügyi kockázatokkal jár, az irodalomban is jelentős az igény radioaktivitástól mentes módszerekre. Mindezek okán elsőként azt tűztük ki célul, hogy szisztematikus vizsgálattal kiválasszuk azt a technikát, mely kismértékű változás detektálására is képes, ahol a kísérleti rendszer a lehető legkisebb mértékben befolyásolja az ADCC folyamatát és az abban részt vevő sejteket.

Membrán permeabilitáson alapuló mérések

A felszabaduláson alapuló (release) tesztek, köztük a klasszikus radioaktív króm felszabadulás teszt lényege, hogy a célsejtben természetesen megtalálható, vagy abba kívülről bejuttatott anyag kiáramlásának mértékét mérik, és ebből következtetnek a sejt pusztulására. A ^{51}Cr radioaktív króm izotóppal történő feltöltés helyett fluorofórok is alkalmazhatunk erre a célra, de történtek próbálkozások a sejt saját enzimeit, pl. a GAPDH mérésére is. Mivel a vizsgált anyag csak a megnövekedett aspecifikus permeabilitású célsejtekből szabadul fel, azaz a kezelés során elpusztult, károsodott célsejtekből, a felszabadult mennyiségből az *in vitro* ADCC kezelés hatékonyságára is lehet következtetni.

Egyes szerzők a felszabadulások vizsgálatoknál szenzitívebbnek írták le a propidium jodid (PI) felvétel áramlási citometriás mérését. A PI az aspecifikus membránpermeabilitás megnövekedése miatt bejut az elpusztult sejtek magjába, és a DNS bázispárjai közé interkalálódva fluoreszcencia intenzitása megnő.

Az ADCC-re specifikus kaszpáz reakciók kvantitálása

Az NK-sejtek granulumaiból felszabadult granzim B a célsejtben kaszpáz kaszkád folyamatot indít el, mely folyamat aktiválódása a célsejt pusztulásához hozzájárul.

Ezzel szemben a sejtet ért aspecifikus stresszhatások miatti sejtelhalás során granzim B aktiváció nem detektálható, így fluoreszcens szubsztrátok segítségével az ADCC a kaspáz aktiváció alapján mérhető.

Impedancia alapú sejtanalízis

Az impedancia alapú valós idejű sejtanalizáló rendszerek működési elve, hogy speciális sejttenyésztő kamra alján található mikroelektrodákon mérik váltakozó feszültség mellett az ellenállást és impedanciát. A sejttenyésztő edény aljára letapadt sejtek az áramkörü jellemzőket megváltoztatják, a változásokból a letapadt sejtekről információkat nyerhetünk.

A mért ellenállás függ a letapadó sejtek általi elektród-fedettségtől és a sejt-sejt kapcsolatoktól, ezáltal hasznosítható többek között a proliferáció, életképesség és citotoxicitás vizsgálatához.

A HER onkoprotein család

A HER (ErbB) családba tartozó transzmembrán glikoproteinek I. típusú receptor tirozin kinázok, melyek fontos szerepet töltenek be a sejtnövekedés, sejttúlélés és differenciáció szabályozásában, és központi szerepet játszanak számos humán daganat patológiájában.

A HER1 (humán epidermális növekedési faktor receptor vagy EGFR, ErbB1) szinte az összes szomatikus sejten megtalálható. A HER2-nek (ErbB2) nincs természetes ligandja, állandóan aktív. A HER3 (ErbB3) és HER4 (ErbB4) közül a HER3 kináz-deficiens, így jelátvitelt indítani önmagában nem, csak más HER családbeli fehérjékkel alkotott heterodimerjeiben tud.

A HER fehérjék jelátviteli mechanizmusa

A receptor tirozin kinázok jelátvitelének jellegzetes és szükséges lépése a dimerizálódás. A receptorok aktív dimerizációs karján keresztül azonos receptorral (homodimerizálódás, pl. HER1-HER1) vagy a család egy másik tagjával (heterodimerizálódás, pl. HER1-HER2) kölcsönhatásba kerül. A dimer tagjai egymást foszforilálva létrehozzák a sejt belüli szignálok kiindulópontját.

A receptorok felépítésére jellemző, hogy – a HER2 kivételével - extracelluláris doménjük ligand hiányában zárt formációt vesz fel. Ligandkötés hatására a receptor nyitott konformációs állapotba kerül, a dimerizációs kar sztérikusan megközelíthetővé válik, így lehetővé válik a receptorok asszociációja egymással. A HER2 dimerizációs karja viszont mindig aktív, kinyújtott állapotban van. Az HER2 a család többi tagjának preferált párképző partnere. A HER2 autoaktivációja – homodimerizációja – expressziós szint függő lehet. A humán daganatokban a HER1-HER2 heterodimerizáció kiemelt jelentőségű.

A receptor tirozin kinázok több szignálút vonal indításáért felelősek, melyek közül a daganat növekedése, áttétképződése és terápia-rezisztenciája szempontjából kettő kiemelt fontosságú:

A **Ras/MAPK** út vonal fontos szerepet tölt be a sejtciklusban, migrációban és differenciációban. Az **Akt** szerin/treonin kináz szintén kulcsfontosságú szereppel bír a metabolizmus, növekedés, proliferáció és túlélés szabályozásában, proto-onkogénként tartják számon.

A HER2 mint onkoprotein

A HER2 túlzott mértékű kifejeződése, „overexpresszálódása” fontos szerepet játszik több tumor kialakulásban, növekedésében. Aktivációja során proliferatív és antiapoptotikus jeleket közvetít. Az emlőkarcinómák 25-30%-ában a HER2 overexpresszióját figyelték meg, amiért génamplifikáció tehető felelőssé. Következménye agresszív fenotípusú daganat, rossz prognózissal: a tumorsejtek proliferációs készsége magas, metasztázisképző hajlamuk magas. Rapid klinikai lefolyásra és a kemo- és radioterápiával szembeni rezisztenciára lehet számítani.

HER2 mint terápiás célpont

Annak a felismerése, hogy egyes HER2 ellenes antitestek gátolni tudják a HER2 overexpresszáló sejtek növekedését áttörő hatásának bizonyult, és számos, a HER2

és az EGFR extracelluláris része elleni antitest kifejlesztéséhez vezetett. Ezek közül a klinikai használatra engedélyezett antitestek az EGFR ellenes cetuximab (Erbix®[®], 2004), és az HER2 ellenes trastuzumab (Herceptin®[®], 1998) és pertuzumab (Perjeta®[®], 2014).

Trastuzumab (Herceptin®)

A trastuzumab a szolid tumorok terápiájára legelsőként (1998) engedélyezett, HER2-ellenes humanizált monoklonális antitest. Elsővonalbeli terápiaként szolgál HER2-pozitív metasztatikus emlőkarcinómás betegek számára.

Lévén az egyik legelső, klinikailag bizonyítottan hatékony antitest, a trastuzumab molekuláris és sejtszintű hatásmechanizmusának feltérképezése számos kutatás tárgyát képezte, mind az antitestre specifikus, mind pedig általánosságban az antitest terápiákra érvényes lehetséges hatásmechanizmusok felderítése céljából.

A trastuzumab kötődése megszakíthatja az interakciókat az HER2 és más fehérjék között is, és sztérikusan blokkolja az indukált proteolitikus hasítás általi HER2 aktivitás-fokozódást. A sejtmembránhoz közeli kötődés hatékony keresztkötést hozhat létre, ami facilitálja az endocitotikus mechanizmust. Az HER2 sejt felszínről endocitózissal való eltávolításának kezdettől fontos szerepet tulajdonítanak. Monovalens trastuzumab Fab fragmentumok nem bírnak a teljes antitesttel hasonló antiproliferatív hatással, ami azt sugallja, hogy a HER2 keresztkötése fontos része a trastuzumab aktivitásnak. Bár a trastuzumab mindezen jelátviteli hatásai *in vitro* igen jelentősek, az utóbbi időben egyre több jel mutat arra, hogy *in vivo* az antitest függő sejtes citotoxicitásnak talán még az *in vitro* hatásoknál is fontosabb szerepe lehet.

A trastuzumab antitest hatékonysága mellett viszont sajnos a daganatok körülbelül felében jellemző az eredendőleg meglévő vagy a kezelés során kialakult rezisztencia.

Pertuzumab (Perjeta®)

A pertuzumab (Perjeta®) szintén humanizált monoklonális antitest, amely az HER2 dimerizációs karjához kötődik. Sokkal hatékonyabban bontja meg a ligand-mediált HER3-HER2 komplexképződést, mint a trastuzumab. Ennek ellenére az első klinikai kipróbálások, melyekben még Omnitarg néven szerepelt, kudarcba fulladtak.

Antitestek alkalmazása kombinációban

Mivel a trastuzumab és a pertuzumab két eltérő epitópot ismer fel a HER2-n, lehetőség van a két antitest egyidejű alkalmazására és célfehérjéhez való kötődésére. *In vivo* nude egerekben a trastuzumab és a szintén HER2-ellenes L26 antitest együttes alkalmazása az *in vitro* trastuzumab-szenzitív N87 jelű gyomor karcinóma sejtek növekedését szinergista módon csökkentette az egyedi kezelésekhez képest. Az állatkísérletek eredményei felvetették a lehetőségét, hogy HER2 ellenes monoklonális antitestek kombinációja növelheti a terápia hatékonyságát, de a mechanizmus ismeretlen maradt.

Friedman és munkatársai az *in vitro* kísérletek eredményeiből extrapolálva *in vivo* is az antitest-mediálta internalizáció szerepét hangsúlyozták a kombinációs hatás valószínű mechanizmusaként, mivel ez a folyamat hatékonyabbá válik, ha az eltérő epitópot felismerő antitestek kombinációjakor hiperkereszt-kötés, és következményesen nagy sejtfelszíni aggregátumok jönnek létre, melyek gyors és hatékony internalizációja gyors HER2 leszáályozást eredményez.

A III. fázisú CLEOPATRA (CLinical Evaluation Of Pertuzumab And TRAstuzumab) nemzetközi tanulmány vizsgálta a pertuzumab hatékonyságát a trastuzumab+docetaxel terápiával kombinációban. A tanulmány végső eredménye alapján a pertuzumabot tartalmazó rezsím szignifikánsan növelte a HER2-pozitív metasztatikus emlőrákos betegek teljes túlélését a pertuzumabot placeboval helyettesítő protokollal szemben. A pertuzumabot az Egyesült Államokban 2013-ban engedélyezték lokálisan előrehaladott, inflammatorikus, vagy korai stádiumú HER2-pozitív emlődaganatok neoadjuváns terápiájaként a trastuzumabbal és docetaxellel kombinációban, Európában pedig a metasztatikus vagy lokálisan

kiújuló, sebészi eltávolításra nem alkalmas emlőrákban szenvedő betegek számára, akik korábban nem részesültek célzott HER2-ellenes terápiában vagy kemoterápiában a betegségük kezeléseként. A jelenleg is folyamatban lévő APHINITY III. fázisú klinikai tanulmányban pedig tovább vizsgálják a pertuzumab + trastuzumab kombinációs terápia előnyét a trastuzumab monoterápiával szemben sebészi kezeléssel átesett HER2-pozitív emlőrákos betegeken. Mivel a HER2-t overexpresszáló emlődaganatok trastuzumab rezisztenciája továbbra is központi probléma, a kombinált kezelések hatásmechanizmusainak *in vitro* vizsgálata kulcsfontosságú lehet.

Célkitűzések

Irodalmi adatok azt mutatták, hogy egyazon target ellen eltérő epitópokat felismerő antitestek kombinált alkalmazása előnyös lehet mind *in vitro*, mind *in vivo*. Ezek alapján felmerül a HER2-t eltérő epitópon kötő trastuzumab és pertuzumab antitestek kombinációs alkalmazásának lehetősége.

Mindazonáltal a kombinációs hatás molekuláris és sejtszintű mechanizmusa nem tisztázott. Bár a kombinációs hatást Friedman és mtsai. a hiperkereszt kötés általi hatékonyabb internalizáció miatti HER2 leszabályozásnak tulajdonították, figyelemmel az antitestfüggő sejtes citotoxicitás vélhetően központi . szerepére az is elképzelhető, miszerint a kombinációban alkalmazott antitestek sztérikusan komplementer kötőhelyekként szolgálnak a természetes ölüsejtek számára.

Ezek alapján az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki:

1. Hatékony, standardizált, radioaktivitástól mentes, kitapadó célsejtekre optimalizált, *in vitro* ADCC vizsgálati módszer kiválasztása.
2. A trastuzumab és pertuzumab kombinált kezelések hatásmechanizmusának *in vitro* és *in vivo* vizsgálata.
3. A kombinációs kezelések klinikai relevanciájának feltárása.

Anyagok és módszerek

Sejtvonalak

Kísérleteinkhez célsejt (target) sejtvonalként HER2-t nagymértékben kifejező, kitapadva növvő epiteliális morfológiájú sejteket, az ADCC vizsgálatához ölü sejtvonalként frissen szeparált perifériás mononukleáris sejteket, ill. immortalizált NK sejtvonalat használtunk.

Az **SKBR-3** az irodalomban széles körben használt és az egyik legjobban jellemzett HER2 pozitív emlőtumor vonal. Trastuzumabra *in vitro* mérsékelten érzékeny.

A **BT-474** szintén invazív duktális emlőkarcinómából tenyésztett kultúra. Trastuzumabra *in vitro* érzékeny.

A **JIMT-1** klinikailag rezisztens humán emlőkarcinóma metasztázisából előállított sejtvonal, Trastuzumabra *in vitro* rezisztens, SCID egérben növeszthető, ott frissen inokulálva kezdetben ADCC miatt trastuzumabra érzékeny.

A **CD16.176V.NK-92** NK-sejtes fenotípusú immortalizált (humán) sejtvonal, nagy affinitású (176V) FcγRIIIA (CD16) receptorral stabilan transzfektálva. A sejtvonal egyik variánsa a nagy affinitású CD16 receptorral együtt eGFP-t ko-expresszál.

Áramlási citometriás vizsgálatok

A sejteket sorter csövekbe gyűjtve 10 µg/ml antitest végkoncentrációban jelöltük 10 percig, majd mosás után szükség szerint másodlagos antitesttel jelöltünk, szintén 10 µg/ml-es végkoncentrációban, további 10 percig. A jelölés után kétszer mostuk HEPES-sel, majd 4%-os formaldehid oldattal fixáltuk a sejteket.

A méréseket BD FACScan, BD FACSCalibur vagy BD FACSAria III áramlási citométeren végeztük. A mérések kiértékelését az FCS Express programmal (v3, v4 és v6 verziószám) végeztük.

Antitest F(ab')₂ fragmentumok készítése

A teljes antitestekből állítottuk elő azok F(ab')₂ fragmentumát az Fc rész pepszines emésztésével. A megfelelő fragmentumok szeparálására méretre és ionerősségre optimalizált gélszűrést használtunk (trastuzumab esetén Sephacryl S300 gyantával töltött oszlop, pertuzumab esetén Superdex 200 gyantával töltött oszlop). A frakciók abszorbanciáját NanoDrop ND 1000-rel (Thermo Scientific) mértük. A frakciókból vett mintákat nem-redukáló SDS-PAGE-sel teszteltük. A HER2-kötés affinitását, az Fc rész hiányát, és az ADCC-mediálás hiányát ellenőriztük.

Antitestek konjugálása fluoreszcens festékekkel

A direkt immunfluoreszcenciás jelölésekhez a trastuzumab és pertuzumab egész antitesteket és F(ab')₂ fragmentumaikat fluoreszcens festékekkel (Alexa Fluor 488 és Alexa Fluor 647) közvetlenül konjugáltuk a festék gyártói protokollja szerint.

Az F(ab')₂-k minőségellenőrzése

HER2-kötés affinitás vizsgálata

F(ab')₂ fragmentumok HER2 affinitását a kiindulási teljes antitestekével hasonlítottuk össze direkt immunfluoreszcenciás jelöléssel. Az SKBR-3 sejteket először az Alexa Fluor 488 konjugált trastuzumab F(ab')₂ vagy szintén Alexa Fluor 488 konjugált pertuzumab F(ab')₂ antitesttel jelöltük tízszeres feleslegben. Ezután a megfelelő teljes antitestet adtuk a szuszpenzióhoz telítő koncentrációban (60 mM).

A jelölést elvégeztük fordított sorrendben is elvégeztük. A sejteket 1%-os PFA-ban fixáltuk és áramlási citométeren mértük.

Fc fragmentum hiányának vizsgálata

Az Fc fragmentum hiányát indirekt immunfluoreszcenciás jelöléssel végeztük.

Az SKBR-3 sejteket IgG vagy F(ab')₂ antitesttel jelöltük, majd HEPES-sel mostuk. A másodlagos jelölőoldat az Fc-fragmentumot felismerő, Alexa Fluor 488 konjugált monoklonális anti-humán Fc antitestet vagy könnyű és nehézláncot is felismerő poliklonális Alexa Fluor 488 konjugált anti-humán (H+L) antitestet tartalmazott. A

másodlagos jelölés, majd HEPES mosás után a sejteket 1%-os PFA-ban fixáltuk és áramlási citométeren mértük.

***In vitro* sejtproliferáció vizsgálata**

A sejtproliferáció *in vitro* vizsgálatát MTT alapú kolorimetriás módszerrel, EZ4U kit felhasználásával végeztük.

A tetrazóium sóval történt 2-4 órás inkubáció után a metabolikus termék abszorpcióját Synergy HT Multi-Detection microplate Reader-rel (Bio-Tek) mértük. A 488 nm-es abszorpciót gyártói előirat szerint korrigáltuk a 620 nm-en mért (háttér) abszorpcióval.

Förster (fluoreszcencia) Rezonancia Energia Transzfer

Az EGFR-HER2 asszociáció felbontásának vizsgálatához mikroszkópos akceptor fotoelhalványításos Förster (fluoreszcencia) rezonancia energiatranszfer (FRET) módszert alkalmaztunk. Az EGFR-hez kötött antitesten lévő donor fluorofort a HER2-höz kötött antitest akceptor fluoroforja fizikai közelség (pl, heterodimerképződés) esetén részlegesen kioltja. Az akceptor fotoelhalványításos módszer során az akceptor fluorofórt fotoelhalványítással kiegészítjük, így a donor fluoreszcenciája megnő. A növekedés mértékéből energiatranszfer térkép számítható.

A fluoreszcencia-intenzitás növekedéséből pixelenként FRET hatásfokot számoltunk az AccPbFRET programmal. A méréseket Zeiss LSM 510 konfokális lézerpasztázó mikroszkópon végeztük.

***In vitro* ADCC vizsgálati módszerek**

FDA és CFSE jelölés

A fluoreszcens festék-felszabadulás méréshez a frissen feltripszinezett JIMT-1 sejteket jelöltük fluoreszcein diacetát (FDA) vagy karboxifluoreszcein diacetát szikimidil észter (CFSE) kevert izomerjeiből álló fluoreszcens festékekkel.

A fluoreszcens mérésekhez indikátormentes DMEM-et használtunk.

FDA és CFSE spontán felszabadulásának vizsgálata

A fluoreszcens festékekkel jelölt JIMT-1 sejtekből a festékek 24-órás spontán felszabadulásának vizsgálatához a jelölt JIMT-1 sejteket 96-lyukú sejtenyésző kamrába tettük. A felülúszó óvatos szuszpendálása után 100 µl-nyi mintát egy másik 96-lyukú plate-be pipettáztunk fluoreszcenciás mérés céljából.

A sejtekben visszamaradt festék becsléséhez a sejteken maradt médiumot friss, indikátormentes médiumra cseréltük, és a sejteket lizáltuk with Triton X-100.

A spontán felszabadulás időfüggésének vizsgálatához a 24-lyukú plate-be kirakott és ott kitapadva jelölt JIMT-1 sejtekhez a mosás után indikátormentes DMEM-et adtunk. Adott időpillanatokban 100 µl mintát vettünk minden lyukból a felülúszó óvatos, de alapos szuszpendálása után.

A fluoreszcencia mérését Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader-rel (Bio-Tek) végeztük, 485/20 gerjesztő és 538/20 emissziós szűrőt alkalmazva.

CFSE- és PI-alapú áramlási citometriás ADCC mérés

A JIMT-1 sejteket CFSE-vel jelöltük, majd indikátormentes DMEM-ben szuszpendáltuk. A JIMT-1 célsejtekhez NK-médium szuszpenzióban NK-sejtet adtunk. A trastuzumabot 10 µg/ml végkoncentrációban adtuk a kezelendő mintákhoz.

A 37 °C-on történő inkubáció alatt 5 órán keresztül adott időpontokban mintát vettünk mindegyik szuszpenzióból. A 100 µl-nyi mintához azonnal propidium jodidot adtunk, és 5 perc múlva mértük BD FACSCalibur áramlási citométeren.

PanToxiLux teszt

A PanToxiLux fluoreszcenciás citotoxicitás teszt az élősejtek által elölt célsejtekben aktivált granzim B és kaszpáz 8 proteázok kimutatásán alapul. A vizsgálat során a célsejtek és az NK-sejtek elkülönítéséhez a „kit” részét képező TFL4 fluoreszcens festékekkel jelöltük a célsejteket. A kísérlet megkezdésének pillanatában már elpusztult sejtek megjelölésére NFL1 festéket használtunk. A mintákat BD FACSAria III áramlási citométeren mértük.

Impedancia alapú sejtanalizátor

A mérések ECIS Z Θ impedancia alapú sejtanalizátor rendszer alkalmazásával készültek.

Az *in vitro* ADCC vizsgálatához a mikrotiter lemezekbe helyezett JIMT-1 sejtek 24 óra inkubációs idő alatt a sejtek letapadnak és szétterülnek a kamra lyukainak alján, lefedve a mikroelektródákat.

Miután a 4000 Hz frekvencián mért ohmikus ellenállás elérte a plató fázist, a kezelő ágenseket és NK-sejteket a rendszerhez adtuk. A mérést addig végeztük, amíg a mért ellenállás elérte a minimális értéket, és már nem csökkent tovább (24-48 óra).

***In vitro* ADCC immunszinapszis-képződés vizsgálata**

A JIMT-1 sejteket 2x9 lyukú mikroslide-ban növesztettük. Ezt követően a sejtekhez trastuzumab és pertuzumab teljes antitesteket vagy F(ab')₂ fragmentumaikat és eGFP-t expresszáló NK-92 sejtet adtunk. A CD16-ot Alexa Fluor 647-tel konjugált anti-CD16 antitesttel, a HER2-t Alexa Fluor 555 - 76.5 Fab antitesttel jelöltük.

Xenograft tumorok *in vivo* vizsgálata SCID egérben

A kezeléseket JIMT-1 sejtekből álló xenograft daganatra gyakorolt hatását SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) egerekben vizsgáltuk. Az antitest képzés zavara miatt a használt egerek immunrendszere nem tud fellépni a testidegen sejtekkel és anyagokkal szemben. Természetes ölüsejtjeik viszont vannak, és ezek antitest felismerése és ölési mechanizmusa megtartott.

A SCID (C.B-17/Icr-Prkdc^{scid} / IcrIcoCrl, Fox-Chase) egereket a Debreceni Egyetem Élettudományi Központ Kísérleti Állatház (nyilvántartási szám: III/4-KÁT/2015) „MD” területén tenyésztették, a kezeléseket és rendszeres méréseket az SPF minősítésű részlegen végeztük.

A JIMT-1 sejteket szubkután (s.c.) injektáltuk. Egerenként 2 xenograft oltás történt a 2 hátsó végtagnak megfelelően dorzálisan.

Az antitest kezelést a xenotranszplantáció után azonnal elkezdtük, hetente két alkalommal. Kezeléseket intraperitoneálisan oltottuk, mindegyik antitest vagy F(ab')₂ fragmentum esetén 100 µg dózisban (5 µg/testtömeg gramm). Egy kezelési csoport 6-8 egérből állt.

A térfogatot a daganat három egymásra merőleges irányban mért kiterjedésének szorzatával becsültük, hetente kétszer. Amennyiben egy kezelési csoportban az átlagos tumortérfogat elérte az 1200 mm³-t, a csoport minden egyedét termináltuk. A kísérletet az oltástól számított 73. napon az utolsó csoport terminálásával zártuk.

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával (# 4/2012/DE MÁB), a szükséges engedélyek birtokában végeztük. Minden állatkísérlet a FELASA útmutatónak és a DIN EN ISO 9001 szabályozásnak megfelelően zajlott.

Tumor xenograft metszetek és immunfluoreszcens jelölésük

Az egerek terminálása után a boncolás során a daganatokat eltávolítottuk és azonnal fagyasztottuk. A fagyasztott mintákból 14 µm vastag metszet sorozatokat készítettünk. A szárítást követően a metszeteket fagyasztva tároltuk (-21°C).

Az immunfluoreszcenciás jelölés során a HER2-t A488-76.5 antitesttel, az NK-sejteket A647-anti-CD45 antitesttel jelöltük. A sejtmagokat DAPI-val festettük. A metszet fedésekor Mowiol antifade-et használtunk.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia

Az immunfluoreszcensen jelölt sejteket és szövettani metszeteket konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (LSM 510, Carl Zeiss GmbH). Az *in vitro* ADCC vizsgálatához az NK-sejtek és a célsejtek által kialakított immunszinapszisok felvételéhez 1,5 µm vastag optikai szeleteket készítettünk. Az *ex vivo* daganatmetszetekről a metszet közepső 10 µm-es részéről nyertünk felvételt, 3 db 4 µm vastag optikai szelet készítésével.

Statisztikai adatelemzés

A kísérleti eredmények bemutatásához azok átlagát \pm SD vagy SEM értékeket használjuk. A dózis-hatás görbék elemzéséhez az adatpontokra Hill-egyenletet illesztettünk. A pertuzumab és pertuzumab F(ab')₂ dimerizációgátló hatását egyutas ANOVA-val, Holm-Sidak post hoc teszttel vizsgáltuk, $\alpha = 0,05$ értéken.

Az adott időpontban mért *in vivo* tumorméretet varianciaanalízist egyutas ANOVA-val, Tukey-féle post hoc teszttel végeztük, $\alpha = 0,05$ értéken.

A daganatok *ex vivo* analízisekor az NK-sejtek tumor-penetrációjának függését a daganatszélétől való távolság függvényében „one site competition” függvénnyel illesztettük. A statisztikai analízishez SigmaPlot12 és GraphPad Prism 7 programokat használtuk.

Eredmények és megbeszélésük

I. Radioaktivitás-mentes, kitapadó célsejtek vizsgálatához optimalizált, in vitro ADCC mérési módszer kiválasztása

Az ADCC legalább két sejt – a célsejt és az NK-sejt – interakciója, így az ADCC módszerek egyik legfontosabb kulcseleme a két sejttípus megkülönböztethetősége a kísérlet során.

I.1. Fluoreszcens festék felszabadulásán alapuló *in vitro* ADCC módszer

A JIMT-1 célsejteket FDA vagy CFSE fluoreszcens festékekkel jelölve 24 óra inkubáció után a felülúszóban mért fluoreszcencia intenzitás a FDA és a CFSE esetén is lineárisan arányos a sejtszámmal. A CFSE jobban megmaradt a sejten belül, a felszabadult fluoreszcens festék intenzitása kisebb, mint a FDA esetén. Ennek ellenére a jelentős mennyiségű spontán felszabadult fluoreszcencia intenzitás minkét festék esetén elfedheti egy ADCC kísérletben az ADCC-kiváltotta célsejt pusztulás miatti felszabadulást.

A jelölt sejtek felülúszójából adott időközönként mintát véve a FDA és a CFSE felszabadulás szaturáló görbét mutat az idő függvényében. A sejtek lizálása után a felülúszóban mért fluoreszcencia intenzitás a FDA esetén nem, a CFSE esetén is csak kismértékben emelkedett. Ez a jel nem elegendő az ADCC hatékonyságában bekövetkező kismértékű változások detektálásához.

A FDA és a CFSE felszabaduláson alapuló teszt tehát modellrendszerünkben nem alkalmas az *in vitro* ADCC vizsgálatára.

I.2. Áramlási citometriás ADCC mérés CFSE és propidium jodid alkalmazásával

Az intracellulárisan stabilabban megmaradó CFSE alkalmas lehet a megjelölt célsejtek a jelöletlen élő sejtektől történő elkülönítésére áramlási citometriás mérés

során. Az elpusztult, vagy pusztulóban lévő sejtek propidium jodid felvétele a CFSE-vel jelölt JIMT-1 célsejtek és az NK-sejtek elkülönítésével párhuzamosan lehetővé teszi, hogy a kevert sejtes mintából négy alcsoportot különíthessünk el.

Az NK sejtek szignifikánsan csökkentették a JIMT-1 sejtek túlélését a kezeletlen kontrollhoz képest, antitest hozzáadása nélkül is. A trastuzumabot a rendszerhez adva a célsejtek túlélése nem csökkent szignifikánsan tovább. Az NK-target sejt arány, valamint a behatási idő változtatása nem befolyásolta érdemben az NK és NK + trastuzumab kezelés megkülönböztethetőségét.

Így összességében elmondhatjuk, hogy a PI/CFSE jelölést alkalmazó áramlási citometriás módszer nem elég specifikus az antitest hatás kvantitálásához.

I.3. ADCC vizsgálata a specifikusan ADCC által kiváltott intracelluláris folyamatok detektálásával

A specifikusan az NK-sejtek által az ADCC során kifejtett „halálos csapás” kimutatásához olyan módszert kerestünk, amely specifikusan az ADCC során a célsejtben kiváltott enzimaktiválódások kimutatásán alapult. A PanToxiLux™ teszt szubsztrátja mind a granzim B, mind attól „upstream” kaszpázok aktivitását kimutatja.

A TFL4 jelölés a CFSE-hez hasonlóan hatékonyan bizonyult a célsejtek és az NK-sejtek áramlási citometriás elkülönítésében.

A célsejtekhez adott NK-sejtek már antitestek jelenléte nélkül is szignifikánsan növelték a „halálos csapás”-t kapott sejtek arányát a kezeletlen kontrollhoz képest, a túlélés csökkent ($p = 0,013$), ez az eredmény megegyezett a CFSE/PI módszerrel mérttel. A PanToxiLux módszerrel viszont kimutatható volt, hogy az NK-sejtek trastuzumab jelenlétében nagyobb arányban pusztították a célsejteket, a csupán NK-sejtekkel kezelt mintákhoz képest a túlélés jelentősen csökkent ($p < 0,0001$).

Azonban egyes antitest-kezelések között, valamint a 10 µg/ml trastuzumab kezelésén kívül más koncentráció vagy más antitest és a csak-NK kezelés között szignifikáns különbség nem volt kimutatható.

A PanToxiLux módszernek az ezt megelőző módszerekhez hasonlóan hátránya, hogy a sejtek hosszú ideig szuszpenzióban vannak az előkezelés és a kísérlet időtartama alatt.

I.4. Sejtadhézió impedancia-alapú mérése ADCC valós idejű követésére

Az impedancia alapú sejtanalizátorral mért ohmikus ellenállás értékek az idő függvényében mutatják, hogy a kezelés után az ellenállás csökken, aminek hátterében az NK-sejtek általi célsejt-pusztítás áll.

A dózis-kalibrációs kísérletek alapján kiderült, hogy az ADCC hatékonyságában a dózisfüggő különbségek az 1-20 ng/ml tartományban mutatkoztak leglátványosabban, a 100 ng/ml dózisok már telítették az ADCC-t.

A normalizált sejtindex görbék végpontjai a túlélő célsejtek arányát demonstrálják. A kezeletlen, csak NK-kezelt és NK + 10 ng/ml trastuzumab kezeléseket összehasonlítva a kezeletlenhez képest a csak NK kezelés nem csökkentette szignifikánsan a túlélést ($p = 0,34$), így korábbi módszerekkel összehasonlítva a jelenlegi módszerben befolyásolja legkevésbé az NK-sejtek alapaktivitása a célsejteket.

Ha valamennyi kezelt csoportot összehasonlítjuk, azt találjuk, hogy a csak-NK-hoz képest, az NK mellett adott trastuzumab és pertuzumab antitest kezelések mind 1 ng/ml, mind 10 ng/ml koncentrációban jelentősen csökkentették a túlélést ($p < 0,01$). Az eltérő antitest koncentrációk között is kimutatható szignifikáns különbség ($p < 0,02$). A két különböző antitest hatékonysága statisztikailag hasonlóan mutatkozott azonos koncentrációnál, de az eredményekből az is látható, hogy a trastuzumab konzekvensen némileg hatékonyabban mediálja az ADCC-t, mint a pertuzumab.

Az impedancia alapú sejtdhézió mérés tehát a többi vizsgált módszerrel nem detektálható különbségeket is kimutat, sőt, pontosan kvantitál, ugyanakkor ezen mérési módszerben befolyásolta az NK-sejtek alapaktivitása legkisebb mértékben befolyásolja a mérés kiértékelését.

Ezek miatt az impedancia alapú mérést választottuk további *in vitro* ADCC kísérleteinkhez.

II.

Anti-HER2 antitestek hatásmechanizmusának és hatékonyságának vizsgálata

A trastuzumab és pertuzumab antitestek számos sejtre fejtenek ki közvetlen biológiai hatást, ezért az ADCC hatás elkülönítéséhez szükség volt a teljes trastuzumab és pertuzumab antitestek mellett azok Fc rész nélküli – azaz az Fc által kiváltott hatásmechanizmusoktól mentes – fragmentumaikra. Számunkra az F(ab')₂ fragmentumok voltak szükségesek, melyek közvetlen biológiai hatásprofiljukban legközelebb állnak a teljes antitesthez, mivel bivalens fragmentumok lévén a receptorok keresztkötésére is képesek.

F(ab')₂ fragmentumok előállítása

A kereskedelmi forgalomban csak a teljes IgG trastuzumab és pertuzumab antitestek érhetőek el, ezért ezekből kiindulva volt szükség az F(ab')₂ fragmentumok előállítására nagyobb mennyiségben.

A teljes antitestekről az Fc részt agaróz gyöngyhöz kötött pepszines emésztéssel távolítottuk el, az emésztési folyamatot optimalizáltuk. A túl hosszú emésztési időtartam az antitestek túlzott fragmentálódásához, sérüléséhez vezetett, míg a rövidebb időtartam sok emésztetlen antitestet eredményez. Ideális emésztési időtartamnak a 16 órát választottuk. Az emésztetlen és részlegesen emésztett frakciókat összegyűjtöttük és újabb emésztés után újra fracionáltuk.

A vizsgált antitestek és alegységeik felhasználása előtt igazoltuk, hogy a várt antitest $F(ab')_2$ fragmentumokat kaptuk-e meg. Sem a trastuzumab $F(ab')_2$ sem a pertuzumab $F(ab')_2$ fragmentumokon nem jelölődött az Fc rész, míg a teljes IgG antitestek Fc része jelölhető volt.

A kiindulási antitestek, illetve $F(ab')_2$ fragmentumaik specifikus antigén felismerő tulajdonságainak összehasonlítását kompetíciós vizsgálatokkal végeztük. A trastuzumab $F(ab')_2$ fragmentumával tízszeres feleslegben végzett jelölés után a trastuzumab IgG telítő koncentrációban 10 perc alatt nem tudott kötődni a HER2-höz, nem tudta leszorítani saját $F(ab')_2$ fragmentumát. Fordítva, az először felkötődő IgG után az $F(ab')_2$ nem jelölt. A vizsgálatot a pertuzumab antitestekkel is elvégeztük.

***In vitro* proliferációs vizsgálatok**

Az antitest kezelések *in vitro* proliferációra gyakorolt hatását ismerten eltérő érzékenységgű sejtvonalakon, MTT alapú módszerrel vizsgáltuk, 3 napos kezeléseket alkalmazva. A teljes antitestek és azok $F(ab')_2$ fragmentuma esetén a JIMT-1 sejtek ismert trastuzumab rezisztenciájának megfelelő eredményt kaptuk.

A trastuzumabra érzékeny BT-474 sejtvonal esetén az egész trastuzumab és $F(ab')_2$ fragmentuma a proliferációt hasonló mértékben csökkentette, félmaximális hatékony koncentrációjuk nem különbözik. A pertuzumab IgG a trastuzumabhoz képest kevésbé volt hatékony, viszont a belőle előállított $F(ab')_2$ egy nagyságrenddel hatékonyabbnak bizonyult az IgG párjánál, félhatékony koncentrációja huszadára csökkent.

HER2 heterodimerizáció vizsgálata FRET-tel

A pertuzumab $F(ab')_2$ nagyobb hatékonyságának magyarázata lehet, hogy a kisebb $F(ab')_2$ hatékonyabb a HER2 dimerizációjának gátlásában. A dimerizáció

mértékének vizsgálatához mikroszkópos akceptor fotokióltásos Förster (fluoreszcencia) rezonancia energiáttranszfer módszert alkalmaztunk. Az EGFR-HER2 heterodimerizációt a pertuzumab kezelés némileg, a pertuzumab F(ab')₂ viszont kifejezetten csökkentette.

A pertuzumab dimerizációt gátló hatása a HER2 dimerizációs karjához való kötődésével magyarázható. Az F(ab')₂, valószínűleg a kisebb mérete miatt kedvezőbb szterikus feltételekkel hatékonyabban gátolja meg a dimerizációt illetve bontja meg a már kialakult EGFR-HER2 dimereket.

A kombinált antitest kezelés hatása az *in vitro* sejtproliferációra

A JIMT-1 sejtek esetén, hasonlóan az önállóan alkalmazott antitestekhez, sem az egész antitestek, sem F(ab')₂ fragmentumaik kombinációja nem csökkentette a proliferációt, a sejtvonal intrinszc rezisztenciája érvényesült.

Az antitest-terápiára érzékeny BT-474 sejteken a kombinált kezeléseket részletes dózis-függésben vizsgáltuk. Mind az IgG, mind az F(ab')₂ kezelések során a két antitest kombinációjának alkalmazásával az önállóan alkalmazott antitest maximális gátlásánál erősebb hatás volt elérhető. Az azonos gátlást kifejtő kombinációkat megjelenítő izoból sávok egyenesen húzódnak a két (önálló kezelést jelentő) végpont között, tehát a kombinációs hatás additív, de nem szinergista.

Az *in vivo* daganatellenes hatás vizsgálata

Az *in vivo* hatást SCID egérbe szubkután xenotranszplantált JIMT-1 tumor sejteken vizsgáltuk.

A kontroll HEPES pufferrel kezelthez képest a trastuzumab és pertuzumab antitestek gátolták a xenograftok növekedését. A két antitest hatékonysága között különbség nem volt látható. A két antitestet kombinációban alkalmazva – a monoterápiában használt dózisaikban –, a tumor növekedése jelentősen csökkent a monoterápiához képest. A tumorok növekedésével párhuzamosan azonban a fejlett ECM és általa a szterikus gátló hatás fokozatosan kialakul, s így kb. 250 μm³-es daganattérfogat

elérése után a kezelt daganatok is ugyanolyan ütemben nőnek, mint a kezeletlen daganatok.

Ezzel szemben sem a trastuzumab F(ab')₂, sem a pertuzumab F(ab')₂ fragmentumok, sem ezek kombinációi nem csökkentették az *in vitro* rezisztens JIMT-1 tumorok növekedését a kezeletlen kontrollhoz képest.

Ebből arra következtethetünk, hogy az egész antitestek *in vivo* hatásmechanizmusában az Fc rész játszik jelentős szerepet, az Fc részén keresztül megvalósuló ADCC kiváltásával.

***Ex vivo* szövettani analízis**

A xenograft daganatokból készült metszetekben a JIMT-1 sejteket a humán HER2, míg az NK-sejteket a CD45 specifikus immunfluoreszcenciás jelölésével azonosítottuk.

Megvizsgáltuk tehát az NK-sejtek számának a penetráció mélységétől való függését, és az egyes kezelések eredményeit összehasonlítottuk. A trastuzumabbal és a pertuzumabbal kezelt tumorokban is nagyobb volt az NK-sejtek sűrűsége a kontrollhoz képest, a trastuzumab és pertuzumab kombinált adása pedig még nagyobb NK-sejt denzitást eredményezett. Megfigyeltük, hogy a kombinált IgG kezelésnél az NK-sejtek mélyebbre tudtak hatolni a tumorba, és abban hosszabb és szélesebb szövethiányokat hoztak létre.

Az IgG és kombinált IgG kezelés során az NK-sejtek nem csak nagyobb számban vannak jelen a daganatban, de aktívabbak is. A HER2-pozitív sejtekkel kapcsolatban álló, feltehetőleg ölü szinapszist képző NK-sejtek laposak, a daganatsejt felszínére lapultak, míg a tumorsejtektől távol lévő NK-sejtek kerek, nem alakítanak ki szinapszist. A lapos/kerek NK-sejt arány a kombinációs kezelésben magasabb volt, mint monoterápiában, mely az NK-sejt denzitás arányokon felül is alátámasztja az IgG kezelések ADCC-t kiváltó funkcióját.

Az *in vitro* ADCC vizsgálata

Az effektor NK-sejtvonal funkcionális működését szaturáló trastuzumab antitest jelenlétében *in vitro* az „ölő”-szinapszis kialakulásának megfigyelésével igazoltuk, konfokális mikroszkóppal.

Az *in vivo* észlelt kombinációs hatás kvantitatív kiértékeléséhez az ADCC *in vitro* vizsgálatát végeztük el az *in vivo* kísérletben is használt JIMT-1, valamint nagy affinitású CD16 receptort kifejező NK-92 sejtvonallal.

Az impedancia alapú sejtanalizátorral végzett ADCC módszerrel 6,6 pM antitest koncentráció már detektálható sejtlést mediált NK-sejtek jelenlétében, mely a 67 pM koncentráció trastuzumab esetén már 90% körüli hatékonyságú volt. Az antitestek magukban, NK-sejtek hozzáadása nélkül, nem okozták a target sejtek pusztulását.

Mind a trastuzumab IgG, mind a pertuzumab IgG dózisfüggő módon eredményezett ADCC-t, és ezáltal csökkentette a sejtindexet. A pertuzumab némileg kevésbé volt hatékony a trastuzumabhoz képest. A kombinációs kezeléseknél abban az esetben, amikor a két antitest koncentrációjának összege (3,3 pM + 3,3 pM vagy 33 pM + 33 pM) megegyezett az önállóan alkalmazott antitest koncentrációjával (6,6 pM vagy 67 pM), a citotoxicitás megegyezett. A kombinációban, amennyiben az összes koncentráció az egyedi kétszerese volt, nem szaturáló koncentrációnál (6,6 pM + 6,6 pM) a kétszeres koncentrációjú önálló kezelésnek megfelelő átlagos hatékonyságot adta.

Az EC_{50} értékeket az egyes antitestekre Hill-egyenlettel meghatározva a kombinált kezelés EC_{50} értéke 6,1 pM, szemben az önálló kezelés 12,0 pM (trastuzumab) és 11,5 pM (pertuzumab) értékeivel, ami az additivitást támasztja alá.

Szaturáló koncentrációnál (67 pM + 67 pM) a kombináció nem okozott szignifikáns hatásvövedést.

Következtetések

Kísérleti módszerfejlesztésünk célja a letapadó célsejtek számára ideális nem-radioaktív *in vitro* kísérleti módszer megtalálása és validálása volt.

A felszabadulásos (release) vizsgálatokban a jelölőanyag spontán felszabadulása is csökkenti a módszerek szenzitivitását és a kísérlet reprodukálhatóságát. Ezt tapasztaltuk mind a FDA, mind a CFSE jelölés esetében. Továbbá a célsejtek aktuális metabolikus állapota, az azokat ért korábbi hatások jelentősen módosíthatják az eredményt, növelhetik a független mérések közötti különbségeket.

A sejthalál indikátor propidium-jodid se nem szenzitív, se nem specifikus az ADCC kiváltotta sejthalálra. A PanToxiLux a hasonló kaspáz aktivitást mérő tesztekkel együtt már az ADCC kezdeti intracelluláris lépéseit érzékeli, szenzitivitása és specificitása jobb. De ezen módszereknél is fennáll, hogy szuszpenzióban kell tartanunk a sejteket, ami a letapadó célsejtek számára nem fiziológiás állapot, befolyásolhatja az életképességet, szenzitivitást, és ami a célzott terápia számára talán legfontosabb, a sejtfelszíni molekulák megjelenését, megcélozhatóságát. A célsejtek pusztulása után azok fragmentálódása, valamint a szuszpenzióban tartás miatt bekövetkező spontán sejthalál is befolyásolhatja a kísérlet eredményét.

Az impedancia mérésén alapuló, jelölésmentes technológiák lehetővé teszik a kísérleti rendszer folyamatos követését, megengedve többek között a kitapadás, szétterülés, proliferáció és sejthalál vizsgálatát. A megvizsgált módszerek közül az ECIS Z Θ impedancia alapú valós idejű sejtanalizátorral végzett ADCC vizsgálat rendelkezett a legnagyobb szenzitivitással és volt a leginkább kvantitálható.

Letapadó célsejtek esetén az *in vitro* ADCC pontos kvantitatív vizsgálatához tehát az impedancia alapú sejtanalizátort javasoljuk. Szuszpenzióban növekvő célsejtek esetén a PanToxiLux teszt és rokon módszerek hatékonyabbak lehetnek az ADCC radioaktivitás-mentes *in vitro* mérésére.

A kombinációs kezelések hatékonyságát annak hatásmechanizmusának tisztázásával kívántuk egyértelműsíteni. Az antitestek direkt biológiai (jelátviteli) és ADCC-t kiváltó hatásai között az elkülönítés a teljes antitestek, valamint $F(ab')_2$ fragmentumaik összehasonlító vizsgálatával vált lehetségessé. Az Fc rész eltávolításához pepszin-agarózos emésztést optimalizáltunk.

A trastuzumab és pertuzumab antitestek kombinációjának direkt biológiai hatását kvantitáltuk az adott antitestekre *in vitro* önmagában érzékeny BT-474 sejteken. Az izoból görbék azt mutatták, hogy az antitestek kombinációja additív hatást fejtett ki az IgG és $F(ab')_2$ fragmentumok esetén is. A két antitesttel elérhető maximális hatás nagyobb volt, mint bármelyik antitestet egyedül alkalmazva. Ez azt támasztja alá, hogy a két antitest eltérő hatásmechanizmussal befolyásolja a HER2 jelátvitelt, melyek egymástól függetlenül képesek a sejtnövekedést gátolni.

Bár semelyik antitest, $F(ab')_2$ fragmentum, vagy kombináció sem tudott *in vitro* közvetlen biológiai hatást kiváltani a JIMT-1 sejteken, a teljes antitestek képesek voltak azon ADCC-t mediálni *in vitro* és *in vivo* is.

A trastuzumab és a pertuzumab egyenértékű daganatellenes hatást mutattak. Az antitestek kombinációs alkalmazása jelentősen hatékonyabb volt. A JIMT-1 xenograftok *in vivo* növekedését az $F(ab')_2$ fragmentumok nem csökkentették, nem tudtak ADCC-t kiváltani.

Az *in vivo* eredmények alapján az ADCC a terápiás antitesteknek egy értékes hatásmechanizmusa, mellyel *in vitro* trastuzumab-rezisztens, HER2-pozitív daganatoknál is számolhatunk. A kombinációs kezelés növeli a daganatot infiltráló, valamint a daganatsejteket aktívan megtámadó NK-sejtek számát, és ez fordított korrelációban van a tumor progressziójával és méretével.

A két antitest az ADCC-t nem-szaturáló koncentrációjánál additívan viselkedett, de szaturáló koncentrációknál, amikor a maximális ADCC-t már külön-külön is elérték, nem tudott még hatékonyabb ADCC-t létrehozni. Ez magyarázható azzal, hogy az

ADCC-t kiváltó hatás *de facto* mindkét antitest esetén ugyanúgy, az Fc részen és az NK-sejtek Fc γ receptorain keresztül történik, és a mechanizmus telítődik.

Mivel az *in vivo* kezeléseknél is legalább additivitást észleltünk, így valószínű, hogy az *in vivo* alkalmazott dózisosok nem voltak telítők.

A tumorok növekedésével párhuzamosan azonban a fejlett ECM és általa a szerikus gátló hatás fokozatosan kialakul, és a kezelt daganatok is ugyanolyan ütemben nőnek, mint a kezeletlen daganatok. Az antitestek daganatellenes hatása tehát a rezisztens JIMT-1 daganatok esetén a kis térfogatú/nagyságú daganatoknál jelentősebb.

A HER2-pozitív daganatok esetén az antitestek kombinációs adása már a kezdetektől összességében biztonságosnak és jótékony hatásúnak tűnik, melyet jelenleg a 3. fázisú APHINITY klinikai tanulmány vizsgál. A CLEOPATRA tanulmányból az a következtetés is felmerült, hogy a trastuzumab és pertuzumab terápiát metasztatikus emlőrák esetén nem is szabad abbahagyni, ami a disszeminált daganatsejtek szenzitivitása miatt érthető és logikus következtetés.

A kombinált kezelés ADCC mediálásában észlelt additív hatása, valamint a tumor disszemináció megakadályozásának fontossága miatt a HER2-pozitív emlődaganatok adjuváns kezelésére a kombinált antitest terápiát javasoljuk elsővonalbeli kezelésként, és a terápia abbahagyását, szüneteltetését nem javasoljuk. Valamint felvetjük, hogy a legjobb hatás elérése érdekében a trastuzumab mellett a pertuzumab adása általánosan javasolt mindenféle preszelektációs kritérium nélkül, a maximális engedélyezett koncentrációban.

Támogatók

OTKA NK 101337, OTKA K119690, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025,
GINOP-2.3.2-15-2016-00020

Richter Gedeon Nyrt., TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1- 2012-0001, UNKP-16-3-IV.



Nyilvántartási szám: DEENK/186/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Gábor
Neptun kód: L420JU
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10038245

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, G.**, Szöllősi, J., Vereb, G.: Quantitating ADCC against adherent cells: impedance-based detection is superior to release, membrane permeability, or caspase activation assays in resolving antibody dose response.
Cytom. Part A. 91 (10), 1021-1029, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.23247>
IF: 3.222 (2016)
2. **Tóth, G.**, Szőőr, Á., Simon, L., Yarden, Y., Szöllősi, J., Vereb, G.: The combination of trastuzumab and pertuzumab administered at approved doses may delay development of trastuzumab resistance by additively enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.
mAbs. 8 (7), 1361-1370, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2016.1204503>
IF: 4.881
3. Roszik, J., **Tóth, G.**, Szöllősi, J., Vereb, G.: Validating pharmacological disruption of protein-protein interactions by acceptor photobleaching FRET imaging.
In: Target Identification and Validation in Drug Discovery. Eds.: Jürgen Moll, Riccardo Colombo, Humana Press, Totowa, NJ, 165-78, 2013.





További közlemények

4. Szőőr, Á., Ujlaky-Nagy, L., **Tóth, G.**, Szöllősi, J., Vereb, G.: Cell confluence induces switching from proliferation to migratory signaling by site-selective phosphorylation of PDGF receptors on lipid raft platforms.
Cell. Signal. 28 (2), 81-93, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.11.012>
IF: 3.937

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,04

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
8,103**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.05.28.

