

Mechanism of action of the combination FOLFIRI + cetuximab in the KRAS mutant colon carcinoma *in vitro*

Wirkmechanismus der Kombination FOLFIRI + Cetuximab beim KRAS-mutierten Kolonkarzinom *in vitro*

*Ao. Univ. Prof. DI Dr. Robert Mader, Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Brodowicz,
Ao. Univ. Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Jozefa Gadek-Wesierski, Ao.Univ. Prof. Mag. Dr. Thomas Grunt*

Ausgangssituation

Aufgrund rezenter Untersuchungen wurde die Wirksamkeit des Antikörpers Cetuximab, das den EGF-Rezeptor blockiert, auf Tumoren mit Wildtyp-KRAS beschränkt.¹ Diese Einschränkung betrifft das EGFR-positive Kolonkarzinom, für dessen Behandlung es in Kombination mit Chemotherapie bzw. als Monotherapie nach erfolgter Behandlung mit Oxaliplatin oder Irinotecan zugelassen ist.² Darüber hinaus ist Cetuximab in der Erstlinientherapie von rezidivierten und/oder metastasierten Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich registriert.

Die Spezifizierung des KRAS-Status war deswegen notwendig geworden, weil klinische und präklinische Untersuchungen darauf hingewiesen haben, dass die Wirksamkeit von Cetuximab nicht direkt mit der Expression von EGFR korreliert,³ sondern abhängig vom Aktivierungszustand der rezeptorabhängigen Signalübertragung ist.⁴ Diese konstitutive Aktivierung wurde für KRAS eindeutig belegt und daher als Kriterium für die Einschränkung der Zulassung von Cetuximab eingeführt.

Klinische Daten aus einer Studie der CECOG berichten überraschende Ergebnisse beim direkten Vergleich der Behandlung mit FOLFOX + Cetuximab vs. FOLFIRI + Cetuximab. Im Einklang mit der Literatur war die Effektivität von FOLFOX + Cetuximab bei den KRAS-Mutationen deutlich verringert, wohingegen der FOLFIRI-Arm bei dieser Subgruppe in der Anfangsphase der Therapie signifikant besser abschnitt. Darüber hinaus stiegen Progressionsrate und Mortalitätsrate nach Absetzen von FOLFIRI unter Erhaltungstherapie mit Cetuximab sprunghaft an. In einem *in vitro*-Modell soll diese Konstellation simuliert werden, um eine mögliche Sensibilisierung von Kolonkarzinompatienten mit KRAS-Mutation auf Cetuximab durch Irinotecan zu belegen. Pharmakokinetische Effekte als alternative Ursache für die Beobachtungen scheiden deswegen aus, weil Cetuximab weder die Pharmakokinetik von Irinotecan noch die von Oxaliplatin beeinflusst.⁵ Der Mechanismus ist daher höchstwahrscheinlich pharmakodynamischer Natur.

Ziele / Methoden

In diesem Projekt sollte die auffallend hohe klinische Wirksamkeit der Kombination von Irinotecan + Cetuximab in Kolonpatienten mit KRAS-Mutation auf ein präklinisches Modell übertra-

gen werden. Dabei wurden folgende Ziele angestrebt:

- a) ein in vitro-Modell zu etablieren, das diese klinische Beobachtung abbildet und
- b) mittels dieses Modells den zugrunde liegenden Mechanismus zu untersuchen.

Als Modelle wurden Kolonkarzinome mit niedrigmalignem und hochmalignem Genotyp und KRAS-Mutation eingesetzt (HCT-116 und CCL 228) und mit KRAS-Wildtyp verglichen (HT-29 und CaCo2). Da der Unterschied des Therapieschemas FOLFOX - FOLFIRI nur in Irinotecan besteht, beschränkten wir uns für diese Untersuchung auf diese Substanz im direkten Vergleich mit Oxaliplatin. Eingesetzt wurde dabei der aktive Metabolit von Irinotecan, SN-38, der durch Umsetzung über Carboxylesterase aus der Muttersubstanz Irinotecan gebildet wird (ca. 100 - 200fach wirksamer als die Muttersubstanz Irinotecan). Als Parameter wurden dabei die Zellviabilität mittels MTT-Assay (Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay von Promega), die Energiebilanz mittels ATP-Assay (CellTiter LumiGLO von Promega) sowie die Aktivierung von Caspasen (Caspase-9 und Caspase-3) in Zellen und im Zellüberstand (Caspase-9-GLO & Apo-One, Promega) sowie die Freisetzung ins Kulturmedium einer Apoptose-spezifischen Protease (MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay, Promega) gemessen

Ergebnisse

Die im folgenden beschriebenen Ergebnisse konnten im Laufe des Projektes erzielt werden und wurden auch schon als Abstracts auf Fachtagungen vorgestellt. Es handelt sich um eine kursorische Darstellung der wichtigsten Ergebnisse, da nicht alle Daten im Bericht präsentiert werden können.

1. Zytotoxizität von Cetuximab in vitro

Um vorweg die Frage nach dem Einfluss von Cetuximab zu klären, wurde die Zellen im Langzeitexperiment mit der Substanz über 144 Stunden inkubiert und in zwei Assays mit einander verglichen. Dabei war der IC50 ist größer 10 µg Cetuximab/ml und es konnte wegen der fehlenden Zytotoxizität kein IC50 ermittelt werden (getestet mittels MTT-Assay und ATP-Assay bei CCL228, HT-29, HCT-116 und CaCo2).

Anmerkung: CCL228 und HCT-116 = KRAS mutiert; HT-29 und CaCo2 = KRAS Wildtyp.

2. Kombination von Cetuximab mit Oxaliplatin oder Irinotecan

Um zu untersuchen, ob Cetuximab seine Wirkung erst in Kombination mit Oxaliplatin oder Irinotecan entfaltet, wurden Kombinationsansätze verfolgt und mit der Dosis-Wirkungskurve von Oxaliplatin bzw. Irinotecan verglichen. Der IC50 der vier getesteten Zelllinien wurde von Cetuximab mit einer einzigen Ausnahme (ATP-Messung bei HT-29) nicht verändert (Abbildung 1). Dies wurde zur Absicherung wiederholt mittels MTT-Assay und ATP-Assay getestet. Diese Absicherung war deswegen wichtig, weil nunmehr für die weiteren Untersuchungen ein signifikanter Effekt von Cetuximab ausgeschlossen werden konnte und somit der Kandidatenkreis eingeschränkt wurde.

3. Vergleich der beiden Zytotoxizitäts-Assays

Die beiden verwendeten Assays, die einerseits mitochondriale Aktivität (MTT-Assay) bzw. Energieumsatz (ATP-Assay) monitieren, unterscheiden sich in den gemessenen IC₅₀ nur geringfügig. Beide Assays sind daher brauchbare Methoden und liefern praktisch idente Aussagen.

4.a Differentielle Wirksamkeit von Oxaliplatin

Die mehrfache Wiederholung der Dosis-Wirkungskurven von Oxaliplatin lieferte einen abgesicherten IC₅₀ für diese Substanz, der für alle vier getesteten Linien zwischen 10 und 20 µM Oxaliplatin lag (Inkubationsdauer: 96 Stunden). Es war daher für Oxaliplatin keine Abhängigkeit vom KRAS Mutationsstatus nachzuweisen.

4.b Differentielle Wirksamkeit von Irinotecan

Es gab hingegen einen Trend zu verstärkter Wirksamkeit von Irinotecan in vitro beim KRAS Mutations-Genotyp, der sich in einer deutlich verstärkten Sensitivität ausdrückte (Tabelle 1). Um diese Daten auf eine entsprechend breite Basis zu stellen, würde sich eine Erhöhung der Fallzahl anbieten, die im Rahmen dieses Projektes nicht mehr durchgeführt werden konnte.

5. Wirkung des Farnesyltransferase-Inhibitors L-744,832

Da Farnesyltransferase-Inhibitoren eine spezielle Wirksamkeit bei KRAS mutierten Kolonkarzinomen nachgesagt wird, testeten wir die differentielle Wirkung eines Farnesyltransferase-Inhibitors (L-744,832) in unserem in vitro System. Dabei wurde beobachtet, dass die Wirksamkeit bei allen vier Zelllinien als sehr gering (IC₅₀ > 50 µM). Dieses Ergebnis wurde sowohl mittels MTT-Assay und ATP-Assay bei CCL228, HT-29, HCT-116 und CaCo2 bestätigt.

6. Inhibierung des Hedgehog-Signalweges

Ähnlich war die Wirkung von Cyclopamin, das als Inhibitor des Hedgehog-Signalweges durchwegs mit einem IC₅₀ > 25 µM anzusetzen war (ebenso wie bei L-744,832 getestet mittels MTT-Assay und ATP-Assay bei CCL228, HT-29, HCT-116 und CaCo2). Somit wurde klargestellt, dass auch der Hedgehog-Signalweg in diesem System keine tragende Rolle spielt.

7. Aktivierung von Caspase-3 durch Oxaliplatin

Ausgehend von den Dosis-Wirkungskurven wurde eine Aktivierung des Apoptoseprogrammes durch diese Substanz erwartet. Diese Aktivierung von Caspase-3 im Zellkulturüberstand wurde wenn überhaupt bei 100 µM bzw. 1000 µM Oxaliplatin beobachtet, wobei durch die Kombination mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor L-744,832 keine nennenswerte Verstärkung auftrat (Abbildung 2). Im Einklang mit den Daten der Zytotoxizitätstestung hatte Cetuximab hat auf diese Aktivierung keinen Einfluss, ebenso wie der Mutationsstatus von KRAS.

8. Aktivierung von Caspase-3 durch Irinotecan

Etwas anders verlief die Aktivierung des Apoptoseprogrammes durch SN-38, dem aktiven Meta-

boliten von Irinotecan: bei 1 μM SN-38 erfolgt in den Linien HT-29 und CaCo2 (WT) und HCT-116 (mutiert) die stärkste Aktivierung von Caspase-3, während bei CCL228 keinerlei Aktivierung aufweist. Ähnlich zu Oxaliplatin wurde durch die Kombination mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor L-744,832 keine nennenswerte Verstärkung beobachtet. Somit war die Aktivierung von Caspase-3 erst ab der sehr hohen Konzentration von 100 μM Oxaliplatin, aber bereits bei 1 μM SN-38 maximal (Abbildung 3).

Ausblick

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen skizzieren eine Rationale, die im Sinne eines umgekehrten translationellen Ansatzes eine klinische Beobachtung zurück ins Labor trägt, um den Mechanismus aufzuklären. Die vorliegenden Daten sind als Pilotprojekt geeignet, die Wertigkeit dieses Ansatzes zu untermauern, bedürfen aber einer Verbreiterung durch eine Aufstockung der untersuchten zellulären Systeme sowie weiterer Inhibitoren der Signalübertragung, um die KRAS-medierte Kommunikation nachhaltig zu unterdrücken. In einem nachfolgenden Projekt wären insbesondere die Signalwege ras - raf - MEKK - ERK und PI3K - Akt - mTOR mögliche Kandidaten für weiterführende Untersuchungen.^{8,9} Diese sollen auf der Ebene der Aktivierung von Signalwegen sowie funktionell durch entsprechende Inhibitoren fortgeführt werden (z.B. FWF-Antrag im Bereich der translationellen Forschung).

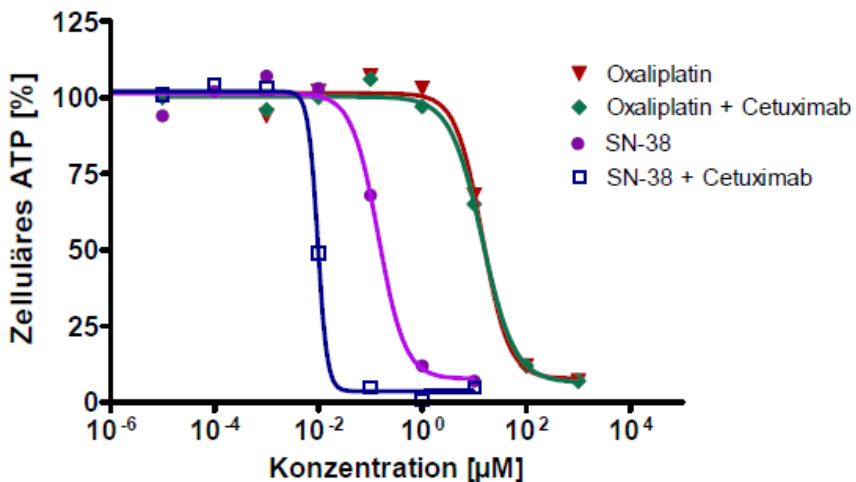


Abb. 1: Wirkung von Oxaliplatin bzw. Irinotecan \pm Cetuximab auf HT-29).

Tabelle 1. KRAS Mutationen und Sensibilität auf Irinotecan

Linie	IC ₅₀ [µM]	KRAS-Status
CCL228	0,0097	mut
HCT-116	0,0283	mut
HT-29	0,0315	WT
CaCo2	0,2917	WT

Tabelle 1

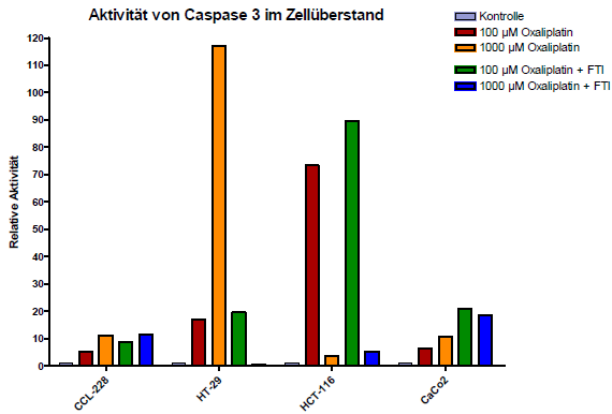


Abb. 2: Aktivierung des Apoptose-Programmes durch Oxaliplatin.

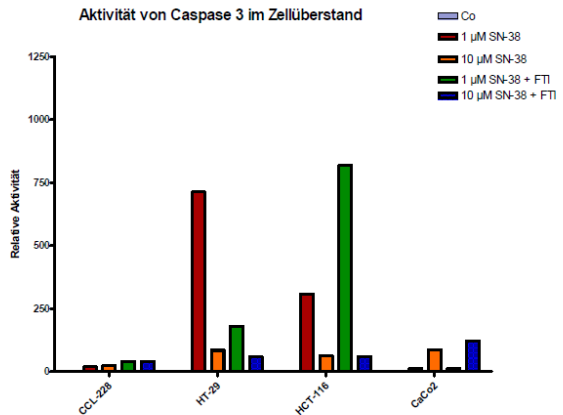


Abb. 3: Aktivierung des Apoptose-Programmes durch SN-38.