



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MALATTIE RESPIRATORIE  
XXIV° CICLO**

---

Dr.ssa Giovanna Privitera

---

**STUDIO DI NUOVI APPROCCI FARMACOLOGICI IN GRADO  
DI INIBIRE L'ATTIVAZIONE DEI RECETTORI DEL  
FATTORE DI CRESCITA EPIDERMICO (EGF) IN LINEE  
CELLULARI DI CARCINOMA POLMONARE NON A  
PICCOLE CELLULE (NSCLC)**

Tutor: Chiar.mo Prof. Nunzio Crimi

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Carlo Vancheri

---

**Anno Accademico 2011 – 2012**

# INDICE

---

<b>1. INTRODUZIONE</b>	
<b>Inquadramento epidemiologico e clinico-terapeutico del carcinoma polmonare</b>	
1.1 <i>Epidemiologia</i>	<i>pag. 2</i>
1.2 <i>Fattori di rischio</i>	<i>pag. 3</i>
1.3 <i>Classificazione del carcinoma polmonare</i>	<i>pag. 5</i>
1.4 <i>Quadro clinico</i>	<i>pag. 5</i>
1.5 <i>Modalità di diffusione</i>	<i>pag. 6</i>
1.6 <i>Diagnosi</i>	<i>pag. 6</i>
1.7 <i>Terapia</i>	<i>pag. 7</i>
1.8 <i>Alterazioni molecolari nel carcinoma polmonare e terapia mirata</i>	<i>pag. 9</i>
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b>	<i>pag. 20</i>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	
3.1 <i>Linee cellulari, reagenti e farmaci</i>	<i>pag. 21</i>
3.2 <i>Saggio per la valutazione della sopravvivenza cellulare</i>	<i>pag. 21</i>
3.3 <i>Estrazione dell'mRNA e sintesi del cDNA</i>	<i>pag. 24</i>
3.4 <i>Real Time PCR</i>	<i>pag. 24</i>
3.5 <i>Ibridazione in situ fluorescente (FISH)</i>	<i>pag. 27</i>
3.6 <i>Analisi statistica</i>	<i>pag. 28</i>
<b>4. RISULTATI</b>	
4.1 <i>Effetti di cetuximab e di trastuzumab sulla proliferazione di linee cellulari di carcinoma polmonare</i>	<i>pag. 29</i>
4.2 <i>Influenza del trattamento combinato sui livelli di mRNA dell'EGFR e dell'HER-2</i>	<i>pag. 31</i>
4.3 <i>Amplificazione dei geni EGFR e HER-2</i>	<i>pag. 33</i>
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<i>pag. 35</i>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<i>pag. 37</i>

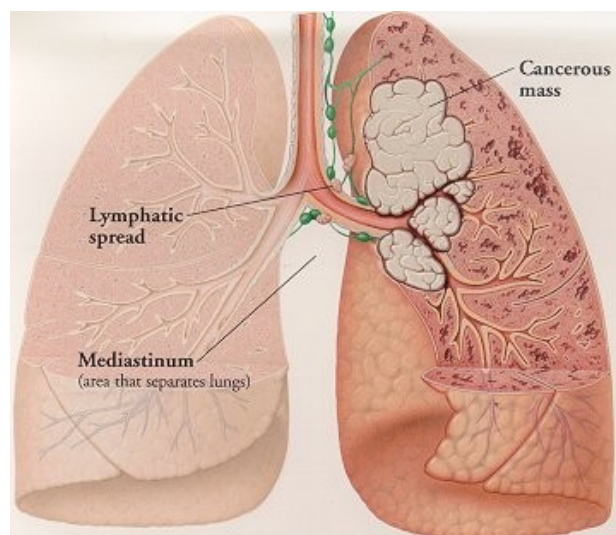
# 1.INTRODUZIONE

## **INQUADRAMENTO EPIDEMIOLOGICO E CLINICO-TERAPEUTICO DEL CARCINOMA POLMONARE**

### *1.1 Epidemiologia*

Il tumore del polmone (Figura 1) rappresenta attualmente il carcinoma più frequentemente diagnosticato e costituisce la principale causa di morte per tumore solido al mondo (Sun S. et al., 2007). I tassi di sopravvivenza, variabili sulla base dello stadio di malattia e del performance status del paziente, pur essendo aumentati negli ultimi 30 anni grazie ai miglioramenti nelle tecniche diagnostiche e alla introduzione di terapie di associazione, permangono molto bassi: in media solo il 15% dei pazienti è vivente a 5 anni dalla diagnosi.

L'incidenza e la mortalità del tumore del polmone variano a seconda dell'età, del genere, del luogo geografico, del gruppo etnico e della classe sociale.



**Figura 1.** Carcinoma polmonare

Per quanto riguarda la distribuzione geografica, la neoplasia è più diffusa nei Paesi sviluppati: in alcune popolazioni, come per esempio negli uomini afro-americani di

diverse aree degli Stati Uniti, si verificano annualmente più di 100 casi ogni 100.000 abitanti, mentre in altre zone del mondo, come in Africa e in generale nelle Nazioni in via di sviluppo, il carcinoma polmonare è una malattia relativamente rara. In Europa l'incidenza maggiore si ha nelle regioni orientali. In Italia il numero nuovo di casi per anno si aggira intorno ai 35000-40000/100000 abitanti, con un tasso di mortalità di 81/100000 negli uomini e 12/100000 nelle donne. Fino a non molto tempo fa l'incidenza della neoplasia era maggiore nell'uomo rispetto alla donna con un rapporto maschi:femmine 5:1; oggi tale rapporto è 2,5:1 a causa della crescente abitudine al fumo nel sesso femminile. Nelle donne il carcinoma polmonare rappresenta oggi il quarto tipo di tumore più comune, dopo quelli al seno, al colon-retto e allo stomaco (Ferlay et al., 2001).

L'età media di insorgenza del tumore polmonare varia tra i 40 e 70 anni di età, con un picco intorno ai 50-60 anni e solo il 2% dei casi viene diagnosticato prima dei 40 anni ([www.cancer.gov/cancerinfo/types/lung](http://www.cancer.gov/cancerinfo/types/lung)).

### ***1.2. Fattori di rischio***

Il cancro del polmone è una malattia multifattoriale che riconosce nella cancerogenesi cause ambientali e cause genetiche (Fong KM et al., 2003).

Il fumo di sigaretta è oggi ritenuto il fattore eziologico più importante (IARC, 1986; Hecht et al., 2012). Esso è responsabile di un incremento di 10-20 volte del rischio di insorgenza di cancro polmonare rispetto ai non fumatori. Tuttavia molti studi hanno posto in evidenza il ruolo patogenetico di altri fattori: genetici, ambientali e virali.

Fattori genetici possono infatti predisporre al carcinoma polmonare. A tale proposito recenti studi hanno dimostrato che nella sua patogenesi possa essere

implicato il gene FHIT, localizzato a livello del braccio corto del cromosoma 3 (van Zandwijk et al., 2002).

Alcuni studi stanno portando alla luce una causa che fino a poco tempo fa era molto sottovalutata e cioè la presenza di radon all'interno delle abitazioni o luoghi di lavoro (De Groot et al., 2012). Da questi studi emerge che il radon rappresenta la prima causa di tumore al polmone dopo il fumo da sigaretta, con un'incidenza che varia dal 10% al 20% dei casi di tumore polmonare nei paesi occidentali e con circa 3.000 morti l'anno in Italia. Il radon aumenta la sua potenzialità cancerogena di 25 volte nel caso di soggetti fumatori, in quanto questi presentano tessuti polmonari che intrappolano facilmente le particelle di questo gas.

Molte sostanze di origine lavorativa sono riconosciute essere carcinogeni polmonari anche se sono meno rilevanti del tabacco dal punto di vista epidemiologico (Stewart et al, 2003). Gli agenti eziologici chiamati in causa in questo caso sono di tipo fisico e chimico. Gli agenti chimici si distinguono in organici e inorganici. I primi comprendono le miscele di composti aromatici policiclici derivanti dalla combustione incompleta dei materiali organici. Queste sostanze chimiche hanno la prerogativa di permanere a lungo nei polmoni per la loro stabilità e per la loro difficile eliminazione.

Tra i composti inorganici il più importante è l'amianto. Il crisotile, una delle fibre di questo minerale naturale, costituisce oltre il 90% dell'amianto usato nella fabbricazione di materiale isolante, nella produzione di freni e frizioni, nei prodotti dell'edilizia, nelle plastiche e vernici come sostanza inerte. Altri minerali, citati con minor frequenza come carcinogeni polmonari, sono l'arsenico, il cromo, il nichel e il cadmio.

Ai fattori causali si affiancano i fattori di rischio, ossia le forme che facilitano l'insorgenza del tumore, come le malattie croniche irritative preesistenti dei

polmoni, quali bronchite cronica e bronchiectasia. Non bisogna nemmeno sottovalutare una tubercolosi curata in passato, sulla cui cicatrice il tumore può attecchire facilmente.

### ***1.3. Classificazione del carcinoma polmonare***

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) il carcinoma polmonare può essere distinto in due istotipi: **carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC)** e **carcinoma a piccole cellule o microcitoma (SCLC)**. Il NSCLC rappresenta circa il 75-80% delle diagnosi ed è a sua volta suddiviso in 4 sottogruppi (Travis et al., 2004; Franklin et al., 2000):

1. carcinoma a cellule squamose e carcinoma fusiforme;
2. carcinoma a piccole cellule: a chicco d'avena, a cellule intermedie, combinato;
3. adenocarcinoma;
4. carcinoma a grandi cellule (a cellule giganti, a cellule chiare).

### ***1.4 Quadro clinico***

Il tumore del polmone può essere asintomatico (6% dei casi), oppure può presentarsi con:

#### *Sintomatologia generale*

*Centrale:* tosse, emottisi, dolore, sintomi da polmonite.

*Periferica:* tosse, dolore toracico, dolore alla spalla e al braccio (tumore di Pancoast), dispnea, versamento pleurico, ascesso polmonare.

*Sintomatologia regionale:* disfonia, dispnea, disfagia, sindrome della vena cava superiore, segni di tamponamento pericardico.

*Sintomatologia sistemica:* sintomi secondari alla presenza di metastasi (ittero, dolore addominale, dolori ossei, deficit neurologici, fratture patologiche, calo ponderale, anoressia, astenia).

*Sindromi paraneoplastiche:*

*Cardiovascolari* (tromboflebiti, endocardite trombotica).

*Neuromuscolari* (demenza, retinopatia, neuropatia vegetativa, miastenia).

*Ematologiche* (eritrocitosi, leucocitosi).

*Metaboliche* (ipercalcemia, inappropriata secrezione di ADH e di ACTH).

*Osteoartropatia polmonare ipertrofica.*

*Dermatologiche:* acantosi nigricans, dermatomiosite.

### ***1.5 Modalità di diffusione***

Il carcinoma polmonare può diffondere per:

1. *Via diretta* con invasione della pleura viscerale e parietale, dei grossi vasi, del pericardio, del diaframma, della parete toracica e della colonna vertebrale.
2. *Via linfatica* con metastatizzazione dei linfonodi prossimali e successivamente distali.
3. *Via ematica* con metastatizzazione a distanza di qualsiasi organo.

### ***1.6 Diagnosi***

Ad oggi per il tumore del polmone non esiste una metodica diagnostica validata come screening di soggetti a rischio. In caso di sospetto clinico di carcinoma broncogeno le indagini strumentali sono rappresentate, in primo luogo, dall'esame radiografico del torace; il completamento della stadiazione richiede tecniche di imaging quali la Tomografia computerizzata (TC) e la TC associata alla Tomografia a emissione di positroni (TC-PET). Per la diagnosi istologica si ricorre

alla metodica dell'agoaspirazione trans-toracica (Fine Needle Aspiration Citology – FNAC) sotto guida TC nel caso di masse toraciche periferiche o submantellari o extra-toraciche, biopsia endobronchiale e/o trans-bronchiale nel caso di lesioni centrali vegetanti con interessamento di linfonodi in stazioni mediastiniche accessibili. La strategia terapeutica è scelta in base all'estensione della neoplasia la cui stadiazione è basata sul sistema TNM (AJCC Cancer Staging Manual, 6<sup>th</sup> ed. 2002) che consente di definire situazioni a prognosi progressivamente peggiore.

### ***1.7 Terapia***

Nel NSCLC il principale approccio terapeutico consiste nella resezione chirurgica (eventualmente preceduta e/o seguita da chemioterapia) limitata però ai soli stadi iniziali ed a eventuali lesioni localmente avanzate (stadio III A) ma è gravata, soprattutto in questi ultimi, da un outcome a lungo termine peggiore.

Alla diagnosi, la maggior parte dei pazienti presenta una malattia avanzata o metastatica (stadio III B e IV); in questi casi l'approccio terapeutico si fonda, essenzialmente, sull'associazione tra più linee poli-chemioterapiche e di terapia radiante concomitante o sequenziale: l'outcome (inteso come sopravvivenza, intervallo libero da progressione di malattia e qualità di vita) di questi pazienti appare insoddisfacente, con tassi di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi per lo stadio IV di meno dell'1%.

Per il trattamento del carcinoma non a piccole cellule, sono stati utilizzati fin dagli anni ottanta vari farmaci antitumorali (cisplatino e il suo analogo carboplatino, la mitomicina, l'ifosfamida, l'etoposide e gli alcaloidi della vinca come vinblastina e vindesina), ma solo pochi di questi agenti hanno dimostrato un'attività superiore al 15%. Dal 1990, nuove molecole rappresentate dai taxani (paclitaxel, docetaxel), dai nuovi antimetaboliti (gemcitabina), dagli analoghi degli alcaloidi della vinca



(vinorelbina) e dagli inibitori della topoisomerasi-I (irinotecan) hanno dimostrato un'attività in questa neoplasia (Crinò 1999 et al; Cardenal et al., 1999).

Nel 1995, una meta-analisi condotta dal NSCLC Collaborative Group ha dimostrato che una polichemioterapia contenente platino, rispetto alla sola terapia di supporto, prolunga la sopravvivenza, migliora il controllo dei sintomi e la qualità di vita dei pazienti affetti da NSCLC. Tutti gli studi sino ad oggi effettuati, disegnati con l'obiettivo di dimostrare l'equivalenza della monochemioterapia rispetto alla polichemioterapia, hanno dimostrato che le associazioni di due farmaci sono più efficaci rispetto all'azione di un singolo agente chemioterapico. Varie esperienze randomizzate hanno mostrato che le nuove associazioni basate sul platino associato a un chemioterapico di nuova generazione sono migliori rispetto alle vecchie combinazioni in termini di risposta e di tossicità, pur senza evidenziare un beneficio per quanto concerne la sopravvivenza. In Europa, l'associazione più comunemente utilizzata è cisplatino-gemcitabina seguita da cisplatino-vinorelbina e cisplatino-docetaxel, mentre negli Stati Uniti lo schema più utilizzato è carboplatino-paclitaxel. Con questi regimi terapeutici il tasso di risposte obiettive in pazienti con malattia avanzata è intorno al 25-35%, la percentuale di sopravvivenza ad un anno del 30-40% e la mediana di sopravvivenza di circa 8-9 mesi. Il trattamento chemioterapico con due farmaci è indicato per tutti i pazienti in buone condizioni generali (ECOG performance status 0-1), di età non superiore a 70 anni che non presentano comorbidità importanti. La durata ottimale è di 3-4 cicli, ma è prassi comune, in presenza di apprezzabile risposta o di un beneficio soggettivo, proseguire fino ad un massimo di 6 cicli.

### ***1.8 Alterazioni molecolari nel carcinoma del polmone e terapia mirata***

Nel corso degli ultimi anni si è registrato lo sviluppo di nuove molecole dotate di particolari meccanismi d'azione, in grado d'interferire in maniera selettiva con la cellula tumorale, bloccandone la proliferazione. Questi nuovi farmaci, definiti "biologici" in quanto indirizzati verso target molecolari specifici diversi da quelli tradizionali della chemioterapia, hanno dimostrato, in esperienze precliniche, interazioni favorevoli con le associazioni chemioterapiche classiche.

Benché tali farmaci agiscano prevalentemente con un meccanismo citostatico e non citotossico, la capacità di interferire con i processi di proliferazione cellulare ed antiapoptotici fa sì che, nei pazienti sensibili, la regressione della malattia risulti più rapida di quanto comunemente osservato con la chemioterapia tradizionale.

Per il carcinoma del polmone assumono particolare importanza le alterazioni molecolari dell'EGFR, della proteina Ras e dell'oncogene Myc. Altre alterazioni possibili possono riguardare p53 e FHIT.

Nel NSCLC l'espressione dell'EGFR compare fin dalle prime tappe della cancerogenesi: nella metaplasia squamosa e nel carcinoma in situ. Un 40-60% dei carcinomi squamosi esprime EGFR, mentre lo esprime il 60-90% dei carcinomi non squamosi.

Vari studi sembrano suggerire una correlazione fra espressione elevata di EGFR ed una ridotta sopravvivenza nel NSCLC, anche se il ruolo di EGFR come fattore prognostico sembra essere maggiore se considerato in associazione ai recettori con cui dimerizza, fra cui HER2/neu. Questo problema rimane ancora controverso anche per i diversi modi con cui l'espressione dell'EGFR è valutata, rendendo difficile confrontare i dati fra i diversi studi; l'immunoistochimica in ogni caso sembra essere il più diffuso.

**EGFR** o **HER-1** è una glicoproteina transmembrana di 170 KDa, formata da 1186 residui aminoacidici, appartenente alla famiglia dei recettori dei fattori di crescita tirosin-chinasici quali: EGFr/ErbB-1, HER2/Erb-2, HER3/Erb-3 e HER4/ErbB-4. Tale recettore è specifico per sei ligandi: il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita trasformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), l'amfiregulina, l'epiregulina, la  $\beta$ -cellulina e il fattore di crescita legante l'eparina. Il recettore è codificato dal proto-oncogene c-erbB-1, presente sul cromosoma 7; questo gene è amplificato o sovraespresso in diverse neoplasie maligne epiteliali e sembra contribuire alla progressione e alla aggressività biologica del tumore (Goustin et al., 1986).

L'EGFR consiste di 3 domini: un dominio extracellulare, uno intracellulare e uno transmembrana. Nel dominio extracellulare, formato da 621 aminoacidi (aa), sono concentrati i siti di glicosilazione e regioni ricche di cisteine. Sono identificabili 4 regioni: la regione 1 che è importante nella dimerizzazione indotta dal ligando; le regioni 2 e 4 che sono ricche in residui di cisteina e la regione 3 che rappresenta il sito di legame per l'EGF. Il dominio intracellulare di 541 aa è costituito dalla regione tirosin-chinasica e dall'estremità carbossi-terminale con 5 siti di autofosforilazione; il dominio tirosin-chinasico del gene è codificato dagli esoni 18-21: dai dati presenti in letteratura, la maggior parte delle mutazioni sono state infatti evidenziate a carico degli esoni 19 e 21 (Riely GJ et al., 2006). Il dominio transmembrana è infine formato da 24 aa ed ha la funzione di connettere il dominio extra- con quello intracellulare.

Nello stato inattivo il recettore esiste in forma monomeric. Il legame del fattore di crescita stabilizza la forma dimerica (attiva) e provoca la sua autofosforilazione. Sono tre i meccanismi attraverso i quali le alterazioni dell'EGFR possono contribuire allo sviluppo del carcinoma del polmone. Il primo meccanismo è la sua iperfunzione a seguito di super-stimolazione esterna (la cosiddetta "iperespressione

dei ligandi” dell’EGFR): la continua presenza di molecole in grado di stimolare l’EGFR, benché non sia sufficiente ad innescare da sola il processo di carcinogenesi, porta ad una condizione perpetua di stimolo proliferativo, e induce la moltiplicazione cellulare, incluso quella delle cellule precedentemente mutate. Un secondo meccanismo è quello dell’amplificazione dell’EGFR. Se il numero di recettori per unità di superficie cellulare aumenta, aumenta di conseguenza la capacità complessiva della cellula di rispondere ad un dato stimolo esterno. Di conseguenza, una cellula che esprime un maggior numero di recettori EGFR è una cellula con una maggiore capacità proliferativa. Il terzo meccanismo è costituito dalle “mutazioni attivanti” dell’EGFR. Le mutazioni del gene di EGFR possono portare all’indipendenza funzionale del recettore, rendendolo attivo anche in assenza di uno stimolo esterno. Tali mutazioni sono presenti nel 20% dei tumori NSCLC, ma raggiungono l’80% di presenza nei tumori NSCLC che non siano non responsivi alla chemioterapia, nell’adenocarcinoma polmonare, nel sesso femminile e nei soggetti di origine asiatica (Fontanini et al., 1997).

La famiglia **ras** comprende 3 membri H-ras, N-ras e K-ras. Mutazioni della proteina ras, soprattutto del tipo K-ras, sono presenti nel 20-40% degli adenocarcinomi polmonari e rappresentano un fattore prognostico sfavorevole (Rosell et al., 1993; Bunn et al., 2000).

**Myc** è invece un oncogene che codifica la sintesi di una proteina che si trova alla fine della stessa cascata di eventi determinata dalla stimolazione della proteina ras; ciò significa che una mutazione attivante di Myc o una sua iperespressione mima fisiologicamente l’attivazione di ras. Le alterazioni di Myc sono associate a moltissime forme di cancro. Nel carcinoma del polmone assumono particolare importanza le forme cMYC, MYCn e MYC1. Mentre la mutazione di cMyc è presente in circa l’8-20% delle forme di NSCLC, la mutazione delle ultime due

forme rappresenta un meccanismo patogenetico fondamentale nello sviluppo del NSCLC.

L'inattivazione di geni oncosoppressori p53 e FHIT si riscontra invece con alta frequenza in tutti gli istotipi e l'inattivazione di geni che controllano l'entrata in ciclo della cellula, Rb e p16INK4A, contraddistingue rispettivamente i microcitomi e i tumori non a piccole cellule. Inoltre altre alterazioni, più generali, consistono in complessi riarrangiamenti cromosomici, quali delezioni e traslocazioni non-reciproche, instabilità di microsatelliti (sequenze ripetute di DNA), sregolata attività telomerasica e neo-angiogenesi. Specifiche alterazioni genetiche possono essere riscontrate non solo nel tumore invasivo, ma anche negli stadi intermedi (metaplasia, displasia) e precoci della trasformazione quali la mucosa bronchiale morfologicamente sana di pazienti con tumore e anche di forti fumatori senza tumore. Fattori di rischio che identificano il tessuto bronchiale normale e pre-neoplastico a rischio di progressione maligna possono essere quindi definiti a livello molecolare (Brambilla C et al., 2003).

L'identificazione e la caratterizzazione di alterazioni genetiche che accompagnano l'insorgenza e la progressione di un tumore polmonare possono pertanto rappresentare degli utili marcatori molecolari da utilizzare per la diagnosi precoce di carcinoma polmonare (Sozzi G, 2003). I marcatori molecolari finora utilizzati, oltre le alterazioni di microsatelliti (LOH, MIN), sono l'ipermetilazione genica e le mutazioni in specifici oncogeni (K-ras 2) e geni oncosoppressori (p53) (Hiyama et al., 1995).

Il gene **HER-2** è un protooncogene che controlla la sintesi di una proteina superficiale della membrana cellulare del peso di 185 KDa, chiamata proteina HER-2, dotata di attività tirosin-chinasica. Questa proteina, chiamata anche p185HER2, trasmette segnali di crescita dall'ambiente extracellulare al nucleo,

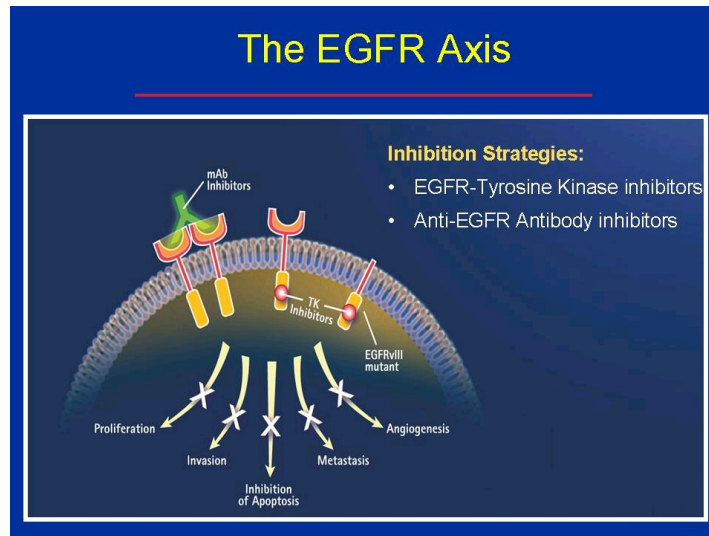
regolando alcuni aspetti dei processi di crescita, divisione e differenziamento cellulare (Coussens et al., 1985). Essa è composta da 3 domini:

- un dominio extracellulare, sede di interazione con il ligando, che riceve i segnali dall'ambiente extracellulare;
- un corto segmento lipofilo transmembrana che trasmette i segnali attraverso la membrana;
- una porzione intracellulare dotata di attività tirosino-chinasica che attiva il processo di trasduzione del segnale dal citoplasma al nucleo.

In molti tumori solidi, la proteina HER-2 viene sovraespressa, di solito, in seguito all'amplificazione del gene HER-2, causata dall'alterazione del processo di controllo genico e non da una mutazione del gene (Pauletti et al., 1996). La sovraespressione della proteina HER-2 mantiene nello stato inattivato il recettore che trasmette segnali al nucleo stimolando la crescita e portando, in alcuni casi, alla trasformazione neoplastica. Considerando i segnali indotti dai recettori HER, il recettore HER-2 assume un ruolo molto importante. Infatti HER-2 non interagisce con il ligando, ma agisce invece come co-recettore per gli altri membri della famiglia HER attivati dall'interazione con i ligandi. Il legame di HER-2 e la formazione di eterodimeri determina l'induzione di un segnale più prolungato e più intenso. Infatti HER-2 è l'elemento gerarchicamente dominante nell'assemblaggio dei dimeri HER che funziona come struttura per l'amplificazione del segnale (Worthylake et al., 1999; (Worthylake et al., 1999; Hendriks et al., 2003). In seguito alla dimerizzazione, HER-2 viene fosforilato e diviene capace di reclutare un vasto numero di molecole di segnalazione modulando profondamente ed integrando fra loro i segnali dati dai singoli recettori HER, così da promuovere la generazione di nuovi profili di segnale (Pinkas-Kramarsky et al., 1996; Riese et al., 1995).

Un secondo effetto dell'iperespressione di HER-2 si evidenzia a livello del riciclo dei recettori HER: HER-2 inibisce fortemente la regolazione negativa e la degradazione dei recettori HER attivati da un ligando, e ciò porta ad un ulteriore aumento dell'attivazione indotta dal ligando. Numerosi dati mettono in evidenza che l'effetto dell'iperespressione di HER-2 è quello di far sì che i complessi recettore-ligando internalizzati vengano riciclati sulla membrana cellulare anziché convogliati verso la naturale degradazione nel compartimento lisosomiale. HER-2 è il membro della famiglia HER più comunemente associato all'atteggiamento neoplastico della cellula, e la sua iper-espressione nelle neoplasie maligne umane è frequentemente associata ad un comportamento più aggressivo del tumore e ad una prognosi infausta (Hynes, Stern, 1994; Alroy, Yarden, 1997).

Negli ultimi anni numerosi studi sono stati condotti per evidenziare, in diversi tumori, le alterazioni dell'EGFR al fine di individuare, nella cascata di segnali molecolari, potenziali bersagli terapeutici per i nuovi farmaci. Sulla base della struttura e della funzione dell'EGFR, sono state sviluppate due differenti strategie terapeutiche: una di queste determina il blocco dell'attivazione dell'EGFR mediante l'impiego di piccole molecole (ad es. gefitinib ed erlotinib) in grado di legarsi alla tirosin-chinasi del recettore, che è l'enzima responsabile della trasduzione del segnale post-recettoriale all'interno della cellula, l'altra utilizza anticorpi monoclonali (ad es. cetuximab) che colpiscono il dominio extracellulare del recettore, bloccando così il sito di legame con EGF con conseguente inibizione dei processi di crescita e progressione delle cellule tumorali (Figura 2).



**Figura 2.** Strategie terapeutiche in grado di inibire selettivamente l'EGFR.

I tumori NSCLC e le linee cellulari che presentano mutazioni dell'EGFR, particolarmente sensibili agli inibitori delle tirosino-chinasi (TKIS) (Clark GM et al., 2006), vengono biologicamente distinti dalle altre forme di NSCLC (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004). Le mutazioni del gene K-ras, che tra l'altro è un mediatore nella trasduzione dell'EGFR, sono mutualmente esclusive con le mutazioni dell'EGFR, e sono associate ad una maggiore resistenza agli inibitori TKIS dell'EGFR. STI-571 (Gleevec o Imatinib) e Iressa (ZD1839) sono stati i primi farmaci inibitori della chinasi ad essere immessi in commercio. Sebbene siano stati studiati diversi inibitori che agiscono mediante un intermedio allosterico e che non sono competitivi con l'ATP, tutti i farmaci finora commercializzati come inibitori chinasi hanno come bersaglio il sito di legame per l'ATP (Cheetman GMT et al., 2004).

In pazienti pretrattati con chemioterapia, tradizionalmente refrattari a qualsiasi ulteriore trattamento medico, gli inibitori tirosino-chinasi erlotinib e gefitinib, hanno prodotto una percentuale di risposte obiettive vicina al 10%, con un miglioramento clinico ed un arresto nella progressione di malattia nel 30-40% dei

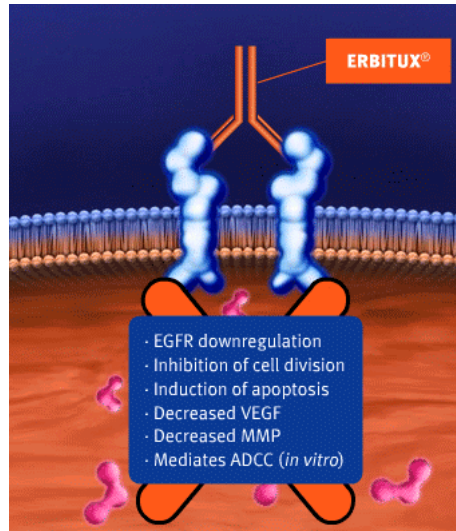


casi. L'erlotinib in un precedente studio randomizzato è stato in grado di ottenere un miglioramento della sopravvivenza statisticamente significativo, quando confrontato con placebo (Shepherd A et al., 2005).

Questi risultati hanno favorito in Italia la sua registrazione per il trattamento di seconda e terza linea del NSCLC. Erlotinib e gefitinib sono stati utilizzati, in prima linea, in studi randomizzati, in associazione alla chemioterapia senza però dimostrare un beneficio in termini di sopravvivenza, probabilmente per l'assenza di un'adeguata selezione dei pazienti. Infatti, alla data di attivazione di questi studi non erano ancora conosciuti i fattori clinici e biologici predittivi di sensibilità a questa classe di farmaci. Oggi è noto che un trattamento biologico di prima linea può aver senso solo in presenza di un adeguato profilo clinico e di precisi bersagli molecolari.

Gli anticorpi monoclonali o (mAb) sono molecole biologiche che si legano specificamente alle cellule bersaglio. Il cetuximab, nome commerciale Erbitux®, è un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). La FDA ne ha approvato l'uso per il trattamento del tumore del colon retto, del tumore del collo e della testa e dal 2010 anche per il trattamento del carcinoma gastrico metastatico.

Cetuximab si lega all'EGFR con una affinità che è circa 5-10 volte più alta di quella dei ligandi endogeni, blocca il legame con i ligandi endogeni dell'EGFR e inibisce così la funzione del recettore. Esso inoltre induce l'internalizzazione dell'EGFR, il che potrebbe provocare la sottoregolazione dell'EGFR stesso (Figura 3).



**Figura 3.** Meccanismo d'azione del cetuximab (Erbix)

Cetuximab inoltre indirizza le cellule immunitarie effettrici citotossiche verso le cellule tumorali che esprimono l'EGFR (citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente) e non si lega ad altri recettori facenti parte della famiglia HER.

Il trastuzumab (nome commerciale Herceptin) è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato, con elevata affinità di legame per la proteina HER-2/neu e in grado di inibirne gli effetti sulla trasformazione cellulare maligna a livello dei tessuti epiteliali. La rilevazione dell'espressione di HER-2 nei tessuti tumorali è stata oggetto di un'ampia gamma di metodologie di analisi e la FDA statunitense ha approvato sia l'impiego della tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH) per misurare l'amplificazione del gene HER-2, al fine di una valutazione prognostica dei pazienti affetti da carcinoma mammario con linfonodi a rischio di recidiva, sia l'impiego della immunistochemica per una definizione pratica delle opzioni di trattamento di pazienti HER-2 positivi.

Il meccanismo d'azione del trastuzumab non è ancora del tutto definito. E' noto che questo anticorpo monoclonale si lega alla porzione extra-cellulare del recettore HER-2/neu determinando una "downregulation" dei livelli di espressione, e

produce un'alterazione della trasduzione del segnale intracellulare HER-2 mediata (Figura 4).

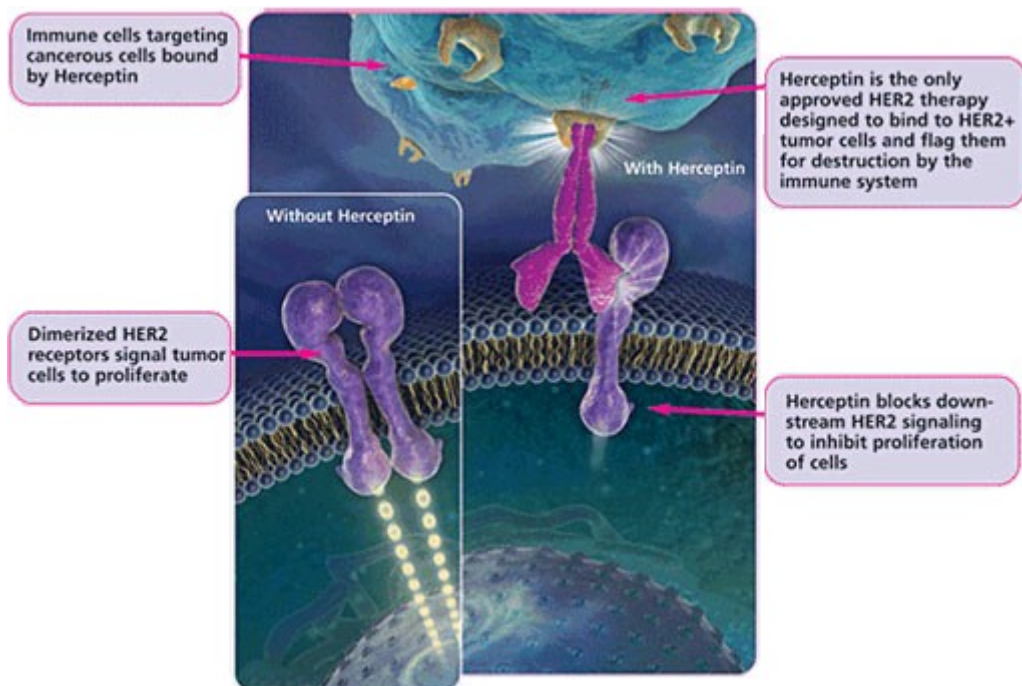


Figura 4. Meccanismo d'azione del trastuzumab (Herceptin)

Verosimilmente esiste anche un'interferenza con i meccanismi di riparazione del DNA che potrebbe spiegare la sinergia d'azione con alcuni agenti chemioterapici (Slamon et al., 2000).

La risposta al trattamento con anticorpi monoclonali è associata al numero di copie del gene (amplificazione genica); la sensibilità al trattamento con gefitinib è correlata invece, alla presenza di mutazioni nel dominio catalitico che determinano modificazioni conformazionali della proteina che diventa più sensibile al farmaco e non lega l'ATP.

L'inibizione dell'angiogenesi tumorale, bloccando gli effetti del Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), rappresenta un'altra strategia terapeutica razionale poiché VEGF ha un ruolo centrale nella crescita, nella proliferazione e nella resistenza al trattamento. Nel corso degli ultimi anni, numerosi farmaci anti-VEGF sono stati testati in pazienti con NSCLC e i risultati più incoraggianti sono

stati ottenuti con un altro anticorpo monoclonale, il bevacizumab. Un recente studio randomizzato di fase III condotto negli Stati Uniti, che ha confrontato in pazienti non pretrattati un trattamento chemioterapico standard (carboplatino + taxolo) verso la stessa chemioterapia associata al bevacizumab, ha mostrato un significativo incremento della mediana di sopravvivenza e dell'intervallo libero da malattia a tre anni per i pazienti che ricevevano il bevacizumab (European Society for Medical Oncology (ESMO Meeting, 2012).

Nel mese di settembre 2012, sono stati presentati all'Agenzia Europea del Farmaco (EMA), i dati su afatinib, farmaco pensato come terapia di prima linea nei pazienti con NSCLC, sui quali ha ottenuto ottimi risultati: l'inibitore dei recettori ErbB ha infatti dimostrato la superiorità rispetto al gold standard nei pazienti di stadio IIIb o IV positivo per mutazione di EGFR.

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

L'applicazione di quanto finora descritto per il trattamento delle neoplasie polmonari, in particolare del NSCLC, si traduce nell'individuare nuove strategie terapeutiche per il trattamento del carcinoma polmonare.

Le mutazioni o la sovra-espressione dei recettori dell'EGF causano nell'uomo molte forme di cancro, incluso il carcinoma polmonare.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare nuovi approcci farmacologici in grado di colpire selettivamente due recettori dell'EGF, l'EGFR e l'HER-2, riscontrabili in alcune forme di tumore polmonare, con l'intento di abbinare all'aumento della sopravvivenza anche una riduzione degli effetti collaterali, garantendo così al paziente un sensibile miglioramento della qualità di vita. In particolare, è stata presa in considerazione l'associazione di due anticorpi monoclonali, il cetuximab e il trastuzumab, diretti rispettivamente contro l'EGFR e l'HER-2 che, con dosaggi opportuni e diverse concentrazioni sono stati somministrati alle linee cellulari A549 e NCI-H226 di carcinoma polmonare. L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'effetto di tale associazione sulla proliferazione cellulare, sui livelli degli mRNA dei recettori EGFR e HER-2 e sullo stato di amplificazione dei corrispondenti geni.

## 3. MATERIALI E METODI

### **3.1 Linee cellulari, reagenti e farmaci.**

Per la realizzazione degli esperimenti sono state utilizzate le cellule A549 e le cellule NCI-H226, linee cellulari immortalizzate, rispettivamente, di adenocarcinoma polmonare e di carcinoma squamoso polmonare, acquistate presso l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

I terreni di coltura per le cellule, i tamponi di lavaggio, la tripsina e tutti i reagenti utilizzati, se non diversamente indicato, sono stati acquistati alla Lyfe Technologies (Monza, Italia). Le cellule sono state coltivate, rispettivamente, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) supplementati con siero fetale bovino (FBS) al 10%, penicillina 100 unità/ml, streptomina 100 µg/ml e mantenute in coltura in un incubatore contenente atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> e 95% di O<sub>2</sub> e regolato alla temperatura di 37°C. Il mezzo cellulare è stato cambiato ogni tre-quattro giorni.

L'MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), è stato acquistato alla Roche Applied Science. Il cetuximab (Erbitux®) è stato gentilmente fornito dalla Merck KGaA, Darmstadt, Germany; il trastuzumab (Herceptin) è stato invece acquistato alla Roche.

### **3.2 Saggio per valutazione della sopravvivenza cellulare**

Le cellule appena acquistate sono state scongelate a 37°C e trasferite in fiasche T25. Dopo averle lasciate aderire e raggiungere il 60% circa di confluenza, sono state lavate con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) e successivamente staccate dalle fiasche di coltura mediante tripsina. La proliferazione cellulare è stata analizzata contando il numero di cellule tramite camera di Burker, utilizzando il colorante vitale Trypan-Blue.

Per condurre l'esperimento sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti, seminando 3000 cellule per pozzetto e utilizzando DMEM per le A549 e RPMI per le NCI-H226, entrambi contenenti FBS al 10%, penicillina e streptomina. Dopo 24 h, il terreno è stato sostituito con DMEM e RPMI, rispettivamente per le A549 e le NCI-H226, contenente l'1% di FBS, penicillina e streptomina. Le cellule sono state mantenute in coltura per altre 24 h. Dopo 24 h esse sono state incubate a 37°C a diversi *time points* (24h, 48h e 72 h), con le seguenti concentrazioni di cetuximab (5 mg/ml, C225, Erbitux®, Merck) e/o trastuzumab (150 mg, 4D5, Herceptin®, Roche): 10 µg/ml, 20 µg/ml o 40 µg/ml. Gli esperimenti sono stati eseguiti almeno tre volte, assegnando 6 pozzetti ad ogni trattamento. Alcune di queste cellule non hanno ricevuto alcun trattamento, perché utilizzate come controllo.

In esperimenti aggiuntivi, alle cellule piastrate e trattate con le diverse concentrazioni di farmaci, sono stati aggiunti 10 ng/ml di Epidermal Growth Factor (EGF) (Lyfe technologies, Monza), avendo sempre come riferimento e controllo 6 pozzetti di cellule contenente solo EGF. Ciascuna piastra conteneva altresì delle cellule controllo esposte a volumi equivalenti di DMSO 0,2%, veicolo di entrambi i farmaci.

Dopo 24 h, 48 h e 72 h dal trattamento è stata determinata la vitalità cellulare mediante il test MTT, un saggio colorimetrico utilizzato per testare l'azione di farmaci, agenti citotossici ed altri prodotti che alterano la vitalità cellulare. Il principio del test si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di convertire il sale di tetrazolio o MTT, di colore giallo, in cristalli di formazano di color porpora. Il formazano viene quindi solubilizzato con dimetilsolfossido (DMSO) e la concentrazione viene calcolata in termini di densità ottica. Il livello di assorbanza è direttamente proporzionale al numero di cellule attive. A ciascun pozzetto della piastra, contenente il campione diluito in 100 µl di terreno di coltura,

sono stati aggiunti 10 µl di MTT. La piastra è stata incubata per 3-4 ore a 37°C in un ambiente umidificato, al 5% di CO<sub>2</sub>. Successivamente è stato aspirato il terreno contenente MTT e sono stati aggiunti, sempre in ciascun pozzetto, 200 µl di DMSO. Quindi è stata letta l'assorbanza del prodotto colorato a 545 nm. La quantità di formazano prodotta è risultata direttamente proporzionale al numero di cellule vive presenti in coltura. I valori di assorbanza sono stati letti mediante il lettore di micropiastre *Multiscan Ascent*® ai tre differenti *time points* (24h, 48h e 72h); inoltre, per ogni linea cellulare, sono stati valutati i valori di assorbanza al *tempo 0 (T0)*.

Per misurare l'inibizione della proliferazione cellulare ottenuta dalla combinazione di 40 µg/ml di cetuximab e 40 µg/ml di trastuzumab, è stata applicata l'espressione del National Cancer Institute (NCI)  $\text{Mean OD}_{\text{test}} - \text{Mean OD}_{\text{tzero}}$ , dove  $\text{OD}_{\text{tzero}}$  misura la densità ottica al tempo 0 (T0), e  $\text{OD}_{\text{test}}$  misura la densità ottica dopo l'esposizione ai farmaci. Un valore superiore a zero indica una inibizione della proliferazione cellulare, un valore inferiore a zero indica un effetto citotossico. Il valore percentuale della crescita (PG), misurato in entrambe le linee cellulari, è stato calcolato utilizzando le seguenti espressioni:

$\text{PG} = 100 \times (\text{Mean OD}_{\text{test}} - \text{Mean OD}_{\text{tzero}}) / (\text{Mean OD}_{\text{Ctrl}} - \text{Mean OD}_{\text{tzero}})$  or  $\text{PG} = 100 \times (\text{Mean OD}_{\text{test}} - \text{Mean OD}_{\text{tzero}}) / \text{Mean OD}_{\text{tzero}}$ , in cui  $\text{OD}_{\text{test}}$  = densità ottica dopo trattamento  $\text{OD}_{\text{tzero}}$  = densità ottica al tempo 0 (cioè densità ottica prima dell'aggiunta dei farmaci);  $\text{Mean OD}_{\text{Ctrl}}$  = densità ottica dopo 72 ore di esposizione al DMSO 0.2%.



### **3.3 Estrazione dell'mRNA e sintesi del cDNA**

Le sospensioni di A549 e di NCI-H226, rispettivamente in DMEM e in RPMI all'1% di FBS, sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e trattate con una combinazione di cetuximab e trastuzumab alla concentrazione di 40 µg/ml, per 12 h, 24 h, 30 h, 48 h e 72 h. In parallelo, sono state piastrate delle cellule di entrambe le linee cellulari a cui è stata aggiunta un'appropriata concentrazione di DMSO agli stessi tempi.

L'RNA di entrambe le linee cellulari è stato estratto mediante l'utilizzo del kit RNeasy Mini kit (Qiagen S.p.A., Italy), secondo il protocollo fornito dall'azienda produttrice. Brevemente, le cellule sono state lisate mediante un buffer contenente guanidina tiocianato. E' stato quindi aggiunto etanolo a tutti i campioni, che sono stati successivamente trasferiti in apposite colonnine da centrifuga. L'RNA ottenuto, di buona qualità, è stato eluito in 30 µL di acqua. L'RNA totale è stato poi quantificato mediante lo spettrofotometro NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando 2 µg di RNA totale proveniente da ciascun campione, esameri random e 50 U/µl di SuperScript II reverse transcriptase (Lyfe Technologies (Monza, Italia)).

### **3.4 Real-time PCR**

La *Real Time PCR*, denominata anche PCR quantitativa, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA: essa misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza dell'amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione. Piuttosto che rilevare l'ammontare totale del prodotto amplificato alla fine dei cicli di PCR, i prodotti della reazione vengono determinati a partire dal ciclo in cui l'amplificato diventa rilevabile, definito ciclo soglia ( $C_t$ ), permettendo di ottenere risultati molto

più accurati rispetto alla PCR tradizionale *end point*. Più elevato è il numero di copie iniziali della sequenza da amplificare, più basso sarà il  $C_t$ . Il diagramma di  $C_t$  su DNA stampo è lineare, e la pendenza della retta (*slope*) fornisce una misura dell'efficienza della PCR. Alcuni strumenti forniscono dati relativi alle curve di dissociazione o di melting che seguono il completamento della PCR: questi dati danno un'indicazione sulla purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di eventuali dimeri di primers. La *Real Time PCR* prevede due metodi di quantificazione del prodotto amplificato: una quantificazione assoluta ed una quantificazione relativa. La quantificazione assoluta richiede l'utilizzo di campioni di cui sia nota la concentrazione assoluta e il numero di copie di DNA o RNA presenti, che vengono utilizzati per costruire una curva standard; interpolando i valori di  $C_t$  del campione in esame sulla curva standard è possibile ottenere un valore quantitativo preciso in termini di numero di copie. La quantificazione relativa è utilizzata per analizzare cambiamenti nell'espressione di un gene in un dato campione in relazione ad un campione di riferimento (definito calibratore); in questo caso non è necessaria la costruzione di una curva standard: gli unknown vengono quantificati paragonando il loro  $C_t$  con quello del calibratore.

La quantificazione dell'amplificato viene effettuata mediante la rilevazione della fluorescenza che si genera durante la PCR per effetto di diverse possibili reazioni chimiche. Le chimiche principali sono basate sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica del DNA, come il SYBR Green, o sull'ibridazione di sonde specifiche.

La fluorescenza non si misura all'endpoint (come nella PCR standard) ma durante la fase esponenziale. Questo elimina la necessità di amplificare duplicati a cicli scalari.

Gli esperimenti di Quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR) sono stati eseguiti mediante il Sistema StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Per la quantificazione dell'mRNA di EGFR e di HER-2, sono state disegnate due coppie di sequenze oligonucleotidiche specifiche utilizzando un software della Lyfe Technologies (Oligo Perfect™ Designer software), basato sulla sequenza della variante-1 di EGFR umano (numero di accesso: NM\_005228.3) e della variante-1 di HER-2 (numero di accesso: NM\_004448.2).

Per la variante-1 di EGFR, sono stati utilizzati i seguenti primers:

**Fw primer 5'-GGG AGT TGA TGA CCT TTG GA-3'**

**Rv primer 5'-TGC ACT CAG AGA GCT CAG GA-3'**

Per la variante-1 di HER-2, sono stati utilizzati i seguenti primers:

**Fw primer 5'-CGA GAG GTG AGG GCA GTT AC -3'**

**Rv primer 5'-AGC AGA GGT GGG TGT TAT GG -3'**

La differenza nella quantità iniziale di RNA totale, nei diversi campioni, è stata normalizzata, in ciascuna analisi, mediante l'espressione genica della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) come standard interno.

Per la GAPDH, sono stati utilizzati i seguenti primers:

**Fw primer 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG -3'**

**Rv primer 5'-TCTTACTCCTTGGAGGCCAT-3'**

Ciascuna reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 25 µl utilizzando il SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 1 µM di primers. Infine, è stato aggiunto 1 µl di cDNA (50 ng/µl ) ad ogni reazione. Ciascun campione è stato caricato in triplicato (tabella 1).

	Concentrazione finale	Stock x 1 campione (µl)
Power SYBER Green PCR Master Mix 2X	1X	12,5
Primer F 25 µM	1 µM	1
Primer R 25 µM	1 µM	1
H <sub>2</sub> O Sterile		9,5
cDNA		1
Volume finale		25

50°C	2 min
95°C	10 min
95°C	15 sec
60°C	1 min

**Tabella 1.** Schema reazione PCR.

Per l'amplificazione della PCR sono state mantenute le condizioni standard (50°C per 2 min, 95°C per 10 min, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 s, 60°C per 1 minuto). Come controllo negativo, sono state eseguite delle reazioni senza cDNA, contenenti acqua sterile al posto del campione. Tutte le reazioni sono state effettuate in triplicato e per ogni coppia di primers è stata inclusa un'analisi di validazione. La quantità di mRNA del gene di interesse è stata dedotta, durante la fase esponenziale della reazione di PCR, dal numero del ciclo in cui si osserva un aumento del livello di background della fluorescenza (Ct).

### **3.5 Ibridazione in situ fluorescente (FISH)**

La FISH Dualcolor è stata condotta mediante il kit Histology FISH Accessory e l'EGFR/CEN-7 FISH Probe Mix e l'HER-2 FISH PharmDx kit (Dako Italia S.p.A., Milano, Italy), secondo i protocolli forniti dai kit. Circa  $2 \times 10^5$  cellule di ciascuna linea cellulare, sospese in buffer PBS (Phosphate Buffered Saline), sono state poste su vetrini e lasciati ad asciugare per 24 h. I vetrini sono stati successivamente disidratati mediante una scala alcolica di grado discendente e lasciati ad asciugare. E' stata quindi aggiunta la sonda su ciascun vetrino, eseguita la denaturazione per 5

min a 82°C e condotta l'ibridazione overnight a 45°C. I vetrini sono stati quindi lavati a 65°C con un buffer salino contenente sodio citrato, successivamente disidratati con una scala di alcol a concentrazione crescente, lasciati ad asciugare e montati con un mezzo fluorescente contenente DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride).

La valutazione del risultato è stata eseguita mediante microscopia a fluorescenza, contando 60 nuclei in interfase. L'EGFR o l'HER-2 sono stati visualizzati, mediante filtro di tetrametilrodamina isotiocianato, come un segnale rosso; il cromosoma 7  $\alpha$ -centromerico (CEN-7) o il cromosoma 17  $\alpha$ -centromerico (CEN-17) come un segnale verde mediante un filtro di fluoresceina isotiocianato, i nuclei come un segnale blu mediante un filtro DAPI.

Per ciascuna linea cellulare è stato quindi calcolato il rapporto tra il numero totale di segnali EGFR o HER-2 e il numero totale di segnali del CEN-7 o del CEN-17. Un rapporto uguale o superiore a 2 è stato considerato indicativo dell'amplificazione di EGFR o HER-2. Le cellule in cui si è osservato un elevato numero di segnali (più di 2 per nuclei) di EGFR/HER-2 e di CEN-7/CEN17 sono state considerate aneuploidi.

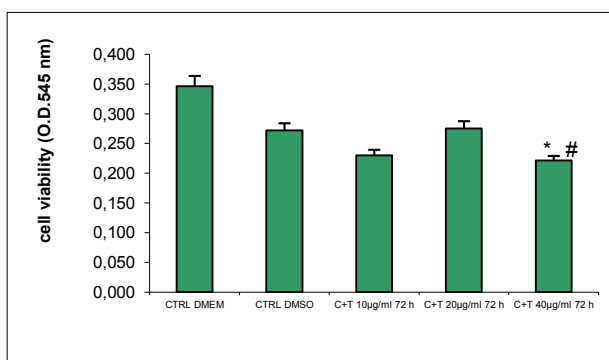
### **3.6 Analisi statistica**

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il modello lineare ONE-WAY ANOVA per l'analisi della varianza, allo scopo di esaminare le differenze nelle cellule trattate e nelle cellule controllo. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte, considerando per ciascun esperimento 6 pozzetti. I risultati rappresentano la media + SEM (Errore Standard Medio) e sono stati analizzati mediante test di Fisher. Valori di  $P < 0,05$  sono stati considerati significativi.

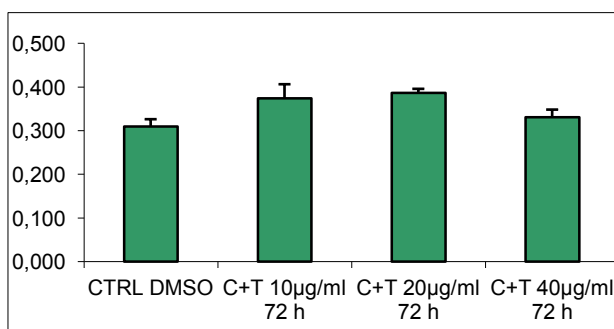
## 4. RISULTATI

### 4.1 Effetti della combinazione di cetuximab e trastuzumab sulla proliferazione di cellule di carcinoma polmonare

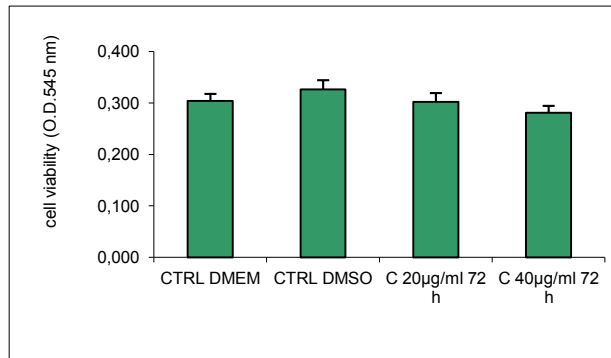
Le cellule A549 e NCI-H226 sono state incubate con gli anticorpi monoclonali cetuximab e trastuzumab, specifici rispettivamente per l'EGFR e l'HER-2. Gli anticorpi, da soli o in combinazione, sono stati aggiunti, alle concentrazioni di 10, 20 e 40 µg/ml, dopo il piastramento delle cellule. L'effetto dell'inibizione della crescita è stato osservato nella linea cellulare A549 (Figura 5), e non in quella NCI-H226 (Figura 6), dopo 72 ore di esposizione alla combinazione di 40 µg/ml di ciascun farmaco. La somministrazione del singolo anticorpo, nelle stesse condizioni, non ha prodotto invece alcun effetto sulla proliferazione della linea cellulare A549 (Figure 7 e 8).



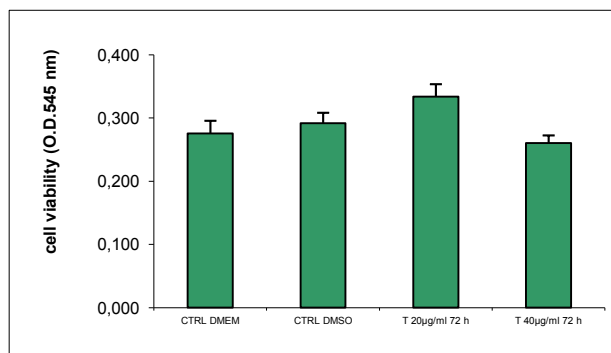
**Figura 5.** Saggio di vitalità cellulare su cellule A549 di adenocarcinoma polmonare dopo somministrazione di cetuximab e trastuzumab. Valori di assorbanza a 545 nm dopo 72 h dal trattamento. C= cetuximab; T= trastuzumab; C+T= cetuximab+ trastuzumab.



**Figura 6.** Saggio di vitalità cellulare su cellule NCI-H226 di carcinoma polmonare squamoso dopo somministrazione di cetuximab e trastuzumab. Valori di assorbanza a 545 nm dopo 72 h dal trattamento. C= cetuximab; T= trastuzumab; C+T= cetuximab+ trastuzumab.



**Figura 7.** Saggio di vitalità cellulare su cellule A549 di adenocarcinoma polmonare dopo somministrazione di cetuximab (C) 20 µg/ml e 40 µg/ml. Valori di assorbanza a 545 nm dopo 72 h dal trattamento.

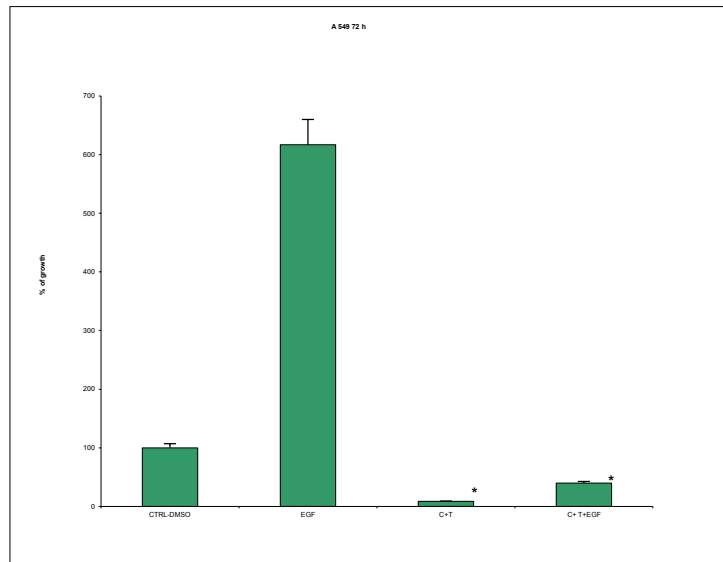


**Figura 8.** Saggio di vitalità cellulare su cellule A549 di adenocarcinoma polmonare dopo somministrazione di trastuzumab (T) 20 µg/ml e 40 µg/ml. Valori di assorbanza a 545 nm dopo 72 h dal trattamento.

Successivamente, sono stati condotti studi di proliferazione allo scopo di studiare sulle due linee cellulari il tipo di effetto (citotossico o citostatico), prodotto dalla combinazione di cetuximab e trastuzumab. Questo effetto è stato valutato dopo 72 h di esposizione al farmaco. L'inibizione dell'effetto della proliferazione è risultato uguale al 91,4% per le cellule A549. Ciò significa che l'inibizione della crescita indotta dal trattamento combinato non scende al di sotto della densità cellulare iniziale al tempo dell'aggiunta dei due farmaci (T0), suggerendo così che la combinazione dei due farmaci inibisce la proliferazione cellulare.

Per accertare l'effetto di un ligando naturale sulla crescita delle cellule tumorali, è stato utilizzato l'EGF, da solo e in associazione con i due anticorpi monoclonali. L'aggiunta di 10 nM di EGF alle cellule piastrate ha stimolato la proliferazione delle A549, ma non ha prodotto alcun effetto sulla proliferazione delle cellule NCI-

H226, probabilmente a causa della presenza di ottimi livelli di attività di fattori di crescita autocrini. Come prevedibile, l'effetto dell'inibizione della crescita mediato dai due anticorpi non è stato revertito dall'aggiunta di EGF (Figura 9).

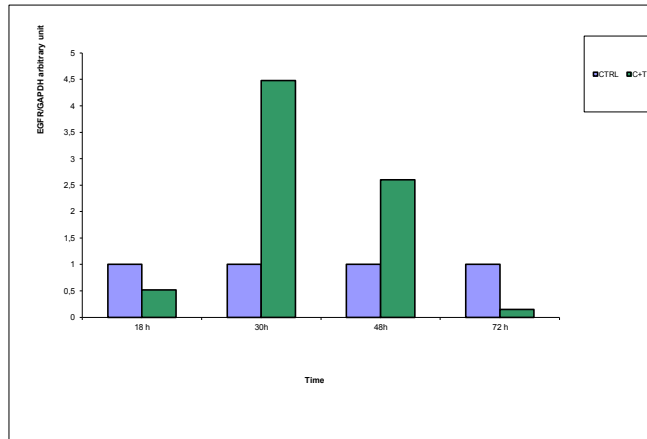


**Figura 9.** Percentuale relativa alla crescita di cellule A549 di adenocarcinoma polmonare dopo 72 h dalla somministrazione di cetuximab e trastuzumab e/o EGF. EGF= fattore di crescita epidermico; C= cetuximab; T= trastuzumab; C+T= cetuximab+ trastuzumab.

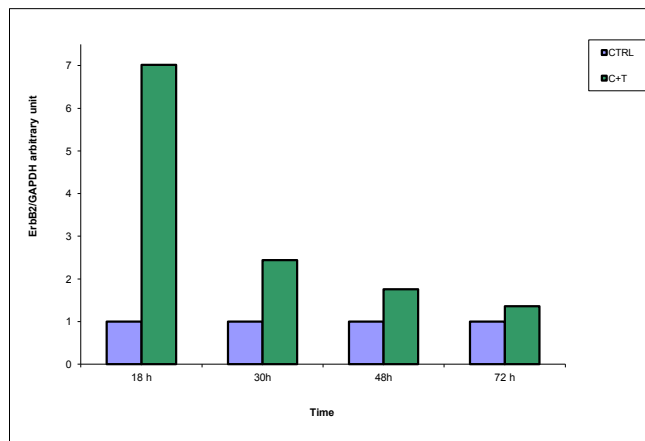
#### 4.2 Influenza del trattamento combinato sui livelli di mRNA dell'EGFR e dell'HER-2 delle cellule A549 e delle cellule NCI-H226

I livelli di mRNA dei recettori EGFR e HER-2, di entrambe le linee cellulari, sono stati valutati mediante la RT-PCR quantitativa, in condizioni basali e dopo 18- 30- 48- e 72 h dal momento in cui le cellule sono state trattate con gli anticorpi. Nella linea cellulare A549, il livello di mRNA dell'EGFR è aumentato dopo 30 h di trattamento per poi notevolmente diminuire a 72 h, tempo in cui il valore quasi si azzerava (Figura 10). Si è invece osservato un più rapido incremento del livello dell'mRNA dell'HER-2 che risulta aumentato già a 18 h. Lo stesso è poi diminuito e ritornato alle condizioni basali dopo 72 h di trattamento (Figura 11).



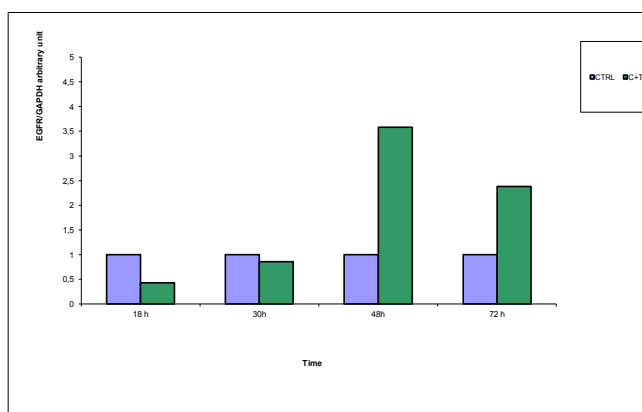


**Figura 10.** Effetti del trattamento combinato con cetuximab e trastuzumab sull'espressione dell'mRNA del recettore EGFR in cellule A549 di adenocarcinoma polmonare ai quattro differenti time points.

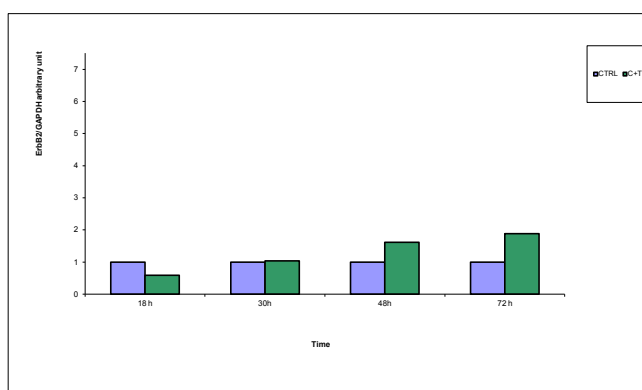


**Figura 11.** Effetti del trattamento combinato con cetuximab e trastuzumab sull'espressione dell'mRNA del recettore ErbB2 in cellule A549 di adenocarcinoma polmonare ai quattro differenti time points.

Nella linea cellulare NCI-H226, il livello di mRNA dell'EGFR è notevolmente aumentato dopo 48 h di trattamento per poi diminuire leggermente a 72 h (Figura 12). I livelli di mRNA dell'HER-2 non subiscono invece cambiamenti rilevanti in seguito al trattamento combinato con i due farmaci (Figura 13).



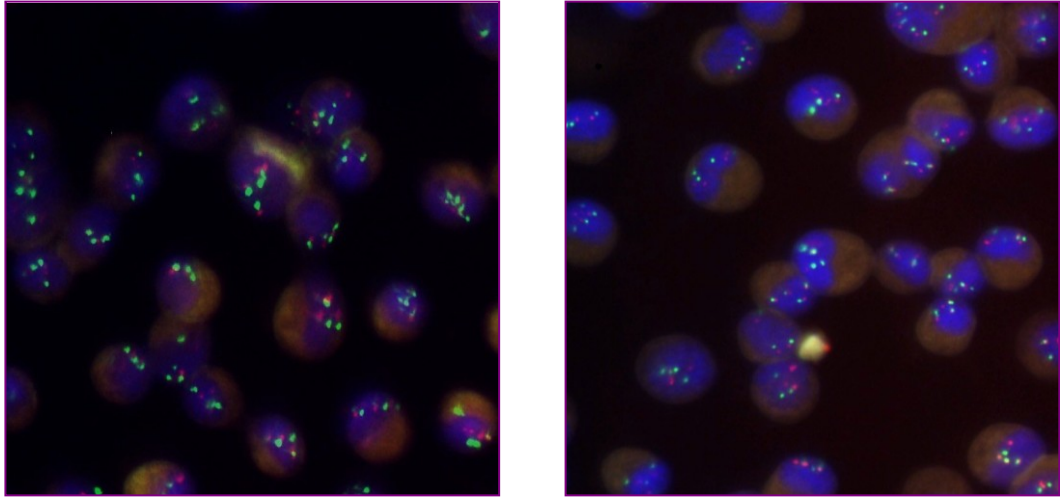
**Figura 12.** Effetti del trattamento combinato con cetuximab e trastuzumab sull'espressione dell'mRNA del recettore EGFR in cellule NCI-H226 di carcinoma polmonare ai quattro differenti time points.



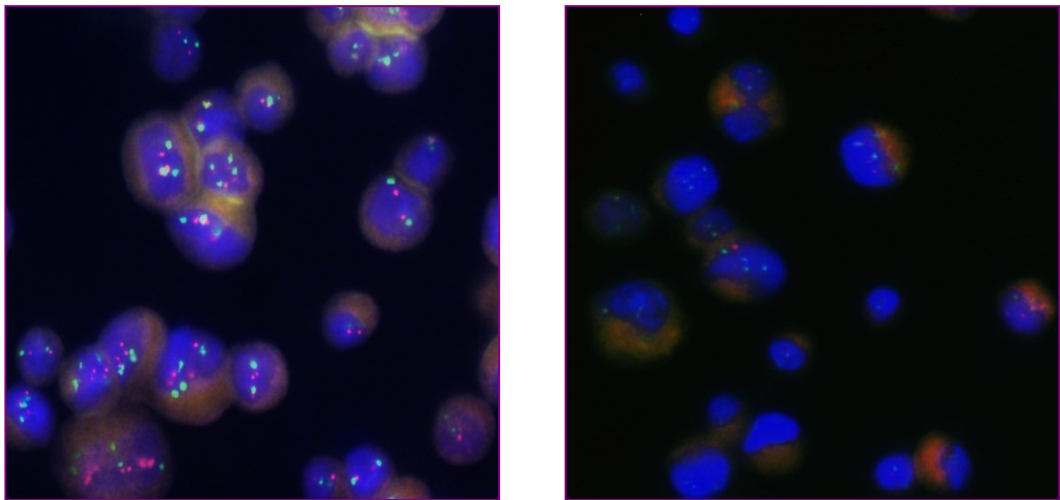
**Figura 13.** Effetti del trattamento combinato con cetuximab e trastuzumab sull'espressione dell'mRNA del recettore ErbB2 in cellule NCI-H226 di carcinoma polmonare ai quattro differenti time points.

### 4.3 Amplificazione dei geni EGFR e HER-2

Lo stato di amplificazione dei geni EGFR e HER-2 è stato analizzato mediante analisi FISH. Entrambe le linee cellulari sono risultate aneuploidi per i due geni in questione, hanno mostrato uguale incremento dei segnali EGFR e CEN7 e di quelli HER-2 e CEN17, indicando una condizione di polisomia (aumento del numero di copie del gene) in assenza di amplificazione (Figure 14 e 15).



**Figura 14.** FISH: a sinistra, amplificazione del gene EGFR, mediante la sonda DAKO EGFR/CEN 7 Dual Color Probe, in cellule A549 di adenocarcinoma polmonare; a destra, amplificazione del gene HER-2, mediante la sonda DAKO HER2/CEN 17 Dual Color Probe, in cellule A549 di adenocarcinoma polmonare.



**Figura 15.** FISH: a sinistra, amplificazione del gene EGFR, mediante la sonda DAKO EGFR/CEN 7 Dual Color Probe, in cellule NCI-H226 di carcinoma polmonare; a destra, amplificazione del gene HER-2, mediante la sonda DAKO HER2/CEN 17 Dual Color Probe, in cellule NCI-H226 di carcinoma polmonare.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I recettori EGFR ed HER-2 sono iperespressi in molti carcinomi e comunemente coinvolti nella biologia dei tumori maligni epiteliali (Hubbard S.R. 2005; Reese D M, 1997; Jardines L et al., 1993). A causa del ruolo dell'EGFR nella progressione del carcinoma del polmone, è stato considerato, nella pratica clinica, l'uso terapeutico di agenti che blocchino la trasduzione del segnale o inducano la “*down-regulation*” dello stesso EGFR (Salomon D S et al., 1995).

Lo sviluppo di farmaci anti-EGF rappresenta quindi una svolta nella terapia dei tumori maligni. Essi, infatti, presentando una minore tossicità, permettono di attuare dei trattamenti di lunga durata in quei pazienti che non riescono a tollerare i farmaci citotossici convenzionali.

In questo lavoro sperimentale abbiamo provato a bloccare l'attivazione di due recettori dell'EGF, EGFR e HER-2, normalmente espressi nelle cellule di carcinoma polmonare A549 e NCI-H226, utilizzando una combinazione di due anticorpi monoclonali, il C225 (cetuximab o Erbitux), diretto contro il dominio extracellulare dell'EGFR, che compete con il ligando per il legame al recettore e previene l'attivazione della chinasi, e il trastuzumab diretto contro il recettore HER-2. Cetuximab è attualmente indicato per il trattamento di pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto con espressione del recettore EGFR e con gene K-ras non mutato (wild-type) e per il trattamento di pazienti affetti da carcinoma a cellule squamose di testa e collo. Erbitux è stato utilizzato in trials di fase II e III anche per il trattamento del NSCLC. Lo studio ha dimostrato che i pazienti con iperespressione di EGFR, che oltre alla classica chemioterapia hanno ricevuto anche cetuximab, hanno avuto una sopravvivenza di 12 mesi verso i 9,6 mesi dei controlli trattati con la sola chemioterapia. Al contrario, nei pazienti con

ridotta espressione di EGFR non vi sono stati benefici clinici a seguito dell'aggiunta di cetuximab (Hoang T et al., 2002).

Tuttavia, nel settembre 2012 la Merck KGaA ha reso noto di aver volontariamente ritirato la domanda di registrazione presentata all'European Medicines Agency (EMA) per ottenere l'indicazione all'impiego di cetuximab anche nei pazienti con tumore al polmone non a piccole cellule, probabilmente a causa del basso incremento di sopravvivenza ottenuto nei pazienti arruolati ([ema.europa.eu/find/medicine](http://ema.europa.eu/find/medicine)).

L'espressione di HER-2, recettore privo del dominio extracellulare e costituzionalmente attivo in assenza di ligando, benchè percentualmente meno rilevante di quanto documentato nel carcinoma mammario, risulta essere aumentata in circa il 4-5% dei NSCLC condizionando anche in questo caso una prognosi sfavorevole. L'uso del trastuzumab è attualmente approvato per il trattamento del carcinoma mammario e del carcinoma gastrico metastatico con iperespressione di HER-2.

Vi sono pochi report relativi all'uso del trastuzumab nel NSCLC, ed alcuni di questi sono pure negativi. Alla luce di questi dati, considerando cioè che l'incremento della sopravvivenza ottenuto con il solo cetuximab è basso e che nel NSCLC l'impiego del trastuzumab è stato finora poco considerato, abbiamo deciso di combinare cetuximab e trastuzumab, perché questi due recettori dimerizzano, in risposta al legame con il ligando, nella maggior parte delle cellule umane normali e maligne. La contemporanea somministrazione di inibitori capaci di colpire più membri della famiglia dei recettori dell'EGF potrebbe infatti apportare un grande beneficio terapeutico. Ye D. e colleghi hanno già riportato l'efficacia "*in vitro*" di questa combinazione in cellule di carcinoma ovarico (Ye D et al., 1999). Dall'analisi dei risultati ottenuti la combinazione di questi due anticorpi ha

dimostrato, nel nostro studio, una inibizione della proliferazione del 91,4% delle cellule A549. Il trattamento combinato riduce, probabilmente, la fosforilazione dei recettori EGFR e HER-2. Non è stata invece osservata alcuna inibizione della proliferazione con i singoli agenti neanche con il prolungamento del trattamento con il singolo anticorpo a 96 h.

Sono stati successivamente analizzati i livelli di mRNA dell'EGFR e dell'HER-2. Nelle cellule A549 è stato osservato un significativo incremento dei livelli di mRNA di EGFR dopo 30 h dal trattamento farmacologico. Ciò potrebbe essere spiegato considerando il meccanismo d'azione del cetuximab, che interagisce specificamente ed esclusivamente con il dominio III della regione extracellulare dell'EGFR, occludendo parzialmente la regione di legame con il ligando che si trova in questo dominio, impedendo al recettore di adottare stericamente la conformazione richiesta per la dimerizzazione e inducendo l'internalizzazione e la degradazione del complesso recettore-anticorpo (Li S et al., 2005; Mandic R. et al., 2006; Vokes EE et al., 2006). All'internalizzazione e degradazione seguirebbe quindi, dopo 30 h di trattamento, la sintesi di nuovo mRNA per sopperire alla perdita dei recettori localizzati sulla superficie cellulare. I livelli di mRNA diminuiscono dopo 48 h e 72 h di trattamento per avvicinarsi poi ai valori normali. Un comportamento analogo si osserva nei livelli di mRNA di HER-2, in cui l'internalizzazione del recettore, conseguente all'interazione con il trastuzumab, determina già a 18 h di trattamento un incremento dell'espressione di tale recettore. Per quanto riguarda le cellule NCI-H226, abbiamo osservato una resistenza al trattamento combinato, pur non presentando mutazione del gene K-ras. Dall'analisi dei livelli di mRNA di entrambi i recettori, si evince un comportamento analogo a quello delle cellule A549 per l'EGFR, dal momento che l'interazione con il suo ligando e la conseguente internalizzazione e degradazione del recettore determina

sintesi di nuovo recettore. Ciò si concretizza in un aumento di circa 3,5 volte dei livelli di mRNA dopo 48 h dal trattamento e mantenimento di alti livelli anche dopo 72 h. Al contrario, il recettore HER2 non sembra essere influenzato dal trattamento farmacologico e, almeno nei primi tempi della somministrazione, i livelli di mRNA non vengono alterati. Solo dopo 72 h si osserva un aumento di tali livelli che vengono circa raddoppiati, ad indicare un possibile coinvolgimento tardivo di tale recettore nella risposta al trattamento combinato. L'iniziale scarso coinvolgimento del recettore HER-2 potrebbe quindi essere responsabile della resistenza delle cellule NCI-H226. Un comportamento di questo tipo da parte dell'HER-2 sarà da noi ulteriormente investigato. E' pertanto nostro obiettivo futuro prolungare il tempo di trattamento delle cellule NCI-H226 con cetuximab e trastuzumab allo scopo di valutare un più tardivo effetto antiproliferativo.

Infine, abbiamo accertato che la differenza di sensibilità alla combinazione di cetuximab e trastuzumab, nelle due linee cellulari prese in esame, non dipende dal numero di copie del gene, in quanto, mediante la tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH), abbiamo osservato lo stesso incremento del numero di copie dei geni EGFR e HER-2 e quindi una condizione di polisomia, in assenza di segnale, in entrambe le linee cellulari.

## 6. BIBLIOGRAFIA

---

Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. 1997. FEBS Lett 23;410(1):83-86. Review.

Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, de Fraipont F, Lantuejoul S, Frappat V et al. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. 2003. Eur Respir J 21: Suppl. 39, 36s-44s.

Bunn PAJ, Soriano A, Johnson G, Heasley L. New therapeutic strategies for lung cancer: biology and molecular biology come of age. 2000. Chest 117: 163S-168S.

Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M. HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. 2006. N Engl J Med 354(24):2619-2621.

Cardenal F, Lopez-Cabrerizo MP, Anton A, Alberola V, Massuti B, Carrato A, et al. Randomized phase III study of gemcitabine-cisplatin versus etoposide-cisplatin in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. 1999. J Clin Oncol 17: 12-18.

Cheetman GMT. Novel protein kinases and molecular mechanism of autoinhibition. 2004. Current Opinion in Structural Biology 14: 700-705.

Clark GM, Zborowski DM, Culbertson JL, Whitehead M, Savoie M, Seymour L, Shepherd Clark GM, Zborowski DM, Culbertson JL, Whitehead M, Savoie M, Seymour L, Shepherd FA. Clinical utility of epidermal growth factor receptor expression for selecting patients with advanced non-small cell lung cancer for treatment with erlotinib. J Thorac Oncol. 2006;1(8):837-846.

Cognetti F, Felici A. Le nuove terapie mirate. 2007. Ministero della Salute - Area editoriale.



Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive omology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. 1985. *Science*. 6;230(4730):1132-1139.

Crinò L, Scagliotti GV, Ricci S, De Marinis F, Rinaldi M, Gridelli C, et al. Gemcitabine and cisplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A randomized phase III study of the Italian Lung Cancer Project. 1999. *J Clin Oncol* 17: 3522-3530.

de Groot P, Munden RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. 2012. *Radiol Clin North Am* 50(5):863-876.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. GLOBOCAN 2000. Lyon: IARC Press. IARC Cancer Base No. 5. book 2001.

Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. 2003. *Thorax* 58: 892-900.

Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, Chine S, Silvestri V, Lucchi M, et al. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. 1997. *Clin Cancer Res* 3: 861-865.

Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. *Cancer Res*. 1986; 46(3):1015-1029. Review.

Hecht SS. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. 2012. *Int J Cancer* Sep 4. doi: 10.1002/ijc.27816.

Hendriks BS, Wiley HS, Lauffenburger D. HER2-mediated effects on EGFR endosomal sorting: analysis of biophysical mechanisms. 2003. *Biophys J*;85(4):2732-2745.

Hiyama K, Ishioka S, Shirotani Y, Inai K, Hiyama E, Murakami I, et al. Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and Rb. 1995. *Oncogene* 10: 937-944.

Hoang T, Traynor AM, Schiller JH. Novel therapies for lung cancer. 2002. *Surg Oncol* 11:229-241.

Hubbard S R. EGF receptor inhibition: attacks on multiple fronts. 2005. *Cancer Cell* 7(4): 287-288.

Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. 1994. *Biochim Biophys Acta* 30;1198(2-3):165-184.

IARC. Tobacco smoking. IARC monography on the evaluation of the carcinogenetic risk of chemicals to humans. 1986. Lyon: IARC Press (38).

Jardines L, Weiss M, Fowble B, Greene M. neu (c-erbB-2/HER2) and the epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer. 1993. *Pathobiology* 61(5-6): 268-282.

Li S., Schmitz K R, Jeffrey P D, Wiltzius J J, Kussie P, Ferguson K M. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. 2005. *Cancer cell*. 7(4):301-311.

Iida M, Brand TM, Campbell DA, Li C, Wheeler DL. Yes and Lyn play a role in nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor. 2012. *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2012.90.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. 2004. *N Engl J Med* 350: 2129-2139.

Mandic R, Rodgarkia-Dara C J, Zhu L, Folz BJ, Bette M, Weihe E, Neubauer A, Werner J A. Treatment of HNSCC cell lines with the EGFR-specific inhibitor cetuximab (Erbix) results in paradox phosphorylation of tyrosine 1173 in the receptor. 2006. FEBS Lett. 580(20): 4793-4800.

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. 2004. Science 304(5676):1458-1461.

Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. 1996. Oncogene 4;13(1):63-72.

Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. 1996. EMBO J 15;15(10):2452-2467.

Pontieri GM. 1987. Patologia generale. Ed. Piccin.

Reese D M, Slamon D J. HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. 1997. Stem Cells 15(1): 1-8.

Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA. 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. 2006. Clin Cancer Res 12(3 Pt 1):839-844.

Riese DJ 2nd, van Raaij TM, Plowman GD, Andrews GC, Stern DF. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. 1995. Mol Cell Biol 15(10):5770-5776.

Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M, et al. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. 1993. *Oncogene* 8: 2407-2412.

Salomon D S, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. 1995. *Crit Rev Oncol Hematol* 19(3): 183-232.

Shepherd FA, Pereira JR, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabárbara P, Seymour L. Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. 2005. *N Engl J Med* 353:123-132.

Slamon D. Herceptin: increasing survival in metastatic breast cancer. 2000. *Eur J Oncol Nurs* 4(Sa):24-29.

Sozzi G, Conte D, Leon ME, Cirincione R, Roz L, Ratcliffe C et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. 2003. *J Clin Oncol* 21:3902-3908.

Stewart BW, Kleihus P, Editors. *World Cancer Report*. 2003. Lyon: IARC Press.

Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers, a different disease. 2007. *Nat Rev Cancer* 7(10):778-90.

Van Zandwijk N, Hirsch FR. Chemoprevention strategies for non-small cell lung cancer. 2002. *Curr Opin Oncol* 14: 185-190.

Vokes E E, Chu E. Anti-EGFR therapies: clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers. 2006. *Oncology (Williston Park)* 20 (5 Suppl 2):15-25.

Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. 1999. *J Biol Chem* 26;274(13):8865-8874.

Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Augmentation of a humanized anti-HER 2 monoclonal antibody 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor monoclonal antibody C225. 1999. *Oncogene* 18: 731-738.