

Biološka terapija kolorektalnog karcinoma

Bartulović, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:291478>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marija Bartulović

Biološka terapija kolorektalnoga karcinoma

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj je diplomski rad prijavljen na kolegiju Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na pomoći, suradnji i podršci pruženoj prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svim mojim prijateljima koji su skupa samnom preživjeli dogodovštine sa faksa. Posebno hvala Aniti i Mariji bez kojih jutarnje kave ne bi bile iste.

Hvala mome Lucku koji svaki dan sluša sve moje priče.

Zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji koja mi je uvijek bila potpora. Najviše hvala mojoj mami za neizmjerni trud, ljubav, volju i vjeru jer da nije bilo nje ne bih ni pisala ovu zahvalu.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija kolorektalnoga karcinoma	1
1.2. Etiologija kolorektalnoga karcinoma	1
1.3. Patogeneza i podjela kolorektalnoga karcinoma	2
1.4. Genska nestabilnost	3
1.4.1. Kromosomska nestabilnost (CIN)	4
1.4.2. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI)	8
1.4.3. Epigenetska nestabilnost (CIMP)	8
1.5. Stadiji kolorektalnoga karcinoma	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	12
4.1. Nova terapija kolorektalnoga karcinoma	12
4.2. Lijekovi koji djeluju na stanice raka s promjenama na EGFR-u	13
4.2.1. Cetuksimab	13
4.2.2. Panitumumab	15
4.3. Lijekovi koji djeluju na stanice raka s BRAFV600E mutacijom	17
4.3.1. Enkorafenib	17
4.4. Antiangiogeni lijekovi	19
4.4.1. Bevacizumab	19
4.4.2. Ramucirumab	21
4.4.3. Aflibercept	23
4.4.4. Regorafenib	25

4.5. Imunoterapija – inhibitori imunosnoga odgovora.....	27
4.5.1. Pembrolizumab	27
4.5.2. Nivolumab	28
5. ZAKLJUČAK	29
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK / SUMMARY	34
8. PRILOG.....	36
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Epidemiologija kolorektalnoga karcinoma

Kolorektalni karcinom (CRC) jedna je od čestih zloćudnih novotvorina u zapadnim zemljama. U muškoj populaciji treći je po učestalosti nakon raka prostate i pluća, dok je u ženskoj populaciji drugi, iza raka dojke. Unatoč mnogim napretcima u terapiji zadnjih godina, po pitanju raka, CRC je drugi najčešći uzrok smrti. CRC se pojavljuje sporadično između petog i sedmog desetljeća života. U 3-5 % slučajeva dijagnosticira se i kod osoba mlađih od 40 godina gdje je često riječ o nasljednom obliku CRC-a (uglavnom kolorektalne polipoze i Lynch sindrom). S epidemiološkoga stajališta, najveći postotak (69 %) CRC-a spada u sporadični oblik kod muškaraca i žena iznad 50 godina života koji nemaju CRC u obiteljskoj anamnezi. Kod 25-30 % pacijenata CRC se nalazi u obiteljskoj anamnezi, ali ne ispunjava uvjete za nasljedni oblik. Manje od 1 % tumora nastaje zbog dugotrajne upalne bolesti crijeva (IBD), Crohnove bolesti ili ulceroznoga kolitisa (Castells, 2016). U Hrvatskoj incidencija raka debelog crijeva iznosi 72,2 na 100 000 stanovnika u godini dana, od toga muškarci čine 90,5, a žene 55,2 (Vrdoljak i sur., 2018).

1.2. Etiologija kolorektalnoga karcinoma

Točan uzrok CRC-a se ne zna, ali postoje mnogi rizični čimbenici koji pridonose nastanku CRC-a. Najvažniji među njima su: dob, spol, kolecistektomija, uterokolična anastomoza te hormonalni faktori. Velik je utjecaj okolišnih čimbenika na nastanak bolesti te sjedilački način života, loša prehrana (dijeta puna pržene, prerađene hrane i crvenog mesa te smanjen unos vlakana, folata, kalcija i D vitamina), prekomjerna tjelesna težina, pušenje i konzumacija alkohola. Osobe s dijagnosticiranim polipima debelog crijeva i rektuma imaju veći rizik od razvoja karcinoma. Također genetička predispozicija može dovesti do nastanka bolesti. Kod obiteljske adenomatozne polipoze i hereditarnoga nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (Lynch sindrom) povećan je rizik nastanka karcinoma. IBD-i kao što su ulcerozni kolitis i Crohnova bolest mogu biti prekancerozne bolesti (Thanikachalam i Khan, 2019; Weitz i sur., 2005).

1.3. Patogeneza i podjela kolorektalnoga karcinoma

CRC je maligni tumor epitelnih stanica sluznice debeloga crijeva i rektuma, a nastaje kao složena interakcija vanjskih utjecaja i nasljednih sklonosti organizma. Većina CRC-a nastaje iz adenoma. Adenomi su moguće predkancerozne polipoidne izrasline, “gljivastog” oblika koje se uzdižu iznad razine ostaloga dijela sluznice. Postoje vilozni, tubularni i vilotubularni (miješani) polipi. Važna je veličina polipa jer 40 % većih polipa kasnije se transformira u malignu vrstu tumora. Ako je polip veći, češće se radi o viloznom histološkom nalazu (Brkić i Grgić, 2006).

Najčešći nasljedni oblici karcinoma su obiteljska adenomatozna polipoza (FAP - engl. *familiar adenomatous polyposis*) i nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (HNPCC – engl. *hereditary nonpolyposis colon cancer*). Javljaju se još i polipoza pridružena MUTYH mutaciji (MAP – engl. *MUTYH associated polyposis*), Peutz-Jeghers sindrom (PJS) i sindrom nazubljene polipoze (SPS – engl. *serrated polyposis syndrome*) (Nojadeh i sur., 2018).

FAP je rijetka autosomno dominantna bolest uzrokovana mutacijom u *APC* genu (engl. *adenomatous polyposis coli*). Ta mutacija dovodi do smanjene ekspresije *APC* gena. Bolest je karakterizirana mnogobrojnim adenomatoznim polipima duž debeloga crijeva (>1000) te zahvaća i ostale dijelove gastrointestinalnoga sustava. Polipi se javljaju u drugom i trećem desetljeću života dok se CRC razvija do 40. godine života (Brkić i Grgić, 2006).

HNPCC je autosomno dominantna bolest koja nastaje zbog mutacije u jednom od četiri *MMR* gena (engl. *mismatch repair*) koji sudjeluju u popravku pogrešno sparenih baza tijekom replikacije DNA. Bolest se dijeli na Lynch 1 sindrom – karcinom koji je lokaliziran u području debeloga crijeva i rektuma i na Lynch 2 sindrom – karcinom povezan s drugim vrstama karcinoma gastrointestinalnoga i reproduktivnoga sustava. U većini slučajeva radi se o mutaciji u *hMSH2* i *hMLH1* genima. Za dijagnosticiranje ove bolesti koriste se: II. amsterdamski kriteriji i senzitivniji kriteriji iz Bethesda-e (Brkić i Grgić, 2006).

Amsterdamski kriterij – svaki od navedenih kriterija mora biti ispunjen (Steinke i sur., 2013):

- prisutna tri ili više rođaka s histološki potvrđenim CRC-om ili rakom endometrija, tankoga crijeva, uretera ili bubrežne zdjelice. Mora postojati prvi stupanj srodstva između dva oboljela člana obitelji. FAP treba biti isključen;
- tumor prisutan u dvije ili više uzastopne generacije;
- jedan ili više rođaka s dijagnosticiranim CRC-om prije 50. godine;

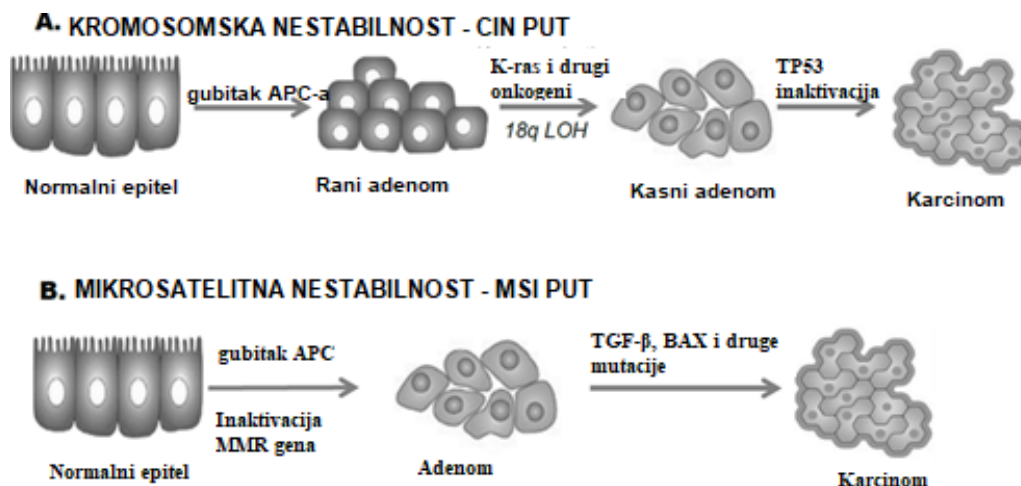
Revidirani kriterij iz Bethesd-e – mora biti ispunjen jedan ili više kriterija (Steinke i sur., 2013):

- osobe s CRC-om prije 50. godine života;
- prisutnost sinkronih ili metakronih CRC-a ili drugih tumora povezanih s Lynch sindromom (tumor želuca, jajnika, gušterače, žučnih vodova, glioblastom mozga, sebacealni adenomi, tumor tankog crijeva), neovisno o dobi;
- CRC s visokom mikrosatelitnom nestabilnošću dijagnosticiran prije 60. godine života;
- CRC kod pacijenata s rođakom prvoga stupnja srodstva koji ima CRC ili tumore povezane s Lynch sindromom dijagnosticirane prije 50. godine života;
- CRC kod pacijenata s dva ili više rođaka prvoga ili drugoga stupnja srodstva dijagnosticiranim s CRC-om ili tumorom povezanim s Lynch sindromom neovisno o dobi.

1.4. Genska nestabilnost

CRC razvija se godinama. Postoje različiti nasljedni oblici karcinoma, a kao predispozicija za ovaj tumor su otkriveni nedostaci gena supresora tumora i aktivnosti onkogeni (Crnek-Kunstelj, 2003). Uz to što brojni rizični čimbenici pridonose nastanku CRC-a, sam CRC potječe iz epitelnih stanica gastrointestinalnoga trakta. Te su stanice sklone mutacijama u specifičnim sekvencijama DNA koje utječu na proliferaciju i mehanizme samoobnove stanice. Mehanizmi genske nestabilnosti važni su molekularni mehanizmi malignih transformacija. U njih se ubrajaju: kromosomska

nestabilnost – CIN (engl. *chromosomal instability pathway*) ili supresijski put, mikrosatelitna nestabilnost – MSI (engl. *microsatellite instability pathway*) ili mutacijski put te epigenetska nestabilnost – CIMP (engl. *CpG island methylator phenotype*) (Slika 1) (Mundade i sur., 2014).



Slika 1. Shematski prikaz mehanizama nastanka CRC-a (prilagođeno prema Mundade i sur., 2014)

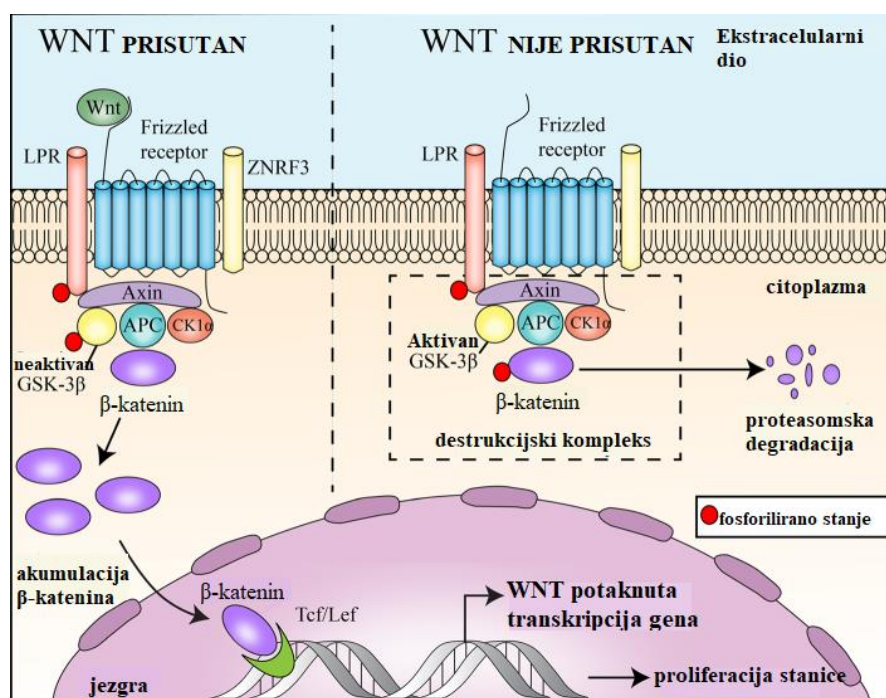
1.4.1. Kromosomska nestabilnost (CIN)

Prema modelu kolorektalne tumorogeneze koji su predložili Fearon i Vogelstein devedesetih godina 20. stoljeća tumor vrlo vjerojatno započinje u stanicama sluznice debelog crijeva gubitkom *APC* gena na kromosomu 5q21. *APC* gen je tumorski supresorski gen te uslijed gubitka *APC* gena dolazi do lokalizirane hiperproliferacije epitela crijeva i pojave polipa crijeva koji su početak razvoja benignoga tumora adenoma (Crnek-Kunstelj, 2003). Genske promjene također uključuju aktivaciju protoonkogena *KRAS*, *c-src*, *c-myc* te inaktivaciju tumor supresorskoga gena *p53* i gubitak heterozigotnosti (LOH – engl. *loss of heterozygosity*) za dugi krak kromosoma 18 (Mundade i sur., 2014).

Mutacija *APC* gena može biti nasljedna ili stečena. Većina CRC-a je karakterizirana disfunkcijom Wnt/ β -katenin puta (kanonski put) koji je bitan za razvoj normalne sluznice debelog crijeva. Oko 80 % bolesnika s FAP-om ima gubitak ili mutaciju *APC* gena. Kada nema Wnt liganda, β -katenin stvara kompleks s *APC* i *AXIN* proteinima gdje ga fosforilira kazein-kinaza 1α (*CKI α*) i kinaza-glikogen-sintaze 3β (*GSK3 β*). Zatim slijedi ubikvitinacija i razgradnja β -katenina (Basu i sur.,

2016). Vezanjem Wnt liganda (Slika 2) započinje signalizacija preko Frizzled (FZD) transmembranskog receptora i proteina povezanoga s receptorom proteina niske gustoće (LRP, engl. *lipoprotein receptor-related protein*). Zatim LRP fosforilira CK1 α i GSK3 β koje time postaju neaktivne i tada se privlače “Dishevelled” proteini. U slučaju kada je APC mutiran citosolne se razine β -katenina povećavaju te se on translocira u jezgru gdje služi kao koaktivator TCF/LEF (engl. *T-cell factor/ lymphoid enhancer factor*) obitelji transkripcijskih faktora. Oni aktiviraju ekspresiju ciljnih gena uključujući neke metaloproteinaze, fibronektin i onkoprotein poput c-Myc-a te ciklin-a D1. Ti onkogeni sudjeluju u staničnoj proliferaciji (Fanali i sur., 2014).

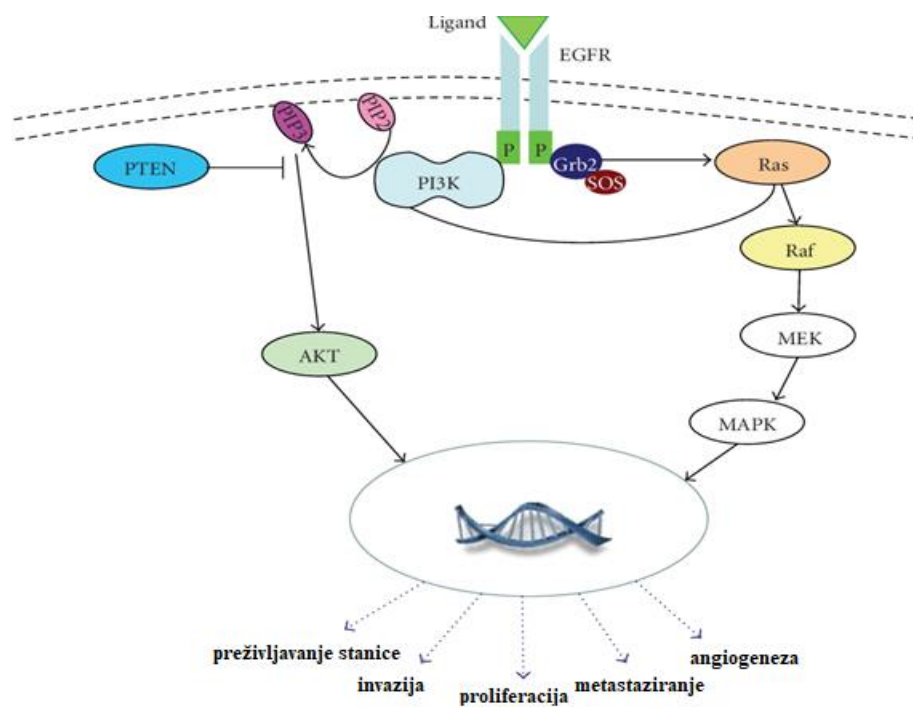
Visoka koncentracija glukoze, čija je povišena potrošnja obilježje tumorskih stanica, dovodi do pojačane translokacije β -katenina u jezgru (Lecarpentier i sur., 2017). U stanicama CRC-a nađeni su i mutirani AXIN proteini koji djeluju kao negativni Wnt regulatori i tumor supresori (Novellademunt i sur., 2015).



Slika 2. Wnt/ β -katenin signalni put (prilagođeno prema Pai i sur., 2017)

EGFR/MAPK je još jedan važan molekularni put koji dovodi do CRC-a. Receptori za epidermalni faktor rasta (EGFR) su transmembranski proteini koji spadaju u ErbB obitelj receptora koje funkcioniraju kao receptorske tirozinske kinaze. Mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK)

spada u veliku obitelj serin/treonin-kinaza koje započinju niz kaskadnih fosforilacija od stanične površine sve do jezgre. EGFR signalna kaskada (Slika 3) ima adapterski proteinski kompleks koji se sastoji od faktora rasta (Grb2) i SOS (engl. *son of seven-less*). Taj kompleks aktivira Ras-GTP (gvanozin-5'-trifosfatnu) aktivnost (Koveitypour i sur., 2019). *KRAS* gen pripada *RAS* (engl. *Rat sarcoma*) obitelji onkogeni (uz *NRAS*, *HRAS* gene) i mutiran je u 30-50 % CRC-a. RAS proteini imaju važnu ulogu u diobi stanice, diferencijaciji i apoptozi. Više staničnih funkcija regulira se aktiviranim RAS-om. Jedan od karakterističnih puteva koji regulira RAS je RAF-MEK-ERK koji je uključen u staničnom ciklusu. RAF obitelj proteina čine tri serin/treonin-kinaze koje aktiviraju MEK1 i MEK2 koje fosforiliraju ERK1 i ERK2. ERK fosforilira citosolne i jezgrine substrate koji reguliraju enzime kao ciklin D1 (Pino i Chung, 2010). Mutacije u ovom putu umanjuju intrinzičku GTP aktivnost *KRAS*-a, što omogućuje da se *KRAS* akumulira u aktivnoj GTP-vezanoj konformaciji te dovodi do konstitutivne aktivacije nizvodnih proliferirajućih signalnih putova (Mundade i sur., 2014).



Slika 3. EGFR/MAPK i PI3K/Akt signalni put (prilagođeno prema Krasinskas, 2011)

PI3K/Akt je jedan od bitnih intracelularnih signalnih puteva odgovornih za stanični rast, proliferaciju, diferencijaciju i migraciju. Fosfoinozid 3-kinaza (PI3K) koja je aktivirana putem EGFR (Slika 3), je heterodimerna molekula koja se sastoji od tri klase: klase I-III. Tip Ia se najviše

povezuje s karcinomima kod ljudi, a sastoji se od dvije podjedinice: regulatorne (p85) i katalitičke (p110). Akt (protein kinaza B, PKB) je serin/treonin-kinaza koja posreduje u djelovanju PI3K za rast i napredovanje tumora. Fosforilacija Akt proteina povezana je sa staničnom proliferacijom i inhibicijom apoptoze u ljudi s CRC-om. Aktivacija PI3K može biti pokrenuta pomoću stimulirajućih ekstracelularnih faktora preko receptorske tirozin-kinaze ili stimuliranjem aktivacije Ras-a. Kada se regulatorna podjedinica p85 veže na intracelularne fosfotirozinske ostatke receptorske tirozin-kinaze uklanja se njegov inhibitorski učinak na katalitičku p110 podjedinicu što uzrokuje aktivaciju PI3K. PI3K potom fosforilira fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat u trifosfat. Fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3) zatim aktivira Akt protein što uzrokuje staničnu proliferaciju. U signalnom putu mTOR koji potiče angiogenezu Akt protein regulira rast, metabolizam te translaciju proteina. Gen koji kodira tumor supresorski protein PTEN defosforilira PIP3 te na taj način utječe na mTOR signalni put (Koveitypour i sur., 2019).

Ljudski **tumor supresorski gen TP53** nalazi se na kromosomu 17p te se sastoji od 11 egzona i 10 introna. Tumorski protein p53 inducira različite procese u stanici od apoptoze, ubrzanoga starenja u slučaju oštećenja DNA, hipoksije ili aktivacije onkogene. 45 % mutacija javlja se u distalnom dijelu debelog crijeva. Najčešće se radi o mutacijama krivoga smisla (engl. *missense*) na egzonu 5 do 8. Radi se o prijelazima GC u AT ponajviše na 5 žarišnih kodona (175, 245, 248, 273 i 282). Ovakve mutacije dovode do sinteze nefunkcionalnih proteina s iznimno dugim poluživotom (Pino i Chung, 2010). Mutacije u *p53* genu povezane su s proširenjem raka na limfu u proksimalnom dijelu debelog crijeva, te proširenjem na limfu i krvne žile u distalnom dijelu debelog crijeva (Li i sur., 2015)

Notch signalni put je bitan u normalnom razvoju, diferencijaciji te proliferaciji stanica. Vezanjem Notch liganda za svoj receptor na ciljnoj stanici aktivira se Notch signalni put preko γ -sekretaze proteinskoga kompleksa te se Notch receptor (-1,-2,-3 i -4) kida. To je ključni korak u stvaranju aktivnoga oblika Notch-a, Notch unutarstanične domene (NICD, engl. *Notch intracellular domain*). NICD se translocira u jezgru gdje se veže za CSL (engl. *CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1*) transkripcijski faktor uz različite koaktivatore. Na taj se način inducira ekspresija željenih gena uključujući i *Hes* gene. Notch ligandi, Notch receptori 1-4 te neke nizvodne molekule u Notch signalnom putu su prekomjerno izražene u CRC-u. Studije su pokazale da je Notch ekspresija veća u ranijem stadiju CRC-a nego u kasnijem stadiju CRC-a (Koveitypour i sur., 2019).

TGF- β signalni put je uključen u kontrolu nekoliko bioloških procesa kao što su stanična proliferacija, migracija i apoptoza. Smatra se da TGF- β (engl. *transforming growth factor - β*) signalni put smanjuje proliferaciju epitelnih stanica kolona te promovira apoptozu. Stoga TGF- β djeluje kao tumorski supresor u epitelu crijeva. Put započinje vezanjem TGF- β liganda na tip II TGF- β receptora (TGFB2). Zatim se fosforilira tip I receptor i aktivira kinazna aktivnost TGFB1. Nizvodno u signalnom putu, SMAD proteini povezani s receptorom (SMAD2, SMAD4) fosforiliraju se i aktiviraju. To omogućuje translokaciju SMAD4 proteina u jezgru i regulaciju transkripcijskih gena. Vezanje liganda za TGFB2 uzrokuje aktivaciju nekoliko nekanonskih signalnih putova i putova koji nisu regulirani preko SMAD proteina. Mnogi CRC-i izgube tumor supresore kao što je TGF- β . Međutim, pokazalo se da je TGF- β izrazito izražen u kasnim fazama kolorektalne karcinogeneze, povećavajući proizvodnju nekoliko mitogenih čimbenika rasta kao TGF- α i EGF te tako djeluje kao promotor tumora (Koveitypour i sur., 2019).

1.4.2. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI)

Uz CIN, 10-15 % sporadičnih CRC-a nastaju zbog mikrosatelitne nestabilnosti. Mikrosatelitne regije su kratki, ponavljajući sljedovi od 1-5 nukleotida koji se nalaze i u tumorskom genomu sklonom mutacijama. CRC nastaje zbog inaktivacije nekoga *MMR* gena za popravak DNA nakon replikacije. U *MMR* gene ubrajamo: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* (Sinicropo i Sargent, 2012). Inaktivacija *MMR* gena dešava se preko prekomjerne metilacije CpG otoka MutL homolog 1 (*MLH1*) gena ili drugih gena poznatih kao epigenetska nestabilnost (CIMP) te preko točkastih mutacija nekoga od specifičnog *MMR* gena. Ta inaktivacija gena, odnosno nakupljanje mutacija u mikrosatelitnim regijama DNA može biti nasljedna kao kod Lynch sindroma ili stečena kod sporadičnih CRC-a (Mundade i sur., 2014).

1.4.3. Epigenetska nestabilnost (CIMP)

Epigenetske promjene igraju veliku ulogu u inicijaciji i progresiji CRC-a. Remodeliranje kromatina kroz kovalentnu modifikaciju histona jedan je od bitnijih poremećaja mehanizama u epigenetskim promjenama. Te modifikacije mogu biti pod utjecajem onkogenoga RAS puta te se na taj način regulira ekspresija ciljnih gena kao što je ciklin D1 i CDH1. Uz posttranslacijsku modifikaciju histona smatra se da je metilacija citozinskih baza u CG punim sekvencama

odgovorna za stvaranje karcinoma. Hipermetilacija gena je jedan od čestih molekulskih mehanizama utišavanja tumorski supresorskih gena te može dovesti do stvaranja raka kroz transkripcijsku represiju tih gena. Hipermetilacija promotorskih regija u CRC-u nastaje rano na nekim genima kao što su *MLH1*, *VIM* i *SEPT9* geni (Safaei i sur., 2013).

1.5. Stadiji kolorektalnoga karcinoma

Postoje različiti načini klasifikacija i stupnjevanja CRC-a. Kod određivanja proširenosti tumora koriste se Dukesova, TNM i Astler-Collerova klasifikacija. Najčešće korištena je TNM klasifikacija (Tablica 1.) u kojoj slovo T predstavlja proširenost tumora, N govori o zahvaćenosti limfnih čvorova, a slovo M o prisutnosti metastaza. Liječenje kemoterapeutcima započinje kada su pristune T3 lezije (Brkić i Grgić, 2006).

Tablica 1. Objašnjenje TNM klasifikacije raka debelog crijeva (prilagođeno prema Vrdoljak i sur., 2018)

Primarni tumor (T)	
TX	Primarni tumor se ne može procijeniti
T0	Nema dokaza primarnoga tumora
Tis	Karcinom <i>in situ</i> (intraepitelni ili intramukozni karcinom)
T1	Tumor prodire u submukozu (kroz mišićni sloj sluznice, ali ne u mišićni dio stijenke)
T2	Tumor prodire u mišićni dio stijenke
T3	Tumor prodire kroz mišićni dio stijenke u perikolorektalno tkivo
T4	Tumor zahvaća visceralnu potrbušnicu ili zahvaća okolne organe ili strukture
T4a	Tumor prodire kroz visceralnu potrbušnicu
T4b	Tumor izravno zahvaća ostale organe ili strukture
Regionalni limfni čvorovi (N)	
NX	Regionalni limfni čvorovi ne mogu se opisati
N0	Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

N1	Metastaze u 1-3 regionalna limfna čvora (tumor $\geq 0,2$ mm)
N1a	Metastaze u 1 limfnom čvoru
N1b	Metastaze u 2-3 regionalna limfna čvora
N2	Metastaze u 4 ili više limfnih čvorova
N2a	Metastaze u 4-6 regionalnih limfnih čvorova
N2b	Metastaze u 7 ili više regionalnih limfnih čvorova
Udaljenje metastaze (M)	
M0	Bez radiološkoga dokaza ili drugoga dokaza o udaljenim metastazama
M1	Metastaze u jednom ili više udaljenih organa ili metastaze po potrbušnici
M1a	Metastaze ograničene na 1 organ bez metastaza po potrbušnici
M1b	Metastaze u 2 ili više organa bez metastaza po potrbušnici
M1c	Metastaze po površini potrbušnice s metastazama ili bez njih u drugim organima

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nastanak kolorektalnoga karcinoma vrlo je složen proces. Unatoč tome, postignut je značajan napredak u razumijevanju staničnih signalnih puteva kod kolorektalnoga karcinoma. U skladu s time ostvaren je i značajan uspjeh lijekova koji djeluju blokirajući određene receptore i molekule. Ti noviji lijekovi uz indikaciju CRC-a imaju i brojne druge indikacije od metastatskog karcinoma dojke, raka želuca, raka pluća nemalih stanica, hepatocelularnog karcinoma i karcinoma pločastih stanica glave i vrata.

Cilj je ovoga diplomskog rada dati pregled dostupnih informacija o novijim terapijskim mogućnostima u liječenju kolorektalnoga karcinoma, njihovim prednostima i manama te načinu primjene tih lijekova.

3. MATERIJALI I METODE

Za potrebe ovoga teorijskog diplomskog rada korišteni su udžbenici iz područja patofiziologije, farmakologije, molekularne biologije kao i stručna i znanstvena literatura do koje se došlo pretraživanjem bibliografskih baza podataka Pubmed-a i ScienceDirect-a. Pretraživana literatura koja je obuhvaćena u ovom diplomskom radu dostupna je posljednjih dvadeset godina. Također su pregledavane i mrežne stranice različitih regulatornih agencija poput Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) i Europske agencije za lijekove (EMA).

U bibliografskim bazama pretraživanje znanstvenih i stručnih članaka temeljeno je na ključnim riječima i njihovim kombinacijama: *colorectal cancer, molecular pathways in colon cancer, EGFR, Wnt/ β -catenin pathway, TGF- β signaling, microsomal instability, staging of CRC, TNM classification, treatment of CRC, FOLFIRI, FOLFOX, cetuximab, bevacizumab, encorafenib, ramucirumab, panitumumab, aflibercept i pembrolizumab.*

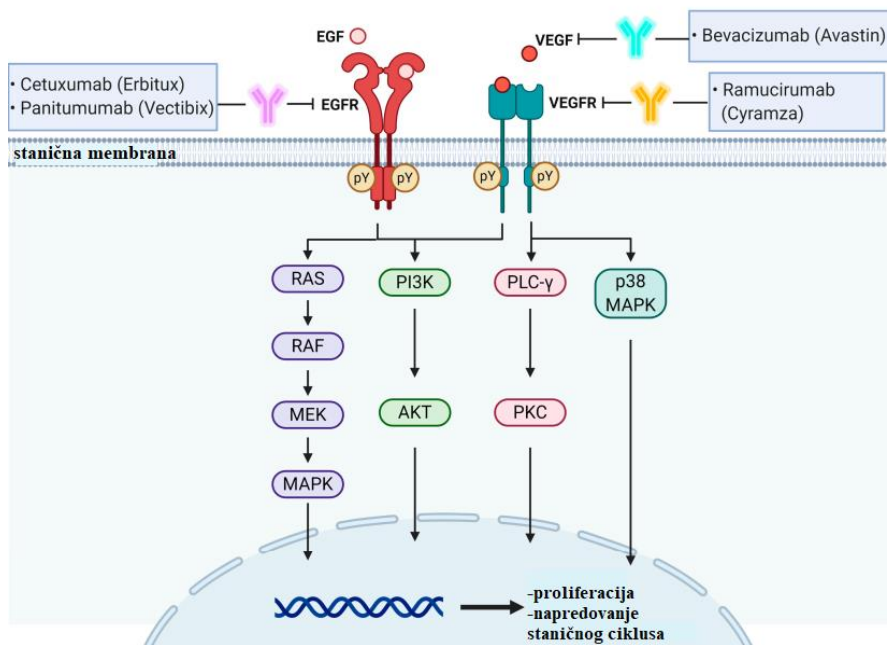
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Nova terapija kolorektalnoga karcinoma

Načini liječenja metastatskoga kolorektalnog karcinoma (mCRC) znatno su se mijenjali tijekom godina. Nekoliko desetljeća, tradicionalna kemoterapija koju čini 5-fluorouracil + leukovorin (5-FU/LV) bili su jedini učinkovit način tretiranja bolesti povezani s medijanom preživljenja oko 12 mjeseci. Oralni su fluoropirimidini (kapecitabin, uracil/ftorafur (UFT)) jednako učinkoviti, a lakše se podnose od 5-FU/LV. Uvođenjem citotoksičnih lijekova irinotekana i oksaliplatine (OX) još je više poboljšan medijan preživljenja. Navedeni se lijekovi koriste i kod lokalizirane uznapredovale bolesti kao i kod metastatskoga CRC-a (Tol i Punt, 2010).

Tradicionalni kemoterapijski režim baziran na 5-fluorouracilu FOLFIRI (sadrži irinotekan, folnu kiselinu i 5-fluorouracil) te FOLFOX (sadrži oksaliplatinu) koristi se kao standard u terapiji. Trenutno se monoklonska protutijela (mAb) (Slika 4.) koriste u kombinaciji sa standardnom terapijom kako bi se poboljšali ishodi liječenja. U usporedbi s tradicionalnim kemoterapeutima, mAb, odnosno biološki lijekovi, imaju manje nuspojava zbog njihovog ciljanog djelovanja. Dobitnici Nobelove nagrade iz fiziologije u 2018., Allison i Honjo, otkrili su imunosupresorske molekule PD-1 (engl. *programmed cell death 1*) i CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) koje su obećavajuće mete u liječenju mnogih vrsta karcinoma uključujući i CRC-a (Hwang i sur., 2021).

Kod svih bioloških lijekova bitno je evidentirati naziv i broj serije lijeka kako bi sljedivost bila što veća. Svi biološki lijekovi imaju određeni stupanj varijabilnosti te postoje razlike između serija istoga biološkog lijeka (www.halmed.hr).



Slika 4. Shematski prikaz EGFR i VEGF molekularnih puteva te utjecaj protutijela na te signalne molekule u progresiji CRC-a i metastaziranju. pY označava fosfotirozinske ostatke (prilagođeno prema Hwang i sur., 2021)

4.2. Lijekovi koji djeluju na stanice raka s promjenama na EGFR-u

4.2.1. Cetuksimab

Registriran kao Erbitux®, cetuksimab je mAb koje se veže na ekstracelularnu domenu EGFR-a. To je kimerno IgG1 protutijelo koje se sastoji od mišjih varijabilnih regija te ljudske konstantne regije i lakoga kappa lanca. Proizveden je u staničnoj liniji sisavaca (Sp2/0) rekombinantnom DNA tehnologijom. Njegovo vezanje za EGFR sprječava ligandom induciranu dimerizaciju receptora, omogućuje internalizaciju istog receptora pa na taj način istodobno regulira količinu eksprimiranih proteina. Nakon vezanja za receptor imunoglobulinski dio cetuksimaba je prepoznat od strane Fcγ receptora (FcγR) efektorskih stanica imunostoga sustava (pr. stanice ubojice - NK stanice) i T stanice) i sudjeluje u smrti stanica raka. Dodatno, cetuksimab reducira tumorsku angiogenezu i migraciju endotelinih tumorskih stanica. Odobren je kod mCRC-a te se preporuča kombinacija sa standardnom kemoterapijom (kemoterapija s irinotekanom ili u prvoj liniji liječenja u kombinaciji s FOLFOX-om) za ljude koji su EGFR pozitivni i imaju “divlji tip” *KRAS* gena, što znači da

nemaju prisutnu mutaciju na *KRAS* genu. Erbitux® se ne smije koristiti kod bolesnika s *RAS* mutacijom ili kod kojih je *RAS* status nepoznat (Hwang i sur., 2021).

Cetuksimab se može koristiti samostalno, ako se terapija s oksaliplatinom i irinotekanom nije pokazala uspješnom ili ako bolesnik ne podnosi irinotekan. Lijek je dostupan u obliku bezbojne otopine za infuziju u bočini od 20 ml ili 100 ml te se Erbitux® 5 mg/ml primjenjuje intravenski preko infuzijske pumpe, obične infuzije ili injekcijske pumpe. Prije svakoga tretmana infuzijom osobe moraju primiti premedikaciju kortikosteroidima i antihistaminicima. Prije korištenja Erbitux® 5 mg/ml mora se pripremiti adekvatno ovisno o načinu primjene. Primjenom preko infuzijske pumpe ili obične infuzije može se koristiti razrijeđeni ili nerazrijeđeni lijek. Razrijeđeni lijek se pripremi s 0,9 %-tnom (9 mg/ml) otopinom natrijeva klorida. Zatim se izračuna potrební volumen lijeka koji se onda preko sterilne štrcaljke i igle prebaci u prethodnu pripremljenu infuzijsku vrećicu fiziološke otopine iz koje je uklonjen odgovarajući volumen otopine. Postupak se ponavlja dok se ne postigne izračunati volumen lijeka. Vrećica se spoji na infuzijsku liniju i ispuní razrijeđenim lijekom. Nerazrijeđeni se lijek pripremi na način da se izračuna potrební volumen lijeka i prenese u sterilnu praznu vrećicu ili spremnik koji se spoji na infuzijsku liniju i ispuní lijekom prije početka infuzije. Za infuziju treba se koristiti posebna infuzijska linija koja se na kraju infuzije treba isprati 0,9 %-tnom sterilnom otopinom natrijeva klorida za injekciju. Za korištenje injekcijske pumpe potrebno je prethodno izračunati potrební volumen lijeka te sterilnom štrcaljkom prebaciti u pumpu i spojiti na infuzijsku liniju (www.ema.europa.eu).

Za sve indikacije cetuksimab se koristi jednom tjedno i početna doza je 400 mg/m² tjelesne površine uz preporučeno vrijeme infuzije od 120 minuta. Sve ostale doze iznose 250 mg/m² u trajanju od 60 minuta. Brzina infuzije ne smije prijeći 10 mg/min. Srednja vrijednost volumena distribucije proporcionalna je vaskularnom protoku. Stabilne se razine serumskih koncentracija cetuksimaba dosegnu nakon tri tjedna, dok je srednja vrijednost C_{max} iznosila 185±55 µg/ml. Cetuksimab ima dugo vrijeme polueliminacije, 70-100 sati po korištenoj dozi. Lijek treba čuvati u hladnjaku na 2-8 °C, a nakon otvaranja bočica se treba primijeniti odmah. Ukoliko se ne primjeni odmah, ne smije se čuvati dulje od 24 h na prikladnoj temperaturi kako bi lijek bio odgovarajuće kakvoće za pacijenta. Lijek je kontraindiciran kod osoba s preosjetljivošću na cetuksimab, dok kombinacija Erbitux® s oksaliplatinom je kontraindicirana kod bolesnika s mutiranim *RAS* mCRC-om ili kod osoba kod kojih nije poznat *RAS* status gena (www.ema.europa.eu).

Od nuspojava kod pacijenata pojavila se anafilaktička reakcija povezana s infuzijom, pogotovo kod pacijenata s alergijama na crveno meso, ugrize krpelja ili pozitivnim rezultatima testova na IgE protutijela protiv cetuksimaba. Kožne reakcije koje se pojavljuju kod 80 % pacijenata sugeriraju da prvu dozu treba primjenjivati polako, na način da brzina ne prijeđe 5 mg/min te pacijenta treba nadzirati naredna dva sata. Ako je došlo do kožne reakcije povezane s infuzijom, prije davanja iduće doze treba se pažljivo procijeniti omjer koristi i rizika. Liječenje cetuksimabom treba zaustaviti ukoliko je došlo do teške kožne reakcije (≥ 3 . stupanj, kod 15 % pacijenata), a liječenje se može nastaviti ako se kožna reakcija vrati na 2. stupanj. Ukoliko dođe do drugoga ili trećega ponavljanja kožne reakcije, liječenje cetuksimabom se mora prekinuti i doza se mora smanjiti (200 mg/m² nakon drugoga ponavljanja, te 150 mg/m² nakon trećega ponavljanja). Ako se teška kožna reakcija nije vratila na 2. stupanj ili se pojavi četvrti put, liječenje se treba trajno prekinuti (www.ema.europa.eu). U nekim slučajevima ovakve su reakcije završile smrću pacijenta. Javljaju se i simptomi poput zimice, vrućice, otežanoga disanja i vrtoglavice (Françoso i Simioni, 2017). Često dolazi do poremećaja elektrolita, od revezbilinoga pada koncentracije magnezija u serumu, pojave hipokalemije zbog dijareje ili hipokalcemije. U kombinaciji s platinom, cetuksimab može povećati rizik od teške hipokalcemije i neutropenije koja može dovesti do različitih komplikacija. Kod osoba s ulceroznim kolitisom liječenje se treba privremeno ili trajno prekinuti. Osobe koje koriste kontaktne leće imaju veći rizik za nastanak ulceracija na rožnici i keratitisa. Kod kombinacije cetuksimaba s fluoropirimidinima javlja se povećan rizik od infarkta miokarda, ishemije srca te kongestivnoga zatajenja srca. Nažalost, nema dovoljno dostupnih podataka o utjecaju cetuksimaba na trudnice i dojilje. Testiranja na životinjama govore o povećanoj incidenciji pobačaja ovisno o korištenoj dozi, no nisu ukazala na teratogenost lijeka. Dojenje se ne preporuča za vrijeme terapije i 2 mjeseca nakon zadnje primljene doze cetuksimabom (Bronte i sur., 2013; www.ema.europa.eu).

4.2.2. Panitumumab

Panitumumab je humano IgG2 mAb dobiveno u staničnoj liniji sisavaca (CHO) rekombinantnom DNA tehnologijom. Lijek se specifično veže za ekstracelularnu domenu EGFR-a. Indiciran je za liječenje osoba s mCRC-om koje imaju “divlji tip” gena KRAS. Koristi se u prvoj i drugoj liniji liječenja mCRC-a. U prvoj liniji se koristi u kombinaciji s FOLFOX ili FOLFIRI terapijom. U drugoj liniji se primjenjuje s FOLFIRI terapijom kod osoba koje su u prvoj liniji liječenja primili

terapiju baziranu na fluoropirimidinima ne uključujući irinotekan. Preporučena doza panitumumaba je 6 mg/kg jednom u svaka dva tjedna kroz jednosatnu infuziju (www.ema.europa.eu). Registriran kao VectibixTM veže se za točkastu mutaciju u domeni III EGFR-a kod osoba koje su razvile stečenu rezistenciju na cetuksimab. Za razliku od cetuksimaba, ne sudjeluje u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima. Vezanjem za receptor ne dolazi do dimerizacije receptora i njegove autofosforilacije inducirane ligandom, nego dolazi do internalizacije EGFR-a. Posljedično se smanjuje ekspresija faktora rasta (EGFR, VEGF), inhibira se stanični rast, angiogeneza, stvaranje interleukina-8 te se inducira apoptoza (Hwang i sur., 2021).

VectibixTM 20 mg/ml nalazi se na tržištu u obliku koncentrata otopine za infuziju - bočica od 5 ml koja sadži 100 mg ili od 20 ml koja sadži 400 mg. Bočica se ne smije mućkati niti snažno tresti. Otopina pH vrijednosti od 5,6 do 6,0 mora biti bezbojna i smije sadržavati prozirne do blago bijele, amorfne čestice koje se mogu ukloniti s 0,2 ili 0,22 µm “in-line” linijskim filterom. Lijek se primjenjuje u razrijeđenom obliku s 0,9 %-tnom otopinom natrijeva klorida te konačna koncentracija ne smije biti veća od 10 mg/ml. Razrijeđena otopina se ne smije tresti, već se miješa nježnim okretanjem. Nakon razrijeđenja lijek se mora trenutno primijeniti, a vrijeme čuvanja ne smije biti duže od 24 h na prikladnim uvjetima (2-8 °C). VectibixTM se primjenjuje intravenski uz infuzijsku pumpu u trajanju od 60 minuta. Trajanje infuzije ovisi o njenoj podnošljivosti te o dozi lijeka. Doze iznad 1000 mg trebaju se primjenjivati oko 90 minuta. Vrijeme polueliminacije panitumumaba je približno 7,5 dana. Izvješća o predoziranju prilikom korištenja dvostruko veće doze (12 mg/kg tjelesne mase) od preporučene doze, ukazuju na štetne učinke panitumumaba u koje se uvrštavaju kožne toksičnosti, proljev, dehidracija te umor (www.ema.europa.eu).

Panitumumab je kontraindiciran kod osoba s plućnom fibrozom ili pneumonitisom. Kombinacija panitumumaba s kemoterapijskim tretmanom koji sadrži oksaliplatinu kontraindicirana je kod osoba s mutiranim *RAS* genom ili kod kojih status *RAS* gena nije poznat. Nuspojave povezane s panitumumabom uključuju dermatološke reakcije, gastrointestinalne tegobe, zimicu, povišenu tjelesnu temperaturu, poremećaje elektrolita, dispneju te različite oftalmološke probleme. Dermatološke reakcije se javljaju kod većine pacijenata (oko 94 %). Teške kožne reakcije (NCI-CTC stupanj 3) prijavljene su kod 23 % pacijenata dok su po život opasne kožne reakcije (NCI-CTC stupanj 4) prijavljene kod <1 % pacijenata koji su primali panitumumab u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim lijekovima. Kada se razviju takve reakcije ili ih pacijent smatra

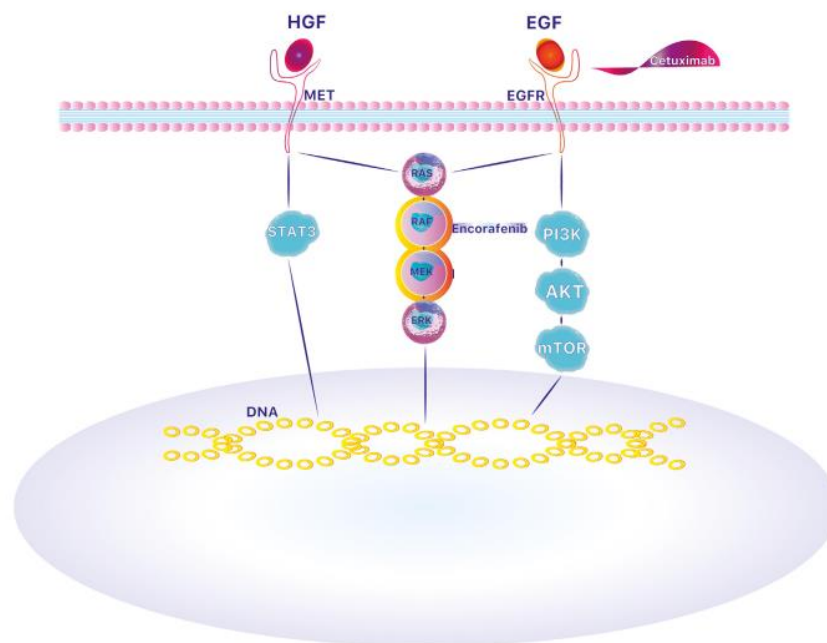
nepodnošljivima, doza primijenjenoga lijeka mora se prilagoditi (smanjiti infuziju na 80 % ili 60 % početne doze). U najlošijem slučaju, kod učestaloga pojavljivanja dermatoloških reakcija visokog stupnja (≥ 3) liječenje se treba prekinuti. Pacijente s teškim dermatološkim reakcijama treba pratiti jer se mogu pojaviti infektivne i upalne komplikacije, primjerice sepsa i nekrotizirajući fasciitis, jer ukoliko te komplikacije ostanu neliječene mogu dovesti do smrti pacijenta. Pad razine magnezija u serumu se pojavio kod nekih pacijenata što može dovesti do teške hipomagnezije. Pacijentima se mora kontrolirati razina magnezija prije početka i tijekom liječenja panitumumabom pa sve do 8 tjedana nakon završene terapije. Primjena panitumumaba u kombinaciji s IFL kemoterapijom koja sadrži irinotekan, bolus 5-fluorouracila i leukovorin se mora izbjegavati zbog visoke učestalosti jakih proljeva. Dodatno, VectibixTM se ne smije primjenjivati u kemoterapeutskom protokolu koji sadrži bevacizumab zbog povećane učestalosti plućnih embolija i infekcija (većinski dermatološkoga podrijetla) te povećane smrtnosti. Nema podataka o primjeni lijeka kod trudnica i dojilja, no ispitivanja rađena na životinjama upozoravaju na reproduktivnu toksičnost te se smatra da panitumumab može izazvati oštećenje ploda. Humani IgG prolazi kroz placentu, pa se zbog toga smatra da bi i korišteni lijek bio prenesen s majke na plod. Žene reproduktivne dobi moraju koristiti kontracepciju za vrijeme liječenja i 2 mjeseca nakon primitka zadnje doze panitumumaba. Kako se humani IgG izlučuje u majčinom mlijeku, smatra se da bi se i lijek mogao izlučivati te se preporuča da žene ne doje za vrijeme terapije i 2 mjeseca nakon primanja zadnje doze lijeka (www.ema.europa.eu).

4.3. Lijekovi koji djeluju na stanice raka s BRAFV600E mutacijom

4.3.1. Enkorafenib

Enkorafenib je registriran pod nazivom Braftovi[®] te se trenutno još prati sigurnosni profil lijeka. U kombinaciji s cetuksimabom indiciran je za liječenje mCRC-a s BRAFV600E mutacijom kod pacijenata koji su prethodno primili sistemsku terapiju. Prije primjene lijeka potrebno je utvrditi je li karcinom pozitivan na *BRAF* mutaciju, budući da je lijek kontraindiciran kod osoba s divljim tipom *BRAF* gena. Najčešća *BRAF* mutacija je zamjena aminokiseline valin glutamatom na poziciji 600. *BRAF* spada u skupinu RAF kinaza. BRAFV600E mutacijom dolazi do aktivacije MEK i ERK kinaza te u konačnici do proliferacije tumorskih stanica. Enkorafenib djeluje kao

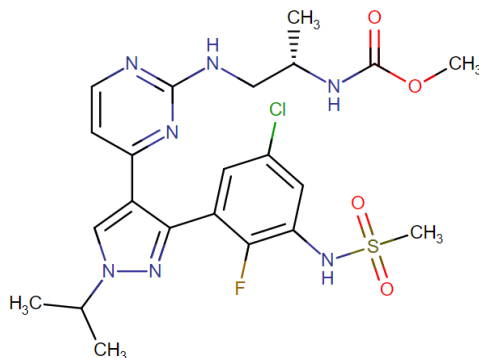
visokoselektivni inhibitor RAF-kinaze (BRAF inhibitor) i tako blokira RAF-MEK-ERK signalni put u tumorskim stanicama s BRAFV600E mutacijom (Slika 5.) (Huijberts i sur., 2020; Roviello i sur., 2020).



Slika 5. Mehanizam djelovanja cetuksimaba i enkorafeniba (prilagođeno prema Roviello i sur., 2020)

Braftovi® dolazi u obliku tvrde kapsule od 50 ili 75 mg. Za mCRC preporučena doza je 300 mg jednom dnevno u kombinaciji s cetuksimabom. Ukoliko se pojave nuspojave (npr. kožne reakcije, sindrom šaka-stopalo, krvarenja, uveitis, produljenje QT intervala) treba smanjiti dozu na 225 mg u prvom smanjenju doze, a na 150 mg u drugom smanjenju doze. Razviju li se nuspojave viših stupnjeva, primjena lijeka se mora trajno obustaviti. Ako se enkorafenib trajno isključi iz terapije, isto se treba napraviti i s cetuksimabom i obratno. Propusti li se uzimanje doze enkorafeniba, lijek se može uzeti ako do sljedeće doze je preostalo više od 12 sati. Enkorafenib ima linearnu farmakokinetiku nakon jednokratne primjene. Kao glavni put biotransformacije je *N*-dealkilacija, a ostali metabolički putevi uključuju hidrosilaciju, glukuronidaciju i hidrolizu karbamata. Metabolizira se preko CYP3A4, CYP2C19 i CYP2D6. Enkorafenib je inhibitor i induktor CYP3A4. Potreban je oprez ukoliko se koriste umjereni i snažni CYP3A4 inhibitori jer se koncentracija enkorafeniba dvostruko, odnosno trostruko povećala. Enkorafenib je potentni,

reverzibilni inhibitor uridindifosfat glukuronozil transferaze (UGT) 1A1. Enkorafenib je supstrat P-glikoproteina. Podjednako se izlučuje putem stolice i mokraće. Najčešće nuspojave kod primjene enkorafeniba u kombinaciji s cetuksimabom su umor, mučnina, povraćanje, proljev, akneiformni dermatitis, osip i bol u abdomenu. U manjem broju slučajeva je došlo do oštećenja bubrežne funkcije (porast kreatinina u krvi) te do porasta jetrenih transaminaza. Ispitivanja su pokazala reproduktivnu toksičnost i zato žene reproduktivne dobi moraju koristiti učinkovitu kontracepciju dok su na terapiji enkorafenibom i najmanje 1 mjesec nakon posljednje doze. Hormonski kontraceptivi su supstrati CPY3A4, stoga enkorafenib može smanjiti njihovu djelotvornost te se savjetuje koristiti dodatnu, fizičku metodu kontracepcije tijekom liječenja enkorafenibom. Nema podataka izlučuje li se enkorafenib u majčino mlijeko (www.ema.europa.eu).



Slika 6. Kemijska struktura enkorafeniba (preuzeo sa www.drugbank.com)

4.4. Antiangiogeni lijekovi

4.4.1. Bevacizumab

Avastin® je rekombinantno humanizirano IgG1 protutijelo proizvedeno DNA tehnologijom u stanicama jajnika kineskog hrčka. Veže se za krvožilni endotelni faktor rasta (VEGF) i sprječava interakciju VEGF sa VEGFR-1 (Flt) i VEGFR-2 (KDR) na površini endotelних stanica. Vezanjem bevacizumaba za VEGF zaustavlja se proliferacija endotelnih stanica i formiranje krvnih žila te se smanjuje opskrba tumora krvlju i tako se inhibira rast tumora. Koristi se u kombinaciji s fluoropirimidinskim kemoterapeutcima jer ne pojačava toksičnost kemoterapije, a indiciran je za liječenje osoba s metastatskim karcinomom kolona ili rektuma (Tol i Punt, 2010).

Lijek dolazi u obliku bistroga do blago opalescentnoga koncentrata za otopinu za infuziju. Jedan ml koncentrata sadrži 25 mg bevacizumaba. Preporučena doza lijeka za mCRC je 5 mg/kg ili 10 mg/kg jednom u dva tjedna, odnosno 7,5 mg/kg ili 15 mg/kg jednom u svakih tri tjedna. Avastin® se mora pripremiti u aseptičkim uvjetima da bi sterilnost otopine bila očuvana. Razrijeđuje se uz pomoć 9 mg/ml otopine natrijeva klorida (0,9 %) te konačna koncentracija otopine bevacizumaba mora biti od 1,4 mg/ml do 16,5 mg/ml. Takav razrijeđeni lijek je kemijski i fizički stabilan na temperaturi od 2 -8 °C do 30 dana nakon pripreme, no s obzirom da ne sadrži konzervanse, lijek se treba odmah primijeniti, a čuvanje ne smije trajati duže od 24 h nakon pripreme. Prva se doza bevacizumaba primjenjuje u obliku intravenske infuzije kroz 90 minuta. Ako se prva infuzija dobro podnijela, druga može biti u trajanju od 60 minuta. Nadalje, ako je druga dobro primljena, sve ostale infuzije mogu biti u duljini trajanja od 30 minuta (www.ema.europa.eu).

Avastin® posjeduje izrazit antiangiogeni kapacitet te se liječenje Avastin® -om može započeti tek 28 dana nakon veće operacije ili dok rana od operacije u potpunosti ne zacijeli (www.ema.europa.eu). Bolesnici koji su na terapiji s bevacizumabom mogu biti izloženiji riziku od gastrointestinalnih proliferacija i fistula, perforacija žučnog mjehura, hipertenzije, proteinuriji te arterijske i venske tromboemolije te krvarenju (Katzung i sur., 2017). Pacijent koji dobije gastrointestinalne perforacije te traheozofagealne fistule mora trajno zaustaviti liječenje bevacizumabom. Kod pacijenata je uočena veća incidencija hipertenzije. Ukoliko pacijent već ima hipertenziju treba ju regulirati prije početka liječenja i obratiti pozornost na mogući razvoj proteinurije. U oko 1,4 % pacijenata nefrotski sindrom (proteinurija stupnja 4) se pojavio tijekom liječenja bevacizumabom te se liječenje moralo obustaviti. Pojava proteinurije i hipertenzije je vjerojatno ovisna o primijenjenoj dozi. Simptomi sindroma reverzibilne posteriorne encefalopatije (PRES) – u koje spadaju konvulzija, glavobolja, poremećaji vida i psihičkog stanja s mogućom pratećom hipertenzijom zapaženi su kod nekih bolesnika. Osobe koje primaju Avastin® u kombinaciji s kemoterapijom pod većim su rizikom od razvoja tromboembolijskih incidenata od osoba koje se liječe samo kemoterapijom. Monoklonska protutijela koja utječu na EGFR (cetuksimab) ne smiju se koristiti u kombinaciji s kemoterapijom koja uključuje bevacizumab. Žene koje su u reproduktivnoj dobi moraju koristiti kontracepciju za vrijeme liječenja i do 6 mjeseci nakon terapije Avastin® -om. Avastin® je kontraindiciran u trudnoći jer se smatra da bi mogao uzrokovati urođene mane tijekom razvoja fetusa. Dojenje se treba izbjegavati za vrijeme liječenja lijekom pa sve do 6 mjeseci nakon terapije. Muškarci imaju u prosjeku veći klirens (+17

%) bevacizumaba od žena, a vrijeme polueliminacije lijeka iznosi od 18-20 dana. Nisu uočene značajne razlike u farmakokinetici bevacizumaba s obzirom na dob (www.ema.europa.eu).

4.4.2. Ramucirumab

Registriran kao Cyramza[®], ramucirumab je u potpunosti humano IgG1 monoklonsko protutijelo proizvedeno u mišjim (NS0) stanicama rekombinantnom DNA tehnologijom. U 2015. godini postaje odobren za liječenje mCRC-a u kombinaciji s protokolom FOLFIRI kod osoba gdje je došlo do progresije bolesti nakon terapije fluoropirimidinom, bevacizumabom i oksaliplatinom (Hwang i sur., 2021). Veže se i za VEGF i specifično za ekstracelularnu domenu VEGFR2 te na taj način inhibira vezanje VEGF liganada, VEGF-A, VEGF-C i VEGF-D za njihov receptor. Vezanjem za VEGFR2 receptor zaustavljaju se ostali signalizacijski putevi među koje spada mitogenom aktivirane protein kinaze p44/p42 te se na taj način inhibira proliferacija i migracija humanih endotelinih stanica. Također, VEGFR2 je ključni receptor u angiogenezi i eksprimiran je u tumorskoj mikrocirkulaciji (www.ema.europa.eu).

Cyramza[®] je dostupna na tržištu u obliku koncentrata za otopinu za infuziju te 1 ml koncentrata u sebi sadrži 10 mg ramucirumaba. Koncentrat je pH vrijednosti 6,0 te je bistra do blago žuta otopina. Nakon razrijeđivanja lijek se primjenjuje u obliku infuzije tijekom 60 minuta i brzina infuzije ne smije biti veća od 25 mg/min. Prije započete infuzije lijekom, treba se odrediti kompletna krvna slika te određeni uvjeti moraju biti ispunjeni (Tablica 2.) (www.ema.europa.eu).

Tablica 2. Kriteriji krvne slike koji trebaju biti ispunjeni prije protokola FOLFIRI (prilagođeno prema www.ema.europa.eu)

	Vrijednosti
Neutrofili	$\geq 1,5 \times 10^9 / l$
Trombociti	$\geq 100 \times 10^9 / l$
Gastrointestinalna toksičnost povezana s kemoterapijom	≤ 1 . stupanj (prema zajedničkom terminološkom kriteriju za štetne događaje Nacionalnog instituta za rak, engl. NCI CTCAE)

Za razrjeđivanje koncentrata lijeka koristi se otopina natrijeva klorida 9 mg/ml. Nakon što se izračuna potreban volumen ramucirumaba uzme se odgovarajući volumen otopine natrijeva klorida tako da konačan volumen u spremniku za infuziju bude 250 ml. Tako se priređena smjesa treba odmah primijeniti ili se može čuvati maksimalno do 24 h na temperaturi od 2-8 °C. Otopina za infuziju ne smije se tresti niti zamrzavati. Koristi se uz infuzijsku pumpu na koju je dodana zasebna infuzijska linija s filterom od 0,22 µm, te se ona po završetku mora isprati s fiziološkom otopinom. Preporučena doza lijeka kod mCRC-a iznosi 8 mg/kg tjelesne mase svakih 2 tjedna primjenjen pomoću infuzije prije FOLFIRI protokola uz premedikaciju antagonistom histaminskog H1 receptora. U slučaju toksičnosti na liječenje, primjerice neutropenije, proljeva ili stomatitisa, doze pojedinačnih sastavnica protokola FOLFIRI mogu se smanjiti ili se njihova primjena može privremeno odgoditi. Od sastavnica protokola FOLFIRI najčešće se prekidalo liječenje s bolusnom dozom 5-fluorouracila. Srednja vrijednost C_{min} u serumu kod osoba s mCRC-om iznosi 46,3 µg/ml (raspon: 7,7-119 µg/ml) nakon druge doze, dok je nakon četvrte doze 65,1 µg/ml (raspon: 14,5-205 µg/ml). Smatra se da se stanje dinamičke ravnoteže dostiže do šeste doze ramucirumaba. Kod starijih osoba kao i kod osoba s oštećenom bubrežnom i jetrenom funkcijom ne preporučuje se smanjenje doze ramucirumaba. Monoklonska protutijela se pretežno uklanjaju iz organizma katabolizmom, a vrijeme polueliminacije iznosi 14 dana (www.ema.europa.eu).

Najčešće povezane nuspojave s ramucirumabom su povećani rizik od gastrointestinalnoga krvarenja i perforacija, perifernih edema, povišenoga krvnog tlaka, neutropenije i proteinurije (Hwang i sur., 2021). Ukoliko se pojavi alergijska reakcija na infuziju premedikacija se mora primijeniti pri svakoj sljedećoj infuziji uz razmatranje primjene kortikosteroida. Nadalje, pri pojavi reakcije na infuziju prvoga ili drugoga stupnja, brzinu infuzije potrebno je prilagoditi smanjivanjem na 50 % brzine tijekom ostatka infuzije kao i kod svih sljedećih infuzija. Liječenje ramucirumabom mora se u potpunosti obustaviti ako dođe do reakcije na infuziju 3. ili 4. stupnja. Pacijenti s većim rizikom od razvoja proteinurije moraju se nadzirati. Ukoliko je razina proteina u mokraći ≥ 2 g/ 24 sata, liječenje ramucirumabom mora se privremeno zaustaviti i može se nastaviti ako razina padne ispod 2 g/ 24 sata uz smanjenje doze prema planu (Tablica 3.). Naraste li razina proteina ponovo, treba provesti drugo smanjenje doze lijeka. Ako je razina proteina ≥ 3 g/ 24 sata ili ukoliko se razvije nefrotski sindrom, liječenje ramucirumabom mora se trajno zaustaviti (www.ema.europa.eu).

Tablica 3. Samanjenje doze ramucirumaba kod prisutnosti proteinurije (≥ 2 g/ 24 sata) (prilagođeno prema www.ema.europa.eu)

Početna doza ramucirumaba	Prvo smanjenje doze	Drugo smanjenje doze
8 mg/kg	6 mg/kg	5 mg/kg

Cyramza® povećava rizik od krvarenja jer je antiangiogeni lijek. Osobe kojima se pojavi krvarenje 3. ili 4. stupnja, liječenje ramucirumabom mora se trajno obustaviti. Prije kirurškoga zahvata liječenje ramucirumabom mora se privremeno prekinuti minimalno 4 tjedna prije samoga zahvata kako ne bi došlo do komplikacija pri zacjeljivanju rane. Parametri krvne slike trebaju se pratiti kod pacijenata s predispozicijom za krvarenje ili koji su na antikoagulantnoj terapiji.

Žene reproduktivne dobi moraju biti na kontraceptivnoj terapiji dok su na terapiji ramucirumabom i do 3 mjeseca nakon posljednje doze lijeka. Iako nema podataka o reproduktivnoj toksičnosti, smatra se da bi ramucirumab mogao imati štetne utjecaje na trudnoću kao i na plod. Dojenje treba prekinuti za vrijeme liječenja i treba izbjegavati dojenje do 3 mjeseca nakon posljednje doze lijeka (www.ema.europa.eu).

4.4.3. Aflibercept

Registriran kao Zaltrap®, aflibercept je fuzijski protein dobiven rekombinantnom DNA tehnologijom u ekspresijskom sustavu stanica sisavaca K-1 iz jajnika kineskoga hrčka. Lijek se koristi u liječenju mCRC-a u kombinaciji s terapijskim protokolom FOLFIRI (sadrži irinotekan, folnu kiselinu i 5-fluorouracil) kod osoba čija je bolest rezistentna na terapiju ili je uznapredovala nakon liječenja oksaliplatinom. Kao fuzijski protein, sastoji se od humane ekstracelularne domene VEGF receptora (1 i 2) i Fc regije ljudske IgG1 molekule. Lijek služi kao receptor za VEGF-A, VEGF-B i placentarni faktor rasta (engl. PlGF – *placental growth factor*) te se puno jače veže za VEGF-A nego bevacizumab. Posljedično, vezanje za VEGF ligande sprječava njihovu interakciju s VEGFR-om i aktivaciju receptora što uzrokuje daljnju inhibiciju signalne kaskade. Inhibirana je proliferacija endotelnih stanica i nastajanje novih krvnih žila (Katzung i sur., 2017).



Slika 7. Slikoviti prikaz djelovanja kemoterapeutskog tretmana Zaltrap®/FOLFIRI
(prilagođeno prema www.zaltrap.com)

Aflibercept dolazi u obliku sterilnoga, bistrog i bezbojnog koncentrata za otopinu za infuziju. Bočica koncentrata od 4 ml sadrži 100 mg ziv-aflibercepta. Prije svakoga ciklusa liječenja treba se napraviti kompletna krvna slika. Liječenje Zaltrap®-om ne smije se započeti dok nisu ispunjeni određeni uvjeti (Tablica 4.) (www.ema.europa.eu).

Tablica 4. Kriteriji krve slike koji trebaju biti ispunjeni prije svakoga ciklusa Zaltrap® i FOLFIRI
(prilagođeno prema www.ema.europa.eu)

	Vrijednosti
Neutrofili	$\geq 1,5 \times 10^9 / l$
Trombociti	$\geq 75 \times 10^9 / l$
Proteini u mokraći	$< 2 \text{ g} / l$ u 24h

Preporučena doza lijeka iznosi 4 mg/kg tjelesne mase primijenjena u obliku intravenske infuzije kroz 1 sat nakon čega slijedi terapija protokolom FOLFIRI. Nakon jednog ciklusa liječenja, sljedeći se ponavlja nakon 2 tjedna te traje sve do progresije bolesti ili do pojave neprihvatljive toksičnosti pacijenta na terapiju. Lijek se čuva u hladnjaku, zaštićen od svjetlosti. Razrijeđeni lijek ne smije sadržavati čestice niti promijeniti boju, a pripremi se uz 0,9 %-tnu otopinu natrijeva klorida ili 5 %-tnu otopinu glukoze za infuziju. Razrijeđeni lijek treba se odmah iskoristiti. Ukoliko se lijek odmah ne iskoristi, smije se čuvati do maksimalno 24 sata na temperaturi od 2-8 °C. Konačna koncentracija infuzije mora biti u rasponu od 0,6 mg/ml do 8 mg/ml aflibercepta. Volumen distribucije slobodnoga lijeka iznosi približno 8 litara. Aflibercept vezanjem za endogeni VEGF stvara stabilan i neaktivan kompleks koji se eliminira proteolitičkim katabolizmom

(razgradnja u manje peptide i aminokiseline). Slobodni aflibercept ima nelinearni (brži) klirens kod doza manjim od 2 mg/kg, dok je linearni klirens uočen kod doza od 2-9 mg/kg zbog nezasićenih bioloških načina eliminacije (proteinski katabolizam) (www.ema.europa.eu).

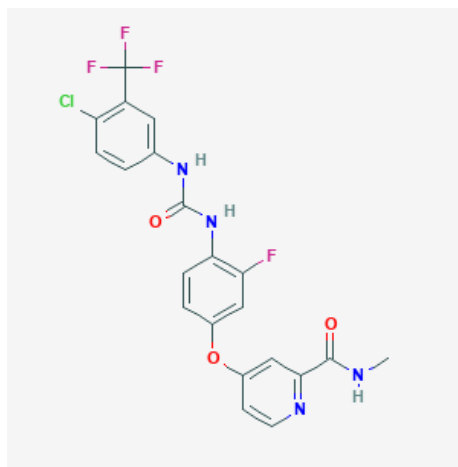
Nuspojave koje se češće mogu pojaviti jesu neutropenija, trombocitopenija, proteinurija, reakcije preosjetljivosti, hipertenzija, proljev i dehidracija. Ukoliko se one pojave treba odgoditi liječenje ili prilagoditi dozu lijeka te u sljedećim ciklusima smanjiti dozu na 2 mg/kg Zaltrap®-a. Pacijenti s kongestivnim zatajenjem srca (NYHA stupanj III ili IV) ne smiju se liječiti afliberceptom. Liječenje lijekom Zaltrap® treba prekinuti minimalno 4 tjedna prije kirurškoga zahvata kako bi se izbjegla mogućnost krvarenja ili otežanoga zacjeljivanja rane. Zbog hiperosmolalnosti (1000 mOsmol/kg) koncentrata lijeka, nerazrijeđeni oblik se ne smije primijeniti bolusnom intravenskom injekcijom niti u obliku intravitrealne injekcije. Nema podataka o primjeni lijeka kod trudnica i dojilja, dok su istraživanja na životinjama pokazala reproduktivnu toksičnost (www.zaltrap.com).

4.4.4. Regorafenib

Regorafenib je indiciran kao monoterapija kod liječenja mCRC-a koji su već prethodno liječeni ili nisu odgovarajući kandidati za dostupnu terapiju. Registriran je kao Stivarga®, djeluje na način da inhibira više protein kinaza koje sudjeluju u tumorskoj angiogenezi (VEGFR2 i 3), metastazama (PDGFR), onkogenezi (KIT, RAF-1, BRAF, BRAFV600E) i tumorskom imunitetu (CSF1R). Ne inhibira kinaze iz EGFR obitelji. Regorafenib jako inhibira mutirani KIT onkogen koji je pokretač gastrointestinalnih tumora te na taj način zaustavlja daljnju proliferaciju tumora (Dhillon, 2018.).

Dolazi u obliku filmom obložene tablete ovalnoga oblika koja sadrži 40 mg regorafeniba. Jedan ciklus liječenja čini 160 mg jednom na dan tijekom 3 tjedna, a zatim tjedan dana bez terapije. Lijek se mora uzimati svaki dan u isto doba dana. Liječenje traje sve dok je korist vidljiva ili dok ne dođe do pojave neprihvatljive toksičnosti. Prije početka liječenja potrebno je napraviti testove jetrene funkcije i pratiti pacijente tijekom prvih 2 mjeseca liječenja. Doza se može prilagoditi ovisno o podnošljivosti lijeka s time da najniža preporučena doza iznosi 80 mg. 3-4 sata nakon primjene lijeka postiže se vršna koncentracija od približno 2,5 mg/l. Koncentracije regorafeniba i njegova dva glavna metabolita M-2 (*N*-oksid) i M-5 (*N*-oksid i *N*-desmetil) bile su najviše kada se regorafenib uzimao nakon doručka s niskim udjelom masti. Zbog enterohepatičke cirkulacije

pojavljuje se veći broj vršnih koncentracija tijekom jednoga dana. Regorafenib se metabolizira u svoje metabolite u jetri pomoću CYP3A4 enzima oksidacijskim metabolizmom i glukuronidira se pomoću UGT1A9. Istovremena primjena inhibitora CYP3A4 i regorafeniba može povećati koncentraciju regorafeniba u serumu za približno 33 %, dok istovremena primjena jakih induktora CYP3A4 može smanjiti bioraspoloživost lijeka za približno 50 %. M-5 se dalje metabolizira u M-4 pomoću mikrobiološke flore što mu omogućuje ponovnu reapsorpciju. Nakon oralne primjene, srednja vrijednost vremena polueliminacije M-2 metabolita iznosi 20 do 30 sati, dok je M-5 metabolita oko 60 sati. Regorafenib može povećati rizik od krvarenja stoga ljudi koji su na antikoagulantnoj terapiji moraju biti oprezniji pri korištenju lijeka. U slučaju sindroma palmarno-plantarne eritrodisteze (engl. *hand-foot syndrome*) i opažene povišene razine jetrenih enzima (ALT, AST) doza lijeka mora se prilagoditi i potrebne mjere poduzeti. Lijek se većinski eliminira putem jetre, ali nije potrebna prilagodba doze kod bolesnika s blagim oštećenjem jetre (Child-Pugh A). Regorafenib je inhibitor UGT1A1, te se zbog toga može razviti blaga nekonjugirana hiperbilirubinemija. Stivarga® može povećati incidenciju infarkta miokarda, ishemije i arterijske hipertenzije. Primjena regorafeniba može uzrokovati oštećenje fetusa, stoga žene reproduktivne dobi moraju koristiti kontracepciju i do 8 tjedana nakon završetka terapije (www.ema.europa.eu).



Slika 8. Kemijska struktura regorafeniba

(preuzeto sa www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

4.5. Imunoterapija – inhibitori imunosnoga odgovora

4.5.1. Pembrolizumab

Pembrolizumab je selektivno humanizirano monoklonsko protutijelo (IgG4/ κ izotip) s visokim afinitetom za receptor programirane stanične smrti-1 (PD-1) koji je eksprimiran na citotoksičnim T limfocitima. Vezanjem PD-1 receptora i pripadajućega liganda (L1 i L2) aktivira se njegova inhibitorna funkcija. Lijek se proizvodi rekombinantnom DNA tehnologijom u stanicama jajnika kineskoga hrčka. Pembrolizumab djeluje na način da blokira interakciju PD-1 receptora i njegovoga liganda. Tako citotoksična aktivnost T limfocita ostaje očuvana i privlači ostale stanice imunološkoga sustava na mjesto tumora. Lijek je registriran pod nazivom Keytruda[®], a koristi se kao monoterapija kod mCRC-a s visokom mikrosatelitskom nestabilnošću (engl. *microsatellite instability-high*, MSI-H) ili kod mCRC-a s nedostatkom mehanizma popravka pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair deficient*, dMMR) (Coupez i sur., 2020).

Da bi pacijenti bili tretirani pembrolizumabom moraju se testirati na MSI-H/dMMR tumorski status. Lijek dolazi u obliku 50 mg liofiliziranoga praška za koncentrat za otopinu za infuziju, a nakon rekonstitucije 1 ml koncentrata sadrži 25 mg pembrolizumaba. Lijek se primjenjuje intravenskom infuzijom u trajanju 30 min, a preporučena doza lijeka u monoterapiji iznosi 200 mg svakih 3 tjedna ili 400 mg svakih 6 tjedana. Ne smije se primijeniti intravenski brzom ili bolusnom injekcijom. Rekonstituirani se lijek pripremi na način da se bočici liofiliziranog praška doda 2,3 ml vode za injekcije. Tako se dobije otopina lijeka koncentracije 25 mg/ml. Iz bočice se izvuče željeni volumen lijeka (do maksimalno 2 ml (50 mg)) te se prenese u infuzijsku vrećicu s otopinom natrijeva klorida 9 mg/ml ili otopinom glukoze (5%). Konačna koncentracija razrijeđene otopine je od 1 do 10 mg/ml. Tako pripremljenu otopinu je potrebno odmah primijeniti iz ugrađeni ili pričvršni sterilni filter veličine 0,2 -5 μ m. U slučaju da se ne primijeni odmah, otopina lijeka se smije čuvati do 96 sati na 2 °C do 8 °C i prije primjene otopina se mora ugrijati na sobnu temperaturu (www.ema.europa.eu).

Ukoliko se razviju imunosno izazvane nuspojave (npr. kolitis, pneumonitis, hepatitis, nefritis, kožne reakcije), liječenje Keytruda[®]-om se treba privremeno odgoditi. Liječenje treba trajno prekinuti ukoliko se radi o nuspojavama visokoga stupnja te uvesti u terapiju kortikosteroida. Snižavanje doze kortikosteroida potrebno je raditi postepeno kroz mjesec dana, a ponovno

uvođenje pembrolizumaba treba biti unutar 12 tjedana od posljednje doze lijeka. Takve imunosne reakcije većinski su bile reverzibilne, ali dio njih je znalo završiti smrtnim ishodom. Nije potrebna prilagodba doze kod starijih osoba te osoba s oštećenom funkcijom bubrega i jetre. Kod bolesnika liječenim pembrolizumabom prijavljena je insuficijencija nadbubrežne žlijezde, hipofizitis, pojava šećerne bolesti tip 1 i poremećaji štitnjače. Od kožnih reakcija prijavljeni su slučajevi toksične epidermalne nekrolize (TEN) i Steven-Johnsonova sindroma (SJS). Česte nuspojave koje su se javljale kod bolesnika su pneumonija, umor, dijareja i mučnina. Žene reproduktivne dobi trebaju koristiti odgovarajuću kontracepciju tijekom liječenja i minimalno još 4 mjeseca nakon posljednje doze lijeka. Humani imunoglobulini prolaze kroz placentarnu barijeru pa se zaključuje da bi njeno primjena tijekom trudnoće mogla imati štetan učinak na plod (www.ema.europa.eu).

4.5.2. Nivolumab

Nivolumab je visoko selektivno humano IgG4/ κ monoklonsko protutijelo. Veže se za PD-1 receptor na T i B limfocitima, makrofagima i stanicama ubojicama. Endogeno vezanje PD-1 receptora i njegovih liganada, L1 i L2, rezultira stvaranjem inhibitornoga signala koje smanjuje proliferaciju T stanica, stvaranje citokina i utišava citotoksičnu aktivnost. Nivolumab blokira interakciju PD-L1 i PD-L2 i aktivaciju receptora te se na taj način izbjegne PD-1 posredovana inhibicija imunosnoga odgovora, uključujući i protutumorski odgovor. Nivolumab je registriran kao Opdivo® i koristi se u terapiji MSI-H ili dMMR mCRC-a, koji se nastavlja širiti nakon kemoterapije fluoropirimidinima (kapecitabinom i fluorouracilom), oksaliplatinom i irinotekanom (Jácome i Eng, 2019; Smith i Desai, 2018).

Dolazi u obliku koncentrata za otopinu za infuziju. Primjenjuje se u obliku intravenske infuzije tijekom 30 ili 60 minuta. Stanje dinamičke ravnoteže postiže se kada se lijek primjenjuje u dozi od 3 mg/kg svakih 2 tjedna kroz 12 tjedana. Može se koristiti samostalno i u kombinaciji s ipilimumabom. Farmakokinetičke analize pokazale su da dob, spol, tjelesna težina, visina, oštećenje bubrega i blago oštećenje jetre nemaju klinički značajnoga utjecaja na eliminaciju nivolumaba. Liječenje nivolumabom treba nastaviti sve dok je korist vidljiva ili do trenutka kada pacijent više ne podnosi terapiju. Imunosno uzrokovane nuspojave slične su kao i kod pembrolizumaba (www.ema.europa.eu).

5. ZAKLJUČAK

Istraživanja različitih molekulskih mehanizama pri nastanku CRC-a pridonjela su razumijevanju njihove važnosti u regulaciji različitih patofizioloških funkcija. EGFR i VEGFR su se pokazale kao češće ciljne mete djelovanja monoklonskih protutijela.

Da bi se mogao koristiti određeni lijek, moraju biti ispunjeni određeni genetički uvjeti. Često se u terapiji kombiniraju monoklonska protutijela s tradicionalnim kemoterapeutima, kako bi se postigla što bolja učinkovitost liječenja te da se smanji postotak recidivirajućih slučajeva. Uz brojne pozitivne aspekte novijih lijekova, bitno je naglasiti veliki broj nuspojava koje oni mogu uzrokovati. Neke nuspojave mogu biti izrazito teško podnošljive pacijentu pa je prije upotrebe određenoga lijeka potrebno procijeniti omjer koristi i mogućega rizika.

Potencijalne nove skupine lijekova za mCRC su u fazi pretkliničkih i kliničkih istraživanja kako bi se utvrdila njihova djelotvornost, sigurnosni profil te optimizirala fizikalno-kemijska i farmakološka svojstva. Istraživanja su dovela do razvoja mikrodijagnostike i poboljšanoga sistemskog liječenja, ali unatoč mnogim napretcima, smrtnost je i dalje visoka. Iako se genetička pozadina CRC-a istražuje zadnjih stotinjak godina, znanstvenici se još uvijek susreću s brojnim neodgovorenim pitanjima.

6. LITERATURA

Avastin, 2009., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 13.4.2021.

Basu S, Haase G, Ben-Ze'ev A. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. *F1000Res*, 2016, 5, 1-10.

Biološki i bioslični lijekovi, <http://halmed.hr>, pristupljeno 13.4.2021.

Braftovi, 2018., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 9.5.2021.

Brkić T, Grgić M. Kolorektalni karcinom. *Medicus*, 2006, 15, 89-97.

Bronte G, Cicero G, Cusenza S, Galvano A, Musso E, Rizzo S, Sortino G, Roselli M, Bazan V, Fiorentino E, Russo A. Monoclonal antibodies in gastrointestinal cancers. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2013, 13, 889-900.

Castells A. Hereditary forms of colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol*, 2016, 39, 62-67.

Chu E, Cancer Chemotherapy. U: Basic & Clinical Pharmacology, Katzung BG, urednici, New York McGraw-Hill, 2017, str. 948-976.

Coupez D, Hulo P, Toucheffeu Y, Bossard C, Bennouna J. Pembrolizumab for the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, 20, 219-226.

Crnek-Kunstelj V. Protoonkogeni, onkogeni i geni supresori tumora. U: Medicinska biologija. Crnjek-Kunstelj V, urednica, Zagreb, Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Katedra za Medicinsku biologiju, 2003, str. 380-395.

Cyramza, 2015., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 18.4.2021.

Dhillon S. Regorafenib: A Review in Metastatic Colorectal Cancer. *Drugs*, 2018, 78, 1133-1144.

Erbix, 2009., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 22.3.2021.

Fanali C, Lucchetti D, Farina M, Corbi M, Cufino V, Cittadini A, Sgambato A. Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: Controversies and perspectives. *World J of Gastroenterol*, 2014, 20, 923-942.

Françoso A, Simioni PU. Immunotherapy for the treatment of colorectal tumors: focus on approved and in-clinical-trial monoclonal antibodies. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11, 177-184.

Huijberts SC, van Geel RM, Bernards R, Beijnen JH, Steeghs N. Encorafenib, binimetinib and cetuximab combined therapy for patients with *BRAFV600E* mutant metastatic colorectal cancer. *Future Oncol*, 2020, 16, 161-173.

Hwang K, Yoon JH, Lee JH, Lee S. Recent Advances in Monoclonal Antibody Therapy for Colorectal Cancers. *Biomedicines*, 2021, 9, 1-24.

Jácome AA, Eng C. Role of immune checkpoint inhibitors in the treatment of colorectal cancer: focus on nivolumab. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19, 1247-1263.

Keytruda, 2015., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 8.5.2021.

Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peynami M, Seyed Forootan F, Nasr Esfahani MH, Ghaedi K. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci*, 2019, 9, 1-14.

Krasinskas AM. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Patholog Res Int*, 2011, 1-6.

Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*, 2015, 21, 84-93.

Lecarpentier Y, Claes V, Vallée A, Hébert JL. Interactions between PPAR Gamma and the Canonical Wnt/Beta-Catenin Pathway in Type 2 Diabetes and Colon Cancer. *PPAR Res*, 2017, 1-9.

Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 2014, 1, 400-406.

Nojadeh JN, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J*, 2018, 17, 159-168.

Novellasmunt L, Antas P, Li VS. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309, C511-521.

Opdivo, 2015., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 8.5.2021.

Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, Kaplan JB, Chae YK, Giles FJ. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematology Oncol*, 2017, 10, 1-12.

Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 2010, 138, 2059-2072.

Roviello G, D'Angelo A, Petrioli R, Roviello F, Cianchi F, Nobili S, Mini E, Lavacchi D. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *Transl Onco*, 2020, 13, 1-7

Safaei A, Sobhi S, Rezaei-Tavirani M, Zali MR. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer. *Iran J Cancer Prev*, 2013, 6, 54-63.

Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular Pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive and therapeutic Implications. *Clin Cancer Res*, 2012, 18, 1506-1512.

Smith KM, Desai J. Nivolumab for the treatment of colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18, 611-618.

Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegell WH, Propping P. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch Syndrome. *Dtsch Arztebl Int*, 2013, 110, 32-38.

Stivarga, 2013., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 5.5.2021.

Strukturna formula enkorafeniba, dostupno na [https:// drugbank.com](https://drugbank.com), pristupljeno 9.5.2021.

Strukturna formula regorafeniba, dostupno na <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 8.5.2021.

Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*, 2019, 164, 1-11.

Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clin Ther*, 2010, 32, 437-453.

Vectibix, 2007., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 22.3.2021.

Vrdoljak E, Pleština S, Omrčen T, Juretić A, Belac Lovasić I, Krznarić Ž, Flam J, Šobat H, Šeparović R, Bolanča A, Vojnović Ž, Boban M, Perko Z, Patrlj L, Zelić M, Gašparov S, Tomaš I, Cambj Sapunar L, Miletić D, Štimac D. Smjernice za dijagnosticiranje, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka debelog crijeva. *Liječ Vjesn*, 2018, 140, 241-247.

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler J, Galle PR, Büchler MW. Colorectal Cancer. *Lancet*, 2005, 365, 153-165.

Zaltrap, 2013., <http://ema.europa.eu>, pristupljeno 3.5.2021.

Zaltrap, 2019., <http://zaltrap.com>, pristupljeno 3.5.2021.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Kolorektalni karcinom (CRC) jest zloćudna novotvorina epitelnih stanica sluznice debelog crijeva i rektuma koja se javlja kod osoba starije životne dobi. U malom broju slučajeva zna se pojaviti i u ranijoj životnoj dobi, gdje je često riječ o nasljednom obliku karcinoma. Mnogo rizičnih čimbenika pridonosi razvoju karcinoma. Postoje različiti oblici nasljednoga CRC-a kod kojih je poznata molekularna pozadina bolesti. Liječenje CRC-a ovisi o stupnju napretka bolesti.

Cilj ovoga diplomskog rada bio je opisati novije lijekove koji se koriste u terapiji metastatskog kolorektalnog karcinoma (mCRC) uz standardnu kemoterapiju.

Tijekom nekoliko desetljeća postignut je značajan napredak u razvoju bioloških lijekova. Biološka terapija, odnosno monoklonska protutijela, dobiveni su biotehnološkim postupcima rekombinantne DNA tehnologije. Ti lijekovi djeluju na način da blokiraju receptor ili ligand koji se veže za taj receptor i time inhibiraju daljnju signalizacijsku kaskadu unutar stanice. Cetuksimab i panitumumab koriste se u terapiji kod osoba koje nemaju mutiran *KRAS* gen. Lijekovi koji djeluju na VEGF signalni put zaustavljaju tumorsku angiogenezu. Enkorafenib djeluje na stanice raka koje imaju BRAFV600E mutaciju. Lijekovi koji djeluju na imunosni sustav ciljaju na imunosupresorske molekule PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) i CTLA-4 (ipilimumab) i tako imunosni odgovor posredovan tim molekulama ostaje očuvan. Navedeni lijekovi imaju brojne nuspojave. Najčešće su kožne reakcije, osipi, mučnina te proljev. Nažalost neke nuspojave mogu imati i smrtni ishod.

Potencijalne nove kombinacije lijekova u liječenju mCRC-a su u kliničkim ispitivanjima i trebat će još neko vrijeme kako bi se ustanovila njihova djelotvornost i sigurnost. Također, potrebno je dodatno praćenje već poznatih lijekova na tržištu.

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is malignant neoplasm of the epithelial cell mucosa in colon and/or rectum region. This tumor is more common with elderly people, however, in small number of cases it can present itself in the earlier stages of life, usually as a hereditary form. There are many risk factors that contribute to the development of this type of cancer. When it comes to hereditary CRC, there are several possible molecular pathways that contribute to its development. Treatment of CRC is dependent on the stage of the cancer.

The aim of this thesis was to describe newly available medications that are used to treat the metastatic colorectal carcinoma (mCRC) alongside standard chemotherapy.

In the last few decades, there was a significant improvement in development of biological therapy. Biological therapy, or otherwise known as monoclonal antibodies, is created by using recombinant DNA technology. The mechanism these drugs work is by inhibiting cell receptor or a ligand that attaches to that receptor. By doing so, they block downstream cell-signaling cascade. Cetuximab and panitumumab are used to treat cancer cells with “wild- type” *KRAS* gene. Drugs that target VEGF signaling pathway diminish tumor angiogenesis. Encorafenib targets tumor cells that have BRAFV600E mutation. Drugs that work as immunotherapy target immunosuppressor molecules such as PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) or CTLA-4 (ipilimumab). This way the immunological response remains active. Drugs mentioned above have numerous side effects. The most common side effects include skin reactions, rashes, nausea, and diarrhea. Unfortunately, some of these side effects can be fatal.

Potential new drug combinations in treatment of mCRC are in clinical studies and it will take some time to determine their efficacy and safety.

8. PRILOG

POPIS KRATICA

ALT	alanin-aminotransferaza
APC	adenomatozna polipoza kolona (engl. <i>adenomatous polyposis coli</i>)
AST	aspartat-aminotransferaza
CRC	kolorektalni karcinom (engl. <i>colorectal cancer</i>)
CIMP	epigenetska nestabilnost (engl. <i>CpG island methylator phenotype</i>)
CIN	kromosomska nestabilnost (engl. <i>chromosomal instability pathway</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
FAP	obiteljska adenomatozna polipoza (engl. <i>familial adenomatous polyposis</i>)
GTP	gvanozin-trifosfat (engl. <i>guanosine triphosphate</i>)
HNPCC	hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. <i>hereditary nonpolyposis colon cancer</i>)
IBD	upalna bolest crijeva (engl. <i>inflammatory bowel disease</i>)
LOH	gubitak heterozigotnosti (engl. <i>loss of heterozygosity</i>)
MMR	geni za popravak DNA (engl. <i>mismatch repair</i>)
MSI	mikrosatelitna nestabilnost (engl. <i>microsatellite instability pathway</i>)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
TGF- β	transformirajući faktor rasta beta (engl. <i>transforming growth factor -β</i>)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

BIOLOŠKA TERAPIJA KOLOREKTALNOGA KARCINOMA

Marija Bartulović

SAŽETAK

Kolorektalni karcinom (CRC) jest zloćudna novotvorina epitelnih stanica sluznice debeloga crijeva i rektuma koja se javlja kod osoba starije životne dobi. U malom broju slučajeva zna se pojaviti i u ranijoj životnoj dobi, gdje je često riječ o nasljednom obliku karcinoma. Mnogo rizičnih čimbenika pridonosi razvoju karcinoma. Postoje različiti oblici nasljednoga CRC-a kod kojih je poznata molekularna pozadina bolesti. Liječenje CRC-a ovisi o stupnju napretka bolesti. Cilj ovoga diplomskog rada bio je opisati novije lijekove koji se koriste u terapiji metastatskog kolorektalnog karcinoma (mCRC) uz standardnu kemoterapiju.

Tijekom nekoliko desetljeća postignut je značajan napredak u razvoju bioloških lijekova. Biološka terapija, odnosno monoklonska protutijela, dobiveni su biotehnološkim postupcima rekombinantne DNA tehnologije. Ti lijekovi djeluju na način da blokiraju receptor ili ligand koji se veže za taj receptor i time inhibiraju daljnju signalizacijsku kaskadu unutar stanice. Cetuksimab i panitumumab koriste se u terapiji kod osoba koje nemaju mutiran *KRAS* gen. Lijekovi koji djeluju na VEGF signalni put zaustavljaju tumorsku angiogenezu. Enkoraferib djeluje na stanice raka koje imaju BRAFV600E mutaciju. Lijekovi koji djeluju na imunosni sustav ciljaju na imunosupresorske molekule PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) i CTLA-4 (ipilimumab) i tako imunosni odgovor posredovan tim molekulama ostaje očuvan. Navedeni lijekovi imaju brojne nuspojave. Najčešće su kožne reakcije, osipi, mučnina te proljev. Nažalost neke nuspojave mogu imati i smrtni ishod. Potencijalne nove kombinacije lijekova u liječenju mCRC-a su u kliničkim ispitivanjima i trebat će još neko vrijeme kako bi se ustanovila njihova djelotvornost i sigurnost. Također, potrebno je dodatno praćenje već poznatih lijekova na tržištu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 36 stranica, 8 grafičkih prikaza, 4 tablice i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Terapija kolorektalnoga karcinoma, monoklonska protutijela, EGFR-receptor za epidermalni faktor rasta

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lidija Bach Rojceky, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Željka Vanić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BIOLOGICAL THERAPY FOR COLORECTAL CANCER

Marija Bartulović

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is malignant neoplasm of the epithelial cell mucosa in colon and/or rectum region. This tumor is more common with elderly people, however, in small number of cases it can present itself in the earlier stages of life, usually as a hereditary form. There are many risk factors that contribute to the development of this type of cancer. When it comes to hereditary CRC, there are several possible molecular pathways that contribute to its development. Treatment of CRC is dependent on the stage of the cancer.

The aim of this thesis was to describe newly available medications that are used to treat the metastatic colorectal carcinoma (mCRC) alongside standard chemotherapy.

In the last few decades, there was a significant improvement in development of biological therapy. Biological therapy, or otherwise known as monoclonal antibodies, is created by using recombinant DNA technology. The mechanism these drugs work is by inhibiting cell receptor or a ligand that attaches to that receptor. By doing so, they block downstream cell-signaling cascade. Cetuximab and panitumumab are used to treat cancer cells with “wild- type” *KRAS* gene. Drugs that target VEGF signaling pathway diminish tumor angiogenesis. Encorafenib targets tumor cells that have BRAFV600E mutation. Drugs that work as immunotherapy target immunosuppressor molecules such as PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) or CTLA-4 (ipilimumab). This way the immunological response remains active. Drugs mentioned above have numerous side effects. The most common side effects include skin reactions, rashes, nausea, and diarrhea. Unfortunately, some of these side effects can be fatal. Potential new drug combinations in treatment of mCRC are in clinical studies and it will take some time to determine their efficacy and safety.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 36 pages, 8 figures, 4 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Treatment of colorectal cancer, monoclonal antibodies, EGFR-epidermal growth factor receptor

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Željka Vanić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021.