



Moleküler Hedefli Anti-Kanser Ajan Kombinasyonlarını Optimize Etmek İçin Stratejiler

Strategies to Optimize the Molecularly Targeted Anti-Cancer Agent Combinations

Ayşe Erdoğan¹, Aysun Özkan¹

¹Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Turkey

ABSTRACT

Cytotoxic agents which are used in cancer chemotherapy reduced several times the number of neoplastic cells but not fully. Therefore, usage of "targeted therapeutics" which were developed with much more rational approach is increasing markedly in patients with solid cancer. Targeted therapeutics due to 'selective targets' aims cancer cells with specific molecular defect thereby, kills the cancer cells, which makes it possible to continue normal cells in a healthy environment. The rapid emergence of hundreds of new agents that modulates ever-growing list of the cancer-specific molecular targets promise great hope for cancer patients. Evaluation of the target agent individually, in combination with standard therapy and other target agents bring about important development challenges. As possible combinations of drugs number is unlimited, the identification of the most promising combinations and giving priority to assessing their strategies are very important. In this article important elements of the development strategy of the target agent combinations will be considered. Difficulties in this kind of combinations of rational pre-clinical and clinical evaluation and possible approaches to overcome these challenges will be discussed.

Key words: Molecularly targeted anti-cancer agents, cancer therapeutic targets.

ÖZET

Kanser kemoterapisinde kullandığımız sitotoksik ajanlar, neoplastik hücrelerin sayılarını birkaç kat azalmakta, ancak tam olarak yok edememektedir. Bu nedenle solid kanserli hastalarda çok daha rasyonel yaklaşımla geliştirilmiş olan 'hedeflenmiş terapötikler'in kullanımları belirgin bir şekilde



artmaktadır. Hedeflenmiş terapötikler 'seçici hedefleri' nedeniyle 'özümlü-moleküler defektli' olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücrelerini öldürürken normal hücrelerin sağlıklı bir ortamda devamına imkan tanımaktadır. Kansere özgü moleküler hedeflerin sürekli büyüyen listesini modüle eden yüzlerce yeni ajanların hızla ortaya çıkması kanser hastaları için büyük umut vaat etmektedir. Hedef ajanların tek olarak, standart tedaviler ile ve diğer hedef ajanları ile kombinasyonlarının değerlendirilmesi önemli gelişim zorluklarını da beraberinde getirmektedir. Olası ilaç kombinasyonlarının sayısı gerçekte sınırsız olduğundan, en umut verici kombinasyonların belirlenmesine ve bunların değerlendirilmesine öncelik verecek olan stratejiler çok önemlidir. Burada, hedef ajan kombinasyonlarının gelişim stratejilerinin önemli unsurları dikkate alınacaktır. Bu tür kombinasyonların rasyonel pre-klinik ve klinik değerlendirmelerindeki zorluklar ve bu zorlukların üstesinden gelmek için olası yaklaşımlar gözden geçirilecektir.

Anahtar kelimeler: Moleküler hedefli anti-kanser ajanları, kanser tedavi hedefleri.

Giriş

Son yirmi yıl içinde moleküler onkolojideki önemli gelişmeler sonucunda karsinogenez, tümör büyüme ve invazyonu ile metastaz biyolojisinde heyecan verici önemli bilgi kazanımları olmuştur. Kanser hücrelerinin 'ölümsüz, immortal' niteliklerine yönelik temel moleküler biyolojik bilgiler, güncel terapötik yaklaşımlara yeni boyutlar kazandırmıştır. Bu yeni anti-kanser ilaçların grubu ile 'hedeflenmiş kanser tedavisi' kavramı gündeme gelmiştir¹. Bu yeni moleküller, özümlü hücre anormalliklere karşı 'hedeflenerek' kullanılmaya başlanmıştır ve "targeted therapies=smart bombs" olarak yabancı literatürde isimlendirilmiştir¹.

Konvansiyonel kemoterapiler seçici olmadıkları için proliferen olan tümör hücrelerini yok ederken normal hücreleri de ortadan kaldırmaktadırlar. Hedeflenmiş terapötikler ise 'seçici hedefleri' nedeniyle 'özümlü-moleküler defektli' olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücrelerini öldürürken normal hücrelerin sağlıklı bir ortamda devamına imkân tanımaktadır. Bu nedenle hedeflenmiş tedavilerin en önemli avantajı 'terapötik indekslerinin yüksek' olmasıdır. Son sekiz-on yıl içinde pre-klinik ve klinik araştırma sonuçları tamamlanmış yeni ajanlar hızla Amerika Birleşik Devlet'lerinde FDA onayı olarak kliniğe gelmiş bulunmaktadır²⁻⁴.

Kanser kemoterapisinde kullandığımız sitotoksik ajanlar, neoplastik hücrelerin sayılarını birkaç kat azaltmakta, ancak tam olarak yok edememektedir⁵. Bu nedenle solid kanserli hastalarda çok daha rasyonel yaklaşımla geliştirilmiş olan hedeflenmiş terapötiklerin kullanımları belirgin bir şekilde artmaktadır. Son yıllarda, normal ve kanser hücrelerindeki biyokimyasal yolların daha iyi anlaşılması sonucunda kanser hücrelerinde malign süreci

yavaşlatacak veya durduracak 'hedef' moleküler yapılar giderek artan sayılarda tanımlanmaya başlanmıştır (Tablo 2)⁶.

Tablo.1. Hedeflenmiş Tedavi Yaklaşımlarında 'Hedef' Olarak Seçilen ve Tercih Edilen Moleküller⁵

Tirozin kinaz sinyal sistemi (TK)
Tümör hücre yüzey antijenleri
Epitelyal büyüme faktör reseptör sistemi (EGFR)
Vasküler endotel büyüme faktör reseptörü (VEGFR)49
Matriks metalloproteinazlar (MMP)
Cyclin-bağımlı kinazlar (CDK)
Apoptosis sürecinde görev alan regülatuar moleküller
Proteazom-yolundaki moleküller
Ras-onkogeni (ras)
Isı-şok proteinleri (HSP)

Böylesine geniş ve hızlı gelişmeler, bu yeni ajanların etkili bir şekilde değerlendirilmesinde ve klinik uygulamaya entegresinde, temel, pre-klinik ve klinik araştırmacılar için önemli sorunlar oluşturmuştur. İlgilenilen sadece hedef ajanların tek tek ve standart sitotoksik tedaviler ile kombinasyonlarının değerlendirilmesi değildir. Ajanlar kombine bir şekilde uygulandıklarında sinerjistik bir şekilde etki gösterebilir olasılığından ilgilenilen ajanın diğer hedef ajanları ile kombinasyonunun değerlendirilmesidir⁶.

İlaç kombinasyonlarının sayısı gerçekte sınırsız iken, en umut verici kombinasyonların belirlenmesini ve bunların değerlendirmesini sağlayacak olan stratejiler çok önemlidir. Ajanların ve kombinasyonlarının moleküler özellikleri ve etki-direnç mekanizmaları ile ilgili bilgiler, moleküler hedef ajanlarının ve kombinasyonlarının deneysel olarak seçiminde ve değerlendirilmesinde gereklidir⁶.

Bu derlemede hedef ajan kombinasyonlarının rasyonel pre-klinik ve klinik değerlendirilmelerinde oluşan zorluklar ile bu zorlukların üstesinden gelmek için olası yaklaşımlar ve izlenecek yollar ele alınacaktır.

Tablo.2. Klinik Gelişmede Seçilmiş Moleküller Hedeflenmiş Ajanlar⁶

Kanser karakteristiği	Hedef	Klinik gelişimdeki ajanlar
Apoptozis	BCL2	AT101, GX15-070
	XIAP	AEG 35156
Göç ve invazyon	SRC	BMS354825, AZD0530
Protein çevrilmesi	HSP90	17-allylaminogeldanamycin
	Proteozom	Bortezomib
Kromatin düzenlenmesi	HDAC	SAHA, depsipeptide
	DNA metil transferaz	5-aza-cytadine, decitabine
Hücre döngüsü	CDKs	Flavopiridol
Anjiyogenez		
Büyüme faktörleri	VEGF	Bevacizumab, VEGF-Trap
Büyüme faktör reseptörleri	VEGFR	Sorafenib, AZD2171, sunitinib, IMC1121B
	PDGFR	Imatinib, sunitinib
Tümör hücre sinyal iletimi		
Büyüme faktör reseptörleri	EGFR	Erlotinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab
	HER2	Trastuzumab, pertuzumab, lapatinib
	FLT3	CEP 701, PKC 412, sunitinib
Hücre içi yollar	RAS	Farnesyl transferase inhibitor tipifarnib
	RAF	Sorafenib
	MEK	PD0325001, AZD 6474
	PI3K, Akt, mTOR	Temsirolimus, everolimus

BCL2, B-hücreli lenfoma protein; CDK, siklin bağımlı kinaz; EGFR, epidermal büyüme faktörü reseptörü; FLT3: fms-benzeri tirozin kinaz; HDAC, histon deasetilaz; HER2, İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; HSP90, ısı şok proteini 90; MEK, mitojen aktiveli protein kinaz; mTOR, Rapamisin'in memeli hedefi, PDGFR, platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü; PI3K, fosfatidilinositol 3-kinaz; VEGF/VEGFR, vasküler endotelial büyüme faktörü/reseptörü; XIAP: Apoptozun X-bağılantılı inhibitörü.

Anti-Kanser İlaçları Neden Kombine Edilmelidir?

Tümör direncini aşmak için ilaç kombinasyonlarının kullanılması kanser tedavisinde köklü bir ilkedir. Kanser hücre biyolojisinin karmaşıklığındaki artan farkındalığımız, hücresel sinyal

ağlarını bozan ajan kombinasyonlarının belirlenmesini önemli bir hale getirdi. Günümüzde artık bazı ilaçlar kanser-spesifik hedefleri inhibe etmek ve hastaya yarar sağlamak için geliştirilmiştir.

Hedef ajanların tek başına ya da standart tedaviler ile kombinasyonlarının aktivitesi klinik olarak uygun olmasına rağmen, tümör tedavisinde nadir olarak olumludur^{7,8}. Bu ajanlar tarafından sağlanan yararların sınırlı olması çeşitli faktörlerden dolayı şaşırtıcı değildir. Bu faktörler; tümör büyümesi ve metastazından sorumlu moleküler yolları belirleyen tümör biyolojisinin karmaşıklığı, bu karmaşıklığın bireysel hastalar veya aynı hasta içindeki tümör hücreleri altklonları arasında değişebilmesidir.

Hedef ajanların şu anda başarılı ya da başarısız olmaları için üç tane uygulama seçeneği vardır: tek ajan olarak, standart tedavilerle kombinasyon, diğer hedef ajanlarla kombinasyon. Klinik çalışmalardan biriken deneyim çok değerli olsa da yavaş ve pahalıdır.

Kombinasyonlar için Sorunlar ve Stratejiler

Ajan kombinasyonlarını etkin bir şekilde değerlendirmek için, öncelikleri belirlemek, devam edip/edilmeyeceğine karar vermek, deneysel modellerin ve erken klinik çalışma planlarının belirlenmesi gerekmektedir. Ancak, spesifik kombinasyonlar klinik gelişmeler için dikkate alındığında iki çok önemli bilimsel sorun ortaya çıkmaktadır⁶. Birinci olarak, çalışma planlanmadan önce başarı şansını arttırmak için hangi pre-klinik ve klinik veriler gereklidir? İkinci olarak, hastaların hangi popülasyonu/popülasyonları çalışılmalıdır? Üçüncü ve bilimsel olmayan soru ise, birçok ajanın farklı şirketler tarafından geliştirilmesi gibi sorunlarla nasıl uğraşılacaktır. İki temel bilimsel soruyu yeterince cevaplayabilmek ve hedefleri, ajanları ve kombinasyonları değerlendirebilmek için önerilen hasta popülasyonu hakkında ne bilindiği mutlaka dikkate alınmalıdır. Hedef ajan kombinasyonlarını değerlendirirken, hedef ajanların standart tedaviler ile olan denemelerinden elde edilen sonuçları da gözden geçirmek mantıklıdır.

I. Standart Tedaviler ile Hedef Ajanların Kombinasyon Denemeleri

Standart kemoterapi uygulamalarına hedef ajanların ilave edilmesini değerlendiren hem başarılı hem de başarısız çok sayıda örnek vardır (Tablo 3).

Tablo.3. Standart Kanser Tedavileri ile Kombine Edilen Hedef Ajanlarının Faz III Denemeleri

Ajan	Kanser	Kemoterapi		Sonuç
		Eş zamanlı uygulama	Kombinasyon için pre-klinik destek	
Gefitinib	Akciğer iki deneme	Evet (paclitaxel ve carboplatin, gemcitabine ve cisplatin)	Evet	Başarısız (Cevap oranı ve toplam sağ kalımda fark yok) ^{9,10}
Erlotinib	Akciğer iki deneme	Evet (carboplatin ve paclitaxel)	Evet	Başarısız (Cevap oranı ve toplam sağ kalımda fark yok) ¹¹
	Pankreas	Evet (gemcitabine)	Evet	Artmış sağ kalım ¹²
Transtuzumab	Meme/HER2+	Evet (doxorubicin, epirubicin ve cyclophosphamide)	Evet	Artmış sağ kalım ⁸
Bevacizumab	Kolon (iki deneme)	Evet (irinotecan, fluorouracil ve leucovorin)	Evet	Artmış sağ kalım ¹³
	Meme: ilk hat	Evet (paclitaxel)	Evet	Artmış sağ kalım ¹⁴
	Meme: ikinci/üçüncü hat	Evet (capecitabine)	Evet	Başarısız (Artmış cevap oranı fakat progresyonsuz sağ kalımda fark yok) ¹⁵
	Akciğer	Evet (paclitaxel ve carboplatin)	Evet	Artmış sağ kalım ¹⁶
Oblimersen	Melanom	Evet (dacarbazine)	Evet	Toplam sağ kalımda başarısız ¹⁷
Cetuximab	Baş-Boyun	Evet (cisplatin)	Evet	Başarısız (Artmış cevap oranı fakat progresyonsuz sağ kalımda istatistiksel olarak önemli bir fark yok) ¹⁸
	Baş-Boyun	Radyasyon	Evet	Artmış sağ kalım ¹⁹

Hedef ajanların, standart sitotoksik tedaviler ile kombinasyonlarının başarısızlığından sorumlu olası nedenler üç faktörün herhangi biri ile ilgili olabilir. Birinci olarak, tek veya

kombinasyondaki ajanların etkilerinin doğası. İkinci olarak, hedefin varlığı/hedefin işlevselliği. Üçüncü olarak da, hedefin biyolojik içeriği ya da diğer hücrel faktörler. Bu faktörler, hedefleri üzerinde ajanların etkisini ya da klinik denemeler için seçilen hasta popülasyonunda biyolojik sonuçları değiştirebilirler. Ajan, hedef ile etkili bir şekilde etkileşimde bulunduğu başarıyla sonuçlanan zayıf farmakolojik özelliklere sahip olabilir. Ajanlar birlikte uygulandığı zaman aralarında antagonizm olabilir. Örneğin, eğer birinci ajan tümör hücrelerinin G1'de tutulmasını uyarırken, ilave edilen ajan sadece hücre döngüsünün S ya da M fazlarında aktif ise ikincisi oluşabilir. Bu gibi istenmeyen bir etkileşim, meme kanserinde tamoksifen ve metotresat kombinasyonunun klinik olmayan çalışmasında rapor edilmiştir²⁰⁻²². Bazı kombinasyon çalışmalarında ajanlarının eş zamanlı değil de art arda uygulamaları değerlendirildiğinde, klinik çalışmalar için bu uygulama planının daha üstün olduğu bulunmuştur^{20, 21,22}. Ayrıca başarısızlık, planlanan hedefin olmamasından, biyolojik olarak önemsiz olmasından, kanser hücrelerinde çok önemli fonksiyonları devam ettirmek için normalden fazla alternatif sinyalizasyon yolunun bulunmasından kaynaklanabilir. Bu faktörlerden başka, bir hastadaki tedaviye cevap vermeyen tümör altklonlarının hızlı bir şekilde ortaya çıkması, mikro-çevre heterojenliğinin bulunması önemli klinik fayda sağlanmasını engelleyebilir. Ayrıca, ilaç metabolizmasındaki ya da ilaç taşınmasındaki değişiklikler de bir ilacın etkisini azaltabilir. Tümör hücrelerinin ajanlara karşı sahip oldukları direnç mekanizmalarına ek olarak, ajanlara karşı olan duyarlılıklarını da kombine uygulamalar örtüyor olabilir. Öyle ki, ajanlar birlikte uygulandığında kazanılan net bir klinik kazanç olmadığı durumlar mevcuttur⁶. Ne yazık ki, spesifik deneme düzenlemelerinde belirli hedef ajanlarının başarısı veya başarısızlığı için gerçek nedenlerin anlaşılması eksik kalmaktadır.

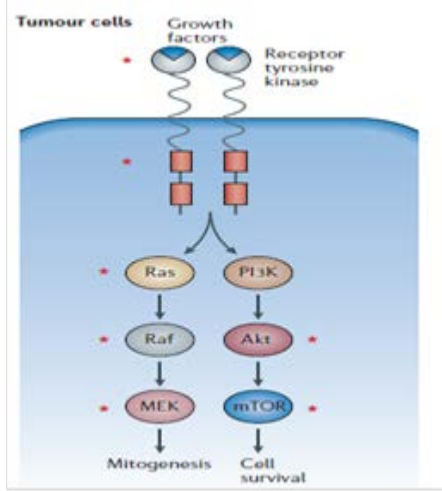
II. Hedef Ajan Kombinasyonların da Dikkate Alınması Gereken Değişkenler

Bu değişkenler şunları içerir: ajanların etki ve direnç mekanizmaları ile aralarındaki etkileşim mekanizmaları, bir kombinasyon için katkının veya sinerjinin pre-klinik gösterilmesi, aktivite gösteren pre-klinik modelleri yansıtan klinik uygulamaları ispat etmek için olan stratejilerdir. İdeal bir kombinasyon için ajanları tek tek seçerken, ajanın kabul edilebilir farmakoloji ve güvenliğe sahip olmasına, ajanın hedef düzenlemesinin gösterilmiş olmasına, ajanın duyarlılığının ya da direncinin seçilen bir hasta popülasyonunda gösterilmiş olmasına dikkat edilmesi gerekir. Bu kriterler listesi 'ideal' durumu göstermektedir. Bu faktörlerin bir ya da daha fazlasının yokluğu kombinasyon gelişimini engellemediği unutulmamalıdır.

Bir kombinasyon için pre-klinik sonuçlardan klinik denemelere geçiş, ajanların uygun konsantrasyonlarının elde edilebilmesini, uygulama programının mümkün olmasını, aktivite gösteren kombinasyonların test edildiği pre-klinik modellerin moleküler içeriğini yansıtan uygun hasta popülasyonunu gerektirebilir⁶.

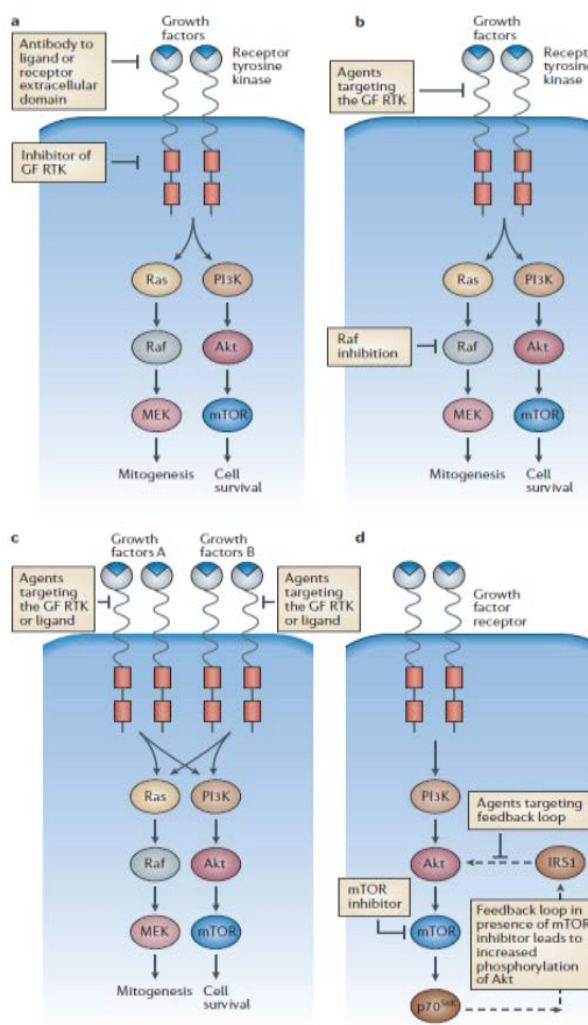
III. Hangi Hedefler ve Hedef Ajanları

Kombinasyon için hedefin veya hedef ajanın seçimi, belirlenmiş bir tümörün patogenezi ve büyümesinin hedeflenmesi ile ilgili bilgiler temelinde yapılabilir (Şekil 1).



Şekil.1. Kombinasyon Tedavileri İçin Hedeflerin ve Ajanların Tanımlanması İçin Basitleştirilmiş Stratejiler⁶

Kombinasyonda ikinci ajan hedefi, ilk ajanın aktivitesini arttırmak amacı ile bir dizi strateji ile seçilebilir; ilk hedefi daha etkili inhibe etmek için, ek hedef (ler) ve/veya yolları inhibe etmek için, tek bir ajana dirençli olmaya neden olan hücrel süreçlerin üstesinden gelmek için (Şekil 2).



Şekil.2. Ajanları Kombine Etmek için Olan Stratejiler⁶

- a) Bu, hem reseptör-ligand bağlanmasını hem de tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederek büyüme faktörü reseptörü gibi bir hedefin inhibisyonunu maksimuma çıkarmak. b) Yol içinde bulunan sinyal bileşenlerinin bir dizisini inhibe ederek bir yolun inhibisyonu maksimuma çıkarmak. c) Paralel yollardaki iki büyüme faktörü reseptörlerini ya da aşağı yöndeki bileşenleri inhibe ederek paralel yolların inhibe edilmesi. d) Bir hedef ve direnç ile sonuçlanan feedback döngüsünün inhibe edilmesi. GF, Büyüme faktörü; IRS1, insülin reseptör substrat 1; MEK, mitojen aktiveli protein kinaz; mTOR, Rapamisin'in memeli hedefi; *PI3K*, fosfatidilinositol 3-kinaz; RTK, reseptör tirozin kinaz.

Kombine edilmiş moleküler hedeflemeler, Önemli hücrel fonksiyonları devam ettiren ikincil bir yolu engelleyebilir (dolayısıyla *de nova* ya da kazanılmış direnç mekanizmasının üstesinden gelinebilir), genel olarak antitümör etkiyi arttıran birinci ajandan etkilenmeyen anjiyogenez gibi bir süreci inhibe edebilir.

IV. Tek İlaç Birçok Hedef ile ya da Birçok İlaç Özgün Tek Hedef ile

Hedef ajan kombinasyonlarını oluşturmaya makul bir alternatif, birçok hedefi olan bir ajani geliştirmektir. Çok hedefli ajanların geliştirilmesi ve değerlendirilmesinin avantajları ve dezavantajları vardır (Tablo 4).

Tablo.4. Kombinasyonda Birçok Ajana Karşı Tek Ajan⁶

Çok Hedefli Tek Ajan
Avantajlar
Moleküler heterojenitenin üstesinden gelebilir
Başarı şansı daha iyi (özellikle tümör belirteçleri ve seçim kriterleri belirsiz ise)
Kolaylık
Dezavantajları
Etki mekanizmalarını tanımlamak zor
Bir hedef geçerli değil
Birkaç ilgili hedefe karşı optimum potansiyele sahip bir ilaç oluşturmak zor
Belirli bir tümör ile ilgili olabilen ya da olmayan ek hedeflerle ilişkili toksisiteye sahip olabilir
Sınırlı Hedefe Sahip Ajanların Kombinasyonu
Avantajlar
Özel kombinasyon planları için esnek, daha uygun
Tek ajanların uygun konsantrasyonlarına maruz kalma
Bireysel hedefler 'onaylanmış' olabilir
Gereksiz toksisiteden kaçınılabilir
Dezavantajları
Birden çok ilaç/çoklu doz
Ajanlar tek olarak ve kombinasyonda değerlendirilmesi/doğrulaması gerekebilir

Çok hedefli ajanlar, kanser hastaları içindeki veya arasındaki moleküler heterojenliğin önüne geçebilmede ve böylelikle klinik de başarılı olmak için iyi bir şans olabilir. Bir kombinasyonun aktivitesinin ve güvenliğinin gösterilmesi tek ajan için olandan daha külfetli olduğundan tek bir ajani çoklu hedefler ile geliştirmek daha kolay olabilir⁶. Bu gibi ajanlar, hedeflerin belirli bir

sırası ile etkileşim için tasarlandıkları gibi belirli hastalıklarla ilişkili spesifik hedeflerin optimum inhibisyonunu sağlamayabilirler. Örneğin, ilgilenilen belirli kinazlara karşı aktiviteyi taranarak çok hedefli kinaz inhibitörleri belirlenmiştir, ancak daha sonra bu kinaz inhibitörlerinin iyi bir şekilde inhibisyon sağlamadıkları görülmüştür⁶. Bu gibi çok hedefli ajanların etkisi herhangi ya da önerilen bütün hedefler ile olan etkileşiminden dolayı olabileceği gibi hedef dışı etkileşimlerinden de kaynaklanıyor olabilir. Bu durum, hücrel fonksiyonlar üzerinde daha geniş ve belki de daha az tahmin edilebilir etkiye sahip olabileceğinden çok hedefli kinaz inhibitörlerinin kombinasyonları artmış toksisiteye neden olabilir. Tümörlerin moleküler profiline dayandırılarak yapılan daha özel hedef ajan kombinasyonları bireysel hastalar için daha uygun olabilir.

Hedef Ajan Kombinasyonlarının Klinik Çalışmaları

Bugüne kadar önerilen hedef ajanların kombinasyon stratejileri çeşitli kategorilere ayrılabilir; bir spesifik hedefin inhibisyonunu maksimuma çıkarmak için olan kombinasyonlar (örneğin, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi aynı hedefe bir antikor ve küçük molekül kinaz inhibitörü), birçok bileşeni hedefleyerek (örneğin, EGFR, RAS ve RAF inhibitörleri) bir yolun inhibisyonunu maksimuma çıkarmak için olan kombinasyonlar, birçok hücrel mekanizmanın (örneğin, EGFR ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) inhibisyonu) inhibisyonunu arttırmak için olan kombinasyonlar (Tablo 5).

Bu stratejileri değerlendiren, klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar bildirilmiştir. Sonuçlar kombinasyon fikirlerinin daha da geliştirilmesi için yeni anlayışlar sağlayabilir. Tek hedefi inhibe eden ajanların kombine edilmeleri hedef inhibisyonunu ve dolayısıyla bu inhibisyonla ilgili olarak toksisiteyi arttırabilir. Örneğin, VEGF nötrleştirici monoklonal antikor bevacizumab ve VEGFR inhibitörü sorafenib'in (Nexavar; Bayer/Onyx) kombine edilmeleri, her bir ajanın kısmen düşük dozlarda VEGF inhibisyonu ile ilişkili olan hipertansiyon ve proteinüri toksisitesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir³¹. Alternatif olarak da, üst üste gelen toksisiteye sahip olmayan ajanların tam dozlarda kombine edilmeleri mümkün gibi görünmektedir (örneğin, EGFR ve VEGFR hedefleyen ajanlar)²⁸. Klinik çalışmalar karışık sonuçlar vermiştir. Örneğin, metastatik meme kanserli hastalarda EGFR inhibitörü gefitinib ile trastuzumab'ın kombinasyonunu değerlendiren bir Faz II klinik araştırmasının raporunda ajanlar arasında olumlu bir etkileşim belirlenmedi³². Renal hücre kanserinde bevacizumab ile

küçük molekül EGFR kinaz inhibitörü erlotinib'in kombinasyonu umut verici sonuçlar vermiştir^{29,30}.

Tablo.5. Yeni Hedef Ajanların Kombinasyonları için Klinik Denemeler

Strateji ve hedefler	Klinik denemeler	Kanser
Bir hedefin inhibisyonunu en üst düzeye çıkarmak		
EGFR Ab + EGFR TKI	Cetuximab + Erlotinib	Kolon, akciğer
	Cetuximab + Gefitinib ²³	Kolon, akciğer
VEGF + VEGFR	Bevacizumab + Sorafenib	Böbrek
Yolun inhibisyonu en üst düzeye çıkarmak		
EGFR + mTOR	Erlotinib + Temsirolimus	Akciğer, gliom
	Gefitinib + Everolimus ²⁴	Akciğer, gliom
	Gefitinib + Sirolimus ²⁵	Akciğer, gliom
EGFR + FTI	Erlotinib + Tipifarnib	Faz I
HER2 + mTOR	Trastuzumab + Everolimus	Meme
HER2 + CDK	Trastuzumab + Flavopiridol	Meme
Paralel yolların inhibisyonu		
HER2 + EGFR	Trastuzumab + Gefitinib ²⁶	Meme
	Trastuzumab + Erlotinib ²⁷	Meme
VEGF + PDGFR/c-KIT	Bevacizumab + Imatinib	Melanom ve böbrek
Çoklu tümör süreçlerinin inhibe edilmesi		
VEGF + EGFR	Bevacizumab + Cetuximab ²⁸	Kolon, pankreas, akciğer, baş ve boyun
	Bevacizumab + Erlotinib ^{29,30}	Meme, baş ve boyun, böbrek, akciğer, pankreas, yumurtalık, karaciğer
VEGF + mTOR	Bevacizumab + Temsirolimus	Böbrek, melanom
EGFR + VEGF/raf	Cetuximab + Sorafenib	Kolon
HER2 + VEGF	Trastuzumab + Bevacizumab	Meme
HDAC + VEGF	SAHA + Bevacizumab	Böbrek
HDAC + CDK	SAHA + Flavopiridol	Faz I
Proteasome + HSP90	Bortezomib + 17AAG	Faz I

17AAG, 17-allylamino 17-demethoxy geldanamycin; Ab, antikor; CDK, sikline bağımlı kinaz; EGFR, epidermal büyüme faktörü reseptörü; FTI, farnesil transferaz inhibitörü; HSP90, ısı şok proteini 90; mTOR, *Rapamisin*in memeli hedefi; PDGFR, *platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü*; HDAC, histon deasetilaz; HER2, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; TKI, *tirozin kinaz inhibitörü*; VEGF/VEGFR, *vasküler endotelial büyüme faktörü/reseptörü*. <http://www.ClinicalTrials.gov>.

Böbrek kanserinin Faz II çalışmasının ön analizinde bevacizumab'ın tek başına uygulaması bevacizumab ve erlotinib kombine uygulaması ile karşılaştırıldığında hedeflenen cevap oranında ya da progresyonsuz sağkalım da bir ilerleme bulunamamıştır³³. Buna karşılık, kolorektal kanserde bevacizumab ve EGFR-hedefleyen antikor cetuximab'ın kombinasyonunun ön verileri umut verirken²⁸, kolorektal kanserde bu iki ajanın kombinasyonunun yararı devam eden Faz III çalışmalarıyla doğrulanması gerekmektedir. Bugüne kadar değerlendirilmiş klinik kombinasyon çalışmalarının başarısı ya da başarısızlığı yayınlanmış pre-klinik veriler temelinde açıkça öngörülebilir olmadığı net bir şekilde görünmektedir.

Pre-klinik ve klinik sonuçlar arasındaki uyum eksikliği birçok nedenden dolayı şaşırtıcı değildir. İlk olarak, kombinasyonların pre-klinik araştırmaları, hastalar arasında hastalığın evresine göre tanımlanan, tümörlerin moleküler heterojenitesini yansıtmayan sınırlı hücre hattı modelleri kullanılarak yürütülmesidir. İkinci olarak, pre-klinik ve klinik olarak ajanların uygun konsantrasyonunu ve uygulama sırasını belirlemek için sınırlı girişimler olmuştur. Son olarak da, duyarlılık veya direnç faktörlerini araştırmak ve ardından bu biyobelirteçleri kullanarak seçilmiş hastaları çalışmaların içine dahil etmek için sınırlı girişimler olmuştur. Örneğin, gefitinib ve trastuzumab kombinasyonunun klinik değerlendirmesi, meme kanseri hücre hatları SK-Br-3 ve BT-474'de kombinasyonun sinerji gösterdiğini bildiren pre-klinik çalışmalar ile desteklenmiştir³⁴. Meme kanseri hastalarında gefitinib'in aktivitesi minimal olmasına rağmen trastuzumab'ın katkı/sinerji gösterdiği pre-klinik çalışmalara dayanılarak, HER2/neu'yi aşırı eksprese eden meme kanseri hastalarında kombinasyon klinik olarak değerlendirilmiştir³⁵. SK-Br-3 ve BT-474 hücre hatlarında kombinasyonun in vitro test sonuçları, klinik sonuçları öngörmede başarısız olduğu açıktır. Laboratuvar ve klinik çalışmalar arasındaki korelasyon eksikliğinin gerçek nedenleri belirsizdir. Hücre hatlarındaki etki mekanizması(ları) ile insan kanserleri karşılaştırıldığında aralarındaki gerçek farklar bilinmemektedir.

Kombinasyonların Klinik Olmayan Değerlendirmeleri

In vitro hücre hatları ve in vivo insan tümör modellerini kapsayan klinik olmayan kombinasyon çalışmaları, ajanlar arasındaki etki ve etkileşim mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağladıkları için, sinerjinin hızlı değerlendirilmesi ile mekanik etkileşimlerin incelenmesine olanak sağladıkları için kanser tedavisinin gelişiminde önemli rolleri vardır. Antitümör

aktivitenin ve etki mekanizmasının değerlendirilmesinin yanı sıra in vivo çalışmalar, konak üzerinde ajanın etkisini, stromal elemanlar ile etkileşimlerini, farmakokinetiği gibi ek faktörlerin değerlendirilmesine de izin verir.

I. Klinik Olmayan Çalışmaların Uygulanabilirliğini Sınırlayan Faktörler

Kanser dergileri ajanların 'sinerjistik' kombinasyonlarını gösteren pre-klinik çalışmalar ile doludur. Bu tür çalışmalarda pre-klinik deney sonuçlarını etkileyebilecek bir dizi değişkeninde dikkate alınması gerekmektedir.

Dikkate alınması gereken önemli değişkenler, tümörün orjini (yani, hastanın biyopsisine karşı hücre hattı), hedef/tümör reseptör durumu, tümör implantasyon bölgesi (örneğin, deri altı ya da karın içi), ajan tedavisinin başlangıcında tümör büyüklüğü, büyüme oranı ve büyüme özellikleri, ajan dozu, formülasyonu, zamanlaması, uygulama yolu ve deney bitiş noktasını içermektedir³⁶. Bunlara ek olarak, dikkat edilecek unsurlar ve potansiyel sınırlamalar vardır. Örneğin, deri altı ksenograft modelleri genellikle metastaz yapmazlar ve bu nedenle antimetastatik stratejileri değerlendirmek için iyi bir model değildir⁶. Klinik popülasyonda yansıtılamayan ama pre-klinik deneylerde aktiviteyi arttırabilen büyüme faktörü ilavesi ya da protein bağlama³⁷ farklılıklarının etkileri gibi kültür koşulları ile ilişkili bazı uyarılar da dikkate alınmalıdır³⁸. Bu faktörler, ilaç kombinasyonlarının değerlendirilmesine özgü olmadıkları gibi tek ajan deneyleri içinde dikkate alınmalarına ihtiyaç vardır. Kombinasyonların pre-klinik çalışmalarında, test edilen ajanların hem tek başına hem de kombinasyonda doğru doz-cevap eğrilerinin oluşturulması gerekmektedir. Bu yüzden hem deneyin dinamik aralığı hem de ilgilenilenin bitiş noktasının doğru değerlendirilmesi önemlidir³⁹.

Fare ksenograftlarında sinerji gösteren kombinasyonlar bildirilmiştir^{40,41}. Ancak, ksenograft çalışmalarında sinerji çalışmalarının sonuçlarını etkileyebilecek değişkenler çoktur, istatistiksel olarak geçerli sonuçlar elde etmek için çok sayıda hayvan ihtiyaç varken, bu gibi değerlendirmeleri yapmak için yeterli kaynaklara sahip nispeten az laboratuvar bulunmaktadır⁴².

Kanser hücre hatları, elde edildikleri orijinal tümörler ile karşılaştırıldığında biyolojik ve kemoduyarlılık özelliklerinde önemli değişiklikler göstermektedirler^{43,44}. In vitro ve in vivo hücre hatları, belirli hedef veya ilgilenilen yol için genellikle moleküler karakterizasyon olmadan kullanılmıştır. Ayrıca, deney sonuçlarını sınırlayan model hücre hatları, insan

kanserlerinin çeşitliliğini yansıtmayabilir ve dolayısıyla da klinik sonuçların öngörüsü olması beklenmeyebilir.

II. Klinik Olmayan Çalışmaların Değeri ve Vaad Ettikleri

Kısıtlamalarına rağmen, klinik olmayan modeller halen ilaç gelişimi için önemli bilgiler sağlayan değerli araçlardır. Birinci olarak, laboratuvar çalışmaları tek bir ajana karşı olan direnç mekanizmasını ortaya çıkarabilir ve böylelikle kombinasyon stratejileri için ek hedefler belirlenebilir. Örneğin, EGFR'ye hedeflenmiş ajanlara duyarlı parental hücre hattı ve dirençli alt klonlarla yapılan pre-klinik çalışmalar, VEGF⁴⁵ ve insülin-benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF1R)⁴⁶ gibi ek sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonunun, EGFR inhibitörlerine karşı kazanılmış dirençten sorumlu olabileceğini göstermiştir. Kombinasyonda EGFR inhibisyonu ile bu ek yolların inhibe edilmesi daha büyük bir etki sağlayabilir. İkinci olarak, laboratuvar çalışmaları en uygun tedavi sıralamasıyla ilgili bilgide sağlayabilir. Örneğin, EGFR inhibitörü gefitinib'in paklitaksel ile kombinasyonunun daha etkili olabileceği ve sitotoksik ajandan önce verilmesinin eş zamanlı uygulamadan daha uygun olduğu laboratuvar çalışmaları ile gösterilmiştir⁴⁷. Bu yeni program klinik denemelerde de test edilmektedir.

Sinerjinin in vitro değerlendirilmesinde şunlara dikkat edilmeli⁶: deney sisteminin geniş bir dinamik aralığı olmalı, ilaca dirençli hatlar da kullanılmalı; direncin başlıca mekanizmaları belirlenmeli, ilaç uygulama klinik olarak ulaşılabilir seviyelerde ve programlarda olmalı, kombinasyon hipoksik koşullar altında da test edilmeli çünkü hipoksi ilaç etkisini antagonize edebilir. Birçok ajan ve kombinasyon standart ajanlara dirençli metastaz gösteren hastalarda test ediliyor. Kombinasyon aktivitesini göstermek için bu tür modellerin kullanılması idealdir. Klinik uygulamayı yansıtmak için pre-klinik deneylerin planlanmasında çok dikkatli olduğundan laboratuvar ve klinikten elde edilen sonuçlar arasındaki ilişkiyi geliştirmek muhtemeldir. Ajanların moleküler hedeflerini ve etkileşimlerini anlamak, belirli bir kombinasyon planlamasından yararlanma olasılığı en yüksek olan hasta popülasyonunu tahmini etmek için temeldir. Hem moleküler hedeflerin hem de ajanların farmakokinetik bilgileri ileride ümit vaat eden kombinasyonların rasyonel seçimine rehberlik edebileceklerdir.

İzlenecek Yollar

Kanser ilaç gelişiminde en heyecan verici beklenti, normal hücrelerde olmayan fakat kanser hücrelerinde olan spesifik genetik anormalliklerden dolayı 'hücre ölüm'ünü uyarın

kombinasyonları belirlemek ve değerlendirmektir⁴⁸. Kanser genetiği ve gen-gen etkileşimlerindeki artan bilgimiz ile kanser ve normal hücreler arasındaki farklılıkların kullanılması terapötik içeriklerin belirlenmesine ve hedef ilaçların tanımlanmasına neden olabilir⁴⁸. Pre-klinik araştırma sonuçlarının dönüştürülebilirliğini maksimuma çıkarmak için önerilen, klinik olarak ulaşılabilir dozlarda uygun tümör modelleri çeşitlerinde test edilmeli ve eğer mümkünse, hedef durumu ve tümör modellerinin moleküler içeriği tanımlanmalıdır.

Sonuç

Gelecekteki çalışmalar birkaç temel görev üzerinde odaklanmaya devam etmelidir: hedef ajan ve kombinasyonlarının klinik olmayan çalışmalarına sistematik bir yaklaşım, pre-klinik ve klinik düzenlemelerde bağlantılı çalışmalar, Hasta seçimi ya da farmakodinamik etkileri ölçmek için güvenilir deneylerin geliştirilmesidir. Böyle bir yaklaşım, geliştirilmekte olan pek çok moleküler hedef ajanın uygulamasını optimize edebilir ve tedavide daha fazla başarı sözünü yerine getirebilir.

Kaynaklar

1. Beeram M, Patnaik A. Targeting intracellular signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Amer.* 2002;16:1089-100.
2. Chaplin DJ, Dougherty GJ. Tumour vasculature as a therapeutic strategy for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1990;9:267.
3. Bicknell R, Harris AL. Anticancer strategies involving the vasculature: vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1992;3:399-407.
4. Goss G, Gauthier I. Targeted therapies: promising a better future for patients. *Signal.* 2004;5:2.
5. Kansu E. Hedeflenmiş tedavilerde "Hedef" moleküller. *ANKEM Derg.* 2005;19(Ek 2): 112-6.
6. Dancey JE, Chen HE. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:649-58.
7. Druker BJ, Moshe T, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344:1031-7.
8. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344:783-92.

9. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2. *J Clin Oncol.* 2004;22:785–94.
10. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol.* 2004;22:777–84.
11. Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23: 5892–9.
12. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S et al. Erlotinib plus gemcitabine compared to gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer. A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group [NCIC-CTG]. *J Clin Oncol ASCO Ann Mtg Proc.* 2005;23:A1.
13. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350:2335–42.
14. Miller K et al. First-line bevacizumab and paclitaxel in patients with locally recurrent or metastatic breast cancer: a randomized, phase III trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2100). *Eur J Cancer Suppl ECCO 13 Abstract Book.* 2005;3:77 A275.
15. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L et al. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:792–9.
16. Sandler AB, Gray R, Brahmer J, Dowlati A, Schiller JH, Perry MC, Johnson DH. Randomized phase II/III Trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab (NSC # 704865) in patients with advanced non squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): An Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Trial- E4599. *J Clin Oncol.* 2005;24:A4.
17. Kirkwood JM, Bedikian AY, Millward MJ, Conry RM, Gore ME, Pehamberger HE et al. Long-term survival results of a randomized multinational phase 3 trial of dacarbazine (DTIC) with or without Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) in patients (pts) with advanced malignant melanoma (MM). *J Clin Oncol.* 2005;24:A7506.
18. Burtness B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2005;23:8646–54.
19. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354:567–78.

20. De Soto JA, Bowen D, Davis JH, Southerland WM, Hawkins MJr. Sequence- and timedependent antagonism between raloxifene and methotrexate in human breast cancer cells. *AntiCancer Res.* 2002;22:1007–9.
21. Osborne CK, Kitten L, Arteaga CL. Antagonism of chemotherapy-induced cytotoxicity for human breast cancer cells by antiestrogens. *J Clin Oncol.* 1989;7:710–7.
22. Albain K, Gren SJ, Ravdin PM, Cobau CD, Levine EG, Ingle JN et al. Adjuvant chemohormonal therapy for primary breast cancer should be sequential instead of concurrent: initial results from intergroup trial 0100 (SWOG-8814). *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2002;21:A143.
23. Taberner J, Schoffski P, Rojo F, de Bruijn E, Ramos FJ, Dumez H et al. Combined anti-EGFR blockade: A Phase I pharmacokinetic and molecular pharmacodynamic study of cetuximab (Erbix) and gefitinib (Iressa) in patients with advanced colorectal, head and neck and non-small cell lung cancer expressing the EGFR. *Clin Cancer Res.* 2005;11:8990s Abs. A107.
24. Milton DT, Kris MG, Azzoli CG, Gomez JE, Helan R, Krug LM et al. Phase I/II trial of gefitinib and RAD001 (Everolimus) in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2005;24:A7104.
25. Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Desjardins A et al. Phase I trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 2006;12:860–8.
26. Moulder SL, Arteaga CL. A Phase I/II trial of trastuzumab and gefitinib in patients with Metastatic Breast Cancer that overexpresses HER2/neu (ErbB-2). *Clin Breast Cancer.* 2003;4:142–5.
27. Britten CD, Pegram M, Rosen P, Finn RS, Wax A, Bosseman L et al. Targeting ErbB receptor interactions: A phase I trial of trastuzumab and erlotinib in metastatic HER2+ breast cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:A3045.
28. Saltz LB, Lenz HJ, Hochster H, Wadler S, Hoff P, Kemeny N et al. Randomized Phase II trial of cetuximab/bevacizumab/irinotecan (CBI) versus cetuximab/bevacizumab (CB) in irinotecan-refractory colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2005;24:A3508.
29. Hainsworth JD, Somsan JA, Spigel DR, Edwards DL, Baughman C, Greco A. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J Clin Oncol.* 2005;23:7889–96.
30. Herbst RS, Johnson DH, Mininberg E, Carbone DP, Henderson T, Kim ES et al. Phase I/II trial evaluating the antivasular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/ epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent nonsmall-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2544–55.
31. Posadas EM, Kwitkowski V, Lie M, Kotz H, Minasian L, Sarosy G et al. Clinical synergism from combinatorial VEGF signal transduction inhibition in patients with advanced solid tumors-early

- results from a Phase I study of sorafenib (BAY 43–9006) and bevacizumab. *Eur J Cancer*. 2005;3 (Suppl.):A1450.
32. Moulder SL, Arteaga CL. A Phase I/II trial of trastuzumab and gefitinib in patients with Metastatic Breast Cancer that overexpresses HER2/neu (ErbB-2). *Clin Breast Cancer*. 2003;4:142–5.
 33. Genentech, Inc. Genentech announces preliminary results from randomized Phase II trial of Avastin and Tarceva in kidney cancer. Press Release October [online] 2005, <<http://www.gene.com/gene/news/pressreleases/display.do?method=detail&id=8967&categoryid=4>>.
 34. Normanno N, Campiglio M, De LA, Somenzi G, Maiello M, Ciardiello F et al. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. *Ann Oncol*. 2002;13:65–72.
 35. Baselga J, Albanell J, Ruiz A, Lluch A, Gascón P, Guillém V. et al. Phase II and tumor pharmacodynamic study of gefitinib in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:5323–333.
 36. Kelland LR. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer*. 2004;40:827–36.
 37. Shinn C, Larsen D, Suarez JR. Flavopiridol sensitivity of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells *in vitro* varies based upon species specific drug protein binding. *Blood*. 2000;96:294b.
 38. Gitler MS, Monks A, Sausville EA. Preclinical models for defining efficacy of drug combinations: mapping the road to the clinic. *Mol Cancer Ther*. 2003;2:929–32.
 39. Reynolds CP, Maurer BJ. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. *Methods Mol Med*. 2005;110:173–83.
 40. Houghton PJ, Stewart CF, Cheshire PJ, Richmond LB, Kirstein MN, Poquette CA et al. Antitumor activity of temozolomide combined with irinotecan is partly independent of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair phenotypes in xenograft models. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4110–8.
 41. Meco D, Colombo T, Ubezio P, Zucchetti M, Zaffaroni M, Riccardi A et al. Effective combination of ET-743 and doxorubicin in sarcoma: preclinical studies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;52:131–8.
 42. Tan M, Fang HB, Tian GL, Houghton PJ. Experimental design and sample size determination for testing synergism in drug combination studies based on uniform measures. *Stat Med*. 2003;22:2091–100.
 43. Ferguson PJ, Cheng YC. Phenotypic instability of drug sensitivity in a human colon carcinoma cell line. *Cancer Res*. 1989;49:1148–53.
 44. Smith A, van Haften-Day C, Russell P. Sequential cytogenetic studies in an ovarian cancer cell line. *Cancer Genet Cytogenet*. 1989;38:13–24.

45. Ciardiello F, Bianco R, Caputo R, Caputo R, Damiano V, Troiani T et al. Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to antiepidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res.* 2004;10:784–93.
46. Jones HE, Goddard L, Gee JM, Hiscox S, Rubini M, Barrow D et al. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11:793–814.
47. Solit DB, She Y, Lobo J, Kris MG, Scher HI, Rosen N et al. Pulsatile administration of the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib is significantly more effective than continuous dosing for sensitizing tumors to paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1983–9.
48. Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nature Rev Cancer.* 2005;5:689–98.
49. Siemann DW, Chaplin DJ, Horsman MR. Vascular targeting therapies for treatment of malignant diseases. *Cancer.* 2004;100:2491-9.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Ayşe Erdoğan
Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü,
Antalya, Turkey
ayseerdogan@akdeniz.edu.tr